

Université de Montréal

**Étude de la fonction anti-apoptotique de la sous-unité R1 de la
ribonucléotide réductase des virus de l'herpès simplex**

par

Florent Dufour

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de philosophiæ doctor
en biologie moléculaire

Août 2010

© Florent Dufour, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

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

présentée par :

Florent Dufour

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Richard Bertrand

Directeur de recherche : Dr Yves Langelier

Membre du jury : Dr Roger Lippé

Examineur externe : Dr Louis Flamand

Représentant du doyen de la FES : Dr Guy Lemay

Résumé :

L'élimination des cellules infectées par apoptose constitue un mécanisme de défense antivirale. Les virus de l'herpès simplex (HSV) de type 1 et 2 encodent des facteurs qui inhibent l'apoptose induite par la réponse antivirale. La sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase d'HSV-2 (ICP10) possède une fonction anti-apoptotique qui protège les cellules épithéliales de l'apoptose induite par les récepteurs de mort en agissant en amont ou au niveau de l'activation de la procaspase-8. Puisqu'une infection avec un mutant HSV-1 déficient pour la R1 diminue la résistance des cellules infectées vis à vis du TNF α , il a été suggéré que la R1 d'HSV-1 (ICP6) pourrait posséder une fonction anti-apoptotique. Le but principal de cette thèse est d'étudier le mécanisme et le potentiel de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV-1 et de la R1 d'HSV-2.

Dans une première étude, nous avons investigué le mécanisme de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV en utilisant le TNF α et le FasL, deux inducteurs des récepteurs de mort impliqués dans la réponse immune anti-HSV. Cette étude a permis d'obtenir trois principaux résultats concernant la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV. Premièrement, la R1 d'HSV-1 inhibe l'apoptose induite par le TNF α et par le FasL aussi efficacement que la R1 d'HSV-2. Deuxièmement, la R1 d'HSV-1 est essentielle à l'inhibition de l'apoptose induite par le FasL. Troisièmement, la R1 d'HSV interagit constitutivement avec la procaspase-8 d'une manière qui inhibe la dimérisation et donc l'activation de la caspase-8. Ces résultats suggèrent qu'en plus d'inhiber l'apoptose induite par les récepteurs de mort la R1 d'HSV peut prévenir l'activation de la caspase-8 induite par d'autres stimuli pro-apoptotiques. Les ARN double-brins (ARNdb) constituant un intermédiaire de la transcription du génome des HSV et activant l'apoptose par une voie dépendante de la caspase-8, nous avons testé dans une seconde étude l'impact de la R1 d'HSV sur l'apoptose induite par l'acide polyribonucleosinique : polyribocytidylique (poly(I:C)), un analogue synthétique des ARNdb. Ces travaux ont montré qu'une infection avec les HSV protège les cellules épithéliales de l'apoptose induite par le poly(I:C). La R1 d'HSV-1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'activation de la caspase-8 induite par le poly(I:C). La R1 d'HSV interagit non seulement avec la procaspase-8 mais aussi avec RIP1 (*receptor interacting protein 1*). En interagissant avec RIP1, la R1 d'HSV-2 inhibe

l'interaction entre RIP1 et TRIF (*Toll/interleukine-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β*), l'adaptateur du *Toll-like receptor 3* qui est un détecteur d'ARNdb, laquelle est essentielle pour signaler l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire et la surexpression de TRIF.

Ces travaux démontrent la capacité de la R1 d'HSV à inhiber l'apoptose induite par divers stimuli et ils ont permis de déterminer le mécanisme de l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV. Très tôt durant l'infection, cFLIP, un inhibiteur cellulaire de la caspase-8, est dégradé alors que la R1 d'HSV s'accumule de manière concomitante. En interagissant avec la procaspase-8 et RIP1, la R1 d'HSV se comporte comme un inhibiteur viral de l'activation de la procaspase-8 inhibant l'apoptose induite par les récepteurs de mort et les détecteurs aux ARNdb.

Mots-clés : HSV, R1, ICP6, ICP10, apoptose, caspase-8, RIP1, TNF α , FasL, poly(I:C)

Abstract :

Elimination of infected cells by apoptosis constitutes an ancestral mechanism of host defense against viral infection. Herpes simplex viruses (HSVs) encode several viral factors to counteract the apoptotic antiviral response. Among them, the R1 subunit of HSV type-2 ribonucleotide reductase (HSV-2 R1, also named ICP10), protects cells by interrupting death receptor-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation. Since protection against tumor necrosis factor alpha (TNF α)-induced apoptosis is decreased in cells infected with an HSV type-1 R1 null mutant, it has been proposed that HSV-1 R1 (ICP6) could also possess an antiapoptotic activity. The fundamental goal of this thesis is to better understand the mechanism and the potential of the HSV R1s antiapoptotic activity.

In a first study, we investigated the mechanism of the antiapoptotic activity of HSV R1s by using TNF α and Fas ligand (FasL), two death-receptor inducers involved in anti-HSVs immune response. From this work, we report three main findings on the antiapoptotic activity of HSV R1s. First, HSV-1 R1 like HSV-2 R1 has the ability to protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis. Second, HSV-1 R1 contributes in protecting infected cells against FasL. Third, HSV R1s and procaspase-8 interact in a way that inhibits the dimerization/activation of caspase-8. These results suggest that in addition to counteracting death receptor-induced apoptosis, HSV R1s could inhibit apoptosis induced by other signals that trigger caspase-8 activation during HSV infection. Double-stranded RNA (dsRNA) are viral intermediates notably produced by HSVs and have been shown to induce apoptosis via caspase-8 activation. We tested in a second study whether HSV R1s have the ability to counteract apoptosis triggered by polyriboinosinic : polyribocytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic analog of dsRNA that triggers caspase-8 activation. We showed that HSVs infection protect epithelial cells from apoptosis induced by poly(I:C). We established that HSV-1 R1 is essential for the protection of HSV-1-infected cells against poly(I:C)-induced caspase-8 activation. HSV R1s interact not only with procaspase-8 but also with the receptor interacting protein 1 (RIP1). The interaction between RIP1 and HSV-2 R1 inhibits the binding of RIP1 to the Toll/interleukine-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β (TRIF), the adaptor of Toll-like

receptor 3 that is an extracellular dsRNA sensor, which is required to activate caspase-8 following extracellular poly(I:C) stimulation and TRIF overexpression. Thus, HSV R1s have the ability to inhibit poly(I:C)-induced apoptosis at several levels by preventing caspase-8 dimerization/activation and TRIF RIP1 interaction.

This work sheds light on the ability of HSV R1s to manipulate apoptosis. Early during the lytic cycle, protein levels of the cellular inhibitors of caspase-8 as cFLIP drop but HSV R1s accumulate concomitantly and act as a viral inhibitor of apoptosis by binding to procaspase-8 and RIP1 in a way that impairs caspase-8 activation by death-receptors and dsRNA detectors stimulation.

Keywords : HSV, R1, ICP6, ICP10, apoptosis, caspase-8, RIP1, TNF α , FasL, poly(I:C)

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Les virus de l'herpès simplex.....	2
1.1.1 Caractéristiques.....	2
1.1.2 Cycle de réplication.....	4
1.1.2.1 Cycle lytique	4
1.1.2.2 Latence et réactivation	7
1.2 L'apoptose.....	9
1.2.1 L'apoptose ou le démantèlement cellulaire organisé.....	9
1.2.2 Les caspases	11
1.2.3 La voie apoptotique intrinsèque.....	15
1.2.4 La voie apoptotique extrinsèque	16
1.2.4.1 Généralités.....	16
1.2.4.2 Voies de signalisation induites par Fas	17
1.2.4.2.1 Signalisation apoptotique induite par Fas	17
1.2.4.2.2 Signalisation non apoptotique induite par Fas	18
1.2.4.3 Voies de signalisation induites par le TNFR1.....	21
1.2.4.3.1 Signalisation non apoptotique déclenchée par le TNFR1	21
1.2.4.3.2 Signalisation pro-apoptotique déclenchée par le TNFR1	22
1.2.5 L'apoptose déclenchée par les ARN double-brins viraux.....	26
1.2.5.1 Généralités.....	26
1.2.5.2 Apoptose induite par la détection des ARN double-brins extracellulaires via le TLR3	27
1.2.5.2.1 Rôle, expression et localisation du TLR3	27
1.2.5.2.2 Réponse immune innée antivirale induite par le TLR3	28
1.2.5.2.3 Induction de l'apoptose par le TLR3	29
1.2.5.3 Apoptose induite par les ARN double-brins cytosoliques	31
1.2.5.3.1 Détection cytosolique des ARNdb et signalisation par RIG-I et MDA5.....	31
1.2.5.3.2 Détection cytosolique des ARNdb et signalisation induite par PKR	35
1.2.6 Apoptose et HSV.....	38

1.2.6.1	Induction de l'apoptose durant l'infection	38
1.2.6.2	Stimuli pro-apoptotiques extrinsèques durant l'infection	40
1.2.6.3	Protéines anti-apoptotiques encodées par les HSV	41
1.3	Les ribonucléotides réductases.....	43
1.3.1	La ribonucléotide réductase de <i>E. coli</i> et des mammifères	43
1.3.2	La ribonucléotide réductase des virus herpès.....	44
1.3.3	La ribonucléotide réductase des HSV	44
1.3.3.1	La sous-unité R1 des HSV	46
1.3.4	Sous-unités R1 encodées par d'autres virus herpès	48
1.4	Objectifs et hypothèses du projet de recherche :	50
Chapitre 2	: Résultats	51
2.1	Article 1 : The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF-alpha- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8	52
2.2	Article 2 : The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus type 1 and 2 protect cells against poly(I:C)-induced apoptosis	97
Chapitre 3	: Discussion et perspectives.....	133

Liste des figures du chapitre 1 :

Figure 1 : Mécanismes d'activation et d'inhibition de la procaspase-8.....	13
Figure 2 : Voies de signalisation induites par Fas.....	20
Figure 3 : Voies de signalisation induites par le TNFR1.....	25
Figure 4 : Voies de signalisation induites par le TLR3.....	30
Figure 5 : Voies de signalisation induites par RIG-I et MDA5.	34
Figure 6 : Voies de signalisation induites par PKR.	37

Liste des figures du chapitre 2 :

2.1 Article 1 :

Figure 1 : GST-HSV-1 R1 and HSV-2 R1 inhibit TNF α - and FasL-induced apoptosis but not HA-EBV R1.....	83
Figure 2 : HSV-1 R1 is essential for protection against FasL-induced apoptosis.	84
Figure 3 : HSV-2 R1 does not affect ERK1/2 and Akt signaling pathways.....	85
Figure 4 : HSV-2 R1 does not affect NF- κ B or JNK activation.	87
Figure 5 : HSV-2 R1 does not modify the accumulation of Fas, FADD, TRADD, RIP1 and c-FLIP.	88
Figure 6 : HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interact with caspase-8.....	89
Figure 7 : HSV-2 R1 interacts directly with caspase-8 through its 2 tandem DEDs.....	91
Figure S1 : TNF α triggers apoptosis in cells expressing very low amounts of TNFR1.	93
Figure S2 : HSV-2 R1 does not affect the nuclear translocation of NF- κ B p65 induced by TNF α treatment.....	95
Figure S3 : HSV-2 R1 inhibits the formation of cytoplasmic filaments induced by casp-8 DED-AB GFP but not the one resulting from FADD YFP.	96

2.2 Article 2 :

Figure 1 : HSV infection protects HeLa cells against poly(I:C)-induced apoptosis.	125
Figure 2 : The HSV-1 R1 null mutant ICP6 Δ is defective in blocking apoptosis.	126
Figure 3 : HSV-1 R1 and HSV-2 R1 inhibit caspase activation induced by poly(I:C).	128
Figure 4 : HSV R1 inhibits apoptosis induced by overexpression of TRIF or RIP1.	129
Figure 5 : HSV R1s interact with RIP1.....	130
Figure 6 : TRIF silencing inhibits caspase activation induced by extracellular poly(I:C) in mock- and ICP6 Δ -infected cells.....	132

Liste des figures du chapitre 3 :

Figure 1 : Modèle d'inhibition de l'activation de la caspase-8 par la R1 d'HSV.....	147
---	-----

Liste des abréviations :

ACD	<i>alpha-crystallin domain</i>
ADP	adénosine diphosphate
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AP1	<i>activator protein 1</i>
ARNdb	ARN double-brins
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	adénosine triphosphate
Bag-1	<i>Bcl-2 associated athanogene 1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
CARD	<i>CARD adaptor inducing IFNβ</i>
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
caspase	<i>cysteiny aspartate-specific proteinase</i>
CDP	cytidine diphosphate
cFLIP _L	<i>cellular-FLICE inhibitory protein long</i>
cFLIP _R	<i>cellular-FLICE inhibitory protein raji</i>
cFLIP _S	<i>cellular-FLICE inhibitory protein short</i>
CHX	cycloheximide
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CYLD	<i>cylindromatosis gene product</i>
Cyt-c	cytochrome-c
dATP	désoxyadénosine triphosphate
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
dsRBD	<i>double-stranded RNA binding domain</i>
dTTP	désoxythymidine triphosphate
E	<i>early</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
eIF2 α	<i>α-subunit of eukaryotic translation initiator factor</i>
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i>
EndoG	<i>endonucléase G</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HHV	<i>human herpes virus</i>
hpi	<i>heure post-infection</i>
Hsp	<i>heat-shock protein</i>
HSV	<i>human herpes virus</i>
ICP	<i>infected-cell protein</i>
IE	<i>immédiate ealy</i>
IFN	<i>interféron</i>
IKK	<i>I-kappa-B-kinase</i>
IPS1	<i>IFNβ-promoter stimulator 1</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
ITCH	<i>itchy</i>
I κ B α	<i>inhibitor of kappa B alpha</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
L	<i>late</i>
LAT	<i>latency associated transcript</i>
MAP3K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
MCMV	<i>murine cytomegalovirus</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	<i>murine embryonic fibroblast</i>
MOMP	<i>mitochondrial outer-membrane permabilization</i>
NAP1	<i>NF-κB-activating kinase-associated protein 1</i>

NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>natural killer</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKR	<i>protein kinase double-stranded RNA-dependent</i>
poly(I:C)	<i>acide polyribonoinosinique : polyribocytidylique</i>
PP1 α	<i>protéine phosphatase 1α</i>
PRR	<i>patter-recognition receptor</i>
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RR	<i>ribonucléotide réductase</i>
RSV	<i>respiratory syncitial virus</i>
SPOTS	<i>signaling protein oligomerization structures</i>
TAB2	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase 1</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
TBK1	<i>TANK-binding protein kinase 1</i>
TICAM1	<i>TIR domain-containing adapter molecule 1</i>
TIR	<i>Toll/interleukine-1 receptor</i>
TLR3	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRIF	<i>Toll/interleukine-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β</i>
UDP	<i>uridine diphosphate</i>
vFLIP	<i>viral-FLICE inhibitory protein</i>
vhs	<i>virion host shut-off</i>
VISA	<i>virus-induced signaling adaptor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

α TIF/VP16 α *trans inducing factor/viral protein 16*

Remerciements

Je tiens à exprimer mon tout premier remerciement et ma gratitude à mon directeur de recherche, Yves Langelier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en me donnant l'opportunité d'effectuer ces travaux doctoraux et pour m'avoir encadré durant la réalisation de ce projet de recherche.

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire qui ont participé à ce projet de recherche : Marie-Josée Sasseville et Stéphane Chabaud. Je remercie également Richard Bertrand, Isabelle Royal, Anne-Marie Mes-Masson, Angela Pearson, Nathalie Grandvaux et Bernard Massie pour leurs précieux conseils et le soutien matériel qu'ils m'ont fournis durant ce doctorat.

Je remercie la faculté des études supérieures, la fondation Marc Bourgie et la fondation Canderel pour leur soutien financier.

Je tiens à remercier également les chercheurs, les stagiaires post-doctoraux, les étudiants et l'ensemble du personnel de l'Institut du cancer de Montréal qui contribuent à faire de ce centre de recherche un lieu propice au développement des étudiants, tant du point de vue professionnel que personnel.

Je remercie tout particulièrement Geneviève Saint-Onge pour avoir partagé avec moi ces années de recherches doctorales avec enthousiasme et bonne humeur. Son professionnalisme, son soutien, son amitié et sa générosité ont été d'une importance capitale pour la réalisation de ce doctorat et pour faire de ce séjour québécois une réussite.

Pour leurs conseils, leur soutien moral et leur amitié, je remercie particulièrement Benjamin Péant, Nicolas Parent, Karine Thériault, Marco Constante, David Mendes Da Silva, Julien Lamontagne et Nicolas Stifani.

Mon affection et ma plus profonde gratitude vont à mes parents, mon frère et ma soeur pour le soutien, l'inspiration et l'amour qu'ils m'ont donnés et qui furent d'une importance vitale, en particulier, durant mon séjour à l'étranger.

Enfin, je ne saurai jamais comment remercier à sa juste valeur, ma compagne Aurore, pour avoir enduré, de si bonne grâce, ces années de labeur, pour avoir supporté, toujours avec le sourire, mes constantes interrogations et mes interminables réflexions. Pour son amour et son enthousiasme infinis, pour m'avoir offert une vie merveilleuse en dehors de mon travail, mille mercis.

Avant propos

Lors d'une infection virale, l'élimination des cellules hôtes par apoptose, un mécanisme génétiquement contrôlé de mort cellulaire programmée, constitue un système de défense antivirale efficace. Il n'est donc pas surprenant que les virus aient acquis au cours de l'évolution la capacité de contrecarrer l'apoptose en développant des protéines originales ou dérivées de molécules cellulaires afin d'assurer leur réplication (rev. 117). L'étude de protéines virales possédant des fonctions anti-apoptotiques a non seulement permis d'accroître nos connaissances des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose mais a également permis de déterminer l'importance du contrôle de l'apoptose dans la pathogenèse de nombreux virus (rev. 116, rev. 343). Les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) font partie des pathogènes capables de contrôler l'apoptose pour assurer leur réplication via différents facteurs viraux anti-apoptotiques (rev. 134).

Une infection par les HSV déclenche les mécanismes de défense antivirale impliquant à la fois la réponse immune innée et la réponse immune adaptative (rev. 59). L'infiltration rapide et persistante de cellules immunitaires au niveau des lésions épithéliales infectieuses et des ganglions infectés crée un environnement riche en stimuli pro-apoptotiques dont certains tels que le $\text{TNF}\alpha$ et le FasL peuvent déclencher l'apoptose via l'activation de la caspase-8. De plus, l'infection elle-même et plus particulièrement la transcription du génome viral déclenche l'apoptose. En effet, la transcription entraîne l'accumulation d'ARN double-brins viraux (ARNdb) dans les cellules infectées ; or, ceux-ci stimulent la réponse innée antivirale laquelle induit notamment l'activation de la caspase-8 (352, 353). Une fois activée, la caspase-8 dirige le clivage protéolytique de nombreux substrats incluant d'autres caspases qui contribuent à l'exécution du programme apoptotique et donc au démantèlement de la cellule (ex : caspase-3) (111, rev. 397). Bien que les cellules infectées par les HSV soient soumises à des stimuli pro-apoptotiques durant l'infection, la survie des cellules hôtes est assurée par des protéines virales anti-apoptotiques comme la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase des HSV (cette thèse et 230, 317).

La ribonucléotide réductase des HSV est une enzyme constituée de deux sous-unités, dénommées R1 et R2, catalysant la synthèse des déoxyribonucléotides triphosphates requis pour la réplication de l'ADN viral. Par conséquent, la création d'inhibiteurs pharmacologiques de l'activité ribonucléotide réductase des HSV a constitué pendant longtemps un champ de recherche très actif. Ces études ont permis de découvrir indirectement que la sous-unité R1 d'HSV-2 est une protéine multifonctionnelle qui en plus de porter le site actif de la ribonucléotide réductase, présente une activité de chaperonne moléculaire et une fonction anti-apoptotique (48, 230). Notre laboratoire a démontré que la R1 d'HSV-2 protège les cellules épithéliales de l'apoptose induite par le $\text{TNF}\alpha$ et FasL en inhibant l'activation de la caspase-8 (230). La R1 d'HSV-2 protège également les neurones de la mort cellulaire induite par divers stimuli pro-apoptotiques (316, 317). D'autre part, l'expression de la R1 d'HSV est précoce et se maintient à un haut niveau durant l'infection. Par conséquent, l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV pourrait permettre à la cellule infectée de résister aux multiples signaux pro-apoptotiques stimulant la caspase-8 durant l'infection. L'inhibition de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV pourrait donc constituer une nouvelle stratégie thérapeutique.

Le présent ouvrage a pour objectif de caractériser l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV et d'étudier son mécanisme. Cette thèse comprend un chapitre d'introduction qui présentera la R1 d'HSV et son potentiel à bloquer l'apoptose induite par des signaux pro-apoptotiques ($\text{TNF}\alpha$, FasL et ARNdb) qui stimulent l'activation de la caspase-8 pendant l'infection. Les résultats des recherches effectuées durant ce doctorat seront exposés sous forme de deux articles scientifiques. Le premier décrira plus particulièrement le mécanisme d'inhibition de l'activation de la caspase-8 par la R1 d'HSV dans le cadre de la stimulation de l'apoptose par le $\text{TNF}\alpha$ et le FasL. Le second article traitera de la capacité de la R1 d'HSV à inhiber l'apoptose induite par le poly(I:C), un analogue synthétique des ARNdb. Enfin, ces résultats seront discutés et mis en perspective dans le dernier chapitre de cet ouvrage.

Chapitre 1 : Introduction

Le chapitre d'introduction de cette thèse comprend quatre sections. Dans un premier temps, les principales caractéristiques et le cycle de réplication des virus herpès simplex seront abordés. Par la suite, les voies apoptotiques menant à l'activation de la caspase-8 seront présentées en insistant particulièrement sur les voies activées par le $\text{TNF}\alpha$, FasL et les ARNdb. L'importance du contrôle des voies apoptotiques par les HSV sera abordée en mettant en évidence la nécessité d'inhiber l'activation de la caspase-8 lors de l'infection. La dernière partie de l'introduction décrira les caractéristiques de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase des virus herpès simplex et particulièrement son activité anti-apoptotique.

1.1 Les virus de l'herpès simplex

Chez l'homme, huit virus herpès ont été identifiés et classés en trois sous familles (alpha, beta et gamma) en fonction de leurs propriétés biologiques comme leur tropisme, leur comportement en culture cellulaire et leur pouvoir pathogène. Cette section de la thèse abordera les principales caractéristiques et le cycle de réplication des virus de l'herpès simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2) qui font partie de la famille alpha du fait de leur cycle de réplication rapide et de leur tropisme à la fois épithélial et neuronal.

1.1.1 Caractéristiques

Une particule d'HSV contient en son cœur un ADN bicaténaire de 152 kb entouré de trois couches successives : la capsid, le tégument et l'enveloppe (rev. 341). La capsid est composée de 8 protéines virales différentes formant une structure icosaédrique comprenant 162 capsomères et mesurant 100 nm de diamètre. L'espace entre la nucléocapsid (capsid et ADN) et l'enveloppe se nomme le tégument. Ils s'agit d'une couche asymétrique et informe de protéines virales et d'enzymes cellulaires impliquées entre autre dans l'initiation de la réplication (139). La couche la plus externe est l'enveloppe, une bicouche lipidique dérivée du réseau trans-golgien, dans laquelle sont insérées les glycoprotéines virales responsables de l'attachement du virus à la cellule cible et la fusion de l'enveloppe avec la membrane cytoplasmique (288). Il est à noter que toute altération de l'enveloppe par les détergents, les solvants ou la chaleur rend les virus herpès

non infectieux, imposant donc un mode de transmission par contacts interhumains étroits. L'analyse de virions purifiés a montré qu'une particule d'HSV-1 comprend 13 glycoprotéines, 8 protéines formant la capside, 23 protéines virales du tégument et une cinquantaine de protéines cellulaires (262).

Le cycle des HSV peut être séparé en deux phases : une phase productive (aussi nommé cycle lytique) et une phase de latence pendant laquelle le virus est présent dans le noyau des cellules hôtes alors qu'il n'y a ni synthèse d'ADN viral ni production de nouveaux virions. Le cycle lytique s'effectue dans les cellules épithéliales et les neurones alors que la latence a lieu uniquement dans les neurones sensitifs. La première infection herpétique est nommée la primo-infection tandis que les infections subséquentes provoquées par la réactivation des virus latents sont nommées récurrences. Une fois infecté par les HSV, l'organisme hôte reste porteur du virus pendant toute sa vie.

Les HSV sont très répandus à travers le monde bien que de nombreux facteurs socioéconomiques, géographiques et génétiques modulent leur prévalence. Au niveau mondial, la prévalence d'HSV-1 varie entre 40 et 80 % des personnes adultes et celle d'HSV-2 se situe entre 30 et 60 % (rev. 341). Les infections par HSV-1 ou HSV-2 sont associées à diverses pathologies bénignes chez les personnes immunocompétentes : herpès labial (boutons de fièvre ou feux sauvages), herpès génital ou herpès oculaire (kératite herpétique). La primo-infection par les HSV est généralement asymptomatique alors que les infections récurrentes présentent divers symptômes et peuvent être douloureuses. Les lésions disparaissent généralement en une dizaine de jours. Les conséquences d'une infection herpétique peuvent être sévères chez les individus à risques tels que les personnes immunodéficientes et les nourrissons. La méningo-encéphalite herpétique est une forme rare et très grave d'infection cérébrale aiguë par HSV-1. En absence de traitement, 70% des cas de méningo-encéphalite herpétique sont mortels et seulement 2,5 % des patients ayant survécus retrouvent des fonctions neurologiques normales (rev. 427). La transmission de l'herpès génital de la mère au fœtus pendant la gestation est rare mais elle peut survenir lors de l'accouchement (1,5 cas sur 25 000 naissances au Canada), on parle alors d'herpès néonatal (4). L'herpès néonatal peut provoquer une infection superficielle (peau / yeux / bouche), une infection cérébrale ou une infection polyviscérale entraînant des taux de

mortalité respectifs de 0 %, 15 % et 50 % et des risques de développement anormal dans 2 %, 70 % et 25 % des cas respectivement (211). Fort heureusement, plusieurs antiviraux ont été développés pour traiter les personnes atteintes par les HSV. Une majorité de ces composés sont des variantes de l'acyclovir (nom commercial : Zovirax), un analogue acyclique de nucléoside qui bloque la réplication de l'ADN viral. D'autres composés dérivés de l'acyclovir tels que le ganciclovir, penciclovir et famciclovir ont été développés (rev. 21).

1.1.2 Cycle de réplication

Dépendamment du type cellulaire infecté, l'infection conduit soit à un cycle lytique aboutissant à la production de particules virales matures et la destruction de la cellule hôte soit à l'établissement de la latence pendant laquelle le processus de réplication est temporairement inhibé jusqu'à l'apparition de conditions favorisant la réactivation virale et donc la reprise de la réplication. Pendant le cycle lytique, l'expression du génome des HSV s'effectue selon une cascade d'expression très régulée impliquant trois groupes de gènes classés suivant leur cinétique d'expression : les gènes très précoces (gènes α ou IE pour *immediate early*), les gènes précoces (gènes β ou E pour *early*) et les gènes tardifs (gènes γ ou L pour *late*) (rev. 340, rev. 417). Cette cascade d'expression est bouleversée lors de la réactivation virale. Bien que le génome des HSV code pour environ 80 polypeptides, seulement 37 gènes sont requis pour la réplication virale en culture *in vitro* (rev. 341).

1.1.2.1 Cycle lytique

Le cycle lytique débute par l'attachement des HSV sur leurs cellules cibles via l'interaction des glycoprotéines gC et gB avec la fraction héparane sulfate de protéoglycanes cellulaires membranaires (rev. 155, rev. 339). Dans les minutes suivant l'attachement, les HSV entrent dans les cellules en fusionnant leur enveloppe soit directement avec la membrane plasmique soit avec la membrane endosomale après endocytose des virions (286, 297, 380). L'entrée des virus implique l'interaction des glycoprotéines virales gD, gB, gH et gL avec divers récepteurs cellulaires de type nectine

ou HveA (rev. 155, rev. 339). Une fois le virus entré dans la cellule hôte, les études menées avec HSV-1 montrent que la majorité du tégument se dissocie libérant la nucléocapside associée à quelques protéines du tégument. Celles-ci assurent entre autre la migration et le ciblage de la nucléocapside au noyau qui y déverse l'ADN viral qui se circularise (202). Les protéines tégumentaires α TIF/VP16 (*α trans inducing factor/viral protein 16*) et vhs (*virion host shut-off*) libérées lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte jouent un rôle crucial dans l'initiation du cycle de réplication. En effet, dans les minutes suivant l'entrée du virus, l'expression des gènes très précoces est induite par le transactivateur α TIF/VP16. En formant un complexe avec des facteurs de transcription d'origine cellulaire, α TIF/VP16 se lie aux séquences consensus TAATGARAT présentes en de multiples copies dans la région promotrice des gènes très précoces ce qui déclenche leur transcription par l'ARN polymérase II cellulaire (rev. 340, 429). Parallèlement, la transcription des gènes cellulaires, l'épissage des ARN, et la synthèse protéique sont inhibés via notamment l'action de l'endoribonucléase vhs qui dégrade de manière non spécifique les ARNm existant et ceux nouvellement synthétisés en clivant les transcrits engagés dans les polyribosomes (98, 183, 391). Vhs participe également au contrôle de la cascade d'expression génique virale en séquestrant et inhibant α TIF/VP16 dans les stades avancés du cycle de réplication (372). De récents travaux suggèrent que vhs pourrait également moduler l'expression génique au niveau traductionnel (345).

Il existe cinq gènes très précoces codant pour les protéines ICP0 (*infected-cell protein 0*), ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47. ICP0, ICP4, ICP22 et ICP27 contrôlent l'expression des gènes précoces et tardifs tandis qu'ICP47 inhibe la présentation de peptides viraux par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (114, 156). Bien que les détails des mécanismes régissant la cascade d'expression des gènes viraux ne soient pas encore complètement élucidés, les protéines multifonctionnelles ICP0, ICP4, ICP22 et ICP27 agissent de concert pour réguler l'expression des gènes viraux. ICP0 joue un rôle de régulateur transcriptionnel et inhibe la répression de l'expression du génome viral (41, 140, rev. 340). ICP4 active la transcription des gènes précoces et tardifs en interagissant avec l'ADN viral, la protéine ICP27 et des molécules de la machinerie transcriptionnelle cellulaire (rev. 341). ICP27 agit au niveau post-transcriptionnel en inhibant l'épissage des précurseurs des ARNm cellulaires, en induisant l'exportation nucléaire des transcrits viraux

et en stimulant la traduction des ARNm (234, 375). ICP22 est requis uniquement pour la réplication dans certaines cellules primaires et pourrait agir comme régulateur transcriptionnel (35, rev. 341).

Les gènes très précoces induisent l'expression des gènes précoces, ces derniers codant principalement pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides et la réplication de l'ADN viral comme une ADN polymérase, une hélicase, une ribonucléotide réductase (voir section spécifique), une thymidine kinase, une dUTPase et une DNase. Bien qu'elles ne soient pas toutes essentielles pour la multiplication virale *in vitro* dans des cellules en prolifération, ces protéines et notamment la ribonucléotide réductase sont indispensables pour la réplication virale dans différents tissus *in vivo* (130, 131, rev. 341). La réplication de l'ADN viral est initiée par la fixation de la protéine virale OBP (*origin-binding protein*) qui sépare les brins d'ADN et initie la synthèse d'ADN. La réplication de l'ADN viral s'effectue par cercle roulant produisant des concatémères qui s'accumulent dans le noyau de la cellule hôte.

Les gènes tardifs englobent les trois quarts des gènes viraux et encodent principalement des protéines de structure constituant la capsid, des glycoprotéines membranaires et d'autres protéines intégrées dans le tégument comme α TIF/VP16 et vhs (rev. 300). La formation de la capsid est un processus autocatalytique impliquant les huit protéines composant la capsid et des chaperonnes à partir desquelles l'assemblage est initié dans le cytoplasme et terminé dans le noyau. Parallèlement, diverses protéines virales permettent le clivage de l'ADN concatémérique et l'encapsidation d'une unité de génome par capsid (rev. 17). Après l'encapsidation de l'ADN viral, le mécanisme par lequel les nucléocapsides acquièrent leur tégument et leur enveloppe demeure encore source de débat mais il impliquerait un bourgeonnement au travers de l'enveloppe nucléaire et des fusions avec les vésicules de l'appareil de Golgi (rev. 277). La sortie du virus mature s'effectuerait par excrétion de vésicule ou bourgeonnement.

En culture, une cellule infectée libère plusieurs centaines de virus matures capables d'infecter les cellules environnantes. Les HSV se répliquent efficacement puisque un cycle complet s'effectue en 18 à 24 h dans des cellules permissives cultivées *in vitro*. En culture *in vitro*, une infection par les HSV entraîne un effet cytopathique, c'est à dire un ensemble

de changements structuraux et biochimiques majeurs incluant des modifications nucléolaires, une condensation de la chromatine, une diminution de la synthèse de macromolécules, un arrondissement de la cellule témoignant des modifications du cytosquelette et des altérations membranaires. De telles altérations conduisent à la destruction de la cellule infectée.

1.1.2.2 Latence et réactivation

Le cycle lytique au niveau des sites de primo-infection ou de récurrence libère des virus capables d'infecter les neurones sensitifs innervant le site de primo-infection ou de récurrence. Dans ces neurones, une infection latente pourra persister durant toute la vie de l'hôte. La latence a lieu dans les neurones des ganglions trigémînés (herpès labial) ou les neurones des ganglions sacrés (herpès génital). Suivant la fusion et le déenveloppement du virus au niveau du bouton terminal de l'axone, la nucléocapside migre vers le corps cellulaire par transport rétrograde (rev. 88). Durant ce transport le long de l'axone, la nucléocapside est débarrassée de son tégument puis l'ADN viral est déversé dans le noyau des neurones où il se circularise. A ce niveau, les HSV complètent un cycle productif ou entrent en latence. En effet, l'expression de gènes viraux (très précoces, précoces et tardifs) et les particules virales sont détectables dans les ganglions trijumeaux de souris infectées par HSV-1 dans les 24 à 72 h suivant l'infection mais il n'est pas clair si ce cycle productif cause la destruction des neurones infectés (214, 405).

L'accumulation de transcrits encodés par les gènes très précoces et précoces a été observée dans les neurones infectés mais rapidement les transcrits associés à la latence (transcrits LAT, *latency associated transcripts*) deviennent les ARN majoritairement exprimés (119, 219, 379). Le gène LAT est exprimé sous forme d'un transcrit de 8,5 kb qui subit un épissage donnant de multiples transcrits très stables s'accumulant dans le noyau et ne codant pour aucune protéine (92). L'établissement de la latence est un processus mal compris ; toutefois, les caractéristiques spécifiques aux neurones, notamment leur grande taille, et l'expression des transcrits LAT ont permis de dresser un modèle pouvant expliquer l'inhibition de l'expression des gènes lytiques et donc la latence (rev. 212). Dans les neurones infectés, α TIF/VP16 reste cytoplasmique et probablement localisé au niveau du bouton terminal de l'axone tandis qu'une large

proportion de l'ADN viral transporté au noyau s'associe avec des histones. Les LAT induisent la modification des histones convertissant les régions promotrices des gènes lytiques en hétérochromatine inhibant ainsi leur expression (55, 212, 424). Récemment, il a été montré que certains transcrits LAT fonctionnent comme des microARN (miARN LAT) inhibant la traduction sans influencer le niveau d'ARNm des gènes très précoces dont ICP4 (nécessaire à la phase productive) et peut être ICP0 (requis pour la réactivation) (365, 402). L'absence d'expression de gènes lytiques durant la latence d'HSV-1 a cependant été remise en doute par de nombreuses études rendant compte de l'expression de certains gènes lytiques dans les neurones infectés (55, 56, 105, 220, 259, 268, 319). Parallèlement, d'autres études menées chez l'humain, la souris et le lapin ont montré la persistance de cellules immunes et de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , interleukine-6) dans les ganglions trigéminals après la résolution de l'infection au niveau du site de primo-infection ou de récurrence (36, 43, 54, 78, 145, 162, 367, 368, 395, 407). Les lymphocytes T CD8⁺ et éventuellement les lymphocytes T CD4⁺ présents à proximité des neurones infectés semblent réguler l'expression des gènes lytiques d'HSV-1 durant la latence (rev. 206, rev. 207). Dans des cultures *ex vivo* de ganglions trigéminals, des cellules T CD8⁺ spécifiques pour un épitope de la protéine virale gB maintiennent un phénotype de cellules activées, produisent de l'IFN γ et bloquent la réactivation d'HSV-1 (205, 259). L'expression persistante d'IFN γ et de TNF α est requise pour maintenir la latence du virus dans les neurones infectés et permettrait d'inhiber l'expression d'ICP0 (83, 287). Bien que les neurones infectés soient maintenus dans un environnement hostile mêlant cellules immunes cytotoxiques et cytokines pro-inflammatoires, les cellules neuronales ne sont pas éliminées. Les neurones pourraient être protégés à la fois des effets pro-apoptotiques des cytokines inflammatoires et des effets cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ via l'activité anti-apoptotique des transcrits LAT (36). Récemment, il a été montré que les miARN LAT possèdent des propriétés anti-apoptotiques (365).

Dans une fraction des neurones portant des HSV en latence, les virus sont périodiquement réactivés par un mécanisme méconnu pouvant être déclenché par un stress émotionnel, une exposition prolongée aux ultraviolets, une forte fièvre ou une diminution de l'efficacité de la fonction lymphocytaire. Les personnes immunodéprimées consécutivement à un traitement chimiothérapeutique, un traitement antirejet ou une

infection par le VIH présentent une augmentation de la fréquence des réactivations et des épisodes de récurrence. Le virus réactivé effectue un cycle de réplication et migre par transport antérograde jusqu'au bouton terminal de l'axone (rev. 78, rev. 182). Les virus matures sont alors libérés et infectent les cellules épithéliales environnantes pour y effectuer un nouveau cycle lytique ayant pour conséquence de produire des lésions récurrentes dont la sévérité varie dépendamment de plusieurs facteurs dont l'état de l'immunité de l'hôte.

1.2 L'apoptose

L'apoptose des cellules infectées est une composante majeure de la réponse antivirale de l'hôte puisqu'elle permet de contenir l'infection, de limiter l'inflammation et de développer une réponse immunitaire spécifique dirigée contre le pathogène (rev. 137). Cette section de la thèse présentera les principales voies apoptotiques en insistant particulièrement sur la signalisation pro-apoptotique et non apoptotique induite par les récepteurs de mort stimulés par le TNF α et le FasL qui sont comme nous le verrons plus tard des molécules impliquées dans la défense antivirale anti-HSV. De plus, l'apoptose induite par les ARN double-brins, des intermédiaires produits notamment durant l'expression du génome des HSV, sera également abordé dans cette section (176, 426).

1.2.1 L'apoptose ou le démantèlement cellulaire organisé

C'est en 1972 qu'est publié par Kerr *et al.* le premier article décrivant le processus de mort cellulaire nommé apoptose (203). Ce processus de mort cellulaire programmée joue un rôle crucial tout au long de la vie des organismes pluricellulaires. Dès le développement embryonnaire, l'apoptose intervient dans l'élaboration des organes, des membres, du réseau neuronal et du système immunitaire. Après la naissance, l'apoptose participe au maintien de l'homéostasie en éliminant les cellules surnuméraires, endommagées ou infectées afin de maintenir l'intégrité cellulaire et tissulaire nécessaire à la survie des organismes. Le déséquilibre de ce processus est responsable de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies auto-immunes et neurodégénératives (rev. 396).

L'apoptose peut être initiée par plusieurs voies de signalisation dont les plus caractérisées sont les voies intrinsèques et extrinsèques. Le déclenchement de la voie intrinsèque, aussi nommée voie mitochondriale, est induit par une cascade d'événements intracellulaires conduisant à la perméabilisation de la mitochondrie et généralement à l'activation des caspases (voir section consacrée aux caspases). La voie extrinsèque, également nommée voie des récepteurs de mort, est déclenchée par la stimulation de récepteurs situés à la surface cellulaire et se caractérise par l'activation des caspases-8 et/ou -10. Les récepteurs impliqués dans la réponse immune innée antivirale détectant la présence d'ARN double-brins viraux sont également capables d'induire l'apoptose via l'activation de la caspase-8 (168, 169, 179, 425).

Le processus apoptotique peut être séparé en trois étapes : l'initiation, l'intégration/décision et l'exécution/dégradation. La phase d'initiation varie suivant la nature du signal pro-apoptotique rencontré qui peut être un signal intrinsèque affectant certains organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique, lysosomes, noyaux) ou un signal extrinsèque (stimulation d'un récepteur par son ligand). L'intégration/décision consiste en un réseau d'interactions moléculaires complexes impliquant des signaux pro et anti-apoptotiques contrôlant la destinée de la cellule autrement dit la survie ou la mort. Dépendamment du résultat de l'intégration des signaux pro et anti-apoptotiques, c'est entre autre durant cette phase que les caspases sont activées ou non. La phase d'exécution/dégradation est sensiblement identique quelque soit la voie empruntée et mène aux modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.

Récemment le « *Nomenclature Committee on Cell Death* » a établi des critères morphologiques et biochimiques caractérisant l'apoptose afin de la différencier de l'ensemble des divers processus de mort cellulaire (rev. 223). Ainsi, il a été établi qu'une cellule apoptotique présente une rétractation des pseudopodes, une réduction du volume cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire, des modifications mineures des organelles cytoplasmiques et un bourgeonnement de la membrane plasmique (rev. 223). Ces modifications morphologiques sont la conséquence de profonds bouleversements biochimiques induit par l'activation des caspases, la stimulation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, la perte du potentiel membranaire

mitochondrial, la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et la fragmentation de l'ADN nucléaire. Malgré ces modifications morphologiques et biochimiques drastiques, la cellule apoptotique maintient son intégrité membranaire pendant la quasi totalité du processus avant d'être éliminée par phagocytose faisant de l'apoptose un processus d'autodestruction cellulaire silencieux n'induisant pas ou peu de réponse inflammatoire (103, rev. 358).

1.2.2 Les caspases

L'apoptose se caractérise par l'activation des caspases (*cysteinyll aspartate-specific proteinase*), des protéases à cystéine active clivant leur substrat après un résidu acide aspartique localisé dans une séquence cible. On distingue trois classes de caspases dépendamment de la structure de leur prodomaine, de leur fonction et de leur origine phylogénétique (rev. 67, 229). Le groupe des caspases effectrices caractérisées par l'absence de prodomaine ou la présence d'un court prodomaine (20 à 30 acides aminés) comprend les caspases -3, -6 et -7. Les caspases initiatrices ou apicales présentant un long prodomaine (90 acides aminés ou plus) sont les caspases-2, -8, -9 et -10. Enfin, les caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14 possèdent un long prodomaine et jouent un rôle dans la maturation des cytokines et la réponse inflammatoire. Le prodomaine des caspases-8 et -10 comprend deux DED (*death effector domain*) disposés en tandem alors que le prodomaine des caspases-1, -2, -4, -5, -9, -11 et -12 comprend un CARD (*caspase-recruitment domain*).

Les caspases présentent un domaine catalytique formé d'une grande sous-unité portant le site actif (sous-unité p18/20 ou α), d'une petite sous-unité définissant la poche de fixation du substrat (sous-unité p10 ou β) et d'une séquence de liaison liant les deux sous-unités. Les caspases sont produites sous forme de zymogènes inactifs et leur mode d'activation diffère suivant le type de caspase considéré. Les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) sont présentes dans le cytoplasme sous la forme d'un dimère de procaspases inactives. L'activation des caspases effectrices s'effectue par le clivage des séquences de liaison des sous-unités α et β par les caspases initiatrices activées en aval (rev. 328). Contrairement aux caspases effectrices, les caspases initiatrices s'accumulent dans la

cellule sous forme de procaspases monomériques inactives. Le prodomaine contenant deux DED ou un CARD permet le recrutement, la dimérisation et l'activation des caspases initiatrices au sein de complexes multiprotéiques dirigeant l'induction de l'apoptose ou de l'inflammation (rev. 107). Ce recrutement concentre localement les procaspases qui sont activées suivant le modèle d' « induction par proximité » puis une étape de maturation par protéolyse permet la libération d'un hétérotétramère actif et stable dans le cytoplasme (pour le modèle de dimérisation/activation de la procaspase-8 voir **Fig. 1**) (33, 201, 293, 327).

Quelque soit son mode d'activation, une caspase active consiste au moins en un hétérotétramère formée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β provenant de deux caspases différentes ($\alpha\beta\beta'\alpha'$). Une fois activées, les caspases coupent leurs substrats au niveau d'une séquence cible caractéristique présentant un résidu aspartate. Cette séquence et sa localisation au sein d'une protéine définissent des substrats optimaux, intermédiaires ou mauvais (rev. 328, rev. 397). Les substrats des caspases initiatrices sont essentiellement des caspases effectrices. Par exemple, la caspase-8 peut cliver et donc activer les caspases-3, -6 et -7 (rev. 111, 397). En revanche, les caspases effectrices sont directement responsables des modifications biochimiques et morphologiques de l'apoptose en clivant plus de 400 protéines impliquées dans la formation du cytosquelette, dans le cycle cellulaire, la prolifération, le métabolisme de l'ADN et des protéines (rev. 67, 71, 89, 266, 397, 406).

Parce que la protéolyse est irréversible, l'activation des caspases est finement régulée. Par exemple, l'inhibiteur XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) interagit et inhibe spécifiquement la caspase-3, -9 et -7 (rev. 96). Les inhibiteurs cFLIP_L, cFLIP_S et cFLIP_R (*cellular-FLICE inhibitory protein (cFLIP) long, short and raji*) inhibent le recrutement et donc l'activation de la procaspase-8 (**Fig. 1**) ou de la procaspase-10 au niveau du complexe multiprotéique assemblé en réponse à l'engagement des récepteurs de mort (rev. 440). Les protéines cFLIP pourraient également activer des voies de survie et de prolifération une fois recrutées aux récepteurs de mort. Contrairement aux procaspases inactives plus stables, les caspases actives sont des espèces protéiques éphémères rapidement dégradées possiblement via les cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis*) ou XIAP qui possèdent une activité ubiquitine ligase E3 (32, 143, 361).

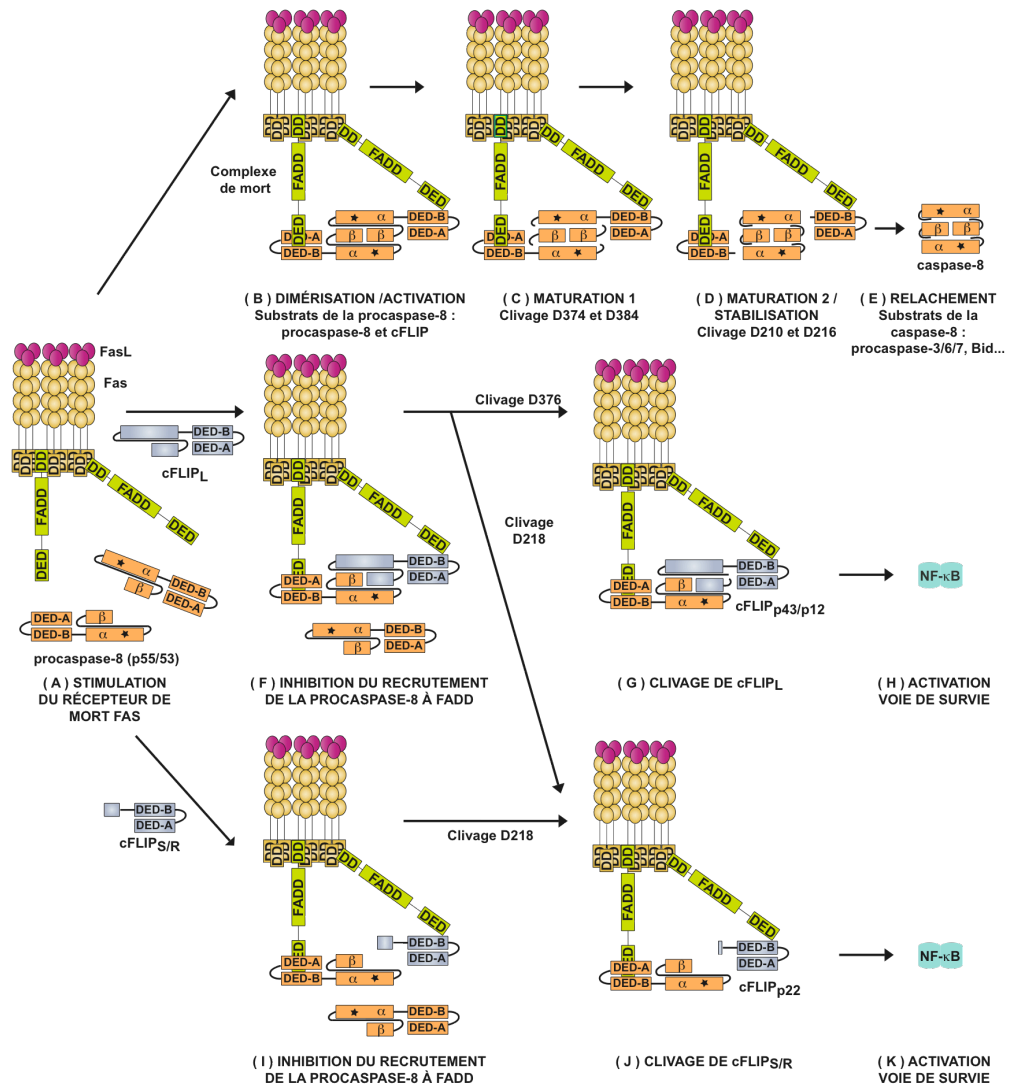


Figure 1 : Mécanismes d'activation et d'inhibition de la procaspase-8.

En absence de stimuli pro-apoptotiques, la procaspase-8 se présente sous la forme d'un monomère inactif (A). Un signal apoptotique (exemple : FasL) initie la formation d'un complexe de mort multiprotéique contenant l'adaptateur FADD qui possède i) un DD permettant son recrutement au constituant du complexe de mort présentant un DD (ici FAS) et ii) un DED permettant le recrutement de la procaspase-8 (A) (rev. 321). L'adaptateur FADD dirige le recrutement et la dimérisation de la procaspase-8 au complexe de mort (interaction entre DED FADD et DED-B procaspase-8). La dimérisation entraîne l'activation des procaspases-8 qui sont alors capables de cliver un répertoire de substrat limité à la procaspase-8 et cFLIP (B) (163). À la suite de la dimérisation/activation, la

caspase initiatrice est stabilisée via deux étapes de maturation par autoclivage. Le clivage de la séquence reliant la grande (α /p18) et la petite (β /p10) sous-unité du domaine catalytique (position D374 et D384) engendre les fragments de caspase-8 p43/41 et p10 qui restent associés au complexe de mort (C). Un second clivage (position D210 et D216) au niveau de la séquence reliant le prodomaine et la sous-unité α /p18 complète la maturation et la stabilisation de la caspase-8 (D). Les caspases-8 stables sont libérées du complexe de mort; celles-ci sont alors capables de cliver Bid et les procaspases 3, 7 et 6 (E) (163). Le recrutement de la procaspase-8 au DED de FADD peut être inhibé par compétition avec les inhibiteurs cFLIP_L (F) et cFLIP_{S/R} (I). Une procaspase-8 dimérisée avec cFLIP_L peut cliver ce dernier en position D376 engendrant les fragments cFLIP p43/p12 (G) capables d'activer les voies de survie (voie NF- κ B) (H). La procaspase-8 peut cliver cFLIP_{S/R} et cFLIP_L en position D218 (J) permettant au fragment cFLIP p22 d'activer les voies de survie (voie NF- κ B) (K) (rev. 440). Astérisque : cystéine active C360 du site catalytique de la caspase-8. DD : *death domain*. DED : *death effector domain*.

1.2.3 La voie apoptotique intrinsèque

L'évènement fondamental de la voie apoptotique intrinsèque ou mitochondriale consiste en la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*mitochondrial outer-membrane permabilization*, MOMP) qui mène au relâchement de diverses protéines pro-apoptotiques du compartiment intermembranaire vers le cytosol (**Fig. 2**) (rev. 222). La voie intrinsèque est activée par divers stimuli (dommage à l'ADN induit chimiquement ou par irradiation, stress du réticulum endoplasmique, stress oxydatif, privation en facteur de croissance) régulant les protéines de la famille des Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*). Les protéines de la famille des Bcl-2 présentent de un à quatre domaines BH (*Bcl-2 homology*) qui influencent la structure, les interactions et la fonction des Bcl-2. Les Bcl-2 ont été répartis en trois classes. La première est composée de protéines anti-apoptotiques à multiples domaines (exemple : Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L), contenant les domaines BH1/2/3/4 ou BH1/2. Une autre classe comprend les protéines pro-apoptotiques à multiples domaines (exemple : Bak, Bax), constituées des domaines BH1/2/3. Enfin, il existe des protéines pro-apoptotiques (exemple : Bid, Bim, Bad, Noxa, Puma) contenant un domaine BH3 unique (rev. 439).

Un réseau complexe d'interaction entre les différentes protéines de la famille des Bcl-2 contrôle la MOMP. Plusieurs modèles de MOMP faisant l'objet de controverses ont été proposés. Bien que le mécanisme de MOMP soit encore mal compris, il a été montré que Bax normalement cytosolique s'insère dans la membrane externe de la mitochondrie où il oligomérisé seul ou en association avec Bak ou tBid (*truncated Bid*) (**Fig. 2**) (226, 430). Ces oligomères déstabilisent la membrane mitochondriale et y forment des pores provoquant le relâchement cytosolique des protéines solubles contenues dans l'espace intermembranaire (61). Ce phénomène est modulé par les autres Bcl-2. Les Bcl-2 anti-apoptotiques à domaine BH1/2/3/4 inhibent la perméabilisation mitochondriale en interagissant ou en neutralisant les effets des Bcl-2 pro-apoptotiques. En interagissant préférentiellement avec les Bcl-2 anti-apoptotiques BH1/2/3/4, les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique libèrent les protéines pro-apoptotiques inhibées par les Bcl-2 anti-apoptotiques favorisant ainsi la MOMP (exemple Bad). D'autres protéines à domaine BH3 unique, comme tBid, se comportent comme des activateurs directs de

protéines pro-apoptotiques telles que Bak ou Bax (252). Enfin, les protéines anti-apoptotiques préviennent directement la formation des pores ou inhibent les protéines à domaine BH3 unique (rev. 439).

La MOMP résulte en une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) entraînant l'arrêt de la phosphorylation oxydative et l'accumulation de ROS (*reactive oxygen species*) (rev. 222). Parmi les effecteurs pro-apoptotiques relâchés suite à la MOMP, l'AIF (*apoptosis-inducing factor*) et l'endonucléase-G (EndoG) participent à la dégradation de l'ADN indépendamment de l'activation des caspases (256, 386). La MOMP provoque également le relâchement de Smac/DIABLO qui active indirectement les caspases en inhibant les cIAP. De plus, le relâchement dans le cytosol du cytochrome-C (Cyt-c) conduit à la formation de l'apoptosome : un complexe multiprotéique assemblant la procaspase-9, Apaf-1, et le cytochrome-C. L'apoptosome active la procaspase-9 selon le modèle d'activation induite par proximité permettant ainsi le clivage et l'activation subséquente des caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) (**Fig. 2**) (rev. 23).

1.2.4 La voie apoptotique extrinsèque

1.2.4.1 Généralités

La voie apoptotique extrinsèque, aussi nommée voie des récepteurs de mort, est activée par la fixation du TNF α sur le TNFR1 (TNFRSF1A, CD120a, p55), du FasL sur le récepteur Fas (TNFRSF6, CD95, APO-1) ou de TRAIL sur les récepteurs TRAILR1 (TNFRSF10A, DR4), TRAILR2 (TNFRSF10B, DR5) ou TRAILR6 (TNFRSF21, DR6). Le TNF α est principalement produit sous forme homotrimérique par les macrophages, les monocytes et les cellules T mais aussi par une grande variété de cellules incluant les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les hépatocytes (rev. 142, rev. 419). Les protéines FasL et TRAIL sont principalement produites sous forme homotrimérique par les cellules immunitaires, notamment les cellules T, les NK (*natural killer*) et les macrophages (rev. 104). Les protéines TNFR1, Fas, TRAILR1, TRAILR2 et TRAILR3 sont exprimées de manière ubiquitaire et contiennent un domaine extracellulaire impliqué dans la fixation du ligand, un domaine transmembranaire et une queue cytosolique

portant un domaine de mort (*death domain*, DD), le DD est une séquence très conservée de 80 acides aminés essentielle à l'exécution du programme apoptotique engendré par le TNFR1, FAS, TRAILR1 et TRAILR2 (rev. 7, rev. 260). Afin de faciliter la transmission du signal, les récepteurs de mort sont pré-assemblés en oligomères même en absence de ligand (50, 51, 369). Une fois stimulés, les récepteurs subissent des modifications conformationnelles permettant le recrutement de protéines adaptatrices qui initient la formation de complexes multiprotéiques de signalisation. Bien que la composition de ces complexes diffère d'un récepteur à l'autre, la stimulation des récepteurs de mort provoque généralement i) le déclenchement d'une voie pro-apoptotique caractérisée par l'activation des caspases initiateurs 8 et/ou 10 ; ii) l'induction d'une voie non apoptotique activant NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et certaines MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (rev. 142, rev. 419). La suite de cette introduction détaille la signalisation induite par la stimulation des récepteurs Fas et TNFR1.

1.2.4.2 Voies de signalisation induites par Fas

1.2.4.2.1 Signalisation apoptotique induite par Fas

Stimulé par la fixation de son ligand, Fas initie l'assemblage d'un complexe d'induction de la signalisation apoptotique nommé DISC (*death-inducing signaling complex*) (**Fig. 2**). Fas activé interagit avec l'adaptateur FADD via une interaction impliquant leur DD respectif puis FADD recrute la procaspase-8 et/ou -10 via une interaction impliquant le DED de ces protéines (pour une description détaillée de l'activation de la caspase-8 voir **Fig. 1**) (rev. 321). La signalisation est ensuite amplifiée via un réseau complexe d'interactions s'établissant entre les récepteurs activés et les adaptateurs FADD permettant ainsi la microagrégation d'une multitude de DISC pour former une structure nommée SPOTS (*signaling protein oligomerization structures*) dont la fonction principale est de recruter, et donc d'activer, une quantité suffisante de procaspases-8 au niveau des protéines FADD oligomérisées (**Fig. 2**) (351, 362, 370). L'activation de la caspase-8 au niveau des SPOTS est nécessaire pour un regroupement massif des complexes DISC reliés à Fas au niveau des radeaux lipidiques (100). Les complexes DISC regroupés vont ensuite être internalisés par endocytose puis entraînés dans des vésicules endosomales

au sein desquelles une formation massive de DISC est observée permettant une activation efficace de la caspase-8 et/ou -10 (**Fig. 2**) (238). Il a récemment été montré que l'activation de Fas pouvait mener à l'assemblage d'un complexe cytosolique formé de FADD, de la procaspase-8 et éventuellement des isoformes de cFLIP dont le rôle est probablement d'amplifier l'activation de la caspase-8 (236). Bien que le DISC classique soit assemblé à partir de FADD, une récente étude a démontré que le FasL lié à la membrane pouvait induire la formation d'un complexe activateur de la caspase-8 contenant RIP1 (*receptor interacting protein 1*) en plus de FADD (289).

Selon la sensibilité des cellules à l'apoptose, on distingue deux voies de signalisation faisant suite à l'activation de la procaspase-8 par le DISC (rev. 24, 359). Dans les cellules dites de type I (ex : HeLa), l'activation de la caspase-3 s'effectue directement par la caspase-8 alors que la voie mitochondriale sert à amplifier l'apoptose induite par le récepteur de mort. Au contraire, dans les cellules de type II (ex : jurkat), l'activation plus restreinte de la caspase-8 n'active pas directement la caspase-3 mais permet le clivage de la protéine pro-apoptotique tBid qui déclenche la voie mitochondriale conduisant à l'activation des caspases effectrices (**Fig. 2**) (254, 264). Les deux types cellulaires se différencient également au niveau de la rapidité de formation des DISC, de leur relocalisation au niveau des radeaux lipidiques et de leur internalisation (100).

1.2.4.2.2 Signalisation non apoptotique induite par Fas

Dépendamment du type cellulaire, l'activation de Fas peut mener à la prolifération, la migration ou la production de cytokines inflammatoires en activant une ou plusieurs voies de signalisation impliquant NF- κ B et les MAPK ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (**Fig. 2**) (25, 320, rev. 321, rev. 418). L'issue de la signalisation par Fas dépendrait du niveau d'agrégation du DISC au récepteur stimulé. Une faible activation de Fas couplée à une agrégation modérée du DISC au récepteur stimulé induit une signalisation non apoptotique alors que l'inverse déclenche une réponse pro-apoptotique (235). La signalisation non apoptotique induite par Fas est peu décrite mais plusieurs modèles impliquant cFLIP ont été proposés (**Fig. 1**). En étant recruté au DISC, l'inhibiteur cFLIP_L permet une autoactivation limitée de la procaspases-8 qui reste reliée au DISC. Cette activation limitée de la caspase-8 pourrait être responsable de

l'induction de NF- κ B par Fas. De plus, la procaspase-8 dimérisée avec cFLIP peut cliver à la fois cFLIP_L et cFLIP_{S/R} pour produire une forme clivée de cFLIP (cFLIP p43/p12) et un fragment cFLIP p22 (contenant les deux DED de cFLIP_{L/S/R}). Ces formes de clivages contrôlent l'activation transcriptionnelle de gènes anti-apoptotiques en stimulant NF- κ B via TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), RIP1 et/ou IKK γ (*I-kappa-B-kinase gamma*) (**Fig. 1 et 2**) (133, 194, 422, rev. 440).

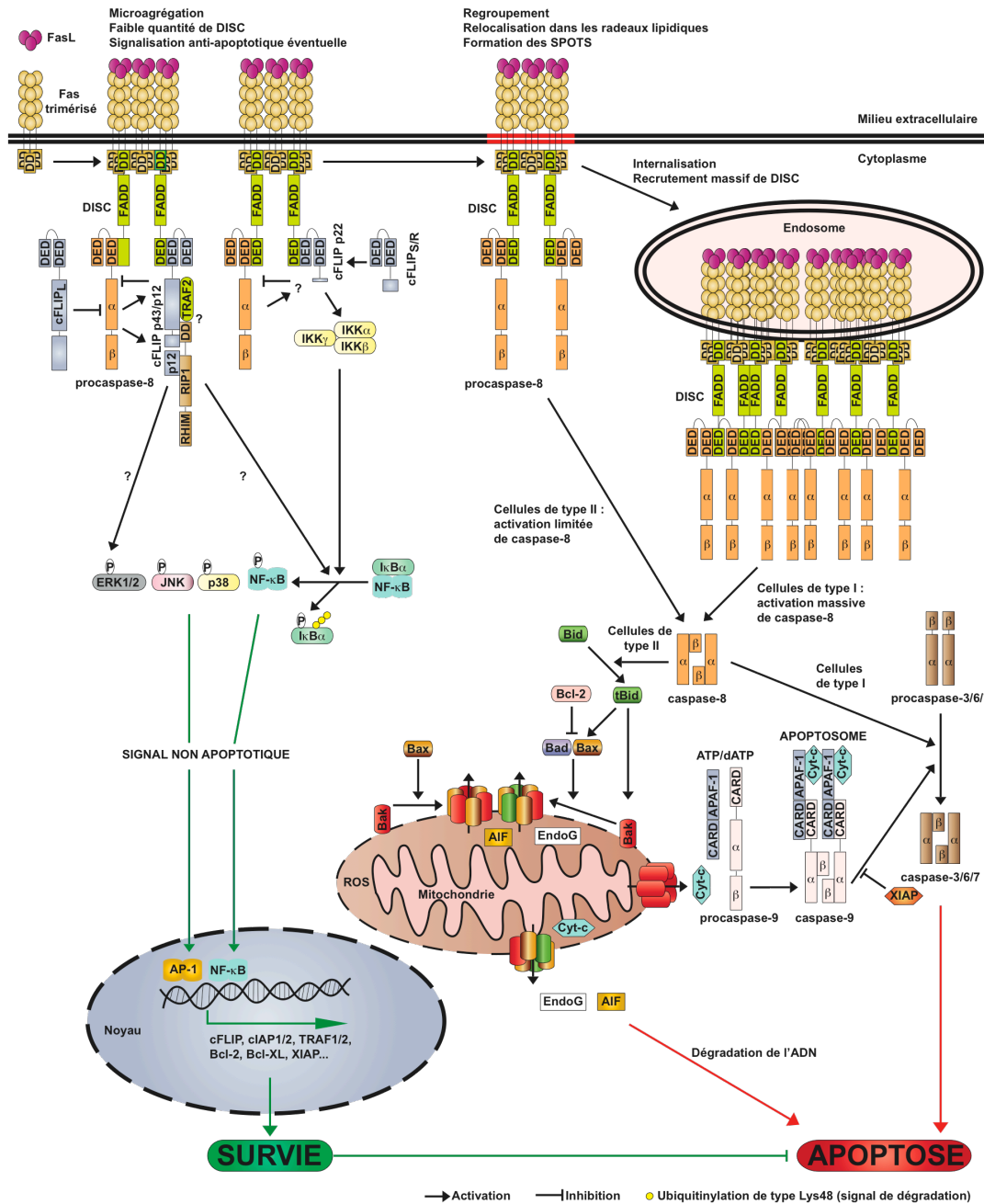


Figure 2 : Voies de signalisation induites par Fas.

Modèle des voies apoptotiques et non apoptotiques induites par la stimulation du récepteur de mort Fas par son ligand FasL. Se référer au texte pour les détails mécanistiques.

1.2.4.3 Voies de signalisation induites par le TNFR1

La stimulation du TNFR1 déclenche de multiples voies de signalisation contrôlant la production de cytokines inflammatoires, la survie, la prolifération et paradoxalement la mort cellulaire (rev. 411). La nature pléiotropique de la réponse au TNF α est probablement la conséquence d'une signalisation impliquant la formation de plusieurs complexes moléculaires aux compositions et aux localisations différentes. L'issue des voies de signalisation engendrées par le TNF α dépendrait du type cellulaire, du contexte cellulaire et de la durée du signal.

1.2.4.3.1 Signalisation non apoptotique déclenchée par le TNFR1

Dans les secondes suivant leurs stimulations, les TNFR1 activés vont induire la formation d'un premier complexe dénommé complexe I au niveau de la membrane cytoplasmique. Le complexe I migre dans les zones de radeaux lipidiques où les protéines du complexe vont subir des modifications post-traductionnelles (243). Le complexe I est formé des protéines : TNFR1, TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), TRAF2/5, cIAP1/2, RIP1 (**Fig. 3**) (152, 283). TRADD et le TNFR1 interagissent via leur DD respectif. TRADD orchestre alors le recrutement de divers protéines dont les ubiquitines ligases E3 : TRAF2 et/ou TRAF5 (26, 101, 160, 161, 283). Dépendamment de son niveau d'expression variable selon le type cellulaire, RIP1 peut se fixer au TNFR1 via son DD mais l'activité de RIP1 et probablement sa fixation sont favorisées par TRADD et TRAF2/5 (101). Le complexe I dirige le recrutement et l'induction des MAP3K (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) responsables de l'activation par le TNFR1 de NF- κ B et des MAPK ERK1/2, p38 et JNK. Une fois recruté au complexe I, RIP1 s'autophosphoryle et est ubiquitinylé par liaison de type Lys63 (activation protéique) ou Lys48 (ciblage pour la dégradation au protéasome 26S) (rev. 192). TRAF2/5 et les ubiquitines ligases E3 cIAP1/2 dirigent l'activation de RIP1 par ubiquitinylation de type Lys63 (rev. 58, 95, rev. 239, 253, 409). RIP1 et TRAF2/5 ubiquitinylés activent la kinase TAK1 (*TGF-beta-activated kinase 1*) via les protéines TAB2 (*TAK1-binding protein 2*) et TAB3 (95). TAK1 induit alors l'activation du complexe IKK - formé de IKK α , IKK β et IKK γ (aussi nommé NEMO) - qui induit la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B

(I κ B α) (**Fig. 3**) (1). Phospho-I κ B α sera ensuite dégradé par le protéasome 26S permettant aux sous-unités de NF- κ B, notamment p50 et p65/RelA, d'être phosphorylées et de migrer au noyau pour stimuler la transcription des gènes anti-apoptotiques cFLIP, cIAP1, cIAP2, TRAF2, Bcl-2 et Bcl-XL (422). D'autres MAP3K (essentiellement des MAPK/ERK kinases kinases, MEKK) sont activées par le complexe I permettant l'induction de JNK, ERK1/2 et p38 (rev. 388, rev. 411). RIP1 est responsable de l'induction de p38 et de ERK1/2 alors que TRAF2/5 contrôle l'activation de JNK (rev. 108).

La kinase Akt (aussi nommée protéine kinase B, PKB) est activée par le TNFR1 par une voie méconnue impliquant la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*). Dépendamment du type cellulaire, du niveau et de la durée d'activation, Akt (rev. 210), ERK1/2 (rev. 22) et p38 (rev. 443) peuvent avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques en phosphorylant des protéines clés de l'apoptose ou en contrôlant la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation et l'apoptose via le facteur de transcription AP1 (*activator protein 1*) (rev. 333, rev. 419). Par exemple, Akt prévient le déclenchement de la voie intrinsèque en phosphorylant Bad ce qui le séquestre dans le cytosol via la protéine chaperonne 14-3-3 ; Akt phosphoryle également la procaspase-9 inhibant ainsi son activation (**Fig. 3**) (44, 80, 444). Akt peut également activer NF- κ B (309). Puisque les voies de signalisations impliquant Akt, ERK1/2, p38, JNK et NF- κ B interagissent entre elles, il est difficile de déterminer avec précision l'impact de chacune d'elle sur la signalisation des récepteurs de mort (rev. 184). Cependant, l'activation de NF- κ B précède celles des MAPK permettant ainsi de moduler finement la signalisation de ces dernières pour produire un signal de survie cellulaire (rev. 192, 394).

1.2.4.3.2 Signalisation pro-apoptotique déclenchée par le TNFR1

En plus du complexe I, l'activation du TNFR1 peut mener à la formation de deux complexes cytosoliques assemblés à partir de TRADD : le complexe IIA et le complexe IIB (**Fig. 3**) (152, 283).

Après internalisation des récepteurs stimulés, des modifications de RIP1 et TRAF2/5, probablement par ubiquitinylation et/ou phosphorylation, permettent à TRADD de recruter la procaspase-8 et/ou la procaspase-10 via FADD formant ainsi le complexe IIA

(**Fig. 3**) (283, 423). FADD et TRADD interagissent via leur DD tandis que FADD recrute la procaspase-8/10 et cFLIP_{L/S/R} par l'intermédiaire d'une interaction impliquant les DED de ces molécules. C'est la compétition entre le recrutement des isoformes de cFLIP et de la procaspase-8 qui détermine l'issue de la signalisation du complexe IIA. L'expression des isoformes de cFLIP est induite par les voies de survie impliquant NF- κ B et Akt (311, 423) alors que leur dégradation par le protéasome est favorisée par l'ubiquitine ligase E3 Itchy (ITCH) dont l'expression est stimulée par l'activation soutenue de JNK (**Fig. 3**) (52). En culture cellulaire, l'induction de l'apoptose par le TNF α requière généralement la présence de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction. La CHX diminue l'expression des protéines à demi-vie courte comme cFLIP_L et cFLIP_S favorisant ainsi l'interaction de la procaspase-8 avec FADD et par conséquent l'apoptose (221).

Le complexe IIB requière l'oligomérisation de RIP1 et de FADD pour induire l'activation de la procaspase-8 (**Fig. 3**) (423). La voie du complexe IIB peut-être inhibée par Smac et les « Smac mimétiques » qui provoquent l'auto-ubiquitinylation des cIAP1/2 et donc leur dégradation par le protéasome 26S. RIP1 se retrouve alors privé de l'ubiquitinylation activatrice normalement assurée par les cIAP1/2 et TRAF2/5 (410, 415). La formation du complexe IIB nécessite également l'intervention de la déubiquitylase CYLD (*cylindromatosis gene product*) suggérant que la déubiquitinylation de RIP1 est requise pour son oligomérisation et son interaction avec FADD (**Fig. 3**). Contrairement au complexe IIA, le complexe IIB ne contient ni TRADD ni TRAF2/5. La délétion génique de TRADD facilite l'assemblage du complexe IIB confirmant que RIP1 peut interagir directement avec le TNFR1 pour transmettre un signal pro-apoptotique (326, 423).

Le complexe IIA (TRADD/FADD/caspase-8) induit donc l'apoptose par une voie dépendant de TRADD pouvant être inhibée par cFLIP alors que le complexe IIB (RIP1/FADD/caspase-8) signale l'apoptose par une voie dépendant de RIP1 pouvant être inhibée par Smac et les « Smac mimétiques » (**Fig. 3**) (423). L'importance de chaque complexe II dans l'apoptose dépendrait du type cellulaire, notamment du niveau d'expression de RIP1, et du contexte de la cellule au moment de la stimulation du TNFR1.

Quel que soit le complexe II formé, la procaspase-8 et éventuellement la procaspase-10 sont activées et déclenchent l'apoptose en clivant directement la caspase-3

(cellule de type I) et/ou en provoquant le clivage de Bid en tBid qui engage la voie apoptotique mitochondriale (cellule de type II) (**Fig. 3**).

Plusieurs boucles d'amplification permettent de sensibiliser les cellules à l'apoptose. Par exemple, la caspase-8 clive RIP1 en position D324 ce qui inhibe l'induction de NF- κ B par le fragment N-terminal de RIP1 et favorise l'interaction du fragment C-terminal de RIP1 avec FADD et la procaspase-8 (258). L'activation de la voie intrinsèque conduit au dysfonctionnement de la mitochondrie et à la production de ROS lesquels initient une boucle d'amplification du signal pro-apoptotique basée sur l'activation soutenue de JNK par les kinases ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) et les MAPK kinases : MKK4 ou MKK7. La kinase JNK active ITCH, induit le clivage de Bid en jBid de manière indépendante de la caspase-8 et active d'autres protéines de la famille des Bcl-2 à domaine BH3 unique comme Bim et Bmf (**Fig. 3**) favorisant ainsi l'apoptose (rev. 86).

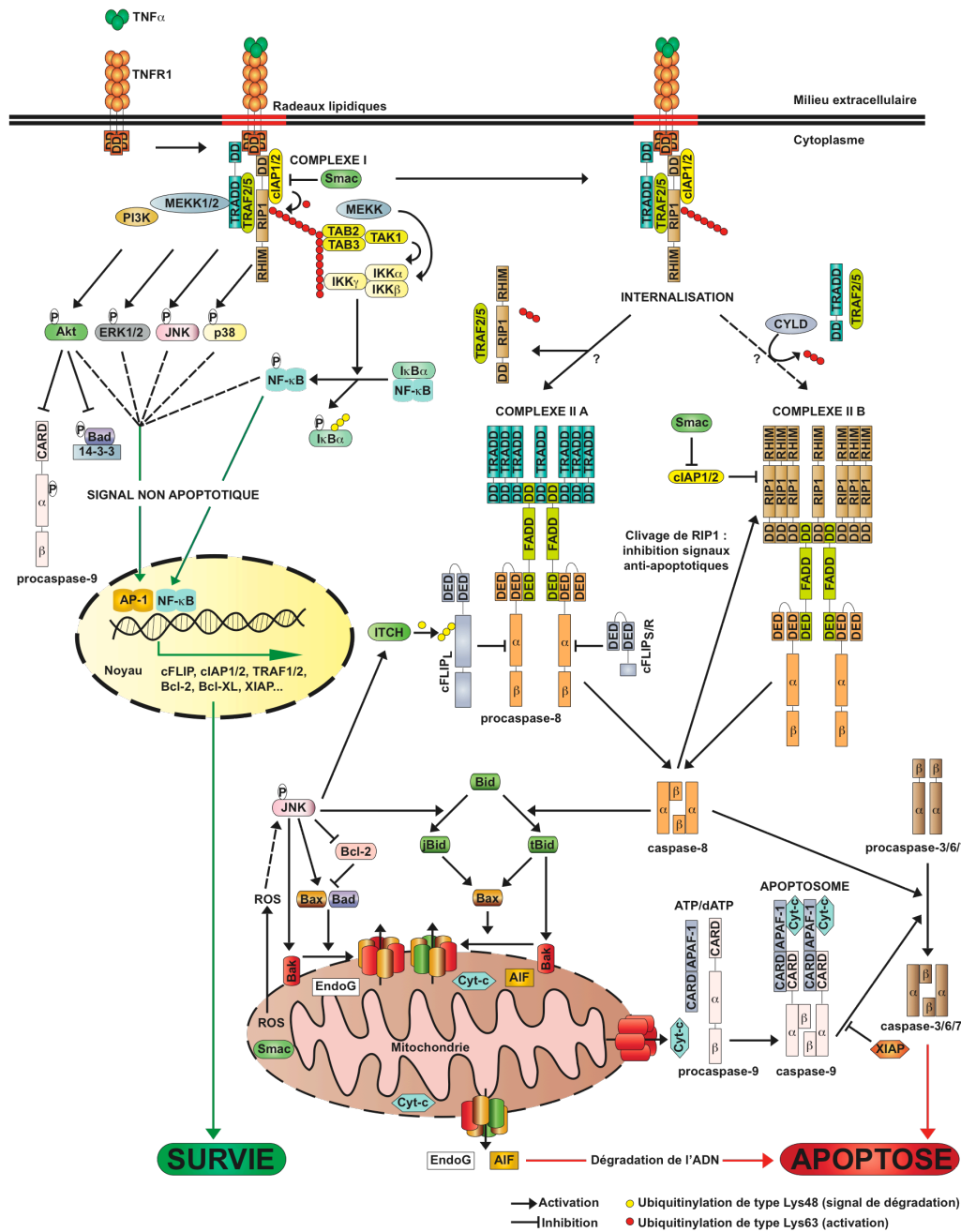


Figure 3 : Voies de signalisation induites par le TNFR1.

Modèle des voies apoptotiques et non apoptotiques induites par la stimulation du récepteur de mort TNFR1 par le TNF α . Se référer au texte pour les détails mécanistiques.

1.2.5 L'apoptose déclenchée par les ARN double-brins viraux

Les virus HSV produisent des ARN double-brins (ARNdb) qui s'accumulent dans les cellules infectées et qui peuvent être relâchés lors de la lyse des cellules hôtes (176, 426). Ces ARNdb sont détectés par divers récepteurs qui activent la réponse innée antivirale induisant le déclenchement de l'apoptose et stimulant la production de cytokines ayant des effets antiviraux. Cette section décrira les voies de signalisation induites par la détection des ARNdb en insistant particulièrement sur l'apoptose en temps que réponse innée antivirale.

1.2.5.1 Généralités

Il y a une dizaine d'année, les mécanismes régissant la détection de l'infection virale et les réponses subséquentes étaient presque totalement inconnus. Aujourd'hui, il est bien accepté que le déclenchement de la réponse antivirale passe par la détection par les récepteurs PRR (*pattern-recognition receptor*) de molécules virales spécifiques nommées PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*). Les ARNdb sont des PAMP produits par les virus à ARN positif et également par certains virus à ADN (adénovirus, virus de la vaccine, HSV-1 et HSV-2) suite à l'appariement d'ARN complémentaires issus de la transcription de séquences convergentes chevauchantes (153, 176, 426). Les ARNdb sont reconnus par plusieurs PRR dont le TLR3 (*Toll-like receptor 3*) et les RLR (*RIG-I-like receptors*), une famille d'hélicases à ARN comprenant notamment RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*). Bien que non classée comme un PRR, la protéine kinase R (PKR) est aussi impliquée dans la reconnaissance des ARNdb.

La stimulation des détecteurs cellulaires d'ARNdb déclenche deux mécanismes antiviraux : la réponse immune innée et l'apoptose. La réponse immune innée antivirale est initiée par des voies de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, AP1 et IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) qui stimulent notamment l'expression de cytokines inflammatoires (ex : TNF α et TRAIL), d'interleukines et d'interférons de type I (IFN α ou β) qui exercent des effets antiviraux directs ou indirects (rev. 199). L'apoptose en

tant que réponse antivirale a été peu étudiée en comparaison à la réponse immune innée antivirale. La détection d'ARNdb par le TLR3, les RLR et PKR entraîne l'activation de la caspase-8 et dans plusieurs cas l'apoptose notamment dans les cellules HeLa utilisées dans notre étude (168, 169, 179, 186, 392, 425).

1.2.5.2 Apoptose induite par la détection des ARN double-brins extracellulaires via le TLR3

Lors de la lyse des cellules infectées, les ARNdb accumulés au cours de l'infection par les HSV (176, 426), sont probablement déversés dans le milieu cellulaire en même temps que les particules virales infectieuses. Ces ARNdb extracellulaires activent le TLR3 qui induit une réponse immune innée antivirale ainsi que l'apoptose.

1.2.5.2.1 Rôle, expression et localisation du TLR3

Le TLR3 a été initialement identifié comme une molécule reconnaissant l'acide polyribonoinosinique : polyribocytidylique (poly(I:C)), un analogue synthétique des ARNdb induisant une réponse antivirale caractérisée par la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires, cette réponse étant absente chez les souris déficientes pour le TLR3 (3). Par la suite le TLR3 a été impliqué dans la reconnaissance de divers virus dont le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), le cytomégalovirus murin (MCMV) et le virus syncytial respiratoire (RSV) (138, 149, 390). L'importance du TLR3 dans le contrôle d'une infection HSV a été mise en évidence par une étude démontrant que le risque d'encéphalites causées par HSV-1 est accru chez les individus porteurs d'une mutation ponctuelle dominante (P554S) du TLR3 (448). Cette étude montre que l'induction d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires par le TLR3 est cruciale pour le développement d'une réponse antivirale primaire dans le système nerveux central lors d'une infection par HSV-1. Toutefois, une redondance dans les systèmes de réponse immune innée antivirale permet à ces patients de survivre à la plupart des infections virales (448).

Le TLR3 est exprimé dans les fibroblastes et les cellules épithéliales dont les kératinocytes, lesquels constituent la première barrière contre les pathogènes (185, 224, 225, 237, 271, 398). Le TLR3 est aussi fortement exprimé dans le système nerveux central

(SNC) puisque le récepteur est présent dans les neurones, les cellules microgliales, les astrocytes et oligodendrocytes (39, 40, 172, 173, 275, 331). Les cellules participant directement à la réponse innée antivirale contre les HSV telles que les cellules dendritiques myéloïdes, les macrophages et les cellules NK expriment également le TLR3 (185, 292, 416). Dans la plupart des cellules, incluant les cellules dendritiques et les macrophages, le TLR3 est exprimé dans des vésicules intracellulaires à pH acide identifiées comme des endosomes précoces alors que les fibroblastes et les cellules épithéliales expriment le TLR3 à la fois au niveau de la membrane cytoplasmique et dans les endosomes (81, 115, 270, 271, 298).

1.2.5.2.2 Réponse immune innée antivirale induite par le TLR3

Le TLR3 est un récepteur transmembranaire constitué d'un domaine extracellulaire en forme de « fer à cheval » offrant une large surface de contact avec les ARNdb, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytosolique présentant un domaine TIR (*Toll/interleukine-1 [IL-1] receptor*) (27, 63). Selon de récents modèles mécanistiques, c'est l'association des ARNdb avec les TLR3 qui réorienterait les domaines TIR activant ainsi la signalisation intracellulaire (249). Le TLR3 activé recrute l'adaptateur TRIF (*Toll/IL-1 receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing IFN β* , aussi nommé TICAM-1 : *TIR domain-containing adapter molecule 1*) via une interaction impliquant les domaines TIR des deux protéines (rev. 199, 307, 436). TRIF recrute alors TRAF3 qui induit la formation d'un complexe de signalisation comprenant les protéines TBK1 (*TANK-binding protein kinase 1*), IKK ϵ , TANK et NAP1 (*NF- κ B-activating kinase-associated protein 1*) induisant la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 (144, 303, 354). IRF3 phosphorylé dimérise et migre au noyau, induisant ainsi l'activation des promoteurs contrôlant l'expression d'IFN α/β (**Fig. 4**) (355).

Par l'intermédiaire de TRIF, le TLR3 active également les facteurs de transcription NF- κ B et AP1 stimulant l'expression d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires (**Fig. 4**). TRIF interagit avec RIP1 par l'intermédiaire de domaines RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) présents au niveau de la région C-terminale de TRIF et dans le domaine intermédiaire de RIP1 (**Fig. 4**) (280). RIP1 subit une polyubiquitinylation de type lys63 nécessaire à l'activation de NF- κ B. L'adaptateur TRADD est également recruté par RIP1 ;

il participe à l'ubiquitinylation et à l'activation de RIP1 (101, 326). TRIF active également NF- κ B en interagissant directement avec TRAF6, une ubiquitine ligase E3 (357). Ce complexe contenant TRIF, RIP1, TRADD, TRAF6 induit le recrutement de IKK γ (NEMO), TAK1, TAB2 et TAB3 (rev. 108). TAK1 induit la phosphorylation des kinases IKK α et IKK β , lesquelles en retour phosphorylent l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α , qui sera dégradé permettant ainsi au facteur de transcription de migrer au noyau (**Fig. 4**) (356, 366). La voie induite par le TLR3 menant à l'activation du facteur de transcription AP1 par p38, JNK et ERK1/2 est mal définie ; elle pourrait impliquer TAK1 (rev. 413).

1.2.5.2.3 Induction de l'apoptose par le TLR3

La fonction pro-apoptotique du TLR3 a été peu étudiée en comparaison de son implication dans la production de cytokines et d'IFN. Initialement, il a été montré en surexprimant TRIF dans diverses lignées cellulaires que cet adaptateur est l'unique protéine contenant un domaine TIR capable d'induire l'apoptose (147, 186, 344). L'activité pro-apoptotique de TRIF requière l'interaction de TRIF avec RIP1 via leurs domaines RHIM respectifs (186). RIP1 interagit alors avec FADD pour initier le recrutement et l'activation de la caspase-8 suivit de l'induction de la caspase-3. Même si elle est probablement activée, la voie apoptotique mitochondriale n'est pas requise pour induire l'apoptose par la surexpression de TRIF (147, 186). Par la suite, il a été montré que le poly(I:C) peut induire l'apoptose dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses mais ceci requière un traitement combiné avec de la cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique), de l'IFN ou des SMAC mimétiques (179, 349, 425). L'activation de la caspase-8 est l'événement principal conduisant à l'apoptose induite par le TLR3 dans les cellules HaCat et plusieurs lignées cellulaires dérivées de mélanome (425). L'ensemble de ces études supporte donc un modèle selon lequel le TLR3 induit l'apoptose via une voie impliquant TRIF, RIP1, FADD et la caspase-8. Toutefois, il a été montré qu'un traitement prolongé au poly(I:C) (supérieur à 24 h) induit l'apoptose de différentes cellules épithéliales issues de cancer du sein en activant la voie apoptotique intrinsèque via notamment la surexpression de Noxa (349). En plus de son rôle initiateur de l'apoptose, il a été rapporté que la caspase-8 contribuerait à la cascade d'activation de NF- κ B en réponse à la stimulation du TLR3 (248, 382).

1.2.5.3 Apoptose induite par les ARN double-brins cytosoliques

La transfection de poly(I:C) induit une réponse immune innée antivirale et l'apoptose en particulier dans les HeLa qui sont des cellules très sensibles à l'apoptose induite par le poly(I:C) transfectée (168, 169). Le poly(I:C) transfecté stimule plusieurs récepteurs cytosoliques dont les RLR (*RIG-I-like receptor*) et PKR (*protein kinase double-stranded RNA-dependent*) mais le rôle précis que joue chacun de ces détecteurs d'ARNdb dans l'apoptose est encore source de débat.

1.2.5.3.1 Détection cytosolique des ARNdb et signalisation par RIG-I et MDA5

1.2.5.3.1.1 Rôles de RIG-I et MDA5 dans la réponse immune innée antivirale

Les PRR connus responsables de la détection cytosolique des ARN viraux et du poly(I:C) sont les deux RLR (*RIG-I-like receptor*) : RIG-I et MDA5. Un troisième RLR, LGP2 (*laboratory of genetic and physiology 2*) (412), pourrait fonctionner comme un régulateur positif ou négatif de RIG-I et MDA5 dépendamment du type d'infection (342, 437). L'utilisation de souris déficientes pour RIG-I ou MDA5 a démontré l'implication de ces RLR dans la production d'IFN en réponse au poly(I:C) ou à une infection virale ; ces travaux ont aussi montré que ces deux détecteurs sont stimulés par des virus différents (127, 196, 198). MDA5 et RIG-I ne détectent pas les mêmes ARNdb ce qui pourrait expliquer pourquoi leur spectre de détection virale diffère. En effet, RIG-I peut détecter de courts ARNdb bien que ses ligands principaux soient des ARN simple-brins à bases modifiées ; MDA5 est le principal détecteur cytosolique des ARNdb longs, structurés et ramifiés comme le poly(I:C) (159, 197, 324, 325, 348, 393). Le rôle de MDA5 et RIG-I dans la réponse immune innée antivirale a surtout été étudié lors d'infection par des virus à ARN. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que les virus à ADN sont reconnus par la voie des RLR. Par exemple, la production d'IFN de type I par des fibroblastes et des macrophages infectés par HSV-1 implique les RLR et l'adaptateur IPS1 (*IFN β -promoter stimulator 1*) (334, 335).

1.2.5.3.1.2 Réponse immune innée antivirale et apoptose induite par RIG-I et MDA5

RIG-I et MDA5 sont composés de deux régions de type CARD localisées dans l'extrémité N-terminale du détecteur. Suivant leur activation, RIG-I et MDA5 recrutent, via leurs domaines CARD, IPS1 (*IFN β -promoter stimulator 1*) aussi nommée CARDIF (CARD, *adaptor inducing IFN β*), VISA (*virus-induced signaling adaptor*) ou MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) (**Fig. 5**) (200, 281, 364, 434). L'adaptateur IPS1 est localisé au niveau de la membrane extérieure de la mitochondrie (coté cytosol) grâce à son domaine TM (*transmembrane domain*) et interagit avec les RLR via son propre domaine CARD (364). IPS1 dirige l'activation d'IRF3, de NF- κ B, d'AP1 et de la procaspases-8 en réponse à la stimulation des RLR (Fig. 5).

La localisation mitochondriale et les multiples domaines d'interaction recensés sur IPS1 différencient la signalisation induite par les RLR de celle stimulée par le TLR3 bien que les deux voies présentent de nombreuses similitudes. Une étude récente a permis de clarifier la voie induite par IPS1 en démontrant le rôle crucial de TRADD dans cette signalisation (282). Quand RIG-I et MDA5 détectent des ARN viraux et interagissent avec IPS1, TRADD est recruté par IPS1. TRADD recrute alors TRAF2, RIP1 et FADD (**Fig. 5**) (200, 282). RIP1 ubiquitinylé orchestre le recrutement de IKK α , IKK β et IKK γ qui conduisent à l'activation de NF- κ B. Parallèlement, TRAF3 interagit directement avec IPS1 et stimule TANK, TBK1, NAP1 et IKK ϵ induisant la phosphorylation, dimérisation et translocation nucléaire de IRF3 (**Fig. 5**) (346). IPS1 stimule également une voie dépendante de TRAF6 et MEKK1 qui induit l'activation de NF- κ B et des MAPK qui contrôlent à la fois la production de cytokines inflammatoires et d'IFN (**Fig. 5**) (438). FADD semble jouer un rôle prépondérant dans la réponse immune innée antivirale puisque des fibroblastes issus de d'embryon de souris (MEF, *murine embryonic fibroblasts*) déficientes en FADD présentent un production réduite d'IFN β et de cytokines inflammatoires en réponse au poly(I:C) (20). Plus récemment, il a été montré qu'en réponse à la détection cytosolique de poly(I:C) par RIG-I/MDA5, FADD associé à IPS1 induit le recrutement et l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 qui est essentielle pour induire la réponse inflammatoire dépendante de NF- κ B (392).

Plusieurs travaux ont porté sur l'apoptose induite par la transfection de poly(I:C) et les voies RIG-I et MDA5. Deux études ont montré que les cellules HeLa transfectées avec du poly(I:C) sont éliminées par apoptose en moins de 4 h via la formation d'un complexe formé de TRADD, FADD et de la procaspase-8 qui conduit à l'activation de la caspase-8, laquelle entraîne la stimulation subséquente des caspases 3, 7 et 9 (168, 169). Plus récemment, il a été montré que le poly(I:C) transfectée dans les HeLa induit l'apoptose non seulement via PKR mais également par l'intermédiaire d'IPS1 (272). Une étude récente a montré que la surexpression de IPS1 dans les HEK293 et les fibroblastes entraînait une apoptose dépendante des caspases via l'activation de la caspase-3 et de la caspase-9 (244). Une autre étude a montré que la surexpression de IPS1 dans les cellules HEK293 induisait une voie apoptotique caractérisée par l'induction des caspases 3, 8 et 9 (255). De plus, IPS1 interagit avec FADD et la procaspase-8 ce qui conduit à l'activation de cette caspase initiateur (255, 392). Ces études suggèrent donc que RIG-I et MAD5 induiraient l'apoptose par une voie déclenchée par la caspase-8. Toutefois, la localisation de IPS1 au niveau de la membrane mitochondriale est requise pour l'induction de l'apoptose suggérant que la voie apoptotique intrinsèque pourrait jouer un rôle dans l'activation de l'apoptose (244). Récemment, il a été montré que la transfection de poly(I:C) (ligand de MDA5) et d'ARN 5'-triphosphate (ligand de RIGI), sur des périodes de 24 et 17 h respectivement, tue les cellules cancéreuses issus de mélanomes humains par la voie apoptotique mitochondriale (30). De plus cet article montre que la transfection de ligands pour MDA5 et RIGI stimulent, via une voie dépendant exclusivement de IPS1, l'expression de diverses protéines pro-apoptotiques à domaines BH3 unique dont Noxa qui s'avère être essentiel pour induire l'apoptose dans ces cellules expliquant pourquoi l'apoptose apparaît tardivement après la transfection. Ainsi, dépendamment des types cellulaires, les RLR pourraient induire l'apoptose par une voie rapide et dépendante de la caspase-8 (ex : HeLa) ou par une voie plus lente nécessitant la stimulation de gènes pro-apoptotiques impliqués dans la voie mitochondriale (ex : cellules issues de mélanome).

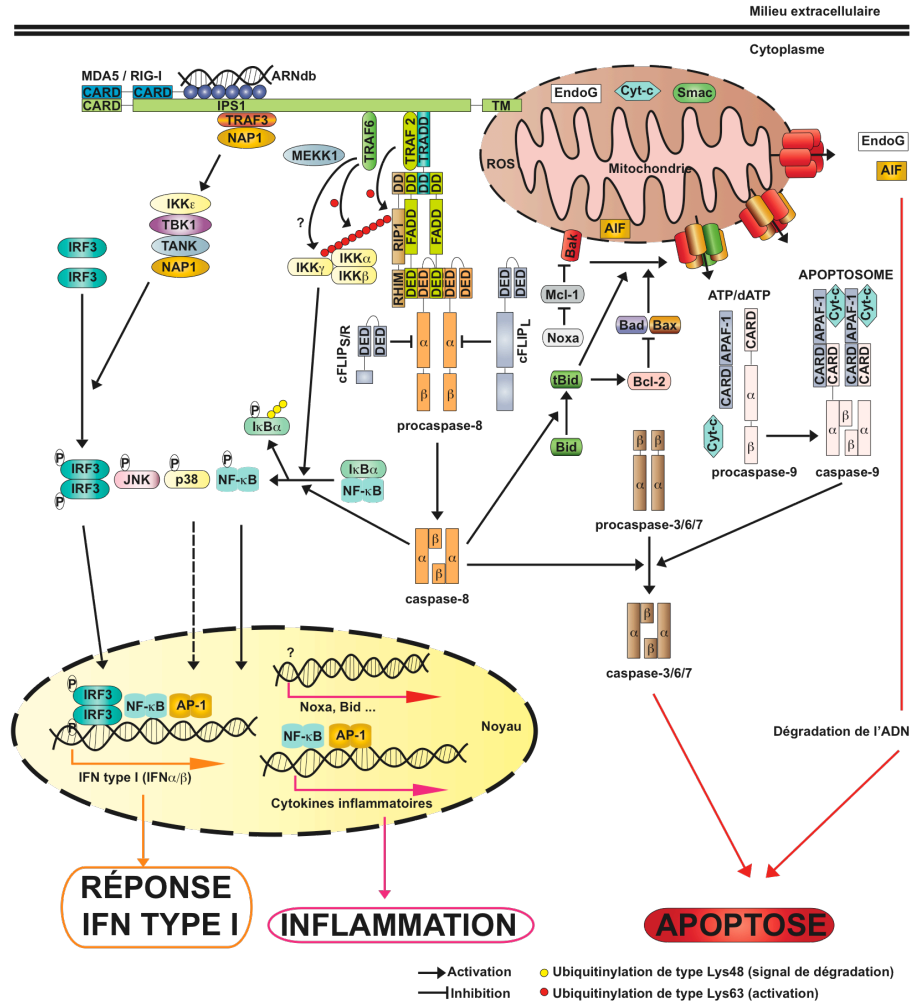


Figure 5 : Voies de signalisation induites par RIG-I et MDA5.

Modèle des voies de signalisation stimulées par RIG-I et MDA5 entraînant l'apoptose, l'inflammation et la réponse à l'IFN de type 1. Se référer au texte pour les détails mécanistiques.

1.2.5.3.2 Détection cytosolique des ARNdb et signalisation induite par PKR

La protéine kinase dépendante des ARNdb (PKR, *protein kinase double-stranded RNA-dependent*) est une protéine constitutivement exprimée dans les cellules de mammifères et son expression est stimulée par les IFN (337). PKR a fait l'objet de nombreuses études démontrant que cette protéine joue non seulement un rôle dans la réponse immune innée antivirale mais aussi dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire (64, 213, 241, 279, 323).

PKR est une sérine-thréonine kinase composée d'un domaine kinase (KD) et de deux domaines de fixation aux ARNdb nommés dsRBD (*double-stranded RNA binding domain*) qui régulent son activité (278). PKR interagit avec les ARNdb indépendamment de leurs séquences mais leurs longueurs ou leurs structures modulent son activité. En effet, PKR est activée par des séquences d'ARN de plus de 33 pb dont le poly(I:C) transfecté et des ARNdb présentant une structure secondaires portant une extrémité 5' triphosphate (31, 267, 294, 449). En absence de stimulation, PKR se présente sous la forme d'un monomère inactif à cause de l'effet inhibiteur que le domaine dsRBD exerce sur le domaine kinase. Après fixation des ARNdb sur le site dsRBD, PKR change de structure, homodimérise puis s'autophosphoryle rapidement (**Fig. 6**). La stabilisation du dimère assurée par phosphorylation permet d'induire l'activité kinase et la reconnaissance de substrats spécifiques (79, 85). Une fois activée, PKR induit la phosphorylation de plusieurs substrats dont la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (*α -subunit of eukaryotic translation initiator factor*). Ainsi, l'une des conséquences de l'accumulation d'ARNdb dans le cytoplasme de cellules infectées est l'inhibition de la traduction cellulaire et virale via la phosphorylation de eIF2 α (19, 240, 241, 381). PKR active également le facteur de transcription NF- κ B en activant le complexe IKK (formé de IKK α , IKK β et IKK γ) probablement par l'intermédiaire de RIP1 et des protéines TRAF2/5 (**Fig. 6**) (34, 121, 125, 187, 442). Lors d'une infection virale, d'un traitement avec du poly(I:C) transfecté ou avec des ARNdb d'origine virale, PKR favorise la production d'IFN de type I initiée par la voie des RLR en activant IRF3 probablement via TRAF3 (272, 303). De plus, PKR peut activer les voies de signalisation impliquant les MAPK p38 et JNK par une voie impliquant IPS1 (128, 446). PKR peut aussi interagir et phosphoryler p53 sur le résidu

Ser392 ce qui entraîne son activation (76, 77). De la sorte, PKR affecte l'expression de nombreux gènes contrôlant entre autre la survie cellulaire et l'apoptose (91, 141). L'inhibition de la synthèse protéique par PKR conduit à la disparition rapide de la cycline D1 et donc à l'arrêt du cycle cellulaire (336).

Plusieurs études ont démontré que l'inhibition du facteur eIF2 α par PKR induisait l'apoptose par blocage de la traduction (91, 122, 360, 378). Il a été montré que l'apoptose induite par PKR implique également l'activation de la procaspase-8 par FADD (**Fig. 6**) (18, 123) ; néanmoins, le ou les adaptateurs reliant PKR et le complexe FADD / caspase-8 n'ont pas encore été identifiés. De plus, il est connu que la transfection de poly(I:C) dans les HeLa active PKR et induit l'apoptose via l'activation de la caspase-8 (168, 169, 272). Enfin, la surexpression de Bcl-2 ou d'un homologue de Bcl-2 et l'utilisation d'inhibiteur de la caspase-9 bloquent en partie l'apoptose induite par PKR suggérant que la voie apoptotique mitochondriale est aussi impliquée (124, 242).

Dans le contexte d'une infection avec les HSV, PKR joue un rôle primordial dans l'élimination du virus puisque la réplication virale est augmentée dans des cellules et chez des souris déficientes pour PKR (204, 245). De plus, l'importance de PKR est soulignée par le fait que les HSV encodent deux inhibiteurs de la voie induite par ce détecteur d'ARNdb : Us11 et ICP γ 134.5. La protéine Us11 séquestre les ARNdb et interagit avec PKR de manière à bloquer son activation par les ARNdb (47, 208, 322). ICP γ 134.5 recrute la protéine phosphatase 1 α (PP1 α) qui déphosphoryle eIF2 α et permet le maintien de la synthèse protéique (65, 153). Les deux protéines, ICP γ 134.5 et Us11, sont requises pour que des cellules infectées par HSV-1 résistent à l'arrêt de la traduction protéique induit par l'IFN (290).

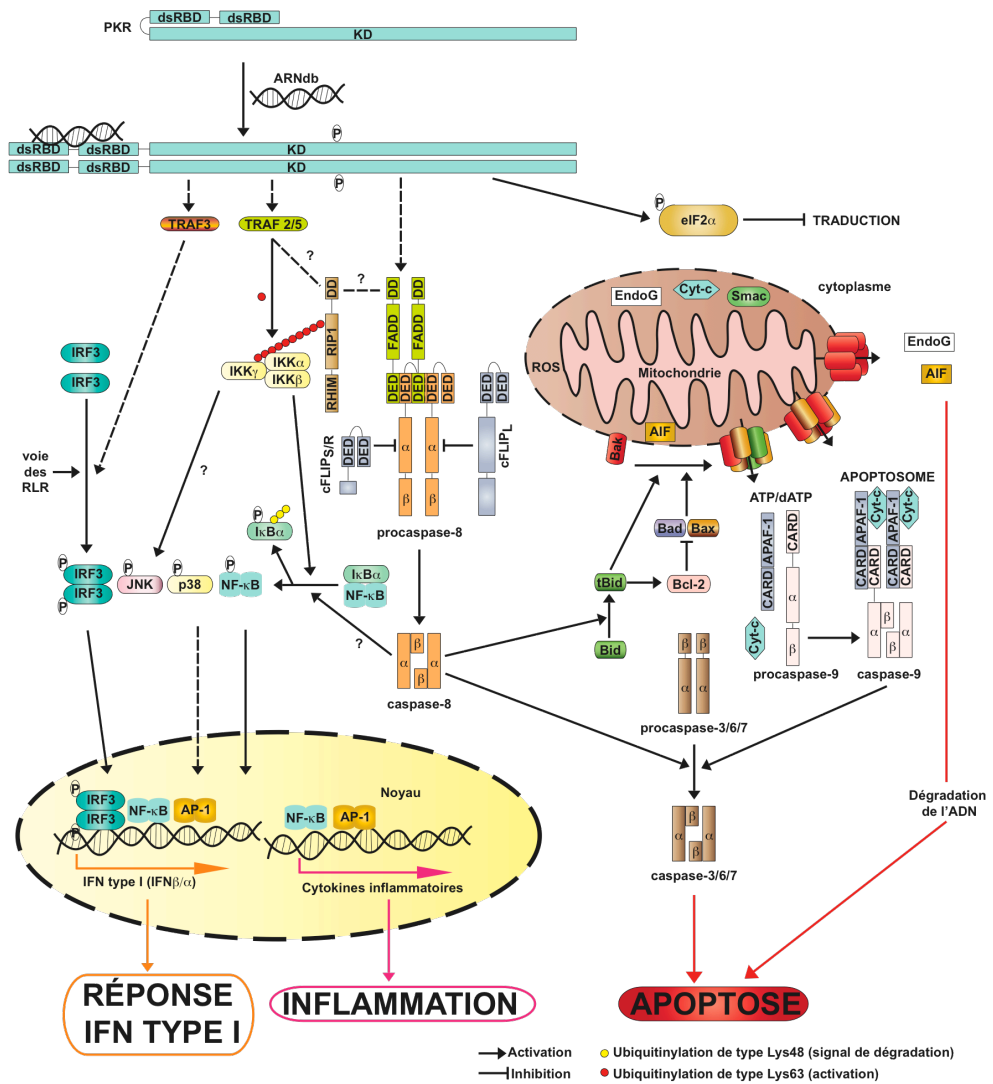


Figure 6 : Voies de signalisation induites par PKR.

Modèle des voies de signalisation stimulées par PKR entraînant l'apoptose, l'inflammation et la réponse à l'IFN de type 1. Se référer au texte pour les détails mécanistiques.

1.2.6 Apoptose et HSV

L'élimination des cellules hôtes par apoptose constitue un mécanisme de défense antivirale permettant de limiter la réplication et la dissémination des virus au sein de l'organisme (216). Toutefois, de nombreux virus ont développé des stratégies anti-apoptotiques originales afin de palier à l'élimination des cellules infectées; leurs études a d'ailleurs permis de faire progresser les connaissances des voies de l'apoptose et de la réponse innée antivirale (rev. 116). Les HSV ont développé de tels mécanismes anti-apoptotiques qui protègent les cellules hôtes des signaux pro-apoptotiques engendrés par le processus d'infection lui-même (signaux intrinsèques) et de la réponse immune antivirale de l'hôte (signaux extrinsèques) (rev. 134). Quelques facteurs viraux aux propriétés anti-apoptotiques ont été identifiés chez les HSV mais les mécanismes par lesquels ils agissent sont généralement méconnus.

1.2.6.1 Induction de l'apoptose durant l'infection

La première étude reliant l'infection au déclenchement de l'apoptose a montré que l'infection de cellules de type épithéliale Hep-2 avec HSV-1 en présence d'un inhibiteur de la traduction (CHX) causait l'apoptose des cellules infectées (215). Par la suite, il a été précisé que si la CHX est ajouté entre 0 et 3 heures post-infection (hpi), les cellules Hep-2 infectées meurent par apoptose puisqu'elles présentent différentes caractéristiques de l'apoptose notamment un bourgeonnement membranaire, la perte du potentiel membranaire mitochondrial, fragmentation de l'ADN nucléaire et l'activation de la caspase-3 (9). En revanche, l'addition de CHX à 6 hpi ou plus tard n'entraîne pas la mort des cellules infectées (12). Les conclusions de ces études sont que les facteurs pro-apoptotiques induisent l'apoptose avant 3 hpi et que les facteurs anti-apoptotiques sont synthétisés dans la cellule infectée entre 3 et 6 hpi. Cette période critique durant laquelle les facteurs anti-apoptotiques sont produits (entre 3 et 6 hpi) a été nommée fenêtre de prévention de l'apoptose. C'est durant cette fenêtre de prévention que sont produits les facteurs viraux qui protègent la cellule infectée de l'apoptose induite par l'infection elle-même (215) et par des signaux extrinsèques (135). Il est à noter qu'une infection par HSV-2 déclenche puis inhibe

l'apoptose selon une cinétique identique à celle observée durant une infection par HSV-1 (8, 9, 13, 118, 215, rev. 217).

Les causes du déclenchement du programme apoptotique durant le processus d'infection demeurent méconnues. Toutefois, une infection avec des virus HSV-1 préalablement irradiés aux ultraviolets n'induit pas l'apoptose démontrant que la fixation d'HSV-1 aux récepteurs cellulaires impliqués dans l'attachement et la fusion, la translocation de la capsidie dans la cellule hôte, l'injection d'ADN viral dans le noyau, la protéine α TIF/VP16 ou d'autres protéines de la particule virale ne sont pas impliquées dans l'induction de l'apoptose par HSV-1 (12, 353). Ces résultats suggèrent que l'expression des gènes très précoces qui a lieu entre 0 et 3 hpi est responsable de l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées par les HSV. En utilisant des mutants de délétions pour les gènes très précoces, l'équipe de Blaho a cherché à identifier les gènes induisant l'apoptose durant une infection par HSV-1 (352). En présence de CHX, l'apoptose induite par une infection avec des mutants d'HSV-1 déficients pour ICP4, ICP22 ou ICP27 est similaire à celle observée lors d'une infection avec le virus sauvage combinée avec un traitement à la CHX (181, 305, 352, 377). En revanche, la délétion du gène codant pour ICP0 (mutant 7134) réduit drastiquement la capacité d'HSV-1 à induire l'apoptose (41, 352). Le virus HSV-1 mutant *d106* exprimant notamment ICP0 et la GFP mais pas les protéines très précoces ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47 induit l'apoptose à un niveau similaire au virus sauvage suggérant qu'ICP0 est responsable de l'induction de l'apoptose (350, 352). De plus, l'expression individuelle d'ICP0 via un plasmide d'expression cause l'apoptose de cellules Hep-2 (352). Enfin, un virus mutant dont la traduction d'ICP0, mais pas la transcription, est inhibée via l'introduction d'une mutation non sens dans le cadre ouvert de lecture d'ICP0 (mutant *n212*) induit l'apoptose des cellules infectées en présence de CHX. Cette étude montre que ce n'est pas la traduction d'ICP0 qui est requise pour l'induction de l'apoptose par HSV-1 mais sa transcription. L'analyse informatique de l'ARNm d'ICP0 a montré qu'il pouvait former des ARNdb qui pourraient alors induire l'apoptose en déclenchant les voies de détection des ARNdb (352). Étant donné que la délétion d'ICP0 ne fait pas disparaître totalement l'apoptose induite lors d'une infection par HSV-1 en présence de CHX, il est probable que d'autres facteurs pro-apoptotiques d'origine cellulaire ou virale soient

impliqués. Par exemple, il a récemment été montré qu'ICP27 exprimé de manière inductible dans les cellules HeLa active p38 et induit l'apoptose (126).

1.2.6.2 Stimuli pro-apoptotiques extrinsèques durant l'infection

Chez les individus immunocompétents, la résolution de la primo-infection ou des récurrences est assurée par la réponse immune innée antivirale (impliquant les cellules infectées elles-mêmes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK) qui favorise l'élimination des cellules infectées et l'établissement subséquent d'une réponse immune adaptative spécifique aux HSV (impliquant les lymphocytes T et B) (rev. 59). Que ce soit durant la latence, la phase de réactivation ou la phase de réplication productive, les cellules infectées par les HSV sont soumises à des cytokines et des ligands des récepteurs de mort qui jouent un rôle prépondérant dans la réponse immune innée et adaptative contre les HSV. Par exemple, durant la réactivation, les kératinocytes et les cellules épithéliales des muqueuses sont rapidement infiltrés par des cellules dendritiques, des macrophages, des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ sécrétant notamment du TNF α , du FasL ou de l'IFN γ (rev. 78, rev. 99, 285, 287, 295, 330, 452). Durant la latence, les neurones infectés sont également soumis aux cytokines (TNF α et IFN γ) produites par les cellules immunitaires infiltrées dans les ganglions (rev. 206, rev. 207, 287). L'activité antivirale de ces cytokines corrèle avec leurs capacités à induire l'apoptose (53, 171, 431).

Il a été montré que le TNF α et le TNFR1 présentent une activité antivirale contre les HSV (57, 261). Le rôle du TNF α dans la résolution de l'infection a été mis en évidence par des études montrant que les taux d'encéphalite herpétique létale sont décuplés chez les souris déficientes pour le gène codant le TNF α ou le TNFR1 du fait de leurs incapacités à éliminer l'infection au niveau du système nerveux central (363, 414). Le FasL joue également un rôle dans l'élimination de l'infection herpétique (90, 171). Il a été montré que les infections létales par HSV-2 sont plus nombreuses chez les souris déficientes pour Fas ou FasL par rapport aux souris sauvages (171). De plus, l'activité pro-apoptotique du FasL issus des lymphocytes T cytotoxiques CD4⁺ joue un rôle primordial dans la lutte contre les infections herpétiques létales (171).

L'apoptose induite par l'infection a été observée *in vitro* dans les cellules transformées et les cellules tumorales ; en revanche, les cellules primaires testées jusqu'à présent se sont révélées être résistantes à l'apoptose induite par HSV-1 (10). Pourtant, l'apoptose des cellules infectées par HSV-1 ou HSV-2 a été observée dans les modèles animaux d'infection herpétique et chez l'homme (2, 5, 6, 82, 170, 308, 315). Comme observé *in vitro*, la sensibilité des cellules infectées à l'apoptose varie d'un type cellulaire à l'autre même *in vivo*. Ainsi, dans un modèle murin d'infection, il a été montré que l'activation de l'apoptose consécutive à une infection par HSV-1 ou HSV-2 varie d'un organe à l'autre et dépend du type cellulaire infecté (102). Par exemple, les cellules du cortex et de la médula des glandes surrénales sont très sensibles à l'infection et à l'apoptose induite par les HSV. Les cellules épithéliales de la cornée sont modérément sensibles à la fois à l'infection et à l'apoptose induite par HSV-1 et HSV-2 alors que les neurones des ganglions trigémés sont très sensibles à l'infection mais peu à l'apoptose induite par ces virus (102). L'origine des signaux déclenchant l'apoptose des cellules infectés *in vivo* n'a pas été identifiée mais l'apoptose pourrait provenir du processus d'infection lui-même ou de facteur extrinsèques. Il est d'ailleurs intéressant de signaler que des cellules apoptotiques non infectées peuvent être observées chez les souris infectées avec les HSV confirmant que l'infection entraîne la production de signaux pro-apoptotiques extrinsèques *in vivo*.

1.2.6.3 Protéines anti-apoptotiques encodées par les HSV

Malgré les multiples stimuli pro-apoptotiques issus de la réponse immune antivirale, les cellules infectées survivent suffisamment longtemps pour permettre la réplication des HSV. Plusieurs études montrent qu'une infection avec les HSV protège les cellules infectées de l'apoptose induite par des traitements au TNF α , FasL, granzyme B ou aux ultraviolets ; l'infection protège donc de nombreux stimuli apoptotiques rencontrés dans l'environnement de la cellule infectée (6, 118, 178, 218, 251, 441). Ces études suggèrent que les HSV encodent des protéines inhibant l'apoptose de manière directe ou par l'intermédiaire de protéines cellulaires dont plusieurs ont été identifiées (rev. 134). L'utilisation de virus déficients pour les gènes codant pour ICP4, ICP22 ou ICP27 a permis de montrer que ces protéines virales jouent un rôle dans la prévention de l'apoptose (9, 250). Cependant, il n'a pas été déterminé si ces protéines ont un rôle anti-apoptotique direct

ou si ces régulateurs transcriptionnels modulent l'expression de gènes cellulaires ou viraux possédant des propriétés anti-apoptotiques. Par exemple, ICP27 influence la signalisation par p38, JNK et NF- κ B (151, 209) et induit l'expression de la protéine virale Us5/gJ possédant des propriétés anti-apoptotiques (11).

Les preuves d'une prévention directe de l'apoptose par des protéines virales ont été accumulées pour la glycoprotéine D (Us6/gD) d'HSV-1, la glycoprotéine J (Us5/gJ) d'HSV-1, la protéine Us3 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliquant ces protéines virales sont peu détaillés pour le moment. Us6/gD est un gène tardif encodant pour une glycoprotéine présente en abondance à la surface du virion (148) et requise pour l'entrée du virus (rev. 155, rev. 339). Un virus HSV-1 mutant nul pour Us6/gD a une capacité moindre à inhiber l'apoptose induite lors de l'infection virale (450, 451). En revanche, l'expression ectopique de Us6/gD inhibe l'apoptose induite par une infection avec le mutant HSV-1 nul pour Us6/gD et celle induite par Fas via un mécanisme inconnu activant NF- κ B (276, 450).

Us5/gJ est une glycoprotéine virale exprimée avec une cinétique tardive. Des cellules T (Jurkat) infectées avec un virus HSV-1 portant une délétion du gène encodant Us5/gJ meurent par apoptose (177). De plus, l'expression de Us5/gJ, via un plasmide d'expression, protège partiellement les cellules T de l'apoptose induite par Fas (177). Enfin, un vecteur d'expression encodant Us5/gJ inhibe l'apoptose induite lors d'une infection avec un mutant d'HSV-1 nul pour Us6/gD (450).

Us3 est un gène tardif codant pour une sérine/thréonine kinase (341). Us3 inhibe l'apoptose induite lors d'une infection avec un virus HSV-1 déficient pour ICP4 ; de plus, une infection avec un virus nul pour Us3 induit une fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose (251). Plusieurs études ont montré que la protéine Us3 exprimée individuellement inhibait l'apoptose induite par l'expression des membres pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 notamment Bad, Bak et Bid probablement en phosphorylant ces derniers (45, 46, 291, 304). Plus récemment, il a été montré que Us3 inhibe l'apoptose induite par la surexpression de la procaspase-3 (29). Il est à souligner que puisqu'elles sont codées par des gènes tardifs, les protéines Us6/gD, Us5/gJ et Us3 sont produites après la fenêtre de prévention. Enfin, la R1 d'HSV-2 présente une fonction anti-apoptotique qui

protège notamment les cellules épithéliales de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Fas et TNFR1) en inhibant l'activation de la procaspase-8 via un mécanisme restant à déterminer (voir la section spécifique à la R1 d'HSV) (230).

1.3 Les ribonucléotides réductases

Les ribonucléotides réductases (RR) sont des enzymes formées de deux sous-unités (dénommées R1 et R2) qui synthétisent les quatre déoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) requis pour la réplication et la réparation de l'ADN en substituant le radical 2'-OH d'un ribonucléotide di ou triphosphate par un atome d'hydrogène. Bien que toutes les RR partagent un mécanisme catalytique commun, elles ont été séparées en trois groupes suivant la nature de leurs sous-unités et les cofacteurs utilisés pour la réaction de réduction (rev. 301). La suite de cette section focalisera sur la classe Ia qui regroupe les RR de tous les organismes eucaryotes, de certaines bactéries comme *Escherichia coli* (*E. coli*) et des virus à ADN comme les virus herpès. L'évolution moléculaire a permis à la sous-unité R1 des HSV d'acquérir, en plus de sa fonction RR, d'autres propriétés notamment une activité anti-apoptotique.

1.3.1 La ribonucléotide réductase de *E. coli* et des mammifères

L'élucidation de la structure tridimensionnelle des sous-unités de la RR d'*E. coli* a permis d'établir un modèle structural adaptable aux autres RR de classe Ia dont fait parti la RR des HSV (302, 401). La RR de classe Ia est composée de deux sous-unités R1 (α) et de deux sous-unités R2 (β) qui s'associent pour former un tétramère hétérodimérique ($\alpha_2\beta_2$). La sous-unité R2 comprend un radical tyrosyl stabilisé par un centre diférique qui est essentiel pour initier la réaction enzymatique au niveau du site catalytique de la R1 (rev. 97). La sous-unité R1 comprend le site catalytique de l'enzyme et généralement deux sites de régulation allostérique qui assurent à la fois la régulation de la spécificité de substrat et l'activité de l'enzyme.

L'activité générale de l'enzyme est contrôlée par le site d'activité dépendamment des niveaux de dATP et d'ATP. Quand l'ATP se fixe sur le site d'activité, la RR est activée tandis que la fixation du dATP inhibe l'activité enzymatique. Le mécanisme de régulation

allostérique permet également de réguler la spécificité de substrat et d'assurer une production équilibrée des désoxyribonucléotides via le site de spécificité. Ce dernier est régulé par les concentrations de dTTP, dGTP et ATP alors que le GTP n'influence pas l'activité enzymatique. Ainsi, en se fixant sur le site de spécificité, l'ATP stimule la réduction de CDP et de l'UDP. La fixation du dTTP induit la réduction du GDP et celle du dGTP stimule la réduction de l'ADP. Les acides aminés de la R1 principalement impliqués dans l'activité enzymatique sont : i) deux cystéines du côté N-terminal fournissant le groupe sulfhydryle au site actif, ii) trois cystéines à l'extrémité C-terminale impliquées dans le transfert du pouvoir réducteur au site actif, iii) deux tyrosines coté C-terminal impliquées dans le transfert d'électrons du radical tyrosyl de la R2 vers le site actif de la R1, iv) la séquence définissant le site de fixation des nucléotides (GxGxxG) (rev. 301). La réaction de réduction requière un donneur d'électron extérieur qui est la thiorédoxine ou la glutarédoxine pour les enzymes de classe Ia.

La RR des mammifères suit le modèle structurale et fonctionnel de celle d'*E. coli*. Néanmoins, l'expression des sous-unités de la RR des mammifères est régulée en fonction de l'état du cycle cellulaire. En effet, les sous-unités ne sont quasiment pas exprimées dans les cellules quiescentes (ex : les neurones) alors que leur expression est maximale durant la phase de synthèse de l'ADN (phase S) assurant ainsi une production de dNTP suffisante dans les cellules en division (rev. 338).

1.3.2 La ribonucléotide réductase des virus herpès

1.3.3 La ribonucléotide réductase des HSV

L'analyse des séquences génomiques des virus herpès α et γ a montré l'existence de gènes viraux codant pour de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire des nucléotides dont des RR virales (rev. 158, 274). Les HSV peuvent donc infecter des cellules dépourvues de RR cellulaire puisqu'ils codent une RR virale fonctionnelle fournissant les dNTP nécessaires à la réplication de leur ADN (70, 165, 231). Des alignements de séquences ont révélé que les acides aminés essentiels à l'activité catalytique de la RR d'*E. coli* (5 cystéines, 2 tyrosines, domaine de fixation des

nucléotides : GxGxxG) sont très conservés chez la R1 d'HSV-1 (ICP6), la R1 d'HSV-2 (ICP10) et la R1 humaine. Bien qu'appartenant à la classe Ia, la RR d'HSV présente des différences avec l'enzyme encodée par les cellules de mammifère et celle de *E coli*. En effet, elle n'est pas soumise à une régulation allostérique (14, 15, 233). De plus, contrairement à la R1 des mammifères qui est monomérique en absence de nucléotide, la R1 d'HSV est principalement dimérique (48, 166, 167, 193). Il est important de signaler que les sous-unités de la RR d'HSV ne peuvent pas s'associer avec les sous-unités cellulaires et n'interfèrent pas avec le cycle cellulaire (Chabaud S, Sasseville AMJ, Guilbault C, Massie B, Langelier Y, résultats non publiés 2002). Puisque les neurones n'expriment pas la RR cellulaire, la RR d'HSV joue un rôle primordial dans la pathogénèse virale *in vivo* : elle est essentielle à la réactivation virale dans les neurones infectés mais ne participe pas à l'établissement de la latence neuronale (37, 130, 131, 175).

En plus du domaine RR qui occupe la majorité de la protéine, les R1 d'HSV présente une extension amino-terminale nommée domaine N-terminal qui pourrait interagir avec le domaine RR (73, 299, 387). Ce domaine d'environ 400 acides aminés n'est pas impliqué dans l'activité RR et constitue une caractéristique unique de la R1 d'HSV-1 et de celle d'HSV-2 (74). Le domaine N-terminal comprend également une séquence présentant des similitudes avec le domaine α -cristallin (ACD, *alpha-crystallin domain*) des protéines de choc thermique (Hsp, *heat-shock protein*) et joue un rôle dans le bon repliement de la R1 (49). Il est à noter que la présence de nombreux acides aminés chargés dans l'extension N-terminale confère à la R1 d'HSV la particularité de migrer sur gel dénaturant d'électrophorèse aux alentours de 140 kDa alors que son poids moléculaire réel est de 125 kDa. La R2 d'HSV a un poids moléculaire de 38 kDa. La R1 d'HSV-2 pourrait être associée à la particule virale mature (373); toutefois, une étude plus récente a montré que la R1 d'HSV-1 (ICP6) n'est pas présente dans les virus matures (262). Des expériences d'immunofluorescence et d'expression de R1 couplée à la protéine fluorescente verte (GFP, *green fluorescent protein*) ont montré que la R1 d'HSV présente une localisation cytosolique diffuse alors que la R2 d'HSV se regroupe dans le cytoplasme en formant des foyers protéiques autour du noyau (49, 75).

Même si il est classé comme gène précoce, le gène UL39 codant pour la R1 d'HSV est exprimé durant la phase très précoce parce que son promoteur contient une séquence de fixation de l'activateur transcriptionnel α -TIF/VP16. Le gène UL40 codant pour la R2 d'HSV est exprimé durant la phase précoce (84, 389, 432, 433). Il est important de signaler que la quantité d'HSV-2 R1 accumulée dans les cellules infectées est dix fois supérieure à celle nécessaire pour assurer la synthèse des dNTP requis pour la réplication de l'ADN viral (Lamarche N, Langelier Y, résultats non publiés 1993).

1.3.3.1 La sous-unité R1 des HSV

Afin d'étudier la fonction de la R1 d'HSV, le gène entier (mutant HSV-1 ICP6 Δ) ou la partie codant pour le domaine RR (mutant HSV-1 *hrR3*) ont été supprimés du virus ce qui a permis de conclure en la nécessité de l'activité RR virale pour la pathogenèse et la réactivation des HSV (130, 132, 435). Toutefois, la présence d'une extension aminoterminal unique à la R1 d'HSV ainsi que son expression précoce et en très grand excès suggéraient que les sous-unités R1 virales pouvaient présenter d'autres fonctions en plus de l'activité RR.

En vue de cristalliser la R1 d'HSV, notre laboratoire a créé une protéine R1 amputée d'une grande partie du domaine N-terminal [mutant R1 Δ (2-357)] dont l'expression via un système adénoviral s'est révélée être pro-apoptotique (269). Par la suite, de plus amples études sur l'apoptose induite par cette protéine ont permis de mettre à jour la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2. Cette dernière est notamment capable d'inhiber l'apoptose induite par l'expression de la R1 Δ (2-357). De plus, la R1 d'HSV-2 exprimée seule protège les cellules épithéliales (cellules HeLa et A549) de l'apoptose induite par le TNF α et le FasL (exprimé via un vecteur adénoviral) mais n'inhibe pas l'apoptose induite par des stimuli activant la voie apoptotique intrinsèque (sur-expression de Bax, staurosporine, etoposide) (230). Contrairement à la R1 d'HSV, la R1 cellulaire ne protège pas de l'apoptose induite par le TNF α (48). La R1 d'HSV-2 inhibe l'apoptose induite par les récepteurs de mort en agissant soit au niveau soit en amont de la procaspases-8 de manière à inhiber l'activation de cette caspase initiatrice par les récepteurs de mort (230). L'importance de la fonction anti-apoptotique a été confirmée en montrant

que la résistance à l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ de cellules infectées avec des virus HSV-1 déficients pour la R1 (HSV-1 ICP6 Δ ou HSV-1 *hrR3*) était diminuée de 50 % par rapport à celle observée lors d'une infection avec la souche sauvage du virus (HSV-1 KOS) (230). Une grande partie du domaine N-terminal, y compris une partie du domaine α -cristallin, peut être supprimée sans affecter la fonction anti-apoptotique de la R1 (49). Toutefois, ces délétions compromettant le repliement et la solubilité de la protéine n'ont pas permis de délimiter avec précision la séquence du domaine N-terminal impliquée dans la fonction anti-apoptotique. En revanche, l'intégrité du domaine RR semble nécessaire pour la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2. Enfin, la zone d'interaction entre la R1 et la R2 n'est pas impliquée suggérant que la co-expression des deux sous-unités de la RR durant le cycle lytique d'HSV-2 ne devrait pas inhiber l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 (49).

D'autres groupes ont confirmé l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2. Une étude a montré que l'expression de la R1 d'HSV-2 protège les cellules Hep-2 de l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ (146). En revanche, les cellules Jurkat, une lignée dérivée de cellules T, meurent par apoptose lorsqu'elles sont transfectées avec un vecteur d'expression codant la R1 d'HSV-2 ou lorsqu'elles sont infectées avec HSV-2 (146). Cette étude suggère que les propriétés anti-apoptotiques de la R1 d'HSV-2 pourraient varier dépendamment du type cellulaire. Une autre étude a montré que les cellules PC12 différenciées en neurones et des neurones primaires murins infectés avec HSV-2 ou transfectés avec un vecteur d'expression de la R1 d'HSV-2 sont protégés de l'apoptose induite par une privation en facteur de croissance neuronal (317).

Le groupe d'Aurelian affirme depuis plusieurs années que le domaine N-terminal de la R1 d'HSV-2, mais pas celui de la R1 d'HSV-1, possède une activité protéine kinase (PK) (68, 69, 373). Toutefois, notre laboratoire et un autre groupe ont démontré que ni la R1 d'HSV-2 (232) ni la R1 d'HSV-1 (72) possèdent une activité kinase intrinsèque ; par contre les deux protéines virales sont de bons substrats pour des protéines kinases cellulaires, comme la caséine kinase II, qui co-purifie avec la sous-unité R1 virale. L'équipe d'Aurelian supporte l'idée que la R1 d'HSV-2 exerce son activité anti-apoptotique en stimulant la voie de survie dépendante de ERK1/2 via sa supposée activité PK (164, 316,

318, 374, 420). L'activation de ERK1/2 par la R1 d'HSV-2 entraînerait la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bag-1 (*Bcl-2 associated athanogene 1*) et XIAP, la stabilisation de Bcl-2, et la diminution de l'expression de Smac/DIABLO (316, 420).

Une fonction de protéine chaperonne attribuée au domaine α -cristallin a également été démontrée biochimiquement pour la R1 d'HSV-2. Cette activité chaperonne est aussi efficace que celle d'Hsp27 (48). Il est intéressant de signaler que dans des cellules en croissance exponentielle (exprimant la RR cellulaire), la croissance du virus mutant ICP6 Δ est sévèrement compromise à 39,5°C alors qu'elle est comparable au virus sauvage à 37°C. Ceci suggère que la fonction chaperonne de la R1 d'HSV-2 pourrait participer à l'efficacité de la production virale sous certaines conditions. Il est aussi possible que l'activité de chaperonne de la R1 puisse prévenir l'agrégation protéique durant la phase d'intense production des protéines virales. Au delà de son rôle dans la fonction de chaperon moléculaire, le domaine α -cristallin pourrait être impliqué dans l'oligomérisation des sous-unités R1 et le bon repliement de la protéine mais son importance vis à vis de la fonction anti-apoptotique est inconnue. Il a aussi été montré que la R1 d'HSV-1 s'associe avec eIF4G pour induire la formation du complexe eIF4F nécessaire au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm des eucaryotes (421). Via son domaine N-terminal, la R1 d'HSV-1 agirait comme une chaperonne permettant l'assemblage du complexe eIF4F et stimulant ainsi la traduction dans les cellules infectées (421).

1.3.4 Sous-unités R1 encodées par d'autres virus herpès

Le génome des virus herpès γ comme par exemple celui d'EBV encode des sous-unités R1 et R2 permettant de former une RR de classe Ia fonctionnelle (120). La R1 d'EBV présente un domaine RR proche de celui de la R1 d'HSV ayant conservé les cinq cystéines et les deux tyrosines importantes pour l'activité RR ainsi que la séquence de fixation du nucléotide (GxGxxG) (rev. 246). En revanche, le domaine N-terminal de cette protéine est plus court que celui de la R1 d'HSV. Pour le moment, il n'a pas été publié d'étude démontrant un potentiel anti-apoptotique des R1 codées par les virus herpès gamma.

Parmi les virus herpès β , le CMV humain, le CMV murin et HHV-7 possèdent un cadre ouvert de lecture codant pour une sous-unité R1 mais ils n'encodent pas de sous-unité R2. La fonction de ces R1 n'est pas la réduction des déoxyribonucléotides puisque les résidus d'acides aminés essentiels à l'activité RR sont absents de ces protéines (384, 428). De plus, des analyses biochimiques ont confirmé que les R1 d'HHV-7 et du CMV murin ne présentent pas d'activité RR (247, 384). Il est peu probable que sous la pression évolutive les virus herpès β aient conservé des séquences codant pour des sous-unités R1 si ces protéines ne jouent pas un rôle dans la pathogenèse virale. En effet, la R1 du CMV murin (M45) présente une activité anti-apoptotique qui est essentielle à la croissance virale dans les cellules endothéliales cultivées *in vitro* et à la pathogenèse virale *in vivo* (38, 247). Deux études ont montré que M45 agissait comme un inhibiteur viral de RIP1. Une première étude a montré que M45 bloque l'activation de NF- κ B et de p38 induite par le TNFR1 ainsi que l'activation de NF- κ B consécutive à une stimulation du TLR3 (265). Une seconde étude a montré que M45 inhibe l'apoptose induite par le TNF α , la surexpression de TRIF ou une infection avec un MCMV déficient pour M45 (403). Toutefois, les conclusions des deux études concernant les domaines de M45 important pour la fonction d'inhibiteur viral de RIP1 diffèrent. L'une a conclu qu'un motif RHIM, localisé dans le domaine N-terminal, est nécessaire à la résistance contre l'apoptose induite par le TNF α et la surexpression de TRIF (403). L'autre étude a conclu que le domaine C-terminal (domaine RR) de M45 est requis pour inhiber l'activation de NF- κ B induite par RIP1 alors que le domaine N-terminal n'est pas nécessaire (265). Une autre étude a montré que les cellules infectées avec des CMV humains déficients pour la R1 (UL45) sont plus sensibles à l'apoptose induite par la stimulation du récepteur Fas que les cellules infectées avec le virus sauvage suggérant que UL45 présente une fonction anti-apoptotique bien qu'elle diffère de M45 notamment par un domaine N-terminal plus court et l'absence de motif RHIM (312).

1.4 Objectifs et hypothèses du projet de recherche :

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier par quel mécanisme la R1 d'HSV-2 et éventuellement la R1 d'HSV-1 inhibent l'apoptose induite par les récepteurs de mort (voies induites par le TNF α et le FasL). Pour cela nous avons émis les hypothèses suivantes : la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 bloqueraient l'apoptose induite par le TNF α et le FasL en modulant soit l'expression, soit la stabilité soit l'activité de protéines clés contrôlant directement ou non l'activation de la procaspase-8 par la voie apoptotique extrinsèque.

Afin de tester nos hypothèses, les objectifs intermédiaires suivants ont été priorisés :

- Vérifier si la R1 d'HSV-1, comme la R1 d'HSV-2, inhibe l'apoptose induite par le TNF α et FasL.
- Déterminer l'impact de la R1 d'HSV sur l'activité, la synthèse et la stabilité des principales protéines possédant une activité pro ou anti-apoptotique impliquées dans la voie extrinsèque de l'apoptose.
- Identifier les partenaires moléculaires de la R1 d'HSV-1 et de la R1 d'HSV-2 ainsi que l'impact de ces interactions sur la fonction anti-apoptotique.

Le second objectif était de déterminer si les R1 d'HSV protègent les cellules infectées de l'apoptose induite par les ARNdb. Nous avons posé comme hypothèse que la R1 d'HSV pourrait inhiber l'apoptose induite par les ARNdb en bloquant l'activation de la procaspase-8.

Afin de tester nos hypothèses, les objectifs intermédiaires suivants ont été priorisés :

- Déterminer si une infection avec les HSV protège les cellules infectées de l'apoptose induite par le poly(I:C), un ARNdb synthétique.
- Déterminer si la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 bloque l'activation de la caspase-8 induite par le poly(I:C).
- Identifier les partenaires moléculaires de la R1 d'HSV-1 et de la R1 d'HSV-2 ainsi que l'impact de ces interactions sur l'apoptose induite par le poly(I:C).

Chapitre 2 : Résultats

Article 1 :**The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF-alpha- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8**

Auteurs : Florent Dufour, A. Marie-Josée Sasseville, Stéphane Chabaud, Bernard Massie, Richard M. Siegel et Yves Langelier.

Publication : article accepté avec demandes de corrections le 7 août 2010 par Apoptosis.

Contribution personnelle :

- J'ai planifié et réalisé les expériences présentées dans cet article, exception faite des figures 3a et 3c. J'ai analysé et interprété les résultats générés et j'ai écrit l'article avec l'aide de mon directeur de thèse, Yves Langelier.

Contribution des coauteurs :

- A. Marie-Josée Sasseville a étudié l'effet de l'expression de la R1 d'HSV-2 sur les kinases ERK1/2 et Akt et a réalisé les figures 3a et 3c de l'article.
- Stéphane Chabaud a participé à l'étude de l'effet de l'expression de la R1 d'HSV-2 sur la kinase Akt.
- Bernard Massie a fourni des constructions plasmidiques et des vecteurs adénoviraux.
- Richard M. Siegel a fourni des constructions plasmidiques.
- Yves Langelier a joué un rôle déterminant au niveau de la conception et de la planification des expériences ainsi que dans la rédaction de l'article.

The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8

Florent Dufour¹, A. Marie-Josée Sasseville¹, Stéphane Chabaud^{1†}, Bernard Massie²⁻⁴, Richard M. Siegel⁵ and Yves Langelier^{*1,2,6}

¹Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du cancer de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, QC, Canada

²Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, QC, Canada

⁴Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada

⁵Immunoregulation Unit, Autoimmunity Branch, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

⁶Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

[†]Present address: Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), Université Laval, Québec, QC, Canada

* Correspondence: Yves Langelier, CRCHUM–Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, QC, Canada H2L 4M1.

ABSTRACT

HSV-2 R1, the R1 subunit (ICP10) of herpes simplex virus type-2 ribonucleotide reductase, protects cells by interrupting death receptor-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation. Here, we demonstrated that individually-expressed HSV-1 R1 (ICP6) shares, with HSV-2 R1, the ability to protect cells against tumor necrosis factor- α - and Fas ligand (FasL)-induced apoptosis. As the long-lived Fas protein remained stable during the early period of infection, we could establish that HSV-1 R1 is essential for the protection of HSV-1-infected cells against FasL. Investigation of the molecular mechanism underlying HSV-2 R1 protection showed that the extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt pathways do not play an essential role in this function. Interaction studies revealed that HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interacted constitutively with caspase-8 when expressed either alone or with other viral genes during HSV infection. The HSV-2 R1 deletion mutant R1(1-834)-GFP and Epstein-Barr virus (EBV) R1, which did not show antiapoptotic activity, did not interact with caspase-8, indicating that interaction is required for the antiapoptotic function. HSV-2 R1 impaired caspase-8 activation induced by caspase-8 over-expression, suggesting that interaction between the two proteins prevents caspase-8 dimerization/activation. HSV-2 R1 bound to caspase-8 directly through its prodomain but did not interact with either its caspase domain or Fas-associated death domain protein (FADD). Interaction between HSV-2 R1 and caspase-8 disrupted FADD-caspase-8 binding. Thus, early during the lytic cycle, HSV R1s act as viral inhibitors of apoptosis by directly binding to caspase-8 in a way that impairs its activation by death-receptor stimulation.

INTRODUCTION

The tumor necrosis factor (TNF) superfamily of ligands, acting through cognate death receptors (DRs), plays a critical role in innate and adaptive immune responses to viruses. The antiviral activity of several of these ligands often correlates with their ability to induce apoptosis initiated by the triggering of DRs [1-3]. TNF α , which acts mainly through binding to TNF receptor 1 (TNFR1), has been reported to have antiviral activity against herpes simplex viruses (HSVs) [4,5]. HSV-1-infected mice knocked-out for TNF α develop HSV encephalitis due to an impaired immune response which fails to clear the virus from the brain [6]. Fas ligand (FasL), expressed on cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, is also important in the elimination of infected cells. Recently, Fas-mediated apoptosis of HSV-2-infected cells involving CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes was shown to be crucial in mice defense against lethal infection [3]. The importance for HSVs to counteract DR activation is furthermore evidenced by the diverse strategies used by these viruses to block DR signaling pathways. At least 2 viral proteins, the ribonucleotide reductase (RR) R1 subunit of HSV-2 (HSV-2 R1) and the virion host shutoff protein (vhs), have been hypothesized to interfere with these pathways [7,8].

Ligand binding to DRs triggers the recruitment of death domain (DD)-containing adaptor proteins to the DD of receptors, resulting in the formation of membrane-bound signaling complexes. Important differences exist between Fas and TNFR1 activation, not only in terms of signaling complexes but also function, Fas exhibiting mainly pro-apoptotic behavior, and TNFR1, mostly proinflammatory activity. Upon FasL-Fas binding, Fas-induced apoptosis involves recruitment of the Fas-associated death domain protein FADD to Fas. Receptor-bound FADD forms a death-inducing signaling complex (DISC) with caspase-8. Aggregation of proteins in DISC initiates the cleavage of caspase 8 and triggers the caspase cascade [reviewed in 9]. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP), by inhibiting the recruitment of caspase-8 to DISCs, negatively modulates the caspase cascade [10,11]. FLIP was originally identified as a viral gene, viral FLIP (v-FLIP), present in γ -herpes viruses, such as equine herpes virus-2, herpes virus saimiri and human herpes virus-8 (HHV-8) [reviewed in 12].

TNF α -induced signaling involves the formation of 2 sequential signaling complexes [13,14]. Upon TNF α binding to TNFR1, a first complex consisting of TNF α receptor-associated death domain protein (TRADD), Ser/Thr kinase receptor-interacting protein 1 (RIP1) and TNF α receptor-associated factor 2 (TRAF2) is formed [reviewed in 15]. This membrane-associated complex (complex I) rapidly leads to the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), p38 MAPK and ERK1/2. Activation of these pathways stimulates the transcription of genes that regulate proliferation, inflammation or apoptosis, including the key antiapoptotic cellular inhibitor of apoptosis (cIAPs) and c-FLIP [reviewed in 16,17]. In a second step, TRADD and RIP1 form an intracellular complex (complex II) with FADD. FADD recruits caspase-8 by death-effector domain (DED) interaction, allowing the dimerization and activation of caspase-8 that initiates the apoptotic process [13,14]. The outcome of TNFR1 stimulation depends on the balance between signals triggered by both complexes, the activation of NF- κ B by complex I playing an essential role in protecting cells against apoptosis [18]. With several cell lines, such as HeLa cells, induction of apoptosis by TNF α critically depends on the presence of cycloheximide (CHX), which, by drastically reducing the levels of the short-lived proteins c-FLIP_L and c-FLIP_S, increases caspase-8-FADD interaction [10].

HSV RRs convert ribonucleotide diphosphates to corresponding deoxyribonucleotides, permitting HSV replication in non-dividing cells [19]. The association of 2 homodimeric subunits, denoted as R1 and R2, forms the holoenzyme. HSV R1s carry the RR domain and a unique NH₂ domain of about 400 amino acids dispensable for RR activity [20,21]. Several non-RR related functions have been associated to HSV R1s [22,7,23,24]. The presence in the HSV R1s N terminus of a stretch exhibiting weak similarity with the α -crystallin domain of the small heat shock proteins (sHsps) led to the observation that HSV-2 R1 possesses a chaperone activity similar to Hsp27. Moreover, HSV-1 R1 promotes protein translation in growth-arrested cells by stimulating the assembly of translation initiation factors eIF4F likely through its molecular chaperone activity [22]. In addition to its RR activity, HSV-2 R1 exhibits antiapoptotic properties [24,7]. It has been proposed that HSV-2 R1 could impair apoptosis induced by the mitochondrial pathway by activation of the ERK1/2 pathway via a putative intrinsic protein

kinase activity associated to its NH₂ domain [24]. However, extensive biochemical studies on HSV-1 R1 and HSV-2 R1 demonstrated that both proteins are devoid of intrinsic kinase activity [25,26]. We have shown that HSV-2 R1, when expressed alone, blocks DR-induced apoptosis but does not impair apoptosis triggered via the mitochondrial pathway [7]. The RR domain of HSV-2 R1 is essential for protection against TNF α -induced apoptosis, whereas the NH₂ domain is dispensable [27]. The mechanism involved in antiapoptotic activity remains unknown, but HSV-2 R1, which interrupts DR-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation, does not act as an enzymatic inhibitor of active caspase-8. The main objective of the present report was to better understand how HSV R1s behave at the molecular level to prevent TNF α - and FasL-induced apoptosis.

Our observation that 2 HSV-1 R1 null mutants, ICP6 Δ and hrR3, exhibited a 50% reduction in antiapoptotic potential against TNF α provided proof that HSV-1 R1 is important for protecting infected cells against this DR ligand. Additionally, as 50% of cells infected with R1 null mutants were resistant to TNF α , we postulated that other viral protein(s) contribute to protection. Since deletion of the *vhs* gene reduced antiapoptotic potential by 30%, we proposed that vhs protein, by decreasing the amount of DRs at the cell surface, could play a significant role in resistance [7]. Our hypothesis was later substantiated by the finding that, owing to the very short half-life of TNFR1 protein, *vhs* is involved in the rapid reduction of TNFR1 early after HSV-1 infection [8].

Here, we demonstrate that individually-expressed HSV-1 R1 shares with HSV-2 R1 the ability to protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis. Since the level of the long-lived Fas protein [28] remains stable during the early period of infection, we tested FasL to better assess the importance of HSV-1 R1 in protecting HSV-infected cells against DR-induced apoptosis. Thus, we established that HSV-1 R1 is essential for the protection of HSV-1-infected cells against FasL. Investigation of the molecular mechanism underlying HSV R1 protection showed that HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interact constitutively with caspase-8 when expressed either individually or with other viral genes during HSV infection. Evidence was provided that interaction between the 2 proteins impairs caspase-8 dimerization/activation. The interaction between HSV-2 R1 and caspase-8 disrupts FADD-caspase-8 binding. These results suggest that HSV R1s are viral caspase-8 inhibitors that

are functionally similar to viral inhibitor of caspase-8 activation (vICA), the UL36 gene product of human cytomegalovirus (CMV).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines : The conditions for culture of HeLa, A549-tTA and A549-tTA-HSV-R1-GFP cells have already been described [27,7]. When cultured in the absence of anhydrotetracyclin (Tet), A549-tTA-HSV-R1-GFP cells express HSV-2 R1 fused to green fluorescent protein (GFP) [27].

Infection : The previously-described adenovirus (Ad) recombinants AdCMV5-GFP, AdCMV5-R1, AdTR5-GFP, AdTR5-R1-GFP and AdTR5-R1(1-834)-GFP express GFP, HSV-2 R1, GFP, HSV-2 R1-GFP and HSV-2 R1(1-834)-GFP, respectively [7]. HeLa cells (2×10^5 cells/well, 2.5×10^6 cells/100-mm dish) were infected at 15 plaque forming unit (PFU)/cell with AdCMV5-R1 or AdCMV5-GFP. A549-tTA cells (2.5×10^6 cells/100 mm dish) were infected with AdTR5-R1-GFP (10 PFU/cell), AdTR5-R1(1-834)-GFP (50 PFU/cell) or AdTR5-GFP (25 PFU/cell). For infection followed by transfection, HeLa cells (2×10^5 cells/well) were infected with AdCMV5-R1 or AdTR5-CuO (10 PFU/cell) for 8 h before transfection. For HSV infections, HeLa and A549-tTA cells (2.5×10^6 cells/100-mm dish) were infected at 10 PFU/cell with the HSV-1 R1 null mutant ICP6 Δ [19] or its parental wild type (WT) HSV-1 strain KOS.

Transfection : HeLa cells were seeded 1 day before transfection in 6-well plates at a concentration of 2×10^5 per well or in 100-mm dishes at 1.5×10^6 per dish. The calcium phosphate technique was used to transfect 10 μ g per well and 50 μ g per dish of the plasmids pAdCMV5 (empty), pAdCMV5-R1 (HSV-2 R1); pLBPF1-GST (GST), pLBPF1-GST-R1 (GST-HSV-1 R1) (kindly provided by A. Pearson); pcDNA3 (empty), pcDNA3-HA-EBV R1 (HA-EBV R1) [29]; pEGFP C1 (GFP) and plasmids encoding for caspase-8 GFP (casp-8 GFP), caspase-8 C360S GFP (casp-8 C360S GFP), caspase-8 DED-AB (1-209) GFP (casp-8 DED-AB GFP), caspase-8 CD (210-479) GFP (casp-8 CD GFP) and FADD YFP [30].

Apoptosis and caspase assays : Apoptosis was induced by adding to the cellular medium either CHX (15 μ g/ml; Sigma) alone as control or CHX (15 μ g/ml) plus human recombinant TNF α (2.5 ng/ml; Sigma) or hexameric FasL (Fc:FasL, a human recombinant FasL fused at the C terminus of the Fc domain of IgG1) [31]. After 6 to 8 h of treatment,

the percentage of apoptotic cells was scored by microscopy in at least 5 randomly-selected fields, as described previously [7]. Attached and detached cells were then collected, washed twice in PBS and lysed with buffer appropriate for subsequent assays. Caspase-3/7 activity (DEVD-AFC cleavage) was measured [7].

Immunoprecipitation : After infection, transfection and/or treatment, attached and detached cells were collected, washed twice with PBS, and lysed at 4°C for 15 min in a buffer containing 0.5% Nonidet-P40, 0.5% Triton X-100, 50 mM Hepes (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Roche), followed by centrifugation (10 min at 10,000 × g at 4°C). Lysates were pre-cleared by incubation with protein G Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) for 2 h at 4°C, followed by centrifugation. Anti-GFP antiserum or caspase-8 monoclonal antibody (mAb) 1C15 (kindly provided by Marcus E. Peter [32]) was incubated with protein G Sepharose 4B beads for 2 h at 4°C. Pre-cleared lysates were incubated with antibody-coated beads for 2 h at 4°C. The beads were recovered by centrifugation, washed 5 times with lysis buffer, and immunoprecipitated. Proteins were eluted by boiling in sodium dodecyl sulphate (SDS) sample-loading buffer. As controls, pre-cleared lysates were incubated for 2 h at 4°C with protein G Sepharose beads alone.

***In vitro* interaction assays :** Glutathione-S-transferase (GST), GST caspase-8 (GST casp-8) [33], GST caspase-8 DED-AB (amino acids 1-180) (GST casp-8 DED-AB) and GST caspase-8 CD (amino acids 181-478) (GST casp-8 CD) [34] were produced in *Escherichia coli* BL21DE3 after induction by isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (0.1 mM) at 37°C. Recombinant GST fusion proteins were purified by affinity absorption with glutathione sepharose 4B beads (Amersham). GST fusion proteins pre-coupled to glutathione sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) were incubated at 4°C for 1 h with 1 μg of HSV-2 R1 purified by peptidaffinity from production in bacteria (pET-R1) or in human 293S cells (BM5-R1) [26]. The beads were recovered by centrifugation and washed 5 times. Bound proteins were eluted by boiling in SDS sample-loading buffer and immunoblotted with anti-R1 serum 168R1.

Protein extraction and immunoblot analysis : Whole cell extracts were prepared by lysis in SDS buffer (2% SDS, protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor

cocktail), followed by brief sonication and centrifugation. Conditions for cytosolic and nuclear protein fraction extraction have been described previously [35]. Protein content was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting [36]. mAbs against caspase-8 (1C12) and phospho-p42/44 ERK1/2 (Thr202/Tyr204; E10), and polyclonal antibodies against p42/44 ERK1/2, Akt, phospho-Akt (Thr308), JNK and phospho-JNK (Thr183/Tyr185), were from Cell Signaling Technology. mAbs directed against FADD (A66-2), TRADD (clone 37) and RIP1 (G322-2) were from BD Biosciences. Anti-TNFR1 (H-5), α -tubulin, I κ B α (C-21), NF- κ B p65 (C-21) and GFP (B-2) mAbs were from Santa Cruz Biotechnologies. mAb AC15 against β -actin was from Abcam, and c-FLIP (NF6), from Alexis Biochemicals. Polyclonal anti-R1 serum 168R1 and polyclonal anti-R2 serum P9 served for HSV R1s and HSV R2s detection, respectively [7,37]. Polyclonal antiserum against GFP was used for HSV-2 R1-GFP and GFP detection [27]. Immunoblotting was quantified with Quantity One software (Bio-Rad).

RESULTS

HSV-1 R1 protects cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis

Indirect evidence that HSV-1 R1 contributes to the resistance of HSV-infected cells to CHX+TNF α came from our observation that deleting R1 in HSV-1 strain KOS decreased antiapoptotic potential by 50% [7]. To firmly establish that individually-expressed HSV-1 R1 impairs apoptosis induced by TNF α or FasL, HeLa cells were transfected with an expression plasmid encoding HSV-1 R1 fused to GST or, for comparison, with an HSV-2 R1 expression plasmid. In these experiments, we also tested a plasmid encoding for EBV R1 (RR active). Treatments with CHX+TNF α or highly cytotoxic hexameric FasL (Fc:FasL [31]) were performed 48 h after transfection with ligand concentrations that induced apoptotic morphology in more than 95% of control cells. Caspase-8 activation was assessed by probing for the full-length and processed forms of caspase-8. Caspase-3/7 activation was quantified by *in vitro* enzymatic assay with DEVD-AFC as substrate. As illustrated in Fig. 1a and 1b, the expression of either HSV-1 R1 or HSV-2 R1 did not activate caspase-8 and -3/7 whereas EBV R1 expression produced a small increase in caspase-3/7 activity (Fig. 1b), indicating that EBV R1 – but neither of the 2 HSV R1s – was slightly proapoptotic in HeLa cells. Both HSV-1 R1 and HSV-2 R1 greatly reduced caspase-8 and -3/7 activation produced by ligand treatment whereas EBV-R1 did not (Fig. 1). These results demonstrate that the R1 of both types of HSVs but not that of EBV can protect cells against TNF α and FasL.

HSV-1 R1 is essential for protection against activation of long-lived DR Fas by FasL

To better assess the importance of HSV-1 R1 in protecting HSV-infected cells against DR-induced apoptosis, we sought to circumvent the problem associated with TNFR1 instability. As Fas has been described to have a longer half-life than TNFR1 [28], we first compared the fate of the 2 receptors after infection with WT HSV-1 KOS or its R1 null mutant ICP6 Δ [19]. As seen in Fig. 2a, TNFR1 in total cell lysates of KOS- and ICP6 Δ -infected HeLa cells decreased regularly from 2-h post-infection but, even at 8 h, it was still present, albeit at a very low level. The rate of TNFR1 disappearance was similar for both viruses, indicating that HSV-1 R1 does not affect the rate of TNFR1 reduction

(Fig. 2a). Most importantly, Fas level remained almost unaltered during the same period. The experiments were repeated with A549-tTA cells or with HSV-2 infection, and similar results were obtained (data not shown). CHX was employed to confirm that Fas has a much longer half-life than TNFR1 (>8 h versus ~1 h) (Fig. S1a) and that cells expressing very low TNFR1 levels can be sensitive to TNF α -induced apoptosis (Fig. S1b and S1c). Two conclusions can be drawn from these findings. First, even if TNFR1 protein level decreases drastically after HSV infection, it is still present at 8 h after infection. Second, protein stability appears to be a key determinant of the fate of DRs during HSV infection.

As Fas levels remained unaltered during the first 8 h of infection, the effect of deleting the HSV-1 R1 gene on protection against FasL was studied by infecting HeLa cells with either WT KOS or ICP6 Δ . After 6 h of 50 μ g/ml Fc:FasL exposure, more than 99% of the cells in mock- and ICP6 Δ -infected samples were apoptotic, as determined by morphological criteria, whereas less than 5% of them were apoptotic in KOS-infected samples. Examination of caspase-8 (Fig. 2b) and -3/7 (Fig. 2c) activation showed that protection against Fc:FasL was completely lost by deleting R1. For all the experiments involving ICP6 Δ , exponentially growing cells were used to prevent the inhibition of translation of viral mRNAs, which would occur if the cells were growth-arrested [22]. Evidence that the synthesis of viral proteins was not impaired in our ICP6 Δ -infected cells was obtained from the observation that the R2 subunit of HSV RR (Fig. 2a and 2b) and the infected cell polypeptide 0 (data not shown) accumulated at similar rate in cells infected with either KOS or ICP6 Δ . This made unlikely the possibility that the antiapoptotic defect of ICP6 Δ against FasL is related to a lower ability of the cells to support the synthesis of viral polypeptides. Together, these data clearly established that HSV-1 R1 is essential for protecting HSV-infected cells against FasL.

Protection from TNF α -induced apoptosis does not require ERK1/2 or Akt activation

The role of the ERK1/2 and PI3-K/Akt signaling pathways in controlling apoptosis is well-known [reviewed in 38,39], and it has been shown that ERK1/2 or PI3-K/Akt activation can confer resistance to ligands of the TNF superfamily [40,41]. Moreover, it has been reported that cells constitutively expressing HSV-2 R1 exhibit activation of the

ERK1/2 signaling pathway [42] and that such activation could be involved in HSV-2 R1 antiapoptotic activity [24].

To study the effect of HSV-2 R1 on ERK1/2 and Akt phosphorylation, we first took advantage of our A549-tTA-HSV-R1-GFP cell line, in which expression of the chimeric protein HSV-2 R1-GFP is controlled by TR5, a Tet-responsive promoter. When these cells are kept in the OFF state in the presence of Tet, HSV-2 R1-GFP expression is shut down and the cells can be killed by CHX+TNF α treatment. Switching ON HSV-2 R1-GFP expression upon Tet removal for 24 h induces HSV-2 R1-GFP expression and full protection against TNF α - and FasL-induced apoptosis [27]. ERK1/2 and Akt activation was measured with antibodies recognizing the activated/phosphorylated forms of Thr202/Tyr204-ERK1/2 and Ser473-Akt in A549-tTA-HSV-R1-GFP cell extracts at 24 h after switching on HSV-2 R1 expression. As depicted in Fig. 3a, HSV-2 R1-GFP expression did not significantly affect the level of either phospho-ERK1/2 or phospho-Akt (similar data were obtained in 5 independent experiments). As this result was contradictory to the above-mentioned report of ERK1/2 activation in 293 cells, we examined the phospho-ERK1/2 level in 293 cells inducibly expressing HSV-2 R1 (293-rtTA-HSV-2-R1 cells). Once again, we did not detect significant ERK1/2 activation after switching on HSV-2 R1 expression (data not shown).

TNF α is known to induce transient cell type-dependent activation of ERK1/2 [43]. To determine whether HSV-2 R1 could influence this transient activation, we investigated the effect of switching on HSV-2 R1-GFP expression for 48 h in A549-tTA-HSV-R1-GFP cells on the time course of TNF α -induced ERK1/2 phosphorylation. As expected, in cells kept in the OFF state, TNF α elicited an increase in ERK1/2 phosphorylation that peaked between 15 and 30 min after treatment (Fig. 3b). HSV-2 R1-GFP-expressing cells treated with CHX+TNF α exhibited a pattern similar to that of control cells in terms of level and time course of ERK1/2 phosphorylation (Fig. 3b).

To further assess the involvement of the ERK1/2 pathway in HSV-2 R1 protection from TNF α -induced apoptosis, the impact of PD98059, a specific pharmacological inhibitor of mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK1/2) [44], was examined. Measurements of caspase-3/7 activity revealed that the presence of PD98059

during CHX+TNF α treatment did not alter the protection afforded by HSV-2 R1 expression (Fig. 3c). The efficiency of the inhibitor was ascertained by showing that it caused the disappearance of basal phospho-ERK1/2 level in serum-starved cells (Fig. 3a) and a strong reduction of ERK1/2 phosphorylation induced by serum addition (Fig. 3c). Similar experiments with LY294002, a specific inhibitor of PI3-K [45], did not disclose any effect on HSV-2 R1 protection against TNF α -induced apoptosis (data not shown). Altogether, these results suggested that the MEK/ERK1/2 and PI3-K/Akt pathways do not play an essential role in HSV-2 R1 protection against TNF α .

HSV-2 R1 does not act through NF- κ B or JNK activation

As HHV-8 v-FLIP/K13 protein, which can interfere with TNF α -induced apoptosis, exhibits the ability to constitutively activate NF- κ B by interacting with I κ B kinase complex (IKK) [12], we sought to determine whether HSV-2 R1 would similarly activate NF- κ B signaling. Moreover, as complex I formation after TNF α stimulation is known to lead to the rapid degradation of I κ B proteins and to the phosphorylation of NF- κ B dimeric transcription factor, which translocates to the nucleus to activate many antiapoptotic genes [reviewed in 9], it was also interesting to study the effect of HSV-2 R1 on NF- κ B activation by TNF α . To this end, we evaluated the impact of turning on HSV-2 R1-GFP expression in our A549-tTA-HSV-R1-GFP cells on I κ B- α degradation (Fig. 4a) and phosphorylation of the major NF- κ B subunit p65 on Ser536 (data not shown). Nuclear translocation of p65 was also examined both by cellular fractionation (Fig. 4a) and immunofluorescence staining (Fig. S2). The results showed that HSV-2 R1-GFP expression for 48 h did not either constitutively activate NF- κ B or affect NF- κ B activation by TNF α .

After TNF α treatment, activation of the JNK pathway by complex 1 has been described as being either anti- or proapoptotic, depending on the cellular context [46]. Fig. 4b illustrates that the TNF α -induced increase in JNK(Thr183/Tyr185) phosphorylation, which peaked at 30 min, was not influenced by HSV-2 R1-GFP expression. Altogether, these results suggested that the protection against TNF α -induced apoptosis afforded by HSV-2 R1 does not involve alteration in the NF- κ B and JNK signaling pathways.

HSV-2 R1 does not modify the accumulation of Fas, FADD, TRADD, RIP1 and c-FLIP

Since we had demonstrated that HSV-2 R1 protects cells against TNF α -induced apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation [7], we examined whether HSV-2 R1 expression could modify the accumulation of key proteins involved in the assembly of death complexes and consequently decrease cellular sensitivity to apoptosis. Using Ad recombinants to express HSV-2 R1 in HeLa cells, we analyzed TNFR1, Fas, TRADD, FADD, RIP1 and caspase-8 protein accumulation by immunoblotting either in the control condition or after DR activation with TNF α , CHX+TNF α or Fc:FasL. We did not detect any modification in Fas, FADD, TRADD, RIP1 or caspase-8 accumulation under HSV-2 R1 expression in control, CHX- or TNF α -treated samples (Fig. 5). When exposed to CHX+TNF α or Fc:FasL for 8 h, more than 95% of cells, either mock- or AdCMV5-GFP-infected, exhibited apoptotic morphology. This high level of apoptosis was clearly evidenced by a large decrease in p55/53 caspase-8 isoforms and the occurrence of its p43/41 and p18 cleaved isoforms (Fig. 5). With both ligands, HSV-2 R1 expression prevented the appearance of cells exhibiting apoptotic morphology (<5%) and inhibited caspase-8 cleavage without any effect on Fas, FADD and TRADD levels. As expected, HSV-2 R1 impaired the caspase-8-dependent cleavage of RIP1 (RIP1 p45) but not the decrease in TNFR1 seen with treatments containing CHX. These results indicated that HSV-2 R1 antiapoptotic activity did not involve a reduction of Fas, FADD, TRADD and RIP1 accumulation.

Since c-FLIP_L and c-FLIP_S isoforms of c-FLIP are caspase-8 inhibitors known to have a high turnover [reviewed in 47], we next tested the hypothesis that HSV-2 R1 could increase their stability by studying the effect of HSV-2 R1 expression on c-FLIP accumulation. HSV-2 R1 did not alter c-FLIP_L and c-FLIP_S levels in control and TNF α -treated samples (Fig. 5). When CHX was applied to inhibit the *de novo* synthesis of c-FLIP [48], it greatly reduced c-FLIP_L and c-FLIP_S levels, in the absence and presence of TNF α , but HSV-2 R1-GFP did not alter the effect of CHX (Fig. 5). As expected, HSV-2 R1 impaired the caspase-8-dependent cleavage of c-FLIP_L (c-FLIP_L p43) seen in mock- and AdCMV5-GFP-infected cells treated with Fc:FasL. Similar results were obtained after induction of HSV-2 R1-GFP expression in A549-tTA-HSV-R1-GFP cells for 48 h (data not

shown). These findings demonstrated that HSV-2 R1 does not exert its antiapoptotic activity by altering the expression or stability of c-FLIP isoforms.

Caspase-8 interacts with antiapoptotic HSV R1s but not with an HSV-2 R1 deletion mutant devoid of antiapoptotic activity or EBV R1

Many antiapoptotic proteins, containing a DED or not, act at the level of death complex assembly by binding with one or more components of these death complexes [reviewed in 49]. Thus, we speculated that HSV R1s could interact with caspase-8 and/or FADD to prevent its activation by DR stimulation, as do other viral inhibitors of apoptosis [50,51]. The first indication for such an interaction came from size exclusion chromatography, showing that caspase-8 constitutively co-elutes in high-molecular-weight fractions with HSV-2 R1 (data not shown).

To obtain direct evidence that HSV-2 R1 has the ability to interact physically with caspase-8 and/or FADD, co-immunoprecipitation experiments were performed with GFP-tagged HSV-2 R1 expressed in A549-tTA cells after infection with Ad recombinant. AdTR5-GFP-infected cells served as controls for the presence of GFP-tag. To examine whether the interaction with caspase-8 correlates with the antiapoptotic function of HSV-2 R1, we also used HSV-2 R1(1-834)-GFP, a deletion mutant devoid of antiapoptotic activity [27]. A549-tTA cells, either mock-, AdTR5-GFP-, AdTR5-R1(1-834)-GFP- or AdTR5-R1-GFP-infected, were treated or not with CHX or CHX+TNF α for 8 h. Note that Ad infected cells did not show any apoptotic morphology in absence of apoptotic stimuli (data not shown). When treated with CHX+TNF α , ~90% of mock-infected, GFP- or HSV-2 R1(1-834)-GFP-expressing cells exhibited apoptotic morphology whereas HSV-2 R1-GFP-expressing cells were fully protected (data not shown). These results were confirmed by the observation of a large decrease in caspase-8 (p55/53) level with a concomitant increase of p43/41 and p18 cleavage products of caspase-8 in all CHX+TNF α -treated cells except for HSV-2 R1-GFP-expressing cells (Fig. 6a, panel lysates). HSV-2 R1-GFP, HSV-2 R1(1-834)-GFP and GFP were immunoprecipitated from lysates of A549-tTA-infected cells with anti-GFP antiserum (Fig. 6a, panels IP: GFP). Caspase-8 was immunoprecipitated from the same lysates with the mAb 1C15 (Fig. 6a, panels IP: casp-8). Immunoblot analyses were

performed with anti-GFP or anti-caspase-8 mAb 1C15. Full-length caspase-8 (casp-8 p55/53) was detected in GFP immunoprecipitates from HSV-2 R1-GFP-expressing cells but not in control cells either mock- or GFP-infected (Fig. 6a, panels IP: GFP). Even though both HSV-2 R1-GFP and HSV-2 R1(1-834)-GFP were expressed at similar levels (Fig. 6a, panel lysates), the latter failed to co-precipitate with caspase-8, regardless of the treatment. In the reverse co-immunoprecipitation experiment, HSV-2 R1-GFP but not HSV-2 R1(1-834)-GFP was specifically detected in caspase-8 immunoprecipitates (Fig. 6a, panel IP: casp-8), the low amount of HSV-2 R1(1-834)-GFP seen in all R1(1-834)-GFP samples being due to the unspecific precipitation of mutant protein with beads (cf. ctl lane). Similar co-immunoprecipitation experiments, with A549-tTA-HSV-R1-GFP cells, confirmed the interaction between HSV-2 R1 and caspase-8 (data not shown). Additional caspase-8 immunoprecipitation experiments with the mAb 1C15 revealed that HSV-1 R1 but not EBV R1 also interacts with caspase-8 (Fig. 6b). Taken together, these results demonstrate that HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interact with caspase-8 whereas HSV-2 R1(1-834)-GFP and EBV R1, 2 proteins devoid of antiapoptotic potential, do not.

HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interact with caspase-8 in the context of HSV infection

We next sought to determine whether HSV R1s could interact with caspase-8 in the context of HSV infection. Our previous work revealed that protection against TNF α -induced apoptosis plateaued around 8 h of infection with both types of HSV [7]. Hence, HeLa and A549-tTA cells were infected for 8 h with either HSV-1 or HSV-2, and caspase-8 was immunoprecipitated with the anti-caspase-8 mAb 1C15. Immunoblot analyses with anti-R1 serum 168R1 revealed that both HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interacted with caspase-8 in the 2 cell lines tested (Fig. 6c). Altogether, these results indicate that HSV R1s can physiologically interact with caspase-8.

HSV-2 R1 impairs apoptosis induced by caspase-8 over-expression

It is well-known that caspase-8 over-expression induces apoptosis [52]. In this context, apoptosis is thought to be the outcome of caspase-8 dimerization through catalytic domain interaction, as single point mutants in the dimer interface, which are unable to

undergo dimerization, exhibit greatly reduced apoptosis induction [53]. To determine whether HSV-2 R1 could prevent apoptosis induced by caspase-8 over-expression, we tested a GFP-tagged version of caspase-8 (casp-8 GFP) (Fig. 7a) previously shown to efficiently induce apoptosis in HeLa cells [30]. Observations by fluorescence microscopy at 24 h following casp-8 GFP transfection showed that all the GFP-positive cells in control dishes (mock-infected or pre-infected with an empty control Ad recombinant) were rounded up and floating in the medium (Fig. 7b). In these detached cells, the fluorescence was seen as diffuse throughout apoptotic bodies and blebs, as well as concentrated in large aggregates (Fig. 7b, photographs). In sharp contrast, when cells had been infected with AdCMV5-R1 prior to transfection, more than 40% of GFP-positive cells remained adherent with healthy morphology (Fig. 7b). In these adherent cells, fluorescence appeared diffuse throughout the cytoplasm, as reported in conditions where apoptosis induced by casp-8 GFP was inhibited by z-VAD-fmk. Immunoblotting with anti-GFP antibody showed that casp-8 GFP (~85 kDa) was nearly completely absent in control cells, which accumulated the processed casp-8 p10 GFP product (~42 kDa) (Fig. 7b). Strikingly, cells expressing HSV-2 R1 accumulated high levels of unprocessed casp-8 GFP (Fig. 7b), indicating that HSV-2 R1 can impair casp-8 GFP activation. To determine whether casp-8 GFP interacted with HSV-2 R1 as did endogenous caspase-8, cells were infected with AdCMV5-R1 and 12 h later transfected with a plasmid encoding catalytically-inactive caspase-8 C360S GFP (casp-8 C360S GFP) (depicted in Fig. 7a) to avoid caspase-8 autoprocessing. Immunoprecipitation with anti-GFP antiserum showed that HSV-2 R1 co-immunoprecipitated with casp-8 C360S GFP, as expected (Fig. 7c). The results demonstrating that HSV-2 R1 impairs caspase-8 activation induced by its over-expression suggested that the interaction between the two proteins impedes caspase-8 dimerization.

HSV-2 R1 interacts directly with caspase-8, and the DEDs of caspase-8 are essential for this interaction

As purified HSV-2 R1 does not inhibit active recombinant human caspase-8, which consists of the processed caspase domain [7], we hypothesized that it interacts with the DEDs of caspase-8. To ascertain that, 2 caspase-8 deletion mutants C-terminally fused to GFP (casp-8 DED-AB GFP and casp-8 CD GFP depicted in Fig. 7a) were tested. In

addition, to determine whether the interaction was specific to caspase-8 DEDs, FADD fused to YFP (FADD YFP, Fig. 7a) was included in the analysis. Immunoprecipitation with anti-GFP antiserum showed that HSV-2 R1 co-immunoprecipitated with casp-8 DED-AB GFP, but not with casp-8 CD GFP or with FADD YFP (Fig. 7c). Consistent with these results, we also observed that HSV-2 R1 could block the formation of previously-described [30] cytoplasmic filaments in casp-8 DED-AB GFP-expressing cells but not those seen in FADD YFP-expressing cells (Fig. S3). Our findings suggested that HSV-2 R1 could interact with DED-AB of caspase-8 in a way that inhibits the formation of filaments but not with the DED of FADD or with the caspase domain of caspase-8.

To better establish that HSV-2 R1 interacted with casp-8 DED-AB, GST pull-down experiments were performed with GST-tagged deletion mutants of caspase-8 produced in *E. coli* and with purified HSV-2 R1 produced in either bacteria (pET-R1) or human cells (BM5-R1). Purified HSV-2 R1, whether produced in bacteria or in mammalian cells, could be efficiently pulled-down with either GST casp-8 or GST casp-8 DED-AB but not with GST casp-8 CD (Fig. 7d). These results demonstrated not only that HSV-2 R1 directly interacts with DED-AB of caspase-8, without requiring additional cofactors, but also that eukaryotic post-translational modifications of HSV-2 R1 are not required for the interaction.

Binding of HSV-2 R1 to caspase-8 disrupts FADD-caspase-8 interaction

To gain additional insight into the mechanism by which HSV R1 interaction with caspase-8 prevented its activation, we investigated whether HSV-2 R1 could affect the interaction between caspase-8 and FADD. Towards this end, HeLa cells were infected with AdCMV5-R1 or an empty Ad recombinant for 16 h before transfecting GFP or casp-8 C360S GFP to avoid caspase-8 autoprocessing. As expected, when immunoprecipitation was performed with anti-GFP antiserum, FADD co-precipitated with casp-8 C360S GFP but not with GFP (Fig. 7e). When cells were infected with AdCMV5-R1 prior to transfection, the interaction between FADD and casp-8 C360S GFP was greatly reduced and HSV-2 R1 was present in the immunoprecipitate. This result indicated that HSV-2 R1 binding to caspase-8 disrupts FADD-caspase-8 interaction.

DISCUSSION

Apoptosis triggered by stimulation of DRs is important in the host response to viral infection. To counteract host defense mechanisms, viruses have evolved several molecular strategies to prevent caspase-8 activation after DR stimulation through the acquisition of proteins that act on different targets in this pathway [51,54-56]. Several reports have indicated that HSVs can efficiently block apoptosis induced by DR activation [reviewed in 57]. In this regard, 2 HSV genes were proposed to play important roles: the R1 subunit of HSV-2 RR which, expressed on its own, protects epithelial cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interrupting DR-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation [7,27], and the *vhs* gene which, by destroying TNFR1 mRNA, impairs the replenishment of short-half-life TNFR1 [8]. Here, we report 3 main findings on the antiapoptotic activity of HSV R1s. First, HSV-1 R1 like HSV-2 R1 has the ability to protect cells against TNF α and FasL. Second, HSV-1 R1 is essential for protecting infected cells against FasL. Third, HSV R1s and caspase-8 interact in a way that inhibits the dimerization/activation of caspase-8.

Infection experiments with 2 HSV-1 R1 deletion mutants (hrR3 and ICP6 Δ) have suggested that the R1 of HSV-1, like that of HSV-2, could contribute to prevent TNF α -induced apoptosis of HSV-infected cells [7,27]. The present work demonstrates that HSV-1 R1, expressed individually, can, like HSV-2 R1, protect cells from TNF α - or FasL-induced apoptosis. This result agrees with our mapping of the antiapoptotic domain of HSV-2 R1, which indicates that it is highly conserved between both types of HSV (95% similarity [27]). Conversely, protection from TNF α is not an attribute of R1 of the γ -herpes virus EBV, at least in the experimental conditions tested here. This deficiency could be related to the absence of a putative α -crystallin domain in the shorter EBV R1, a domain important for HSV-2 R1 antiapoptotic activity [23]. It is noteworthy that until now protection from TNF α has been observed only for another herpes virus R1, that of murine β -herpes virus CMV, also named M45 [reviewed in 58].

After HSV-1 and HSV-2 infection, protection against TNF α -induced apoptosis appeared early after the beginning of infection in parallel with HSV R1 synthesis, indicating an important role for the protein in this protection [7]. However, during the same

period, there is a rapid decrease of TNFR1 from HSV-1- and HSV-2-infected cells (Fig. 2a and [8]), which should also contribute to TNF α resistance. By pre-treating cells with CHX, we were able to mimic the TNFR1 decrease seen during HSV infection and to provide evidence that such a reduction might not contribute significantly to TNF α resistance during the first 8 h of infection. It is currently unknown why infected cells exhibiting barely detectable levels of TNFR1 could still be highly sensitive to TNF α , but the reason could be that low levels of TNFR1 are sufficient to trigger apoptosis or that TNF α signals through TNFR2 or through a third, unknown TNFR. The existence of such an unknown TNF receptor was invoked to explain how TNF α could protect against fatal HSV-1 encephalitis in TNFR1^{-/-} TNFR2^{-/-} mice [59]. Nevertheless, these findings reinforced our previous conclusion that HSV-2 R1 plays a more preponderant role than vhs in TNF α resistance early during the lytic cycle [7]. Moreover, from the observation that HSV infection does not affect Fas levels, we were able to show that HSV-1 R1 is essential in protecting HSV-1-infected epithelial cells against FasL. This demonstration is important not only because of the magnitude of the effect seen with the R1 deletion mutant but also because Fc:FasL was used without CHX, a more physiological treatment than CHX+TNF α . The importance of protection against TNF family cytokines in HSV pathogenesis remains to be determined. A recent report that Fas-FasL signaling is important in protecting mice against HSV-2 lethality suggests that HSV R1 could contribute to increase virus replication by counteracting this immune system mechanism [3].

Since some viral antiapoptotic proteins have been found to target the ERK1/2 and Akt signaling pathways, including HSV-2 R1 [24], it was important to evaluate whether they could be involved in the antiapoptotic activity of HSV-2 R1. Three lines of evidence strongly argue against any effect of HSV-2 R1 on ERK1/2 and PI3-K/Akt pathways in the protection against TNF α . Firstly, HSV-2 R1 expression at a level sufficient to confer full protection against TNF α -induced apoptosis did not significantly affect ERK1/2 or Akt phosphorylation. Secondly, HSV-2 R1 did not modify the transient activation of ERK1/2 induced by TNF α . Thirdly, suppression of the ERK1/2 or Akt pathways with specific biochemical inhibitors did not influence HSV-2 R1 protection against TNF α -induced apoptosis. Our observation that the inducible expression of HSV-2 R1 did not increase ERK1/2 phosphorylation contrasts with previous reports that 293 or PC12 cells stably

expressing HSV-2 R1 exhibit a higher level of ERK1/2 phosphorylation than their parental counterparts [42,60]. As we have been unable to detect any increase in ERK1/2 phosphorylation upon inducible HSV-2 R1 expression in 293 cells, we have ruled out, as an explanation for this discrepancy, that the effect could be cell type-specific. It is possible that the higher constitutive ERK1/2 phosphorylation, previously observed in 293 cells stably expressing HSV-2 R1, could be due to clonal variation. Indeed, it is well-known that several established cell lines exhibit high constitutive ERK1/2 phosphorylation whereas others do not [61].

HSV R1 protection against DR-induced apoptosis differs from viral strategies affecting the expression or stability of critical proteins implicated in DR signaling [62,63,56,64]. Indeed, HSV-2 R1 does not affect either the expression of c-FLIP isoforms or their stability. Furthermore, HSV-2 R1 does not modify the expression of TNFR1, TRADD, FADD, RIP1 and caspase-8. HSV-2 R1 does not constitutively activate NF- κ B and JNK or alter the activation of NF- κ B and JNK by TNF α . Such observations not only indicate that these pathways are not involved in protection from TNF α but also strongly suggest that HSV-2 R1 does not interfere with the TNF α -induced formation of complex I, since assembly of the complex is required for early NF- κ B, JNK or ERK1/2 phosphorylation. In this respect, HSV-2 R1 differs from HHV-8 v-FLIP/K13 that constitutively activates the canonical NF- κ B pathway by interacting with IKK γ [12].

Even if sequences of HSV R1s do not present similarities with c- or v-FLIP, we speculated that HSV R1s could interact with caspase-8 to prevent its activation by DR stimulation, as do other viral inhibitors of apoptosis [50,51]. Immunoprecipitation experiments confirmed that both individually-expressed HSV-1 and HSV-2 R1 interact with caspase-8 with or without treatment with DR ligands, demonstrating that the interaction is constitutive. Moreover, interaction between HSV R1s and caspase-8 could be detected with extracts of HSV-1- and HSV-2-infected cells, supporting a role for this interaction in the resistance of HSV-infected cells to DR-induced apoptosis [65,7]. HSV-2 R1 binding to caspase-8 appears indispensable for the antiapoptotic activity of HSV-2 R1 since the deletion mutant HSV-2 R1(1-834)-GFP, which is devoid of antiapoptotic activity [27], does not interact with caspase-8. Moreover, EBV R1, which does not show

antiapoptotic potential in our experimental system, does not interact with caspase-8. The data, obtained with 2 series of caspase-8 deletion mutants, showed that HSV-2 R1 interacts with the 2 tandem DED-containing prodomains of caspase-8 but not with the caspase domain of caspase-8. This is in agreement with the observation that HSV-2 R1 does not protect cells against caspase-8 CD GFP-induced apoptosis (F. Dufour and Y. Langelier, unpublished observations) and with our previous finding that purified HSV-2 R1 does not inhibit the protease activity of active caspase-8, which contains only the caspase domain [7]. More importantly, the use of purified proteins in GST pull-down experiments demonstrated that HSV-2 R1 interaction with either full-length caspase-8 or caspase-8 DED-AB is direct and does not require additional molecules. Also, as the interaction still occurred when both proteins were produced and purified from bacteria, it can be concluded that post-translational modifications specific to mammalian cells are not necessary for binding. Altogether, these data firmly establish that HSV R1s, by interacting constitutively and directly with caspase-8, prevent its activation. A similar mechanism of action has been described for vICA, the UL36 gene product of human CMV that is also conserved in all CMV genome sequenced to date [66]. Like HSV R1s, vICA suppresses TNF α - and FasL-induced apoptosis but appears to marginally inhibit cell death induced by cytotoxic drugs activating the mitochondrial apoptosis pathway [51,7]. Even though HSV-2 R1 and vICA do not exhibit sequence similarity, both proteins associate with caspase-8 in the absence of DR activation and interact with the caspase-8 prodomain.

Since dimerization is a precondition for self-processing and caspase-8 activity [67], we speculated that HSV R1s could interact with caspase-8 in a way that inhibits this event. Supporting our hypothesis, we found that HSV-2 R1 protects cells against apoptosis induced by over-expression of GFP-tagged caspase-8 that is triggered by dimerization/activation of the over-expressed zymogen [52]. In the case of TNF α - or FasL-induced apoptosis, complex II or DISC drives dimerization and activation of monomeric caspase-8 via FADD [14,13]. Since HSV-2 R1 interacts with the DEDs of caspase-8 and FADD contains a DED involved in both FADD self-association and caspase-8 interaction [68], we investigated putative interaction between FADD and HSV-2 R1. We have been unable to detect, by co-immunoprecipitation, any interaction between HSV-2 R1 and endogenous or over-expressed FADD, indicating that the interaction is specific to the

tandem DEDs contained in the caspase-8 prodomain. A recent report identified the caspase-8-specific binding surface on FADD and suggested preferential interaction of caspase-8 DED-B with FADD DED [68]. Since HSV-2 R1 interacts with the caspase-8 prodomain, it is conceivable that oligomerized HSV-2 R1 could sterically hinder the site of caspase-8 interaction with FADD DED. Supporting this hypothesis, we found that the interaction between over-expressed casp-8 C360S GFP and endogenous FADD is inhibited when HSV-2 R1 is expressed. It remains to be determined whether HSV R1s inhibit the recruitment of caspase-8 to the assembled complex II or DISC.

Extensive studies have uncovered several antiapoptotic proteins in the herpes viruses family, several of them being FLIP or Bcl-2 homologues [reviewed in 69]. HSV R1s differ structurally and functionally from these inhibitors. Indeed, HSV R1s belong with vICA to a new class of viral antiapoptotic proteins that interact directly and constitutively with caspase-8 in a way that inhibits its activation. Finally, we can speculate that, in addition to counteracting DR-induced apoptosis, HSV R1s could inhibit apoptosis evoked by other signals that trigger caspase-8 activation during HSV infection. This function could be particularly important in certain types of cells as it has been shown recently that both c-FLIP_L and c-FLIP_S are degraded during HSV infection [71].

Acknowledgments

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grant NRF #67052. We thank Angela Pearson, Andrew D. Badley, Marcus E. Peter and Joseph S. Pagano for their kind gifts of plasmids and antibodies, Sandra Weller for the generous donation of ICP6 Δ , Pascal Schneider for its kind gift of Fc:FasL, and W. Edward C. Bradley as well as Richard Bertrand for critical manuscript editing. This is National Research Council of Canada publication.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Wong GH, Tartaglia LA, Lee MS, Goeddel DV (1992) Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor [corrected]. *J Immunol* 149 (10):3350-3353
2. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC (2003) Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8 (3):237-249.
3. Ishikawa T, Yamada H, Oyamada A, Goshima F, Nishiyama Y, Yoshikai Y (2009) Protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *J Virol* 83 (22):11777-11783.
4. Lokensgard JR, Hu S, Sheng W, vanOijen M, Cox D, Cheeran MC, Peterson PK (2001) Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J Neurovirol* 7 (3):208-219.
5. Chen SH, Oakes JE, Lausch RN (1994) Synergistic anti-herpes effect of TNF-alpha and IFN-gamma in human corneal epithelial cells compared with that in corneal fibroblasts. *Antiviral Res* 25 (3-4):201-213.
6. Sergerie Y, Rivest S, Boivin G (2007) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 196 (6):853-860.
7. Langelier Y, Bergeron S, Chabaud S, Lippens J, Guilbault C, Sasseville AM, Denis S, Mosser DD, Massie B (2002) The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* 83 (Pt 11):2779-2789
8. Liang L, Roizman B (2006) Herpes simplex virus 1 precludes replenishment of the short-lived receptor of tumor necrosis factor alpha by virion host shutoff-dependent degradation of its mRNA. *J Virol* 80 (15):7756-7759.
9. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A (2009) Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 10 (4):348-355.
10. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21 (12):3964-3973.

11. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276 (23):20633-20640.
12. Bagneris C, Ageichik AV, Cronin N, Wallace B, Collins M, Boshoff C, Waksman G, Barrett T (2008) Crystal structure of a vFlip-IKKgamma complex: insights into viral activation of the IKK signalosome. *Mol Cell* 30 (5):620-631.
13. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114 (2):181-190.
14. Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM (2003) Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278 (28):25534-25541.
15. Thorburn A (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16 (2):139-144
16. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10 (1):45-65.
17. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM (2004) Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 21 (4):461-465.
18. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281 (5383):1680-1683.
19. Goldstein DJ, Weller SK (1988) Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant. *Virology* 166 (1):41-51.
20. Ingemarson R, Lankinen H (1987) The herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase is a tight complex of the type alpha 2 beta 2 composed of 40K and 140K proteins, of which the latter shows multiple forms due to proteolysis. *Virology* 156 (2):417-422.
21. Swain MA, Galloway DA (1986) Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminally transcribed transcripts. *J Virol* 57 (3):802-808.
22. Walsh D, Mohr I (2006) Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes Dev* 20 (4):461-472.

23. Chabaud S, Lambert H, Sasseville AM, Lavoie H, Guilbault C, Massie B, Landry J, Langelier Y (2003) The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett* 545 (2-3):213-218.
24. Perkins D, Pereira EF, Gober M, Yarowsky PJ, Aurelian L (2002) The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J Virol* 76 (3):1435-1449.
25. 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 (Pt 6):1471-1476.
26. Langelier Y, Champoux L, Hamel M, Guilbault C, Lamarche N, Gaudreau P, 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 (3):1435-1443.
27. Chabaud S, Sasseville AM, Elahi SM, Caron A, Dufour F, Massie B, Langelier Y (2007) The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J Gen Virol* 88 (Pt 2):384-394.
28. Neznanov N, Chumakov KP, Ullrich A, Agol VI, Gudkov AV (2002) Unstable receptors disappear from cell surface during poliovirus infection. *Med Sci Monit* 8 (10):BR391-396.
29. Whitehurst CB, Ning S, Bentz GL, Dufour F, Gershburg E, Shackelford J, Langelier Y, Pagano JS (2009) The EBV Deubiquitinating Enzyme, BPLF1, Reduces EBV Ribonucleotide Reductase Activity. *J Virol*.
30. Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, Cohen J, Lenardo MJ (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 141 (5):1243-1253.
31. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 23 (4):1428-1440.

32. Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME (1997) FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272 (43):26953-26958.
33. Nie Z, Phenix BN, Lum JJ, Alam A, Lynch DH, Beckett B, Krammer PH, Sekaly RP, Badley AD (2002) HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death Differ* 9 (11):1172-1184.
34. Medema JP, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME (1998) Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 273 (6):3388-3393.
35. Peant B, Diallo JS, Dufour F, Le Page C, Delvoye N, Saad F, Mes-Masson AM (2009) Over-expression of IkappaB-kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi) induces secretion of inflammatory cytokines in prostate cancer cell lines. *Prostate* 69 (7):706-718.
36. Lamarche N, Matton G, Massie B, Fontecave M, Atta M, Dumas F, Gaudreau P, Langelier Y (1996) Production of the R2 subunit of ribonucleotide reductase from herpes simplex virus with prokaryotic and eukaryotic expression systems: higher activity of R2 produced by eukaryotic cells related to higher iron-binding capacity. *Biochem J* 320 (Pt 1):129-135.
37. Cohen EA, Gaudreau P, Brazeau P, Langelier Y (1986) Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *J Virol* 60 (3):1130-1133.
38. Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81 (2):807-869.
39. Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9 (6):667-676.
40. Dida F, Li Y, Iwao A, Deguchi T, Azuma E, Komada Y (2008) Resistance to TRAIL-induced apoptosis caused by constitutional phosphorylation of Akt and PTEN in acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol* 36 (10):1343-1353.
41. Pucci B, Indelicato M, Paradisi V, Reali V, Pellegrini L, Aventaggiato M, Karpnich NO, Fini M, Russo MA, Farber JL, Tafani M (2009) ERK-1 MAP kinase prevents TNF-induced apoptosis through bad phosphorylation and inhibition of Bax translocation in HeLa Cells. *J Cell Biochem* 108 (5):1166-1174.

42. Hunter JC, Smith CC, Bose D, Kulka M, Broderick R, Aurelian L (1995) Intracellular internalization and signaling pathways triggered by the large subunit of HSV-2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Virology* 210 (2):345-360.
43. Luschen S, Falk M, Scherer G, Ussat S, Paulsen M, Adam-Klages S (2005) The Fas-associated death domain protein/caspase-8/c-FLIP signaling pathway is involved in TNF-induced activation of ERK. *Exp Cell Res* 310 (1):33-42.
44. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270 (46):27489-27494.
45. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269 (7):5241-5248.
46. Liu J, Lin A (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15 (1):36-42.
47. Yu JW, Shi Y (2008) FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* 27 (48):6216-6227.
48. Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P (2000) Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* 275 (32):24357-24366.
49. Hay S, Kannourakis G (2002) A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 83 (Pt 7):1547-1564.
50. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI (1997) Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (4):1172-1176.
51. Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS (2001) A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (14):7829-7834.
52. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996) In vitro activation of

- CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (15):7464-7469.
53. Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J (2002) Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* 277 (52):50761-50767.
54. Tewari M, Dixit VM (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270 (7):3255-3260.
55. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386 (6624):517-521.
56. Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB, Ray R (2006) Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* 80 (9):4372-4379.
57. Goodkin ML, Morton ER, Blaho JA (2004) Herpes simplex virus infection and apoptosis. *Int Rev Immunol* 23 (1-2):141-172.
58. Lembo D, Brune W (2009) Tinkering with a viral ribonucleotide reductase. *Trends Biochem Sci* 34 (1):25-32.
59. Lundberg P, Welander PV, Edwards CK, 3rd, van Rooijen N, Cantin E (2007) Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol* 81 (3):1451-1460.
60. Wales SQ, Li B, Laing JM, Aurelian L (2007) The herpes simplex virus type 2 gene ICP10PK protects from apoptosis caused by nerve growth factor deprivation through inhibition of caspase-3 activation and XIAP up-regulation. *J Neurochem* 103 (1):365-379.
61. Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M (2005) Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* 280 (14):13285-13291.
62. Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K, Duerksen-Hughes PJ (2007) The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 81 (8):4116-4129.

63. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279 (24):25729-25744.
64. Chiou SH, Yang YP, Lin JC, Hsu CH, Jhang HC, Yang YT, Lee CH, Ho LL, Hsu WM, Ku HH, Chen SJ, Chen SS, Chang MD, Wu CW, Juan LJ (2006) The immediate early 2 protein of human cytomegalovirus (HCMV) mediates the apoptotic control in HCMV retinitis through up-regulation of the cellular FLICE-inhibitory protein expression. *J Immunol* 177 (9):6199-6206.
65. Galvan V, 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 U S A* 95 (7):3931-3936.
66. McCormick AL, Skaletskaya A, Barry PA, Mocarski ES, Goldmacher VS (2003) Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology* 316 (2):221-233.
67. Keller N, Mares J, Zerbe O, Grutter MG (2009) Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* 17 (3):438-448.
68. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y, Werner MH (2006) The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 22 (5):599-610.
69. Galluzzi L, Kepp O, Morselli E, Vitale I, Senovilla L, Pinti M, Zitvogel L, Kroemer G (2010) Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *J Intern Med* 267 (5):526-542.
70. Tschopp J, Thome M, Hofmann K, Meinel E (1998) The fight of viruses against apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 8 (1):82-87.
71. Kather A, Raftery MJ, Devi-Rao G, Lippmann J, Giese T, Sandri-Goldin RM, Schonrich G (2010) Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol* 84 (2):1034-1046.

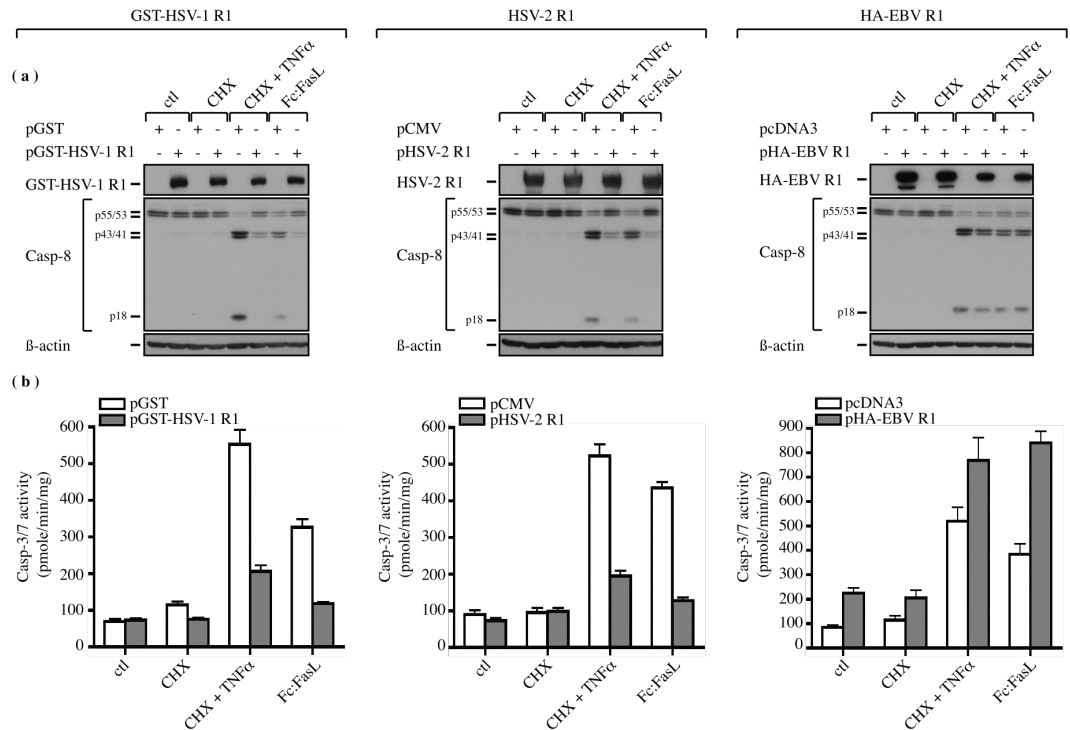


Figure 1 : GST-HSV-1 R1 and HSV-2 R1 inhibit TNF α - and FasL-induced apoptosis but not HA-EBV R1.

HeLa cells were transfected with the plasmid pAdCMV5 (pCMV) or pAdCMV5-R1 (pHSV-2 R1) (*left panel*); pLBPF1-GST (pGST) or pLBPF1-GST-R1 (pGST-HSV-1 R1) (*middle panel*); pcDNA3 or pcDNA3-HA-EBV R1 (pHA-EBV R1) (*right panel*). After 48 h, the cells were untreated (ctrl) or treated with CHX (15 μ g/ml), CHX+TNF α (2.5 ng/ml) or Fc:FasL (10 ng/ml) for 8 h. Cytoplasmic cell lysates were analyzed by immunoblotting for HSV R1s, EBV R1, caspase-8 (1C12) and β -actin protein content **a** and tested for caspase-3/7 activity **b**. The immunoblots and caspase activities (mean \pm SE, $n = 4$) are representative of at least 2 experiments performed in duplicate.

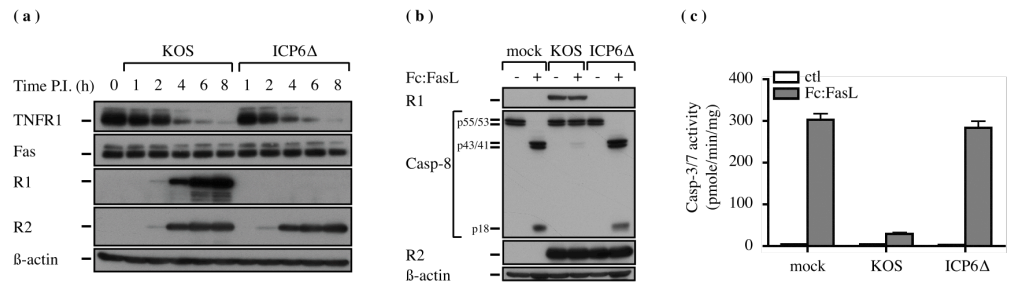


Figure 2 : HSV-1 R1 is essential for protection against FasL-induced apoptosis.

a HeLa cells were infected with the parental HSV-1 strain (KOS) or the R1 null mutant strain (ICP6Δ) and harvested at the indicated times post-infection (P.I.). Whole cell extracts were analyzed by immunoblotting for TNFR1, Fas, HSV-1 R1, HSV-1 R2 and β-actin. **b, c** HeLa cells were mock-infected (mock) or infected as in **a** for 8 h and then treated with Fc:FasL (50 ng/ml) or not (ctl). After 6 h, the cells were harvested and cytoplasmic cell lysates were analyzed by immunoblotting for HSV-1 R1, HSV-1 R2, caspase-8 (1C12) and β-actin protein content **b** and tested for caspase-3/7 activity **c**. The immunoblots and caspase activities (mean ± SE, $n = 4$) are representative of 2 experiments performed in duplicate.

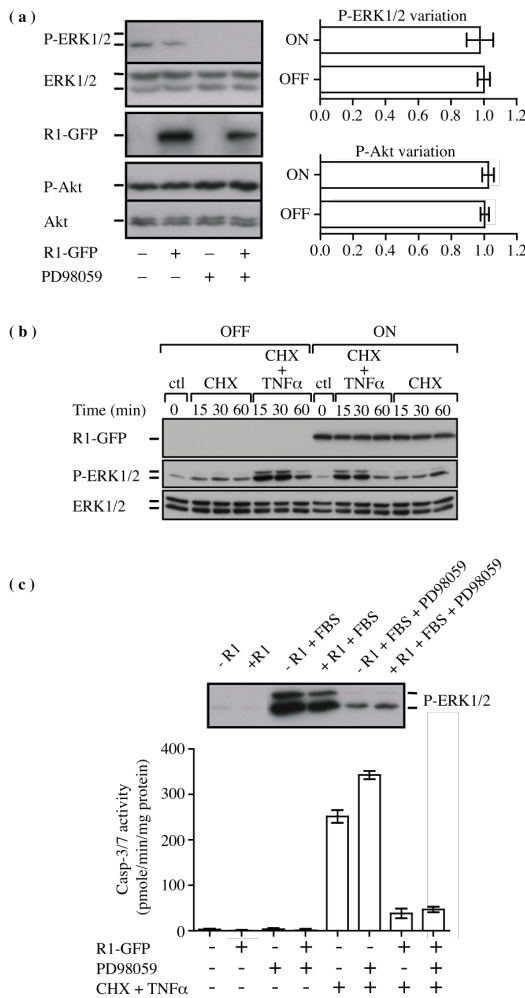


Figure 3 : HSV-2 R1 does not affect ERK1/2 and Akt signaling pathways.

a A549-tTA-HSV-R1-GFP cells, grown for 5 h in medium containing (OFF) or not (ON) Tet and 10% FBS, were cultured in 0.5% FBS for 18 h before being treated or not with PD98059 for 90 min. Total protein extracts were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1-GFP, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, P-ERK1/2), phospho-Akt (Ser473, P-Akt), Akt and ERK1/2. P-ERK1/2 and P-Akt variations (mean \pm SE, $n = 10$) in ON samples versus OFF samples were quantified by densitometric analyses of immunoblots from 5 experiments performed in duplicate. **b** Cells were cultured as in **a** and treated with CHX or CHX+TNF α for the indicated periods. Total protein extracts were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1-GFP, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, P-ERK1/2) and ERK1/2. Immunoblotting is representative of 3 experiments performed in duplicate. **c** Cells were incubated or not with PD98059 for 90 min as in **a** and treated with CHX+TNF α for 5

h before harvesting for caspase-3/7 activity determination. The inserted immunoblot shows the efficacy of PD98059 in inhibiting ERK1/2 phosphorylation induced by 7-min treatment with medium containing 10% FBS. Immunoblots and caspase assays (mean \pm SE, $n = 6$) are representative of 3 experiments performed in duplicate.

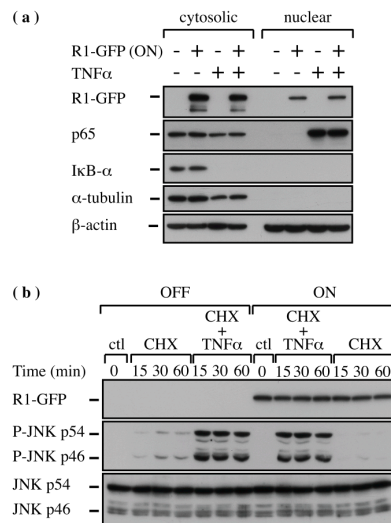


Figure 4 : HSV-2 R1 does not affect NF- κ B or JNK activation.

a A549-tTA-HSV-R1-GFP cells were grown as in Fig. 3a before being treated or not with TNF α for 30 min. Cytosolic and nuclear fractions were prepared and analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1-GFP, NF- κ B p65 (p65) and I κ B- α . Protein loading was assessed by probing for β -actin, and cytosolic contamination of nuclear fraction, by probing for α -tubulin. **b** Cell lysates prepared as in Fig. 3b were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1-GFP, phospho-JNK (Thr183/Tyr185, P-JNK) and JNK. The immunoblots are representative of 3 experiments performed in duplicate.

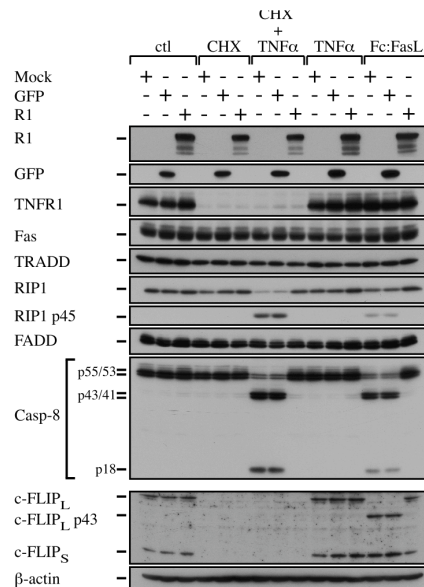


Figure 5 : HSV-2 R1 does not modify the accumulation of Fas, FADD, TRADD, RIP1 and c-FLIP.

HeLa cells were either mock-infected or infected with AdCMV5-R1 (R1) or AdCMV5-GFP (GFP). After 24 h, the cells were treated for 8 h with CHX (15 μ g/ml), CHX+TNF α (2.5 ng/ml), TNF α (2.5 ng/ml) or Fc:FasL (10 ng/ml). Total cell lysates were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1, GFP, TNFR1, Fas, TRADD, RIP1, FADD, caspase-8 (1C12), c-FLIP and β -actin. Immunoblots are representative of 2 experiments performed in duplicate.

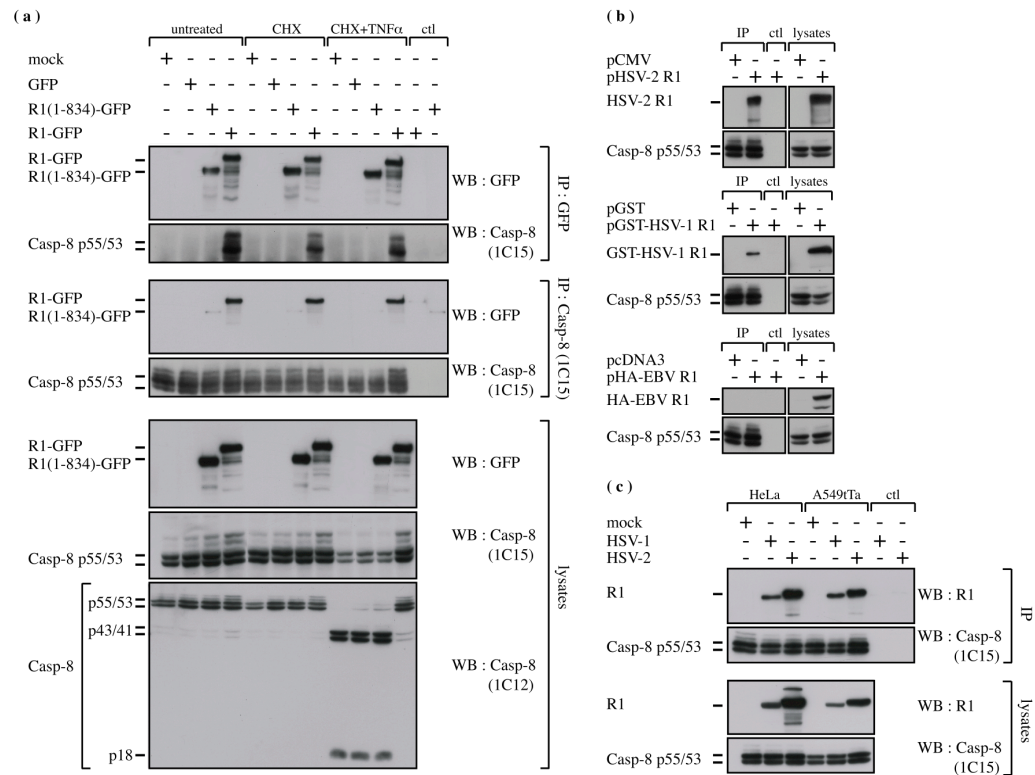


Figure 6 : HSV-1 R1 and HSV-2 R1 interact with caspase-8.

a HSV-2 R1, but not the inactive mutant R1(1-834)-GFP, co-immunoprecipitates with caspase-8. A549-tTA cells were infected with AdTR5-R1-GFP (R1-GFP), AdTR5-R1(1-834)-GFP (R1(1-834)-GFP) or AdTR5-GFP (GFP) and, 24 h later, were treated or not (untreated) with CHX or CHX+TNF α . After 8 h, the cells were harvested, and GFP-tagged proteins or caspase-8 were immunoprecipitated with anti-GFP antibody or anti-caspase-8 mAb 1C15. As precipitation control (ctl), pre-cleared lysates were incubated with G-sepharose beads without antibody. Immunoprecipitates (panels IP) and cell lysates (panels lysates) were analyzed by immunoblotting for GFP-tagged proteins and caspase-8. **b** HSV-1 R1 and HSV-2 R1 co-immunoprecipitate with caspase-8 but not EBV R1. HeLa cells were transfected with the plasmid pAdCMV5 (pCMV), pAdCMV5-R1 (pHSV-2 R1), pLBPF1-GST (pGST), pLBPF1-GST-R1 (pGST-HSV-1 R1), pcDNA3 or pcDNA3-HA-EBV R1 (pHA-EBV R1). After 48 h, the cells were harvested, and caspase-8 was immunoprecipitated as in **a**. Immunoprecipitates (panels IP) and cell lysates (panels lysates) were analyzed by immunoblotting for HSV R1s, HA-EBV R1 and caspase-8 (1C15). **c**

HSV-1 R1 and HSV-2 R1 co-immunoprecipitate with caspase-8 in the context of HSV infection. HeLa and A549-tTA cells were infected with HSV-1 (strain KOS) or HSV-2 (strain HG-52). After 8 h, the cells were harvested, and caspase-8 was immunoprecipitated as in **a**. Immunoprecipitates (panels IP) and cell lysates (panels lysates) were analyzed by immunoblotting for HSV R1s and caspase-8 (1C15). The immunoblots are representative of at least 2 experiments performed in duplicate.

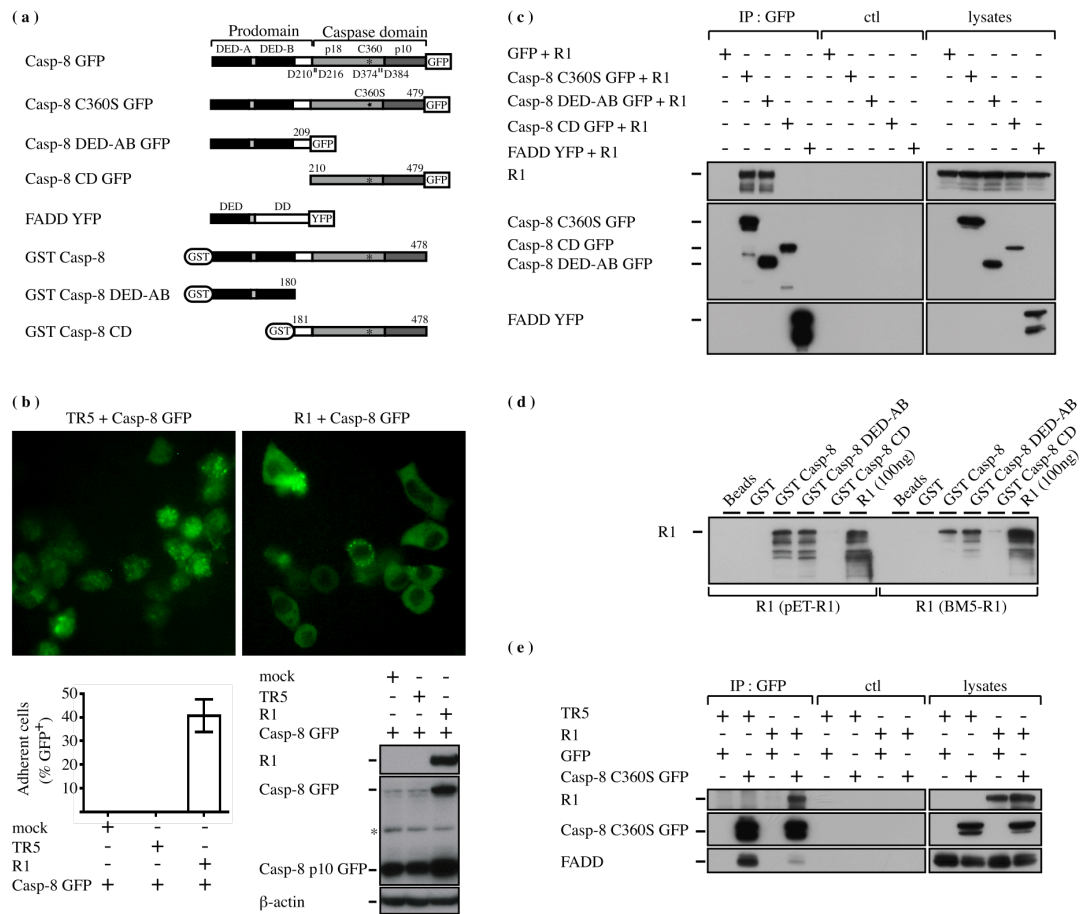


Figure 7 : HSV-2 R1 interacts directly with caspase-8 through its 2 tandem DEDs.

a Schematic representation of the fusion proteins used in this study. Death-effector domains are indicated by DED, death domains by DD, and caspase domain by CD. The aspartic residue processed during caspase-8 maturation and the active site cysteine (C360) are shown. **b** HSV-2 R1 protects cells against caspase-8 GFP-induced apoptosis. HeLa cells were mock-infected or infected with AdCMV5-R1 (R1) or AdTR5CuO (TR5). After 8 h, they were transfected with plasmid encoding for casp-8 GFP. Twenty-four h later, GFP-positive cells were photographed under fluorescence microscopy, and the percentage (mean \pm SE, $n = 6$) of GFP-positive adherent cells was determined. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1, GFP-tagged proteins and β -actin. The data are representative of 3 independent experiments performed in duplicate. The asterisk indicates a non-specific band. **c** HSV-2 R1 interacts with caspase-8 through its DEDs but not with FADD. HeLa cells were infected with AdCMV5-R1 (R1) and transfected 12 h later with

the plasmid encoding GFP, casp-8 C360S GFP, casp-8 DED-AB GFP, casp-8 CD GFP or FADD YFP and harvested 30 h later. GFP-tagged proteins were immunoprecipitated with polyclonal anti-GFP antibody. As immunoprecipitation control (ctl), pre-cleared lysates were incubated with G-sepharose beads without antibody. Immunoprecipitates (IP) and cell lysates (lysates) were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1 and GFP-tagged proteins. Since the anti-GFP mAb B-2 has low affinity for YFP, FADD YFP was revealed with the anti-FADD mAb A66-2. **d** HSV-2 R1 directly interacts with caspase-8 through its DEDs but not with its caspase domain. Beads coupled to GST, GST casp-8, GST casp-8 DED-AB or GST casp-8 CD were incubated with 1 μ g of purified HSV-2 R1 (pET-R1 or BM5-R1), and proteins bound to beads were analyzed by immunoblotting with the anti-R1 serum 168R1. As control for unspecific binding, 1 μ g of each purified R1 was incubated with uncoupled beads (Beads) or GST-coupled beads (GST). R1 was quantified by loading 100 ng of each R1. **e** The interaction between HSV-2 R1 and caspase-8 disrupts FADD-caspase-8 binding. HeLa cells were infected as in **b** and transfected to express GFP or casp-8 C360S GFP. GFP-tagged proteins were immunoprecipitated as in **c**. Immunoprecipitates (IP) and cell lysates (lysates) were analyzed by immunoblotting for HSV-2 R1, FADD and GFP-tagged proteins. The immunoblots are representative of 2 experiments.

SUPPLEMENTARY DATA

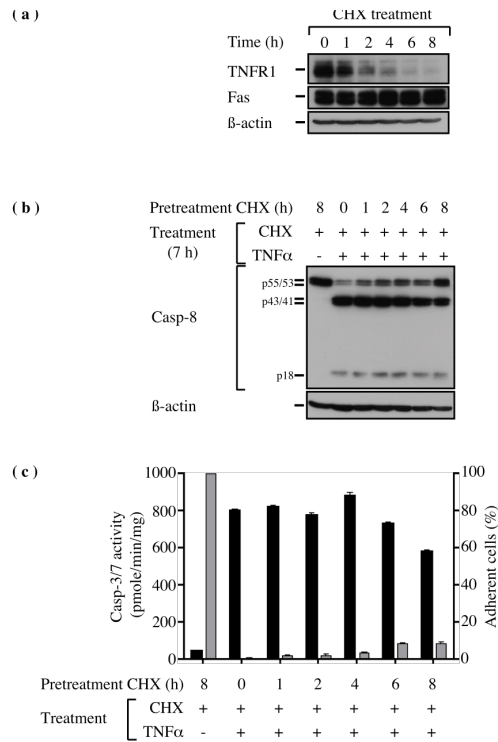


Figure S1 : TNF α triggers apoptosis in cells expressing very low amounts of TNFR1.

a HeLa cells were treated with CHX (15 μ g/ml) and harvested at the indicated times. Whole cell extracts were analyzed by immunoblotting for Fas, TNFR1 and β -actin. **b, c** HeLa cells were pretreated with CHX (15 μ g/ml) for the indicated periods. Then, the cells were washed and treated with CHX (15 μ g/ml) or CHX+TNF α (2.5 ng/ml) for 7 h (immunoblotting and caspase-3/7 activity) or 24 h (percentage of adherent cells). Cytoplasmic cell lysates were analyzed by immunoblotting for caspase-8 (1C12) and β -actin protein content **b**, and tested for caspase-3/7 activity (black bar) **c**. The percentage of adherent cells was evaluated after 24 h of treatment with CHX or CHX+TNF α (grey bar) **c**. The immunoblots and caspase activities (mean \pm SE, $n = 4$) are representative of 2 experiments performed in duplicate.

Text: To test sensitivity to TNF α -induced apoptosis of cells expressing low levels of TNFR1, cells were pretreated with the protein synthesis inhibitor CHX to decrease TNFR1 levels similarly to those observed during HSV infection. As shown in Fig. S1a, TNFR1 protein levels decreased more rapidly after CHX treatment than during HSV infection, and became barely detectable from 6 h post-treatment. The amount of Fas remained unaltered because of its long half-life [1,2]. We next investigated sensitivity to TNF α -induced apoptosis of cells pretreated with CHX before CHX+TNF α treatment. The results revealed that, up to 4 h of CHX pretreatment, cells were as sensitive to TNF α -induced-apoptosis as those not pretreated with CHX (0 h). This was clearly evidenced by similar levels of i) p43/41 and p18 cleavage products of caspase-8 (Fig. S1b), ii) caspase-3/7 activity, and iii) morphologically apoptotic cells (Fig. S1c). Despite drastic reduction of TNFR1 protein at 6 and 8 h of CHX pretreatment, there was only a slight decrease in TNF α -induced apoptosis; indeed, at 8 h, caspase-3/7 activity was diminished by less than 20% whereas only 10% of cells became resistant to apoptosis according to morphological criteria (Fig. S1c). These results showed that TNF α -induced apoptosis can be triggered in the presence of very low TNFR1 levels and indicated that the TNFR1 decrease seen after HSV infection is not significantly involved in TNF α resistance during the first 8 h of infection.

REFERENCES

1. Neznanov N, Kondratova A, Chumakov KM, Angres B, Zhumabayeva B, Agol VI, Gudkov AV (2001) Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol* 75 (21):10409-10420.
2. Neznanov N, Chumakov KP, Ullrich A, Agol VI, Gudkov AV (2002) Unstable receptors disappear from cell surface during poliovirus infection. *Med Sci Monit* 8 (10):BR391-396.
3. Laramee M, Chabot C, Cloutier M, Stenne R, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Royal I (2007) The scaffolding adapter gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J Biol Chem* 282 (11):7758-7769

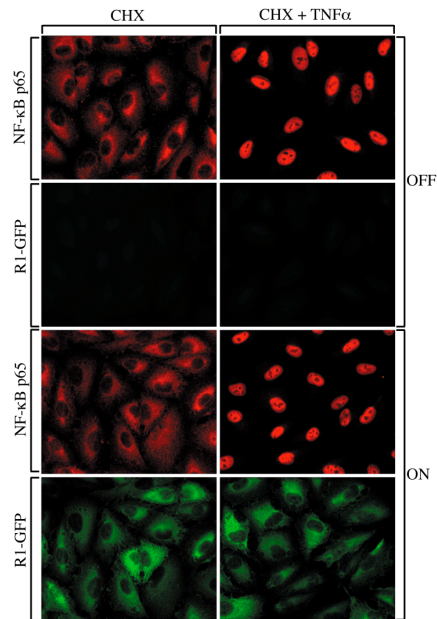


Figure S2 : HSV-2 R1 does not affect the nuclear translocation of NF- κ B p65 induced by TNF α treatment.

A549-tTA-HSV-R1-GFP cells seeded on glass coverslips in 6-well plates (0.3×10^6 cells/well) were cultured in 0.5% FBS medium containing (OFF) or not (ON) Tet for 48 h before being treated with CHX (15 μ g/ml) or CHX+TNF α (2.5 ng/ml). After 30 min, the cells were fixed and immunostained with anti-NF- κ B p65 mAb, followed by Texas-Red-conjugated secondary antibody, as described previously [3]. NF- κ B p65 (in red) and R1-GFP (in green) were visualized with an Olympus Bx51 microscope and photographed with an Olympus Qcolor-5 CCD camera.

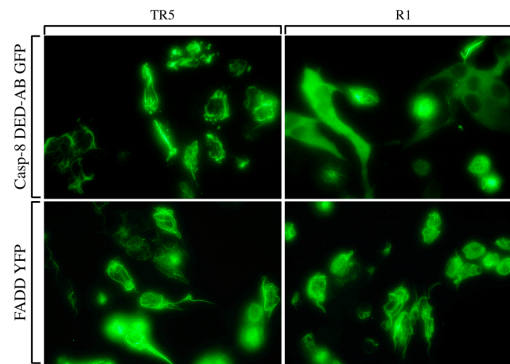


Figure S3 : HSV-2 R1 inhibits the formation of cytoplasmic filaments induced by casp-8 DED-AB GFP but not the one resulting from FADD YFP.

HeLa cells were infected with AdCMV5-R1 (R1) or AdTR5CuO (TR5) (10 PFU/cell) and were transfected 12 h later with plasmids encoding GFP, casp-8 DED-AB GFP or FADD YFP. After 30 h, GFP- or YFP-positive living cells were photographed under fluorescence microscopy.

2.2 Article 2 :

The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus type 1 and 2 protect cells against poly(I:C)-induced apoptosis

Auteurs : Florent Dufour, Luc Bertrand, Angela Pearson, Nathalie Grandvaux et Yves Langelier.

Publication : à soumettre à Journal of Virology le 15 septembre 2010

Contribution personnelle :

- J'ai planifié et réalisé les expériences présentées dans cet article. J'ai analysé et interprété les résultats générés et j'ai écrit l'article avec l'aide de mon directeur de thèse, Yves Langelier.

Contribution des coauteurs :

- Luc Bertrand et Angela Pearson ont cloné la R1 d'HSV-1 et créé le plasmide permettant l'expression de la R1 d'HSV-1 étiquetée GST.
- Nathalie Grandvaux a mis au point et fourni le siRNA anti-TRIF
- Yves Langelier a joué un rôle déterminant au niveau de la conception et de la planification des expériences ainsi que dans la rédaction de l'article.

The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus type 1 and 2 protect cells against poly(I:C)-induced apoptosis

Florent Dufour^{1,2}, Luc Bertrand³, Angela Pearson³, Nathalie Grandvaux^{1,4} and Yves Langelier^{*,1,2,5}

¹ CR-CHUM - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal - Montréal, Qc, Canada

² ICM - Institut du Cancer de Montréal - Montréal, Qc, Canada

³ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec - Laval, Qc, Canada

⁴ Département de Biochimie, Université de Montréal - Montréal, Qc, Canada

⁵ Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal - Montréal, Qc, Canada

Correspondence: Yves Langelier, CR-CHUM - Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Qc, Canada, H2L 4M1.

ABSTRACT

Double-stranded RNA (dsRNA) is a viral intermediate known to initiate innate antiviral responses upon host cell detection. Poly(I:C), a synthetic analogue of dsRNA, rapidly triggers apoptosis and caspase-8 activation in HeLa cells. Here, we demonstrated that following infection by HSV HeLa cells became rapidly protected from apoptosis induced by extracellular poly(I:C) combined with cycloheximide or transfected poly(I:C). Using the HSV-1 R1 null mutant virus ICP6 Δ , we established that HSV-1 R1 is essential for the protection of HSV-1-infected cells from poly(I:C)-induced apoptosis. The observation that the cellular FLICE-inhibitory proteins rapidly disappeared during infection suggested that HSV R1s could serve to compensate for the loss of these cellular inhibitors of caspase-8-mediated apoptosis. Individually expressed HSV-1 R1 and HSV-2 R1 counteract caspase-8 activation induced by poly(I:C). Interaction studies showed that HSV R1s not only interact constitutively with caspase-8 but also with RIP1 when expressed either individually or with other viral genes during HSV infection. The HSV-2 R1 deletion mutant R1(1-834)-GFP, a protein devoid of antiapoptotic activity, did not interact with caspase-8 and RIP1, indicating that interaction is required for the antiapoptotic function. HSV-2 R1 inhibits the interaction between the TLR3 adaptor TRIF and RIP1, which is essential to mediate TRIF-dependent apoptosis induced by extracellular poly(I:C) plus cycloheximide and TRIF overexpression. Importantly, TRIF silencing reduced caspase-8 activation induced by a treatment of mock- or ICP6 Δ -infected cells with extracellular poly(I:C) confirming that TRIF is involved in extracellular poly(I:C)-induced apoptosis. Thus, early during the lytic cycle, HSV R1s targets both caspase-8 and RIP1 to impair the apoptotic host defense mechanism triggered by dsRNA detection.

INTRODUCTION

Apoptosis is an ancestral defense mechanism of eukaryotic cells against viruses (33). By sacrificing themselves upon recognition of viral invasion, infected cells attempt to limit virus replication and protect the host. The importance of apoptosis as an antiviral response is evidenced by the existence of diverse viral apoptotic cell death suppressors (13). Double-stranded RNA (dsRNA) is thought to be a major pathogen-associated molecular pattern produced by RNA and DNA viruses that can trigger apoptosis (23, 25, 57). Intracellular dsRNA generated during infection can be released into the extracellular space from where it can stimulate antiviral responses into neighboring cells.

Innate responses to dsRNA depend on cellular sensors that activate specific signaling pathways resulting in inflammatory gene expression and apoptosis. Depending on their cellular location, viral dsRNA and poly(I:C) are recognized by the membrane-bound Toll-like receptor 3 (TLR3) or cytosolic sensors such as protein kinase dsRNA-dependent (PKR) and retinoic acid-inducible gene (RIG)-like receptors (RLRs) (15, 51). TLR3 detects extracellular and endosomal viral dsRNA and poly(I:C) (54) whereas cytosolic dsRNA and transfected poly(I:C) are detected by intracellular sensors (15, 51). TLR3 signals apoptosis via TRIF, a TIR-domain containing adaptor (43, 60, 61). TRIF-induced apoptosis requires the activation of caspases through a Fas-associated death domain (FADD)/caspase-8 axis (19). The ability of TRIF to induce apoptosis maps within its C-terminal RIP homotypic interaction motif (RHIM) that allows direct interaction with the receptor-interacting protein 1 (RIP1), a RHIM and death-domain containing serine/threonine protein kinase involved in the regulation of multiple cellular processes such as cell death and inflammation (27, 41).

dsRNA-mediated apoptosis, which is mainly studied with the synthetic analogue polyriboinosinic-polyribocytidylic acid [poly(I:C)], has been observed in a wide variety of primary, tumoral and immortalized cells (22, 25, 47). Two categories of cells have been identified depending on the rapidity and the extent of their apoptotic response to poly(I:C). In rapid responders (e.g. HeLa, human keratinocytes) transfected poly(I:C) or extracellular poly(I:C) combined either with CHX or SMAC mimetics induce a rapid engagement of the apoptotic machinery without requirement of type 1 interferon and *de novo* protein synthesis

(22, 23, 25, 57). In slow responders (e.g. murine embryo fibroblasts, human breast cancer cells), the apoptotic response to poly(I:C) is slow and requires *de novo* expression of type 1 interferon or proapoptotic factors such as members of the Bcl-2 family (22, 47, 49).

Recently, it has been shown that extracellular poly(I:C) induces apoptosis in several cancer cell lines through a TLR3/TRIF-dependent activation of caspase-8, which subsequently activates effector caspases such as caspase-3 (25, 47, 57). These reports suggested that TLR3 signals apoptosis through a TRIF/RIP1/FADD/caspase-8-dependent pathway in cells highly susceptible to poly(I:C)-induced apoptosis. In contrast, transfected poly(I:C) induces apoptosis through the assembly of a dsRNA-triggered death signaling inducing protein complex involving FADD and caspase-8, thus leading to the rapid activation of this initiator caspase subsequently followed by caspase-8-dependent stimulation of the effector caspase-3 and -7 (22, 23). However, molecular mechanisms linking cytosolic dsRNA-sensors to apoptosis are still ill defined even if RLRs and PKR have been shown to trigger caspase-8 activation (16, 50).

Herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2 infections elicit an immune response involving both innate and adaptive components of the immune system (6). Cellular recognition of HSV infection is triggered by several viral intermediates including dsRNA, which are produced by overlapping converging transcription and accumulate in large amount in the infected cells from the onset of HSV genome expression (24, 58). HSV recognition and specific antiviral response have been shown to involve the dsRNA sensors TLR3, PKR and RLRs (1, 3, 45, 46, 63).

HSV encode apoptotic cell death suppressors that confer resistance of the host cells against apoptosis induced by the viral replication itself and by extrinsic proapoptotic stimuli linked to immune effector cell cytotoxicity or the activation of death receptors (18). Several viral genes have been involved in the control of apoptosis including UL39 that encodes for the ribonucleotide reductase (RR) R1 subunits of HSV (35, 44). HSV RR consists of two homodimeric subunits, R1 and R2, which form the holoenzyme. This enzyme by providing the deoxyribonucleotides essential for viral DNA replication plays an essential role in quiescent cells notably in neurons. In addition to antiapoptotic properties, several non-RR related functions have been ascribed to HSV R1. A controversial protein

kinase activity has been described for the unique amino-terminal domain of the HSV-2 R1 protein (7, 9, 36). A chaperone-like activity similar to the one of HSP27 has been reported for HSV-2 R1 and others have found that HSV-1 R1 stimulates translation by promoting eIF4F translation complex assembly (4, 56).

Our previous works have shown that HSV-1 R1 and HSV-2 R1 protect epithelial cells from TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting constitutively and directly with caspase-8 in a way that prevents its activation by death receptors (10, 35). Based on previous reports showing the key role of caspase-8 activation in poly(I:C)-induced apoptosis (22, 57), we hypothesized that HSV R1s could also prevent poly(I:C)-induced apoptosis. In this study, we demonstrated that HSV infection protects HeLa cells from poly(I:C)-induced apoptosis and established that HSV-1 R1 is essential for this protection. Moreover, we showed that HSV-1 R1 and HSV-2 R1 not only interact constitutively with caspase-8 but also with RIP1 when expressed either individually or with other viral genes during HSV infection. Finally, we showed that HSV-2 R1 could inhibit TRIF apoptotic signaling by inhibiting TRIF/RIP1 binding. Thus, HSV R1s are viral inhibitor of dsRNA-induced apoptosis that target both caspase-8 and RIP1 to exert their antiapoptotic effect.

Materials and methods

Cell culture and infection. The conditions for the culture of HeLa and A549-tTA cells were as previously reported (4, 35). The previously described adenovirus (Ad) recombinants AdCMV5-R1, AdTR5-GFP, AdTR5-R1-GFP, AdTR5-R1(1-834)-GFP, AdTR5-R1 Δ (2-249)-GFP express HSV-2 R1, GFP, HSV-2 R1-GFP, HSV-2 R1(1-834)-GFP and HSV-2 R1 Δ (2-249)-GFP respectively (5, 35). One day after plating, HeLa and A549tTa cells were infected with Ad recombinants at MOIs chosen to obtain roughly similar level of expression of recombinant R1 proteins: AdCMV5-R1 (10 PFU/cell), AdTR5-CuO (10 PFU/cell, empty), AdTR5-GFP (25 PFU/cell), AdTR5-R1-GFP (25 PFU/cell), AdTR5-R1(1-834)-GFP (50 PFU/cell), AdTR5-R1 Δ (2-249)GFP (5 PFU/cell) (5, 10, 35). For HSV infections, HeLa cells were infected with the HSV-2 strain HG-52, the R1 null mutant HSV-1 ICP6 Δ or its parental strain KOS (10 PFU/cell) for the indicated periods (17).

Transfection. One day after plating, HeLa cells were transfected using calcium phosphate with the following plasmids: pAdCMV5 (empty vector), pAdCMV5-R1 (HSV-2 R1), pEGFP C1 (empty vector, Clontech), pLBPF1-GST (glutathione-S-transferase, GST), pLBPF1-GST-R1 (GST-HSV-1 R1), pcDNA3.1 (empty vector), pcDNA3-HA-EBV R1 (HA-EBV R1) (59). Transfection of pCMV14-3XFLAG (empty vector), pCMV14-3XFLAG-TRIF (TRIF-FLAG), pCMV14-3XFLAG-TRIF Δ C(1-541) (TRIF Δ C-FLAG), pcDNA3-6myc-RIP1 (myc-RIP1) were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen) (27). When required to block cell death induced by recombinant protein, 50 μ M Z-VAD-fmk (Bachem) was added to the culture medium 6 h after transfection.

Apoptosis determination. Forty-eight hours after transfection or 8 h after infection, cells were treated with cycloheximide (CHX) (15 μ g/ml; Sigma), CHX (15 μ g/ml) plus human recombinant TNF α (2.5 ng/ml; Sigma), poly(I:C) (10 μ g/ml; Calbiochem), CHX plus poly(I:C) or transfected with poly(I:C) (10 μ g/ml) using Lipofectin (Invitrogen) as previously described (22). After 6 h of treatment, the percentage of apoptotic cells was scored by microscopic observation in at least five randomly selected fields, as previously

reported (35). Attached and detached cells were then collected, washed twice in PBS and lysed with buffer appropriate for subsequent assays. Caspase-3/7 activity (DEVD-AFC cleavage activity) was measured as described previously (35). To determine apoptosis induced by the expression of recombinant TRIF or RIP1, HeLa cells were infected for 8 h with Ad recombinants and then co-transfected with appropriate expression vectors mixed with pEGFP C1. Twenty-four hours after transfection, GFP-positive cells were scored in five randomly selected fields to calculate the percentage of adherent cells (adherent GFP-positive cells/total GFP-positive cells X 100). Cells were then harvested with buffer appropriate for subsequent assays.

Gene silencing. Sequence of specific siRNA TRIF is as follows (depicted is the 19 nucleotides portion in the sense strand of targeted mRNA) 5'-UUAGAGUUGUCAUCGAAUC-3'. Allstars negative control siRNA from Qiagen was used as non-silencing control siRNA. HeLa cells seeded in six well plates were transfected with siRNA (40 nM) using Lipofectamine 2000.

Immunoprecipitation. Following infection or transfection, cells were collected, washed twice with PBS, and lysed at 4°C for 15 min in immunoprecipitation buffer (IP buffer) containing 0.5% Nonidet-P40, 0.5% Triton X-100, 50 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Roche) followed by centrifugation (10 min at 10 000 × g at 4°C). Lysates were precleared by incubation with protein G Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) for 2 h at 4°C followed by centrifugation. Anti-GFP antiserum (5), anti-FLAG (M2; Sigma), anti-myc (clone 9E10; Upstate) or anti-RIP1 (clone 38; BD Biosciences) were incubated with protein G Sepharose 4B beads for 2 h at 4°C. Precleared lysates were incubated with antibody coated beads for 2 h at 4°C. As control, precleared lysates were incubated for 2 h at 4°C with protein G Sepharose beads. Beads were recovered by centrifugation, washed 5 times with IP buffer and immunoprecipitated proteins were eluted in SDS sample-loading buffer for subsequent immunoblot analysis.

Glutathione-S-transferase pull-down. Following transfection, cells were collected and lysed with IP buffer as described above. Lysates were precleared by incubation with protein G Sepharose 4B beads for 2 h at 4°C followed by centrifugation. Precleared lysates

were incubated with glutathione sepharose 4B beads (Amersham) for 2 h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed 5 times with IP buffer and the bound proteins were eluted by boiling in SDS sample-loading buffer.

Immunoblot analysis. Whole cell extracts were prepared by lysis in SDS buffer (2% SDS, protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail) followed by brief sonication and centrifugation. Cytoplasmic extracts were prepared by lysis in IP buffer. Protein content analyses were performed by SDS-PAGE and immunoblotting as described previously (34). The following antibodies were used for immunoblotting: anti-FADD (A66-2; BD Biosciences), anti- β -actin (AC15; Abcam), anti-RIP1 (G322-2; BD Biosciences), anti-FLAG (M2; Sigma), anti-myc (9E10; Upstate), anti-HSV-1 ICP0 (5H7; Abcam) and anti-TRIF (AL227; Alexis Biochemicals). GFP and GFP-tagged proteins were detected using the monoclonal antibody anti-GFP B-2 (Santa Cruz Biotechnologies) or a polyclonal antibody against GFP (5). Caspase-8 was detected using the monoclonal antibody anti-caspase-8 1C12 (Cell signaling) or the monoclonal antibody 1C15 (kindly provided by Marcus Peter) (48). For HSV R1 and HSV R2 detection, the polyclonal anti-R1 serum 168R1 and the polyclonal anti-R2 serum P9 were used respectively (8, 35).

Statistical analyses. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences between groups were determined by a two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Bonferroni post-test using the Prism 4 software (GraphPad Software). The levels of statistical significance are indicated as follows in the figures: $p < 0.05$ (*), $p < 0,01$ (**) or $p < 0,001$ (***)

RESULTS

HSV infection inhibits poly(I:C)-induced apoptosis.

To determine whether HSV-infected cells could be protected from poly(I:C)-induced apoptosis, we chose HeLa cells because they are known to rapidly undergo apoptosis in response to either extracellular poly(I:C) when combined to protein synthesis inhibition by CHX to block the synthesis of short-life apoptosis inhibitors [CHX + poly(I:C)] or intracellular poly(I:C) [transfected poly(I:C)] (25). Indeed, <95% of HeLa cells treated with CHX + poly(I:C) for 6 h exhibited morphological changes typical of apoptosis, including membrane blebbing, cell body condensation and detachment from substratum whereas transfected poly(I:C) was slightly less efficacious with 60% of cells exhibiting apoptotic morphology (Fig. 1A). Caspase-3/7 activity determination using DEVD-AFC as substrate confirmed the better efficacy of extracellular poly(I:C). To assess the effect of HSV infection on poly(I:C)-induced apoptosis, cells were infected with HSV-1 strain KOS or HSV-2 strain HG-52 for 6 h before being treated with CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C). This period was chosen as it had been shown to be sufficient for maximal protection from CHX + TNF α (35). Fig. 1 shows that poly(I:C)-induced apoptosis either evaluated by morphological criteria (Fig. 1A) or caspase-3/7 activity (Fig. 1B) was drastically reduced in cells infected either with HSV-1 or HSV-2. These results demonstrated that HSV-1 and HSV-2 infection can protect cells from apoptosis induced by extracellular poly(I:C) and transfected poly(I:C).

In order to determine the time-course of appearance of the protective effect, HeLa cells were mock-infected or infected with HSV-1 strain KOS or HSV-2 strain HG-52 for increasing periods before being treated with CHX + poly(I:C), the most effective of the two treatments. Protection from poly(I:C)-induced apoptosis as scored by apoptotic morphology became detectable between 2 and 4 h with HSV-2 and appeared about 1 h earlier with HSV-1 (Fig. 1C). However, for the two HSV strains tested, maximal protection was reached within 6 to 8 h when the level of apoptosis following CHX + poly(I:C) treatment became comparable with the one observed in HSV-infected cells treated only with CHX. These results suggest that the protective effect is mediated by the synthesis of IE or E viral protein(s), of which R1 being a likely candidate.

Cells infected with the HSV-1 R1 null mutant ICP6 Δ are sensitized to poly(I:C)-induced apoptosis.

As it has been shown that apoptosis induced by CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C) is initiated by caspase-8 (22, 23, 25, 57), we hypothesized that HSV R1 could play a role in protecting HSV-infected cells against poly(I:C)-induced apoptosis. This hypothesis was first tested by infecting HeLa cells for 8 h with the HSV-1 R1 deletion mutant ICP6 Δ or its wild type parent KOS and treating them with poly(I:C), CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C). In this experiment, the extent of apoptosis was evaluated by assessing caspase-8 activation by immunoblotting and caspase-3/7 activation by *in vitro* enzymatic assay. As expected from the results described in Fig. 1, KOS infection efficiently impaired the caspase-8 proteolytic processing (Fig 2A, lane 11 and 14) and the caspase-3/7 activation (Fig. 2B) induced by either CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C) (Fig 2A, lane 11 and 14 and Fig. 2B). In sharp contrast, ICP6 Δ infection did not prevent the cleavage of the full-length caspase-8 (p55/53) (Fig. 2A, lane 12 and 15) and reduced only slightly caspase-3/7 activation resulting from CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C) treatments (Fig. 2B). Most strikingly, ICP6 Δ -infected cells treated with extracellular poly(I:C) without CHX showed strong caspase-8 (Fig. 2A, compare lane 7-8 to lane 9) and caspase-3/7 activation (Fig. 2B) both of which being nearly absent in mock- or KOS-infected cells. The ICP6 Δ sensitizing effect was even more evident when cells with apoptotic morphology were scored, increasing from <5% in mock infected dishes to >95% in ICP6 Δ -infected dishes. Taken together, these results suggest that HSV-1 R1 plays a crucial role in the protection of HSV-infected cells against poly(I:C)-induced apoptosis and that ICP6 Δ infection increases HeLa cells sensitivity to poly(I:C)-induced apoptosis.

HSV infection affects the accumulation of known regulators of caspase-8 activation.

ICP6 Δ sensitization of HeLa cells to poly(I:C)-induced apoptosis suggested that HSV-1 R1 could replace cellular inhibitor(s) of caspase-8 activation down-regulated during HSV infection. As the cellular FLICE-inhibitory proteins (c-FLIP) and cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2 (c-IAP1 and c-IAP2) are known regulators of the caspase-8 activation in death-receptor and TLR3 signaling pathways (11, 12, 53, 55, 62), we tested

whether infection with KOS or ICP6 Δ would influence their accumulation. Infection with both viruses produced a decrease in the levels of long (c-FLIP_L) and short (c-FLIP_S) isoforms of c-FLIP starting around 2 h post-infection to reach a barely detectable level at 8 h (Fig. 2C). The level of c-IAP1 remained stable until 4 h post-infection and thereafter gradually declined whereas c-IAP2 showed only a slight decrease at the 8 h time point. Importantly, the rate of disappearance of c-FLIP_L, c-FLIP_S and c-IAP1/2 proteins was roughly similar for both viruses showing that HSV-1 R1 does not affect the accumulation and the stability of these antiapoptotic proteins. For all our experiments, exponentially growing cells were used to prevent the inhibition of translation of viral mRNAs occurring in growth-arrested cells infected with an ICP6-null mutant (56). To ensure that the synthesis of viral proteins was not impaired in our ICP6 Δ -infected cells, the accumulation of the R2 subunit of HSV RR and the infected cell polypeptide 0 (ICP0) was measured. As R2 and ICP0 accumulated at similar rate in cells infected with both viruses (Fig. 2C), we concluded that the antiapoptotic defect of ICP6 Δ against poly(I:C) was not due to a lower ability of the cells to support the synthesis of viral polypeptides. Taken together, these results suggest that HSV-1 R1 owing to its property of viral inhibitor of caspase-8 activation could during infection compensate for the loss of inhibitors of caspase-8 activation.

HSV-1 R1 and HSV-2 R1 inhibit poly(I:C)-induced apoptosis.

As individually expressed HSV-1 R1 and HSV-2 R1 have been shown to inhibit TNF α caspase-8-mediated apoptosis (10, 35), we hypothesized that both proteins could also impair the activation of caspase-8 induced by poly(I:C). HeLa cells were transfected with an expression plasmid encoding for HSV-1 R1 fused to GST (GST-HSV-1 R1) or a HSV-2 R1 expression plasmid and treated with poly(I:C), CHX, CHX + poly(I:C) or transfected poly(I:C) 48 h after transfection. CHX + TNF α was also included as a positive control. In cells transfected with control plasmids, treatments with CHX + poly(I:C), transfected poly(I:C) or CHX + TNF α triggered caspase-8 (Fig. 3A and 3B, upper panels, lane 9, 11, 13) and caspase-3/7 (Fig 3A and 3B, lower panels) activation. In sharp contrast, proteolytic processing of caspase-8 (Fig. 3A and 3B, upper panels, lanes 10, 12 and 14) and caspase-3/7 activation (Fig 3A and 3B, lower panels) were efficiently inhibited in GST-

HSV-1 R1 or HSV-2 R1 expressing cells treated with CHX + poly(I:C), transfected poly(I:C) or CHX + TNF α . In agreement with caspase analyses, the % of morphologically apoptotic cells was reduced by more than 2-fold by both HSV R1s (data not shown). These results demonstrated that i) both HSV-1 R1 and HSV-2 R1 expressed individually protect HeLa cells from poly(I:C)-induced apoptosis by preventing caspase-8 cleavage and caspase-3/7 activation, ii) no other HSV proteins are required for the protection against poly(I:C).

HSV-2 R1 inhibits TRIF- and RIP1-dependent apoptosis.

Extracellular poly(I:C) is detected by TLR3, which triggers apoptosis through the adaptor protein TRIF. Ectopic expression experiments have shown that TRIF signals apoptosis through a FADD/caspase-8-dependent axis by interacting with RIP1 via RHIM motifs (19, 20, 27, 38). As HSV-2 R1 inhibits apoptosis mediated by extracellular poly(I:C) + CHX, we sought to determine whether HSV-2 R1 could also prevent apoptosis induced by TRIF and RIP1 overexpression. HeLa cells were mock-infected or infected for 8 h with Ad control or Ad HSV-2 R1 and were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged TRIF or myc-tagged RIP1. As control, we used TRIF Δ C-FLAG, a TRIF deletion mutant lacking a C-terminal region (171 amino acids) encompassing the RHIM motif required for interaction with RIP1 (27). To identify transfected cells, a GFP expression vector was co-transfected with TRIF and RIP1 constructs. Twenty-four hours after transfection, TRIF- and RIP1-induced apoptosis was evaluated by calculating the percentage of adherent GFP-expressing cells. When transfection of TRIF-FLAG or myc-RIP1 were performed after mock or Ad control infection, the majority of GFP-positive cells exhibited apoptotic morphology, only 25 % of TRIF-transfected cells and 40 % of RIP1-transfected cells remaining adherent with a morphology similar to control cells (Fig. 4A). In sharp contrast, when cells had been infected with Ad HSV-2 R1 prior to transfection with TRIF-FLAG or myc-RIP1, more than 90 % of GFP-positive cells remaining adherent (Fig. 4A). Analyses of caspase-8 processing showed that TRIF-FLAG and myc-RIP1 induced proteolytic cleavage of caspase-8 as revealed by the accumulation of the fully processed p18 large subunit in mock- and Ad control-infected cell lysates (Fig. 4B, lane 4, 5, 10 and 11). In contrast, corresponding lysates from cells expressing HSV-2 R1 exhibited barely detectable

amount of p18 cleaved fragment (Fig. 4B, lane 6 and 12). As expected, overexpression of TRIF Δ C-FLAG induced little apoptosis (Fig. 4A) or caspase-8 cleavage confirming that interaction between TRIF and RIP1 is required to signal apoptosis (Fig. 4B, lane 7, 8 and 9) (27). We also observed that HSV-2 R1 had significant impacts on overexpressed recombinant proteins. Firstly, HSV-2 R1 expressing cells accumulated higher level of TRIF-FLAG protein than control cells (Fig. 4B, compare lanes 4 and 5 to 6). As TRIF-FLAG protein accumulation in HSV-2 R1 expressing cells was comparable with the one observed in mock-infected cells transfected with TRIF-FLAG and treated with the pancaspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. 4B, lane 6 and 13), we propose that the higher TRIF-FLAG accumulation in HSV-2 R1 expressing cells results from the inhibition of apoptosis by HSV-2 R1. Secondly, as expected from previous reports showing that caspase-8 cleaves RIP1 during FasL- and TNF α -induced apoptosis (31, 38, 40), a processed form of myc-RIP1 (myc-RIP1_C) was observed with an anti-myc mAb predominantly in the absence of protection against apoptosis. Indeed, the detection of myc-RIP1_C correlated with the presence of active caspase-8 in mock- and Ad control-infected cells (Fig. 4B, lane 10 and 11) and was decreased by the pancaspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. 4B, lane 14). HSV-2 R1, which suppressed both RIP1-induced apoptosis and caspase-8 activation, also diminished the cleavage of myc-RIP1 suggesting also that this cleavage was induced by caspase-8 in mock- and Ad control-infected cells (Fig. 4B, lane 12). Altogether, these results demonstrate that HSV-2 R1 efficiently blocks caspase-8 activation and apoptosis induced by ectopic expression of TRIF and RIP1.

HSV R1s interact with RIP1.

As recent reports demonstrated that M45, a catalytically inactive homologue of HSV R1 from murine cytomegalovirus (MCMV), interacts with RIP1 in a way that blocks TRIF-induced apoptosis (39, 52), we examined whether HSV R1s could interact with RIP1. For HSV-1 R1, HeLa cells were transfected with expression plasmids encoding for GST-tagged HSV-1 R1 or GST and GST pull-down assays were performed (Fig. 5A). The detection of both full-length caspase-8 (p55/53) and RIP1 in the GST-tagged HSV-1 R1 sample (lane 2) but not in the GST control (lane 1) revealed that HSV-1 R1 not only interacts with the full-length caspase-8 (p55/53) but also with RIP1. To assess the

interaction between HSV-2 R1 and RIP1, immunoprecipitation was performed with an anti-myc antibody on extracts prepared from HeLa cells infected with Ad control or Ad HSV-2 R1 and subsequently transfected with a myc-RIP1 expressing vector (*Z-VAD-fmk* was added to the culture medium 6 h after transfection to prevent myc-RIP1 cleavage) (Fig. 5B). As can be seen in lane 2, HSV-2 R1 co-immunoprecipitated with myc-RIP1. However, this interaction did not affect the binding of myc-RIP1 to endogen FADD, which was equivalently co-immunoprecipitated in the presence or absence of HSV-2 R1 (Fig. 5B, lanes 1 and 2).

Two studies on the domains of M45 required for interaction with RIP1 came to different conclusions. One report proposed that a putative RHIM motif localized in the N-terminal portion of M45 is involved in the interaction with RIP1 (52). The other study concluded that the C-terminal region of the R1 homology domain of M45 was required for the interaction with RIP1 whereas the N-terminal end encompassing the RHIM motif was dispensable (39). Interestingly, a RHIM-like sequence has also been identified by sequence alignment in the unique N-terminal domain of HSV-2 R1 (37). Therefore, it was interesting to investigate which HSV-2 R1 domains were involved in RIP1 interaction. To this end, A549tTA cells were infected with Ad encoding for HSV-2 R1-GFP, HSV-2 R1(1-834)-GFP, a C-terminal deletion mutant devoid of antiapoptotic activity against TNF α or FasL, or R1 Δ (2-249)-GFP, a N-terminal truncation mutant showing antiapoptotic property but lacking the putative RHIM-like motif (5). GFP-tagged proteins were immunoprecipitated from infected cells lysates using an anti-GFP antiserum (Fig. 5C). Both caspase-8 and RIP1 were detected in immunoprecipitates from cells expressing HSV-2 R1-GFP (lane 4) or HSV-2 R1 Δ (2-249)-GFP (lane 3) but not in cells expressing GFP (lane 1) or HSV-2 R1(1-834)-GFP (lane 2). These results showed that the reductase domain of HSV-2 R1 but not its N-terminal domain containing the putative RHIM sequence is essential for interaction with the full-length caspase-8 (p55/53) as well as RIP1.

To assess whether HSV R1s could interact with RIP1 in the context of HSV infection, HeLa cells were infected either with HSV-1 KOS or HSV-2 HG-52 for 8 h. RIP1 was immunoprecipitated using an anti-RIP1 antibody. Immunoblot analyses performed with the polyclonal anti-R1 serum 168R1 revealed that both HSV-1 R1 and HSV-2 R1 co-

immunoprecipitated with RIP1 (Fig. 5D, lanes 2 and 3). Note that the 168R1 serum, which was raised with purified HSV-2 R1, recognized less efficiently the HSV-1 R1 than the HSV-2 R1. These results demonstrated that HSV R1s physiologically interact with RIP1 during infection with both HSVs.

HSV-2 R1 inhibits the RHIM-dependent interaction between TRIF and RIP1.

To assess the impact of the HSV-2 R1 interaction with RIP1, we tested whether HSV-2 R1 could affect the binding between TRIF and RIP1, which is essential for TRIF-induced apoptosis (19, 27). To this end, HeLa cells were infected with Ad control or Ad HSV-2 R1 and then co-transfected with myc-RIP1 plus TRIF-FLAG in the presence of Z-VAD-fmk. The immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins showed that myc-RIP1 co-immunoprecipitated with TRIF-FLAG in Ad control-infected cells (Fig. 5E, lane 1). In contrast, when cells have been infected with Ad HSV-2 R1 prior to transfection, the interaction between myc-RIP1 and TRIF-FLAG was greatly reduced (Fig. 5E, lane 2). The FLAG immunoprecipitates also revealed that HSV-2 R1 did not interact with TRIF-FLAG (Fig. 5E, lane 2). These results suggest that the binding of HSV-2 R1 to RIP1 impairs the interaction between TRIF and RIP1.

Poly(I:C) induces caspase-8 activation through a TRIF-dependent signaling pathway in mock- and ICP6 Δ -infected cells.

As it has been shown that extracellular poly(I:C) induces apoptosis via a TLR3/TRIF/caspase-8 signaling pathway (57), we tested whether the specific silencing of TRIF by siRNA would reduce the strong caspase activation induced by extracellular poly(I:C) in ICP6 Δ -infected cells. To this end, HeLa cells were transfected with control siRNA or TRIF siRNA. After 48 h, cells were mock-infected or infected with HSV-1 ICP6 Δ for 8 h; then, cells were treated with CHX, poly(I:C) or CHX + poly(I:C) for 6 h. Treatment with TRIF siRNA but not control siRNA strongly decreased the amount of TRIF (Fig. 6A, lanes 3 and 6). Importantly, the levels of TRIF in cells infected for 8 h with ICP6 Δ remained comparable with the one detected in mock-infected cells (Fig. 6A). TRIF silencing inhibited the proteolytic processing of caspase-8 (Fig. 6B, upper panel, lane 9 and

12) and also reduced caspase-3/7 activity observed in mock-infected cells treated with extracellular poly(I:C) alone or in combination with CHX (Fig. 6B, lower panel). TRIF silencing in ICP6 Δ -infected cells efficiently reduced the caspase-8 cleavage induced by both poly(I:C) and CHX + poly(I:C) (Fig. 6C, upper panel, lane 9 and 12). In addition, caspase-3/7 activation was significantly inhibited in ICP6 Δ -infected cells transfected with TRIF siRNA (Fig. 6C, lower panel). TRIF silencing did not affect the resistance of KOS-infected cells against poly(I:C), as expected (data not shown). These results demonstrate that extracellular poly(I:C) induces caspase-8 activation and caspase-3/7 in part through a TRIF-dependent signaling pathway in mock- and ICP6 Δ -infected HeLa cells.

DISCUSSION

In the context of HSV infection, dsRNA accumulate in infected cells and could also be released in the extracellular space following viral-induced cell lysis. Poly(I:C), a synthetic dsRNA analogue, has been shown to induce apoptosis in several cell types. In HeLa cells, extracellular poly(I:C) plus CHX induces apoptosis through TLR3 via a TRIF/RIP1/caspase-8 axis (19, 27, 57) whereas intracellular poly(I:C) stimulates diverse cytosolic dsRNA sensors that induce caspase-8 activation through the formation of a dsRNA-triggered death inducing signaling complex (22). HSV infection confers protection from apoptosis induced by the virus itself and a variety of exogenous proapoptotic stimuli such as TNF α and FasL (2, 14, 32). The present work demonstrates that infection by either HSV-1 or HSV-2 protects HeLa cells from apoptosis induced by either extracellular poly(I:C) plus CHX or transfected poly(I:C).

We previously demonstrated that the R1s of HSV-1 and HSV-2 contribute to prevent death receptor-induced apoptosis of HSV-infected epithelial cells by inhibiting caspase-8 activation through a direct interaction with the caspase 8 prodomain (5, 10, 35). Here, we provide two lines of evidence that argue in favor of an essential role of HSV R1s for the inhibition of poly(I:C)-induced apoptosis. Firstly, our data showed that the protective effect appears rapidly in both HSV-1 and HSV-2 infected cells with a time course compatible with the synthesis of HSV R1s and that deleting R1 in the HSV-1 strain KOS (mutant ICP6 Δ) dramatically decreased the antiapoptotic potential of the infection. This finding is important not only by the magnitude of the effect obtained with the R1 deletion but also because ICP6 Δ -infected cells were killed following treatment with extracellular poly(I:C) alone whereas mock-infected cells required concomitant inhibition of protein synthesis to be destroyed by poly(I:C) delivered in the culture medium. Secondly, HSV-1 R1 and HSV-2 R1 expressed individually efficiently inhibit caspase-8 proteolytic cleavage induced by extracellular or transfected poly(I:C), a cleavage which is a crucial step to fully activate and stabilize this initiator caspase (21).

The hypothesis that HSV R1 could inhibit poly(I:C)-induced apoptosis was mainly based on our previous demonstration of its direct physical interaction with procaspase-8.

The immunoprecipitation and GST pull-down experiments reported here showed that in addition HSV-1 R1 and HSV-2 R1 constitutively interact with RIP1 when expressed either alone or in combination with other viral genes during HSV infection. In this respect, HSV R1s are similar to the R1 subunit of MCMV, M45, which by interacting with RIP1 inhibits TNF α - and TRIF-induced apoptosis (39, 52). Delineating the relative importance of the two interactions (HSV R1/caspase-8 vs HSV R1/RIP1) in the protection against poly(I:C)-induced apoptosis was not achieved in the present work. On one hand, the C-terminal deletion mutant HSV-2 R1(1-834)-GFP, which is devoid of antiapoptotic activity against TNF α and FasL (5), and poly(I:C) (F. Dufour and Y. Langelier, unpublished observations), does not interact with caspase-8 and RIP1. On the other hand, the N-terminal deletion mutant lacking the RHIM motif interacts with both proteins and protects against both types of proapoptotic stimulus. Previously, we demonstrated that HSV R1s and full-length caspase-8 interact constitutively and directly in a way that inhibits the dimerization/activation of caspase-8 (10). Given the facts that i) caspase-8 activation has been shown to be essential to apoptosis induction by extracellular poly(I:C) and transfected poly(I:C) in several cell lines including HeLa cells and ii) HSV R1s inhibit poly(I:C)-induced caspase-8 activation, it is likely that the HSV R1/caspase-8 binding plays a role in the protective effect. Our data also suggest that HSV-2 R1 inhibits the interaction between the TLR3 adaptor TRIF and RIP1, which mediates TRIF-dependent apoptosis induced by extracellular poly(I:C) as well as by TRIF overexpression. Therefore, it is reasonable to suggest that both interactions (HSV R1/caspase-8 and HSV R1/RIP1) should contribute to protect infected cells from apoptosis induced by dsRNA sensors the activation of which has been shown to elicit the assembly of signaling complexes that share common proteins such as RIP1 and caspase-8 (15, 30, 54). It remains to be determined whether HSV R1s as M45 inhibit other RIP1 functions in dsRNA-sensors and death receptors signaling pathways (37).

Our search of explanations for cell sensitization to poly(I:C) by ICP6 Δ -infection pointed out to a new physiological role for HSV R1. Indeed, our finding that infection of HeLa cells with HSV-1 (KOS and ICP6 Δ , Fig. 4) and HSV-2 (data not shown) induces a rapid decrease in cFLIP_S and cFLIP_L protein levels suggested that HSV R1 could contribute to compensate for the loss of these cellular caspase-8 regulators during HSV infection.

Interestingly, preliminary data indicating that ICP6 Δ -infection could also sensitize HeLa cells to Fc:FasL suggested that this viral counterbalance could play a protective role for other proapoptotic stimuli involving caspase-8 activation. A recent report showing that HSV-1 infection down-regulated cFLIP_L and cFLIP_S accumulation in several epithelial cell lines including HeLa cells (29) and in immature dendritic cells indicated that other viral genes such as LAT could also contribute to counterbalance cFLIP loss.

As *in vitro* transcribed natural mRNA and RNA released by necrotic cells are potent host-derived activator of TLR3 (28) and that TLR3/TRIF signaling pathway signals apoptosis in ICP6 Δ -infected cells, it is tempting to speculate that HSV R1s could protect infected cells from TLR3-induced apoptosis triggered by viral dsRNA as well as cellular RNA escaping during destruction of the host cell. Other viral proteins could contribute to prevent dsRNA-mediated apoptosis. Indeed, HSVs express several inhibitors of the innate immune response (e.g. Us11, ICP0, ICP34.5 and vhs) but their ability to modulate dsRNA-induced apoptosis have not been directly tested (42). Our results indicate that these proteins with known antiapoptotic properties do not succeed to impair apoptosis induced by transfected and extracellular poly(I:C) during an infection with an HSV R1 null mutant.

HSV developed a large number of strategies to prevent both alarming and suicidal mechanisms of the antiviral response inimical to its replication (18, 42). As a good example, HSV R1s are multifunctional proteins that not only supply deoxyribonucleotides necessary for viral DNA replication but also exert antiapoptotic activity that protect host cells from death receptor-induced apoptosis. This study reveals that HSV R1s also exert a protective effect against poly(I:C)-induced caspase-8 activation in HSV-infected cells by interacting with RIP1 and caspase-8. Interestingly, this type of viral protection is not restricted to HSV since a recent study showed that infection with the classical swine fever virus, a positive-sense RNA virus, protects endothelial cells from extracellular poly(I:C)-mediated apoptosis notably by inhibiting caspase-8 activation (26). Thus, viral inhibition of dsRNA-mediated apoptosis could be a strategy used by several viruses to ensure host cell survival and therefore efficient replication and spreading.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant NRF # 67052.

We thank William J. Kaiser for the kind gift of plasmids.

REFERENCES

1. **Al-Khatib, K., B. R. Williams, R. H. Silverman, W. Halford, and D. J. Carr.** 2004. Distinctive roles for 2',5'-oligoadenylate synthetases and double-stranded RNA-dependent protein kinase R in the in vivo antiviral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN-beta. *J Immunol* **172**:5638-47.
2. **Aubert, M., and J. A. Blaho.** 1999. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol* **73**:2803-13.
3. **Carr, D. J., T. Wuest, L. Tomanek, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2006. The lack of RNA-dependent protein kinase enhances susceptibility of mice to genital herpes simplex virus type 2 infection. *Immunology* **118**:520-6.
4. **Chabaud, S., H. Lambert, A. M. Sasseville, H. Lavoie, C. Guilbault, B. Massie, J. Landry, and Y. Langelier.** 2003. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett* **545**:213-8.
5. **Chabaud, S., A. M. Sasseville, S. M. Elahi, A. Caron, F. Dufour, B. Massie, and Y. Langelier.** 2007. The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J Gen Virol* **88**:384-94.
6. **Chew, T., K. E. Taylor, and K. L. Mossman.** 2009. Innate and Adaptive Immune Responses to Herpes Simplex Virus. *Viruses* **1**:979-1002.
7. **Chung, T. D., J. P. Wymer, C. C. Smith, M. Kulka, and L. Aurelian.** 1989. Protein kinase activity associated with the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *J Virol* **63**:3389-98.
8. **Cohen, E. A., P. Gaudreau, P. Brazeau, and Y. Langelier.** 1986. Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *J Virol* **60**:1130-3.
9. **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 (Pt 6)**:1471-6.
10. **Dufour, F., A. M. Sasseville, S. Chabaud, B. Massie, M. R. Siegel, and Y. Langelier.** 2010. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1

and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. Submitted at Apoptosis.

11. **Friboulet, L., C. Gourzones, S. W. Tsao, Y. Morel, C. Paturel, S. Temam, C. Uzan, and P. Busson.** 2010. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* **10**:327.
12. **Friboulet, L., C. Pioche-Durieu, S. Rodriguez, A. Valent, S. Souquere, H. Ripoché, A. Khabir, S. W. Tsao, J. Bosq, K. W. Lo, and P. Busson.** 2008. Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis. *Neoplasia* **10**:1183-94.
13. **Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat, and G. Kroemer.** 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* **4**:e1000018.
14. **Galvan, V., and B. Roizman.** 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 U S A* **95**:3931-6.
15. **Garcia, M. A., E. F. Meurs, and M. Esteban.** 2007. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**:799-811.
16. **Gil, J., and M. Esteban.** 2000. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**:3665-74.
17. **Goldstein, D. J., and S. K. Weller.** 1988. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J Virol* **62**:196-205.
18. **Goodkin, M. L., E. R. Morton, and J. A. Blaho.** 2004. Herpes simplex virus infection and apoptosis. *Int Rev Immunol* **23**:141-72.
19. **Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang, and H. B. Shu.** 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**:15652-61.
20. **Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel.** 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**:387-96.

21. **Hughes, M. A., N. Harper, M. Butterworth, K. Cain, G. M. Cohen, and M. MacFarlane.** 2009. Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* **35**:265-79.
22. **Iordanov, M. S., J. D. Kirsch, O. P. Ryabinina, J. Wong, P. N. Spitz, V. B. Korcheva, A. Thorburn, and B. E. Magun.** 2005. Recruitment of TRADD, FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs). *Apoptosis* **10**:167-76.
23. **Iordanov, M. S., O. P. Ryabinina, P. Schneider, and B. E. Magun.** 2005. Two mechanisms of caspase 9 processing in double-stranded RNA- and virus-triggered apoptosis. *Apoptosis* **10**:153-66.
24. **Jacquemont, B., and B. Roizman.** 1975. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *J Virol* **15**:707-13.
25. **Jiang, Q., H. Wei, and Z. Tian.** 2008. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* **8**:12.
26. **Johns, H. L., E. Bensaude, S. A. La Rocca, J. Seago, B. Charleston, F. Steinbach, T. W. Drew, H. Crooke, and H. Everett.** 2010. Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from pIpC-mediated apoptosis. *J Gen Virol* **91**:1038-46.
27. **Kaiser, W. J., and M. K. Offermann.** 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* **174**:4942-52.
28. **Kariko, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman.** 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**:12542-50.
29. **Kather, A., M. J. Raftery, G. Devi-Rao, J. Lippmann, T. Giese, R. M. Sandri-Goldin, and G. Schonrich.** 2010. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol* **84**:1034-46.
30. **Kawai, T., and S. Akira.** 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1143**:1-20.

31. **Kim, J. W., E. J. Choi, and C. O. Joe.** 2000. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* **19**:4491-9.
32. **Koyama, A. H., and A. Adachi.** 1997. Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78 (Pt 11)**:2909-12.
33. **Koyama, A. H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, and A. Adachi.** 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect* **2**:1111-7.
34. **Lamarche, N., G. Matton, B. Massie, M. Fontecave, M. Atta, F. Dumas, P. Gaudreau, and Y. Langelier.** 1996. Production of the R2 subunit of ribonucleotide reductase from herpes simplex virus with prokaryotic and eukaryotic expression systems: higher activity of R2 produced by eukaryotic cells related to higher iron-binding capacity. *Biochem J* **320 (Pt 1)**:129-35.
35. **Langelier, Y., S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbault, A. M. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, and B. Massie.** 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* **83**:2779-89.
36. **Langelier, Y., L. Champoux, M. Hamel, C. Guilbault, N. Lamarche, P. Gaudreau, and B. Massie.** 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**:1435-43.
37. **Lembo, D., and W. Brune.** 2009. Tinkering with a viral ribonucleotide reductase. *Trends Biochem Sci* **34**:25-32.
38. **Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, and Z. G. Liu.** 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**:2514-26.
39. **Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune.** 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3094-9.
40. **Martinon, F., N. Holler, C. Richard, and J. Tschopp.** 2000. Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett* **468**:134-6.
41. **Meylan, E., and J. Tschopp.** 2005. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* **30**:151-9.

42. **Mossman, K. L., and A. A. Ashkar.** 2005. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol* **18**:267-81.
43. **Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya.** 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**:161-7.
44. **Perkins, D., E. F. Pereira, M. Gober, P. J. Yarowsky, and L. Aurelian.** 2002. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J Virol* **76**:1435-49.
45. **Rasmussen, S. B., S. B. Jensen, C. Nielsen, E. Quartin, H. Kato, Z. J. Chen, R. H. Silverman, S. Akira, and S. R. Paludan.** 2009. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene- like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* **90**:74-8.
46. **Rasmussen, S. B., L. N. Sorensen, L. Malmgaard, N. Ank, J. D. Baines, Z. J. Chen, and S. R. Paludan.** 2007. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol* **81**:13315-24.
47. **Salaun, B., I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque, and T. Renno.** 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* **176**:4894-901.
48. **Scaffidi, C., J. P. Medema, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1997. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* **272**:26953-8.
49. **Sun, Y., and D. W. Leaman.** 2005. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem* **280**:15561-8.
50. **Takahashi, K., T. Kawai, H. Kumar, S. Sato, S. Yonehara, and S. Akira.** 2006. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* **176**:4520-4.
51. **Takeuchi, O., and S. Akira.** 2008. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* **20**:17-22.

52. **Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski.** 2008. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J Biol Chem* **283**:16966-70.
53. **Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit, and D. Vucic.** 2007. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**:669-81.
54. **Vercammen, E., J. Staal, and R. Beyaert.** 2008. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* **21**:13-25.
55. **Vince, J. E., W. W. Wong, N. Khan, R. Feltham, D. Chau, A. U. Ahmed, C. A. Benetatos, S. K. Chunduru, S. M. Condon, M. McKinlay, R. Brink, M. Leverkus, V. Tergaonkar, P. Schneider, B. A. Callus, F. Koentgen, D. L. Vaux, and J. Silke.** 2007. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**:682-93.
56. **Walsh, D., and I. Mohr.** 2006. Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes Dev* **20**:461-72.
57. **Weber, A., Z. Kirejczyk, R. Besch, S. Potthoff, M. Leverkus, and G. Hacker.** 2009. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell Death Differ*.
58. **Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan.** 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**:5059-64.
59. **Whitehurst, C. B., S. Ning, G. L. Bentz, F. Dufour, E. Gershburg, J. Shackelford, Y. Langelier, and J. S. Pagano.** 2009. The EBV Deubiquitinating Enzyme, BPLF1, Reduces EBV Ribonucleotide Reductase Activity. *J Virol*.
60. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-3.
61. **Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that

preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**:6668-72.

62. **Yu, J. W., and Y. Shi.** 2008. FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* **27**:6216-27.

63. **Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Heron, L. Vallee, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova.** 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**:1522-7.

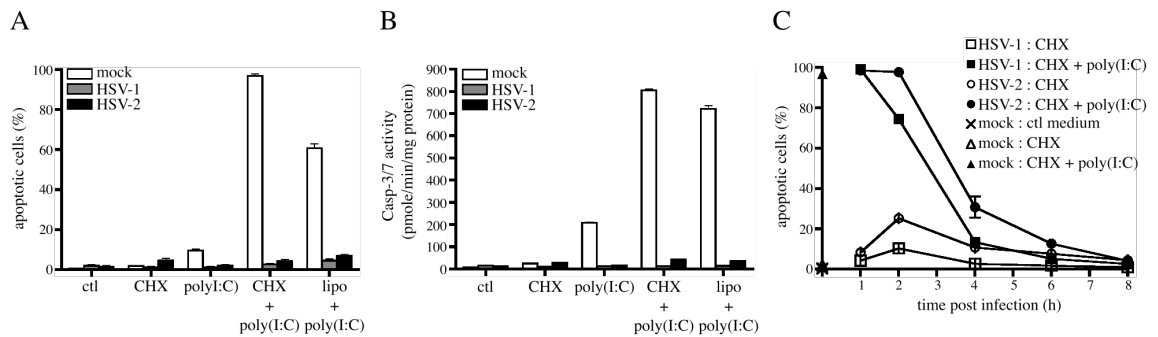


Figure 1 : HSV infection protects HeLa cells against poly(I:C)-induced apoptosis.

(A) HeLa cells were mock-infected or infected with either HSV-1 strain KOS (HSV-1) or HSV-2 strain HG-52 for 8 h before addition of control medium (ctl), CHX, poly(I:C), CHX + poly(I:C) or poly(I:C) transfection [lipo + poly(I:C)]. After 6 h, the percentages of apoptotic cells were scored (means \pm SE). (B) Cells prepared in (A) were harvested and cytoplasmic lysates were tested for caspase-3/7 (Casp-3/7) activity (mean \pm SE). (C) HeLa cells were mock-infected or infected with either HSV-1 strain KOS (HSV-1) or HSV-2 strain HG-52 for increasing periods before addition of CHX, CHX + poly(I:C) (10 μ g/ml) or control medium. The percentages of apoptotic cells were scored 6 h after addition of the lethal cocktail (means \pm SE).

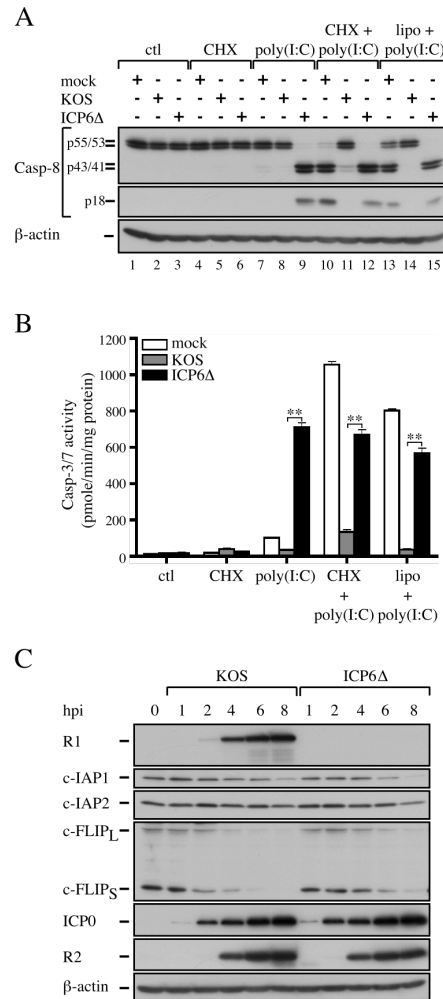


Figure 2 : The HSV-1 R1 null mutant ICP6Δ is defective in blocking apoptosis.

HeLa cells were mock-infected or infected with either HSV-1 KOS (KOS) or HSV-1 ICP6Δ (ICP6Δ) for 8 h before addition of control medium (ctl), CHX, poly(I:C), CHX + poly(I:C) or poly(I:C) transfection [lipo + poly(I:C)]. After 6 h, cells were collected and cytoplasmic cell lysates were (A) analyzed by immunoblotting for caspase-8 (Casp-8) and β-actin protein content and (B) tested for caspase-3/7 (Casp-3/7) activity. The immunoblots and caspase activities (mean ± SE, $n = 6$, $**P < 0.01$) are representative of three independent experiments done in duplicate. (C) The levels of c-FLIP_L and c-FLIP_S isoforms and c-IAP1/2 decrease following HSV infection. HeLa cells were infected with either HSV-1 KOS (KOS) or HSV-1 ICP6Δ (ICP6Δ). At the indicated times post-infection (hpi) cells

were collected and total protein extracts were prepared for analyses by immunoblotting for HSV R1, c-IAP1, c-IAP2, c-FLIP, HSV R2, ICP0 and β -actin protein content. The immunoblots are representative of two independent experiments done in duplicate.

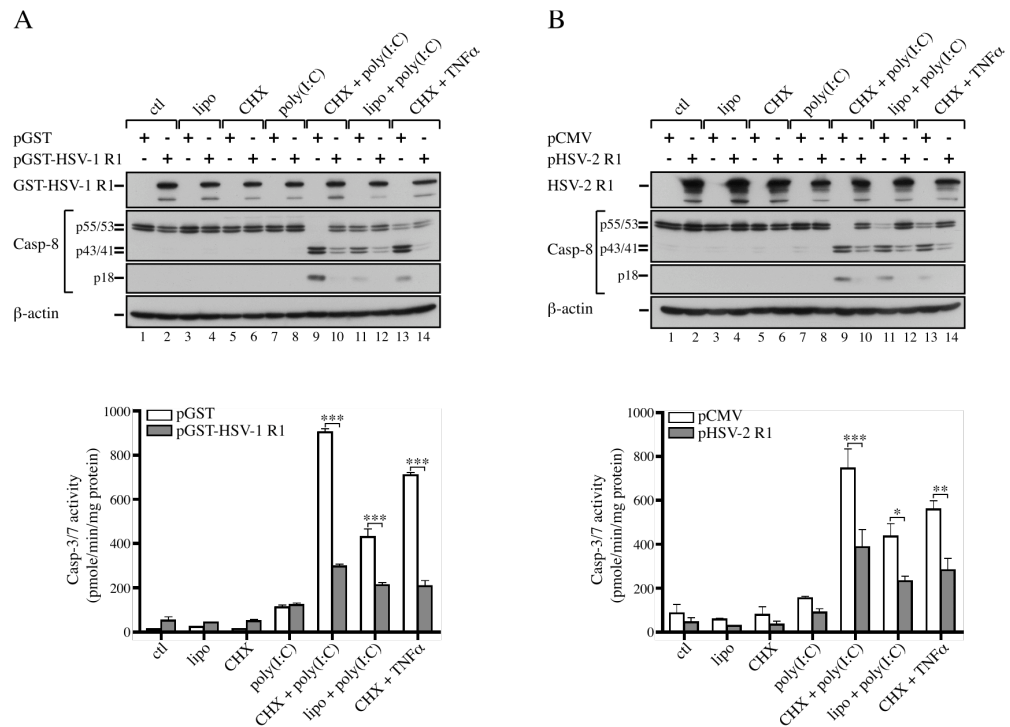


Figure 3 : HSV-1 R1 and HSV-2 R1 inhibit caspase activation induced by poly(I:C).

HeLa cells were transfected with (A) pLBPF1-GST (pGST) or pLBPF1-GST-R1 (pGST-HSV-1 R1) or (B) pAdCMV5 (pCMV) or pAdCMV5-R1 (pHSV-2 R1). After 48 h, cells were untreated (ctl) or treated with CHX, poly(I:C), CHX + poly(I:C) or transfected with poly(I:C) [lipo + poly(I:C)]. As positive control for HSV R1 protection, cells were also treated with CHX + TNF α . After 6 h, cells were harvested and cytoplasmic lysates were (upper panels) analyzed by immunoblotting for HSV R1, caspase-8 (Casp-8) and β -actin protein content and (lower panels) tested for caspase-3/7 (Casp-3/7) activity. Estimating the proportion of GFP positive cells on parallel dishes co-transfected with pEGFP C1 gave transfection efficiency higher than 80 %. The immunoblots and caspase activities (mean \pm SE, $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) are representative of three independent experiments.

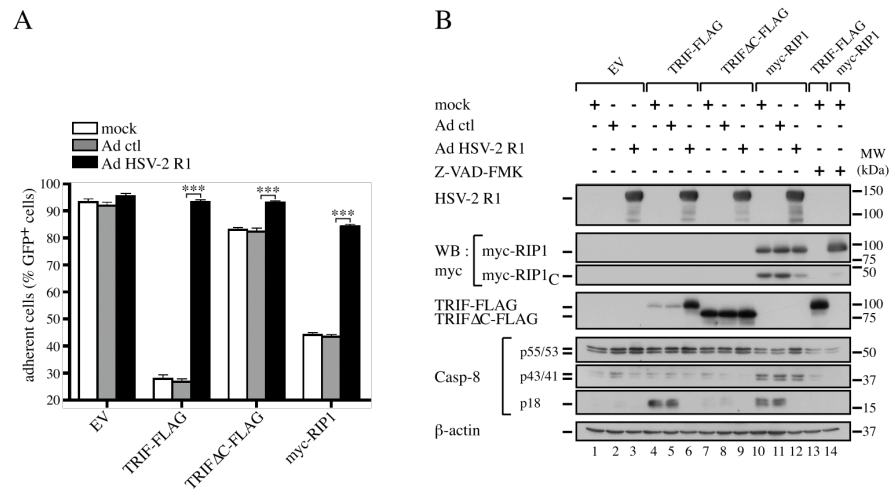


Figure 4 : HSV R1 inhibits apoptosis induced by overexpression of TRIF or RIP1.

(A) HeLa cells were mock-infected or infected with AdTR5CuO (Ad ctl) or AdCMV5R1 (Ad HSV-2 R1). After 8 h, cells were co-transfected with pEGFP C1 mixed with empty vector (EV) or expression plasmids encoding for TRIF-FLAG, TRIFΔC-FLAG or myc-RIP. The percentages of GFP-positive adherent cells were scored after 24 h. (B) Cells were collected and cytoplasmic cell lysates were analyzed for HSV-2 R1, RIP1, caspase-8 (Casp8), β-actin, myc-tagged and FLAG-tagged protein content. Myc-RIP1_C indicates a processed form of myc-RIP1. The immunoblots and percentage of GFP-positive adherent cells (mean ± SE, $n = 3$, *** $P < 0.001$) are representative of three independent experiments.

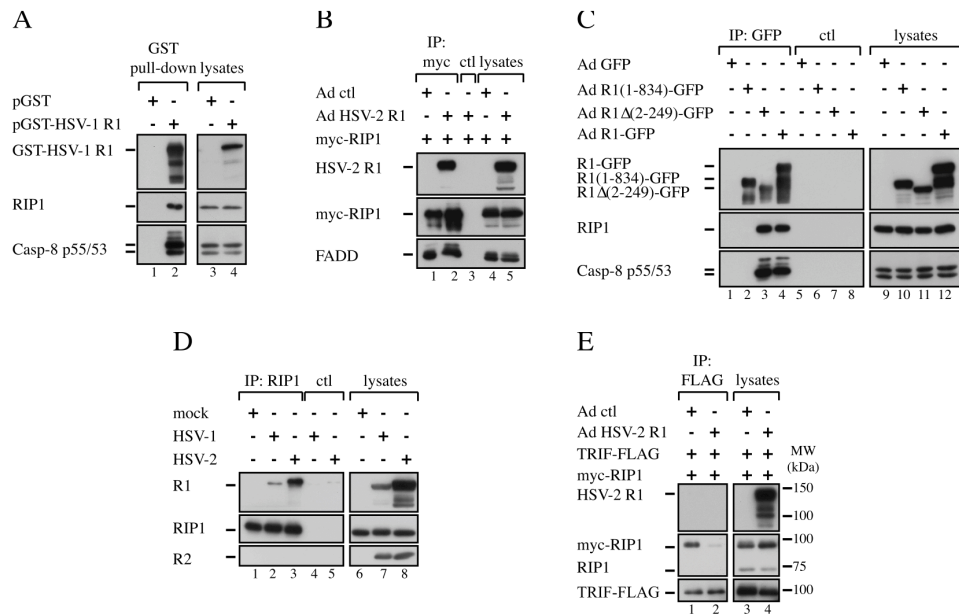


Figure 5 : HSV R1s interact with RIP1.

(A) HSV-1 R1 precipitates with RIP1. HeLa cells were transfected with pLBPF1-GST (pGST) or pLBPF1-GST-R1 (pGST-HSV-1 R1) for 48 h. GST-tagged proteins were precipitated by GST-pull-down. Precipitates (GST pull-down) and whole cell lysates were analyzed for HSV-1 R1, caspase-8 (Casp-8) and RIP1 protein content. (B) HSV-2 R1 co-immunoprecipitates with RIP1. HeLa cells were infected with AdTR5CuO (Ad ctl) or AdCMV5R1 (Ad HSV-2 R1). After 8 h, infected cells were transfected with pcDNA3-6myc-RIP1 (myc-RIP1) in the presence of Z-VAD-fmk to maintain cell viability for 24 h. Myc-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-myc antibody. Immunoprecipitates (IP: myc) and whole cell lysates (lysates) were analyzed for HSV-2 R1, FADD and myc-tagged protein content. (C) A large part of the N-terminal, but not the C-terminal domain of HSV-2 R1 is dispensable for interaction with RIP1 and caspase-8. A549-tTA cells were infected with AdTR5-R1-GFP (Ad R1-GFP), AdTR5-R1(1-834)-GFP (Ad R1(1-834)-GFP) or AdTR5-GFP (Ad GFP). After 24 h, cells were harvested and GFP-tagged proteins were immunoprecipitated using a polyclonal anti-GFP antibody. Immunoprecipitates (IP: GFP) and whole cell lysates (lysates) were analyzed for caspase-8 (Casp-8), RIP1 and GFP-tagged protein content. (D) HSV-1 R1 and HSV-2 R1 co-

immunoprecipitate with RIP1 in the context of HSV infection. HeLa cells were infected with HSV-1 (strain KOS) or HSV-2 (strain HG-52). After 8 h, cells were harvested and RIP1 was immunoprecipitated using anti-RIP1 (clone38) antibody. Immunoprecipitates (IP: RIP1) and whole cell lysates (lysates) were analyzed for HSV R1s, RIP1 and caspase-8 (Casp-8) protein content. (E) HSV-2 R1 inhibits the interaction between RIP1 and TRIF. HeLa cells were infected with AdTR5CuO (Ad ctl) or AdCMV5R1 (HSV-2 R1) and 8 h later, cells were co-transfected with the plasmid encoding myc-RIP1 and the plasmid expressing TRIF-FLAG in the presence of Z-VAD-fmk. FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG (M2) monoclonal antibody. Immunoprecipitates (IP: FLAG) and whole cell lysates (lysates) protein content were analyzed by immunoblotting with the polyclonal anti-R1 serum 168R1, and with anti-RIP1 (G322.2) and anti-FLAG (M2) monoclonal antibodies. As precipitation control (ctl), precleared lysates were incubated with G-sepharose beads without antibody. The immunoblots are representative of at least two experiments done in duplicate.

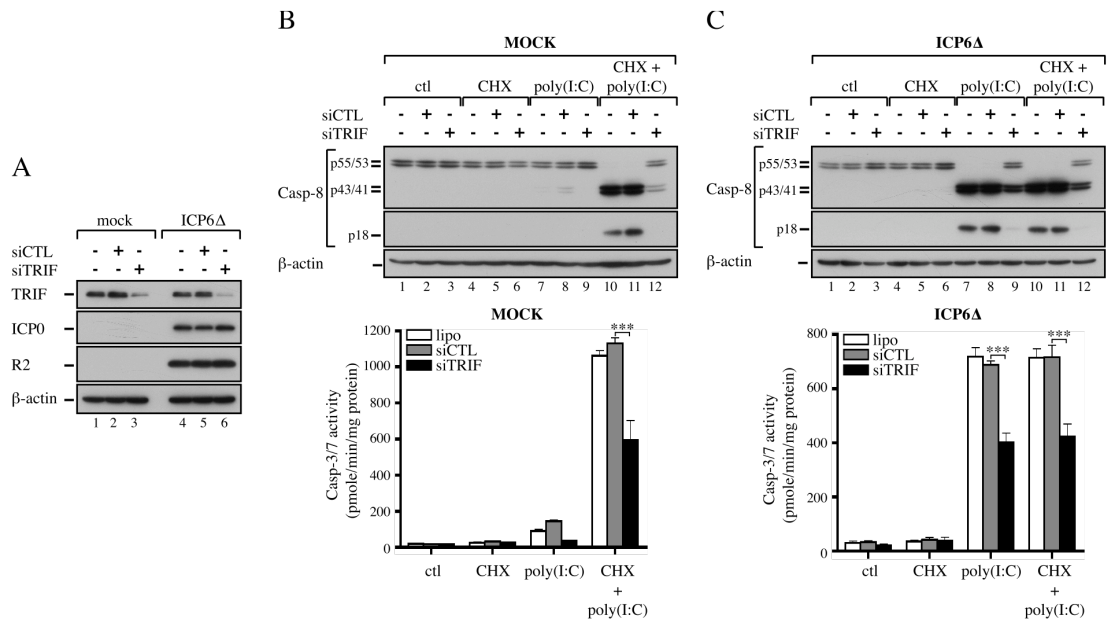


Figure 6 : TRIF silencing inhibits caspase activation induced by extracellular poly(I:C) in mock- and ICP6Δ-infected cells.

(A) TRIF siRNA efficiently decreases TRIF expression. HeLa cells were transfected with control siRNA (siCTL) or TRIF siRNA (siTRIF) using Lipofectamine 2000 as vehicle (lipo). After 48 h, cells were mock-infected or infected with HSV-1 ICP6Δ (ICP6Δ). After 8 h, cells were collected and total protein extracts were prepared for analyses by immunoblotting for HSV R1, HSV R2, ICP0, TRIF and β-actin protein content. (B, C) Effect of TRIF silencing on caspase activation. HeLa cells were transfected with siRNAs and subsequently (B) mock-infected or (C) infected with HSV-1 ICP6Δ (ICP6Δ) for 8 h before addition of control medium (ctl), CHX, poly(I:C) or CHX + poly(I:C). After 6 h, cells were collected and cytoplasmic cell lysates were analyzed by immunoblotting for caspase-8 (Casp-8) and β-actin protein content (upper panels), and tested for caspase-3/7 (Casp-3/7) activity (lower panels). The immunoblots and caspase activities (mean ± SE, $n = 6$, *** $P < 0.001$) are representative of three independent experiments done in duplicate.

Chapitre 3 : Discussion et perspectives

Le but de cette thèse était d'étudier la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV découverte avant le début de mon stage. Les travaux de cette thèse ont montré que la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 possèdent une activité anti-apoptotique permettant de protéger les cellules épithéliales de l'apoptose induite par le $\text{TNF}\alpha$, le FasL et le poly(I:C) en inhibant l'activation de la procaspase-8. La R1 d'HSV-1 joue un rôle essentiel dans l'inhibition de l'apoptose induite par le FasL et le poly(I:C). Notre étude du mécanisme de la fonction anti-apoptotique a montré que la R1 d'HSV-2 inhibe la dimérisation/activation de la procaspase-8 en interagissant constitutivement et directement avec cette caspase initiateur. Nous avons également montré que la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2, en plus d'interagir avec la procaspase-8, interagissent constitutivement avec RIP1 lorsqu'elles sont exprimées individuellement ou lors d'une infection par les HSV. L'interaction de la R1 d'HSV avec la procaspase-8 et RIP1 permet d'inhiber l'apoptose induite par les détecteurs aux ARNdb. Ces travaux démontrent que la R1 d'HSV constitue un puissant inhibiteur viral de la caspase-8 permettant d'assurer la survie de la cellule infectée face aux signaux pro-apoptotiques produits aussi bien par la réponse innée que la réponse immunitaire adaptative anti-HSV. Par rapport au travail présenté dans cette thèse et aux recherches préalablement effectuées dans le laboratoire, nous présenterons quelques perspectives de recherches permettant d'étudier à terme l'impact de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV dans la pathogenèse virale.

DISCUSSION :

La R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 inhibent l'apoptose induite par le TNF α et le FasL :

Préalablement à mon arrivée au laboratoire, il avait été proposé que la R1 d'HSV-1 posséderait une activité anti-apoptotique similaire à celle de la R1 d'HSV-2 puisque les cellules infectées avec un virus déficient pour la R1 d'HSV-1 étaient deux fois plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF α que des cellules infectées avec un virus HSV-1 sauvage (230). Toutefois, une preuve directe de l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-1 n'avait pas été apportée. Les résultats présentés dans le chapitre 2 montrent que la R1 d'HSV-1, exprimée individuellement de manière transitoire, tout comme la R1 d'HSV-2, inhibe l'apoptose induite par le TNF α et le FasL en bloquant l'activation de la procaspase-8 (94). Ces résultats confirment les études effectuées dans notre laboratoire ayant établi que les domaines protéiques impliqués dans l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 sont conservés chez la R1 d'HSV-1, ces régions présentant 95 % d'identité (49). En revanche, la R1 d'EBV, qui présente 35 % d'identité avec la R1 d'HSV et est fonctionnellement active en ce qui concerne l'activité ribonucléotidase réductase, n'a pas montré d'activité anti-apoptotique dans les conditions testées dans notre étude (94). Cette absence de protection pourrait être expliquée par le fait que la R1 d'EBV, plus courte que la R1 d'HSV, ne possède pas de domaine α -cristallin dont l'importance dans la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 a été démontrée (49). Bien que la voie de signalisation du TNF α soit une cible privilégiée de nombreux inhibiteurs d'origine virale, il est intéressant de noter que jusqu'à présent, seulement trois inhibiteurs de l'apoptose induite par le TNF α ont été identifiés dans la famille des virus herpès, il s'agit de la R1 de MCMV (M45), la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 (94, 230, 403).

Étant donné que 50 % des cellules infectées avec le virus HSV-1 ICP6 Δ étaient résistantes à l'apoptose induite par le TNF α (230), cela suggérerait que d'autres protéines virales pouvaient contribuer à l'effet protecteur. Étant donné que la délétion du gène codant pour vhs (U_L41) avait pour effet de diminuer de 30 % l'apoptose induite par le TNF α , il avait été suggéré que l'endoribonucléase vhs pourrait jouer un rôle anti-apoptotique en diminuant l'expression des récepteurs de mort à la surface des cellules infectées participant

ainsi à la résistance au TNF α (230). Une étude publiée en 2006 a montré que l'expression protéique du TNFR1 diminue rapidement à la surface et dans les lysats totaux de cellules Hep-2 infectées avec HSV-1 ou différents virus HSV-1 mutants (257). En revanche, les niveaux de TNFR1 ne diminuent pas lorsque les cellules sont infectées avec le mutant ΔU_L41 (mutant nul pour vhs) (257). Ce groupe a également montré que la demi-vie du TNFR1 dans des cellules infectées ou non infectées mais traitées avec de la CHX (100 $\mu\text{g/ml}$) est de 30 minutes. Enfin, cette équipe a observé que la disparition du TNFR1 corrèle avec celle de l'ARNm du TNFR1 (257). Toutefois cette étude n'a pas démontré l'impact fonctionnel de la disparition du TNFR1 dans les cellules Hep-2 infectées avec HSV-1 ou traitées avec de la CHX. Nos résultats ont confirmé la rapide diminution de l'expression protéique du TNFR1 au cours d'une infection avec HSV-1 (KOS et ICP6 Δ) et HSV-2 (HG-52); toutefois, la protéine ne disparaît pas complètement même après 8 h d'infection. En prétraitant les cellules avec de la CHX, nous avons mimé la disparition du TNFR1 observée durant une infection avec les HSV et démontré qu'une expression même très faible du TNFR1 n'affecte pas de manière significative l'apoptose induite par le TNF α (94). Par conséquent, la réduction d'expression du TNFR1 contribue peu à la résistance des cellules infectées durant les huit premières heures suivant l'infection. Notre étude n'explique pas pourquoi les cellules exprimant de faible quantité de TNFR1 sont si sensibles à l'apoptose induite par le TNF α mais plusieurs explications sont envisageables. Les faibles niveaux de TNFR1 pourraient suffire à induire l'apoptose dans des cellules sensibilisées par la CHX ou par l'infection virale. En effet, nos résultats ainsi que ceux d'autres équipes ont montré qu'un traitement à la CHX de même qu'une infection par les HSV provoquent une diminution de l'expression des isoformes de cFLIP (93, 94, 195, 221). Il est d'ailleurs intéressant de signaler que la réduction d'expression protéique de cFLIP lors d'une infection avec HSV-1 ne s'effectue pas par un mécanisme affectant les niveaux d'ARNm, ce qui suggère que l'endoribonucléase vhs n'est pas responsable de la disparition de cFLIP (195). De plus, l'existence d'un troisième récepteur au TNF α pourrait contribuer à expliquer nos résultats. Cette hypothèse a été avancée pour expliquer que le TNF α puisse protéger des souris déficientes pour le TNFR1 et le TNFR2 (TNFR1^{-/-} TNFR2^{-/-}) d'une encéphalite causée par une infection avec HSV-1 (263). En se basant sur nos résultats montrant que l'expression de Fas, une protéine à longue demi-vie (296), n'est pas affectée

durant une infection HSV, nous avons été capables de montrer que la R1 d'HSV-1 joue un rôle prépondérant dans la protection des cellules épithéliales infectées avec HSV-1 contre l'apoptose induite par le FasL. Il est important de rappeler que nos expériences avec le FasL trimérisé (Fc :FasL) ont été réalisées sans CHX ce qui exclue le biais relatif à l'utilisation de cet inhibiteur de synthèse protéique nécessaire pour induire l'apoptose avec le TNF α . Toutefois, nos résultats ne montrent pas de différence quant à la capacité de la R1 d'HSV a protéger les cellules de l'apoptose induite par le FasL ou le TNF α plus CHX ce qui suggère que l'inhibition de la synthèse protéique n'a pas d'effet sur le mécanisme anti-apoptotique de la R1 d'HSV.

Nos résultats montrent que la protection apportée par une infection avec HSV-1 KOS contre l'apoptose induite par le FasL est complètement perdue lors d'une infection avec le virus déficient pour la R1 d'HSV-1 (ICP6 Δ). Il a été montré que la traduction des protéines virales est inhibée dans des cellules quiescentes infectées avec le virus HSV-1 ICP6 Δ ; toutefois, l'expression protéique virale n'est pas affectée dans des cellules en croissance exponentielle infectée avec un virus déficient pour ICP6 (131, 421). Pour toutes nos expériences impliquant le virus HSV-1 ICP6 Δ , des cellules en croissance exponentielle ont été utilisées afin de prévenir l'inhibition de la traduction des ARN viraux observée lors de l'infection de cellules quiescentes (421). Nos résultats montrant que l'accumulation de la sous-unité R2 et d'ICP0 est équivalente lors d'une infection avec les virus KOS et ICP6 Δ suggèrent que la synthèse protéique virale n'est pas diminuée lors d'une infection avec le virus ICP6 Δ . Il est donc peu probable que les défauts de propriétés anti-apoptotiques du virus ICP6 Δ soient attribuables à une perturbation de l'expression protéique virale dans les cellules hôtes (notamment des protéines anti-apoptotiques virales telles que vhs ou Us6/gD par exemple). Les résultats montrant la disparition rapide du TNFR1 (article 1, Fig. 2a) suivant une infection avec le virus HSV-1 ICP6 Δ suggèrent que l'endoribonucléase vhs est bien présente dans la particule virale infectieuse et qu'elle est exprimée durant l'infection. D'autre part, les infections avec le virus ICP6 Δ ont été réalisées avec une multiplicité d'infection standard; or, il a été montré qu'une haute multiplicité d'infection doit être utilisée pour forcer un virus déficient pour Us6/gD à pénétrer dans les cellules (450). Ceci suggère que la protéine Us6/gD est exprimée pendant le cycle viral et qu'elle est présente dans la particule virale infectieuse ICP6 Δ .

Les voies ERK1/2 et Akt ne sont pas impliquées dans le mécanisme anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 :

Notre approche pour identifier le mécanisme anti-apoptotique de la R1 d'HSV a été basée sur les conclusions des précédents travaux effectués dans notre laboratoire montrant que la R1 protège les cellules épithéliales de l'apoptose induite par le TNF α en agissant au niveau ou en amont de l'activation de la procaspase-8. La R1 d'HSV ne présentant pas de similarité avec les protéines virales anti-apoptotiques connues (rev. 117), il nous a fallu étudier l'impact de la R1 sur les différentes voies pro- et/ou anti-apoptotiques susceptibles d'influencer l'activation de la caspase-8.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la R1 d'HSV-2 sur les voies de signalisation impliquant les protéines kinase ERK1/2 et Akt puisque ces voies participent au contrôle de l'apoptose (rev. 227, rev. 306) et qu'il a été montré que l'activation de ces kinases confèrent une résistance à l'apoptose induite par le TNF α et TRAIL (87, 332). De plus, le groupe d'Aurelian a précédemment montré que la R1 d'HSV-2 surexprimée de manière constitutive dans des cellules 293 entraînait la phosphorylation de ERK1/2 (164) et que cette activation était responsable de l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 (317). Pour ces raisons, l'étude de l'influence de la R1 d'HSV sur les voies impliquant ERK1/2 et Akt fut priorisée. Trois résultats présentés dans le chapitre 2 suggèrent que la R1 d'HSV-2 n'active pas les voies de signalisation MEK/ERK1/2 et PI3-K/Akt et que ces voies ne sont probablement pas impliquées dans le mécanisme de protection. En effet, nous avons montré que l'expression de la R1 d'HSV-2, à un niveau suffisant pour conférer une protection contre l'apoptose induite par le TNF α , n'affecte pas de manière significative la phosphorylation de ERK1/2 et d'Akt. De plus, l'activation transitoire de ces kinases suivant une stimulation au TNF α n'est pas affectée par l'expression de la R1 d'HSV-2. Enfin, l'inhibition des voies impliquant ERK1/2 et Akt à l'aide d'inhibiteurs biochimiques spécifiques ne perturbe pas la capacité de la R1 d'HSV-2 à inhiber l'apoptose induite par le TNF α . Nos résultats contredisent ceux obtenus par le groupe d'Aurelian montrant une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans des

cellules 293 et PC12 exprimant de manière constitutive la R1 d'HSV-2 par rapport aux cellules contrôles non transfectées (164, 420). Nos résultats ont été principalement obtenus en utilisant la lignée A549-tTA-HSV-R1-GFP, développée au laboratoire (49), qui exprime de manière inductible la R1 d'HSV-2 couplée à la GFP. De plus, nous avons également observé que l'expression de la R1 d'HSV-2 n'induit pas la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules 293-rtTA-HSV-2-R1 qui expriment également de manière inductible la R1 d'HSV-2. Nous pensons donc que ces résultats divergents ne sont probablement pas explicables par l'utilisation de lignées cellulaires différentes. L'absence de phosphorylation de ERK1/2 suivant l'induction de l'expression de la R1 d'HSV-2 dans les 293-rtTA-HSV-2-R1 suggère que la phosphorylation de ERK1/2 observée par le groupe d'Aurelian dans des cellules 293 exprimant de manière stable la R1 d'HSV-2 pourrait être la conséquence d'une variation clonale. En effet, il a déjà été constaté que l'établissement de lignée cellulaire peut entraîner une activation constitutive de ERK1/2 dans certaines lignées et pas dans d'autres (150). L'hypothèse d'une variation clonale induite par la surexpression constitutive de la R1 d'HSV-2 expliquerait également pourquoi divers mécanismes anti-apoptotiques ont été proposés par ce groupe. En effet, dépendamment des articles voir même des clones analysés au sein d'une même étude, l'activation de la voie ERK1/2 par la R1 d'HSV-2 exprimée constitutivement fut rapportée comme ayant des conséquences diverses : surexpression des protéines anti-apoptotiques Bag-1 (*Bcl-2 associated athanogene 1*) et XIAP, stabilisation de Bcl-2 et diminution de l'expression de Smac/DIABLO (316, 420). Alors que ce groupe soutient depuis des années que c'est le domaine PK qui confère à la R1 d'HSV-2 sa fonction anti-apoptotique en activant ERK1/2, deux articles ont clairement démontré que ni la R1 d'HSV-1 ni la R1 d'HSV-2 ne possèdent une activité kinase intrinsèque (72, 232) et la présente étude suggère que le mécanisme anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 n'implique pas l'activation des voies MEK/ERK1/2 et PI3K/Akt.

La R1 d'HSV-2 n'affecte pas la stabilité et l'accumulation de protéines clés impliquées dans le contrôle de l'apoptose induite par les récepteurs de mort :

Certaines protéines anti-apoptotiques virales contrôlent l'apoptose en jouant sur l'expression ou la stabilité de protéines impliquées dans la voie des récepteurs de mort

(116). Par exemple, les protéines du « core » d'HCV et IE2 de HCMV exercent une activité anti-apoptotique en stimulant l'expression de cFLIP (60, 347). Le mécanisme de l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 est différent de celui de ces protéines virales puisque la R1 d'HSV-2 n'augmente ni l'expression ni la stabilité des isoformes cFLIP_L et cFLIP_S. De plus, la R1 d'HSV-2 n'affecte ni l'expression ni la stabilité de protéines clés impliquées dans les complexes de mort assemblés suite à la stimulation du TNFR1 ou de Fas (TNFR1, Fas, TRADD, RIP1, FADD, procaspase-8). La R1 d'HSV-2 n'active pas de manière constitutive les voies NF- κ B et JNK indiquant que la R1 d'HSV-2 diffère de la protéine vFLIP/ORFK13 d'HHV8 qui stimule de manière constitutive la voie NF- κ B en interagissant avec IKK γ (16). De plus, nos résultats suggèrent que la R1 d'HSV-2 n'a pas d'impact sur la formation du complexe I induite par le TNF α puisque l'assemblage du complexe I est requis pour induire la phosphorylation de NF- κ B p65, JNK et ERK1/2; or, celle-ci n'est pas affectée par la R1 d'HSV-2 (**Fig. 1**).

La R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 interagissent avec la procaspase-8 de manière à inhiber sa dimérisation et donc son activation :

Puisque la R1 d'HSV inhibe à la fois l'apoptose induite par le DISC (voie Fas) et par le complexe II (voie TNFR1), nous avons émis l'hypothèse que la R1 pouvait interagir avec la procaspase-8 de manière à inhiber son activation par ces deux types de complexe de mort. Cette hypothèse avait été suggérée par nos expériences de chromatographie d'exclusion ayant montré que la procaspase-8 et la R1 d'HSV-2 éluent constitutivement dans des fractions de haut poids moléculaire (Dufour F., Chabaud S., Langelier Y. données non publiées). Nos expériences d'interaction menées à l'aide de techniques d'immunoprecipitation et de GST *pull-down* ont démontré que la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 interagissent de manière constitutive avec la procaspase-8 quand elles sont exprimées individuellement ou en association avec les autres protéines virales lors d'une infection (94). L'interaction de la R1 d'HSV-2 avec la procaspase-8 est indispensable à la fonction anti-apoptotique puisque le mutant de délétion R1(1-834)-GFP et la R1 d'EBV, qui ne possèdent pas d'activité anti-apoptotique contre le TNF α , n'interagissent pas avec la procaspase-8.

Nous avons complété notre étude de l'interaction entre la R1 d'HSV-2 et la procaspase-8 en utilisant des mutants de délétion de la caspase-8. Ceci nous a permis de conclure que la R1 d'HSV-2 interagit avec le prodomaine de la caspase-8, contenant deux DED en tandem (caspase-8 DED-AB), mais qu'elle n'interagit pas avec le domaine caspase. De plus, nos expériences d'interaction *in vitro* à l'aide de protéines purifiées ont montré que l'interaction de la R1 d'HSV-2 avec la procaspase-8 et la caspase-8 DED-AB est directe et ne requière pas de modifications post-traductionnelles spécifiques aux cellules de mammifères puisque les protéines purifiées ont été produites en bactérie. Nous n'avons pas démontré que la R1 d'HSV-1 interagit directement avec la procaspase-8. Toutefois, il est envisageable que la R1 d'HSV-1 interagisse directement avec la procaspase-8 puisque les domaines protéiques impliqués dans l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 sont conservés chez la R1 d'HSV-1 (95 % d'identité) et que nos résultats ont montré que la R1 d'HSV-1 possède une activité anti-apoptotique (49, 94).

La dimérisation de la procaspase-8 est indispensable à l'activation de cette caspase initiateur (163). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'interaction de la R1 d'HSV avec la caspase-8 pouvait inhiber la dimérisation/activation de la procaspase-8. L'un des moyens de tester cette hypothèse consistait à surexprimer dans des cellules humaines la procaspase-8 couplée à la GFP ce qui provoquerait la dimérisation/activation du zymogène surexprimé et donc l'apoptose (106). Nos résultats montrent que la R1 d'HSV-2 inhibe l'apoptose et donc la dimérisation/activation induite par la surexpression de procaspase-8 GFP. Dans une situation où l'apoptose est induite par le FasL, le TNF α ou le poly(I:C), ce sont les complexes de mort qui induisent la dimérisation/activation de la caspase-8 via FADD. Nous avons donc émis l'hypothèse que la R1 d'HSV-2 exerçait son activité anti-apoptotique en inhibant l'interaction entre FADD et la procaspase-8. Ce type de mécanisme est notamment employé par la protéine E6 d'HPV16 (grande isoforme) qui inhibe l'apoptose induite par Fas en interagissant à la fois avec la procaspase-8 et FADD ce qui prévient l'interaction entre ces deux partenaires (109, 110). Toutefois, contrairement à la R1 d'HSV, la grande isoforme E6 d'HPV16 accélère la dégradation de la procaspase-8 et de FADD (109, 110). Bien que la R1 d'HSV ne présente pas de similarité avec E6 d'HPV16, il était important de vérifier si la R1 pouvait inhiber l'apoptose induite par les récepteurs de mort en interagissant avec FADD. Toutefois, nos expériences

d'immunoprécipitation et de GST *pull-down* n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction de la R1 d'HSV-1 ou de la R1 d'HSV-2 avec FADD endogène ou surexprimé. En revanche, nous avons montré que la R1 d'HSV-2 inhibe l'interaction entre FADD endogène et la procaspase-8 surexprimée confirmant notre hypothèse selon laquelle l'interaction de la R1 d'HSV-2 avec la procaspase-8 inhibe l'interaction de cette dernière avec FADD (Fig. 1).

La R1 d'HSV interagit avec RIP1 :

C'est à la suite de la publication en 2008 de deux articles montrant l'interaction de M45 (R1 de MCMV) avec RIP1 que nous avons testé l'interaction de la R1 d'HSV avec cet adaptateur (265, 403). Par immunoprecipitation et GST *pull-down*, nous avons démontré que la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 interagissent de manière constitutive avec RIP1 quand les deux R1 sont exprimés individuellement ou en présence d'autres protéines virales lors d'une infection par les HSV (93). Ces techniques ne permettant pas de déterminer si l'interaction entre la R1 d'HSV et RIP1 est directe ou indirecte, de futures études d'interaction *in vitro* devront être menées afin de répondre à cette question. Nous avons cherché à définir le site d'interaction et montré que le mutant de délétion R1(1-834)-GFP, dénué d'activité anti-apoptotique contre le TNF α (49), n'interagit ni avec RIP1 ni avec la procaspase-8. Des alignements de séquences ont mis en évidence dans la R1 d'HSV-2 (entre les résidus 55 et 76) un motif similaire au RHIM de M45 qui serait impliqué dans l'interaction avec RIP1 (246). Toutefois, nos résultats suggèrent que ce motif ne serait pas impliqué dans l'interaction puisque le mutant de délétion R1 Δ (2-239)-GFP, présentant une activité anti-apoptotique contre le TNF α (49), interagit à la fois avec RIP1 et la procaspase-8. Ces résultats concordent avec la cartographie des sites de la R1 d'HSV-2 effectuées précédemment en utilisant le TNF α comme inducteur d'apoptose (49) et montrent que l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV-2 corrèle avec sa capacité à interagir avec RIP1 et la procaspase-8. De plus, l'interaction de RIP1 surexprimée avec FADD endogène n'est pas inhibée par la R1 d'HSV-2 suggérant que le DD de RIP1 est accessible même lorsque la R1 d'HSV interagit avec RIP1. Ce résultat soutient la conclusion selon laquelle la R1 d'HSV n'inhibe pas l'assemblage du complexe I induit par le TNF α puisque celui-ci nécessite l'interaction du DD de RIP1 avec le DD de TRADD; or, les DD doivent être

libres pour interagir (101). Par conséquent, l'interaction de la R1 d'HSV avec RIP1 n'est probablement pas impliquée dans le mécanisme de protection contre le TNF α et le FasL ; en revanche, l'interaction entre la R1 d'HSV et la procaspase-8 joue certainement un rôle prépondérant dans l'inhibition de la dimérisation/activation de la procaspase-8 au niveau de FADD recruté dans les complexes II et le DISC (**Fig. 1**).

La R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 inhibent l'apoptose induite par les ARNdb :

Ayant démontré que la R1 d'HSV inhibe l'activation de la procaspase-8 induite par la voie des récepteurs de mort (TNFR1 et Fas), nous avons émis l'hypothèse que la R1 d'HSV pourrait protéger les cellules infectées d'autres stimuli pro-apoptotiques impliquant l'activation de la caspase-8. Nous avons focalisé notre attention sur les ARNdb suite à la publication de plusieurs travaux ayant démontré que la caspase-8 est activée par le poly(I:C) transfecté dans les HeLa (123, 168, 169). Par la suite, il a été montré que la voie du TLR3 induit l'apoptose via l'activation de la caspase-8 (425) et que les RLR, MDA5 et RIG-I, activent la caspase-8 (392). Sachant que les cellules infectées par les HSV produisent des ARNdb (176, 426), nous avons vérifié si une infection pouvait protéger les cellules hôtes de l'apoptose induite par le poly(I:C) et si la R1 d'HSV pouvait inhiber l'activation de la caspase-8 consécutive à un traitement avec du poly(I:C). De nombreux articles ont mis en évidence la capacité des cellules infectées avec HSV-1 ou HSV-2 à résister à l'apoptose induite par le virus lui-même ou par des stimuli extrinsèques (rev. 134). Notre étude montre pour la première fois qu'une infection avec HSV-1 ou HSV-2 protège les cellules HeLa de l'apoptose induite par la transfection de poly(I:C) ou par un traitement avec du poly(I:C) extracellulaire utilisé en combinaison avec de la CHX. Nous avons observé que la protection contre le poly(I:C) apparaît selon une cinétique corrélant avec l'accumulation de protéines encodées par des gènes viraux IE et E et notamment avec l'accumulation de la R1 d'HSV. En infectant les HeLa avec les virus HSV-1 KOS et ICP6 Δ , nous avons démontré que la R1 d'HSV-1 joue un rôle essentiel dans l'inhibition de l'apoptose et de l'activation de la caspase-8 induite par le poly(I:C).

La capacité des HSV à bloquer la réponse immunitaire innée antivirale induite par l'infection et le poly(I:C) a été massivement étudiée et il est étonnant que personne n'ait décrit la capacité des HSV voir d'autres virus à protéger les cellules infectées vis à vis de

l'apoptose induite par le poly(I:C). Pendant la rédaction du manuscrit du second article, une étude est parue montrant qu'une infection avec le CSFV (*classical swine fever virus*), un virus à ARNdb à polarité positive, protège les cellules endothéliales porcines de l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire en inhibant l'activation de la caspase-8 ainsi que la voie apoptotique mitochondriale (180). Ceci suggère que l'inhibition de l'apoptose induite par les ARNdb pourrait constituer une stratégie utilisée par plusieurs virus pour permettre la survie de la cellule hôte favorisant ainsi leur réplication.

Les cellules HeLa sont considérées comme une lignée sensible au poly(I:C) puisque la transfection de poly(I:C) induit une apoptose efficace, rapide (activation de la caspase-8 dès 2 h de traitement et $\approx 80\%$ de cellules en apoptose après 6 h) et indépendante de l'IFN et de la synthèse protéique *de novo* (168). Bien que les HeLa soient sensibles aux ARNdb, le poly(I:C) extracellulaire utilisé seul induit une très faible activation de la caspase-8 après 6 h de traitement (93) et moins de 10 % des cellules traitées présentent une morphologie de type apoptotique après 24 h d'exposition au poly(I:C) (Dufour F. et Langelier Y., résultats non publiés). En revanche, la CHX en inhibant l'expression de cFLIP sensibilise les HeLa à l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire. Toutefois, nous avons été surpris d'observer que la délétion de la R1 d'HSV-1 entraîne une si grande sensibilité des cellules infectées avec ICP6 Δ envers les traitements au poly(I:C) et notamment vis à vis du poly(I:C) extracellulaire utilisé en absence de CHX. La sensibilité des HeLa au poly(I:C) extracellulaire étant décuplée en présence de CHX, nous avons émis l'hypothèse qu'une infection avec les HSV pouvait diminuer l'expression d'inhibiteurs cellulaires de la caspase-8 notamment cFLIP. En effet, nous avons montré que l'infection de HeLa avec HSV-1 (KOS et ICP6 Δ), de même qu'avec HSV-2 (Dufour F. et Langelier Y., résultats non publiés), entraîne une rapide disparition de cFLIP (cFLIP_L et cFLIP_S) ce qui est en accord avec les observations décrites dans l'étude de Kather *et al* effectuée avec HSV-1 (195). De plus, nos résultats montrent que l'expression de cIAP1 et cIAP2, deux autres régulateurs de l'activation de la caspase-8 impliqués dans la voie des récepteurs de mort et du TLR3 (112, 113, 408, 415), est diminuée dans une moindre mesure plus tard durant l'infection suggérant que la disparition de cIAP1/2 pourrait également contribuer à la sensibilisation des cellules infectées avec ICP6 Δ vis à vis des stimuli activant la caspase-8. De manière concomitante à la disparition des inhibiteurs cellulaires de la caspase-8, la R1 d'HSV

s'accumule dans les cellules infectées. Ces observations suggèrent que la R1 d'HSV agit comme un inhibiteur viral de la caspase-8 pour pallier à la disparition des inhibiteurs cellulaires de l'activation de la caspase-8 notamment cFLIP (**Fig. 1**).

Deux études ont démontré que le poly(I:C) transfecté induit l'apoptose des cellules HeLa via l'activation de la caspase-8 (168, 169). De plus, de récentes études réalisées avec des lignées de kératinocytes et des cellules dérivées de mélanome ont démontré que le poly(I:C) extracellulaire, utilisé en combinaison avec la CHX ou un SMAC mimétique, induit l'apoptose par une voie impliquant le TLR3, TRIF et la caspase-8 (179, 425). Toutefois, on peut se demander par quelle voie le poly(I:C) extracellulaire induit-il l'apoptose des cellules HeLa ? Nous avons observé que le poly(I:C) transfecté ou le poly(I:C) extracellulaire plus CHX active la caspase-8 dans les HeLa. De plus, nos expériences effectuées avec un siRNA inhibant l'expression de TRIF confirment que le poly(I:C) extracellulaire induit l'activation de la caspase-8 dans les HeLa via TRIF suggérant que c'est bien la voie du TLR3 qui est activée. Il a été montré que le TLR3 et les RLR, MDA5 et RIGI-I, peuvent induire l'apoptose via la voie mitochondriale notamment en induisant l'expression de Bcl-2 pro-apoptotiques comme Noxa dans des cellules qui peuvent être considérées comme peu sensibles au poly(I:C) (30, 385). Dans les HeLa, nous avons montré que l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire plus CHX est rapide (\approx 90 % des cellules présentent une morphologie apoptotique après 6 h de traitement) et ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo*. Ce résultat suggère que la surexpression des Bcl-2 pro-apoptotiques, même si elle est éventuellement stimulée, n'est probablement pas impliquée dans le déclenchement de l'apoptose suivant un traitement avec du poly(I:C) plus CHX puisque dans ce cas la synthèse protéique est inhibée. D'autre part, une précédente étude a montré que si la voie mitochondriale peut être engagée suivant la transfection du poly(I:C) dans les HeLa, c'est l'activation de la caspase-8 par un complexe impliquant TRADD, FADD et la caspase-8 qui est l'évènement déclencheur de l'apoptose (168). Notre étude ne permet pas d'exclure l'implication de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire plus CHX ou le poly(I:C) transfecté. Toutefois, si le poly(I:C) induisait l'activation de la caspase-8 via la caspase-3 activée par la voie mitochondriale, la R1 d'HSV ne pourrait pas l'inhiber. En effet, la R1 d'HSV n'inhibe pas l'activation de la caspase-8 induite par : i, divers agents induisant la voie mitochondriale

(surexpression de bax, etoposide, etc) ; ii, les caspases-8 et -3 actives *in vitro* ; iii, et la staurosporine laquelle stimule l'activation de la caspase-8 par une voie dépendante de la caspase-3 (230). Comme nos résultats montrent que la R1 d'HSV inhibe à la fois l'apoptose et l'activation de la caspase-8 induite par le poly(I:C) transfecté et le poly(I:C) extracellulaire, la voie mitochondriale, même si elle est induite, doit jouer un rôle mineur dans l'apoptose engendrée rapidement par le poly(I:C) dans les HeLa.

Rôle de l'interaction de la R1 d'HSV avec RIP1 et la procaspase-8 dans l'inhibition de l'apoptose induite par les ARNdb :

La R1 d'HSV bloque l'activation de la caspase-8 consécutive à la transfection de poly(I:C), laquelle stimule les récepteurs cytosoliques aux ARNdb. L'un d'eux, PKR, participe à la détection cytosolique du poly(I:C) et à la réponse innée antivirale. En effet, l'activation de PKR conduit à la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α ce qui bloque la traduction protéique et donc limite la réplication virale. De plus, l'inhibition du facteur eIF2 α par PKR induit l'apoptose par blocage de la traduction (91, 122, 360, 378). L'apoptose induite par PKR implique également l'activation de la procaspase-8 par FADD au sein d'un complexe dont toutes les composantes n'ont pas encore été identifiées (18, 123). Dans les HeLa, la transfection de poly(I:C) active PKR et induit l'apoptose via l'activation de la caspase-8 (168, 169, 272). Nos résultats suggèrent que la R1 d'HSV constitue un inhibiteur de l'activation de la caspase-8 consécutive à la stimulation de PKR. La R1 d'HSV s'ajoute donc à la liste des inhibiteurs de la voie induite par PKR contenant déjà Us11 et ICP γ_1 34.5 dont le rôle consiste essentiellement à maintenir la traduction en déphosphorylant eIF2 α (47, 65, 153, 208, 322). Dans les HeLa, le poly(I:C) transfectée induit l'apoptose non seulement via PKR mais également par l'intermédiaire d'IPS1, l'adaptateur de RIG-I et MDA5 (272). Il a été montré que MDA5 et RIG-I activent la caspase-8 par une voie dépendante de FADD (392) et qu'IPS1 surexprimé interagit avec la procaspase-8 (255). Toutefois, le rôle de l'activation de la caspase-8 dans l'apoptose induite par les RLR n'a pas été étudié spécifiquement et une étude a montré que les RLR induisent l'apoptose par la voie mitochondriale dans des cellules tumorales issues de mélanomes (30). L'ensemble de nos résultats nous permet d'envisager que l'interaction de la R1 d'HSV avec la procaspase-8 inhibe la dimérisation/activation de la caspase-8 induite par

PKR et les RLR (**Fig. 1**). De plus amples études seront nécessaires pour caractériser l'apoptose induite par les détecteurs cytosoliques d'ARNdb et donc l'impact de la R1 d'HSV sur ces voies. L'impact de l'interaction de la R1 d'HSV avec RIP1 dans la voie des RLR et de PKR devra également être investiguée.

Le TLR3 est impliqué dans la réponse immune innée anti-HSV-1 et joue un rôle prépondérant dans la limitation de l'infection au niveau du système nerveux central (447). Même si les ARNdb s'accumulent à l'intérieur des cellules infectées, le cycle lytique aboutit inévitablement à la lyse de la cellule hôte permettant ainsi la libération des ARNdb dans le milieu extracellulaire. De plus, il a été montré que les ARN cellulaires libérés lors de la nécrose sont capables d'induire le TLR3 suggérant que ceux relâchés durant la lyse pourraient également stimuler ce récepteur (190, 191). Non seulement le TLR3 signale l'immunité innée antivirale mais il déclenche également l'apoptose via une voie impliquant TRIF, RIP1, FADD et la caspase-8 (147, 425). L'interaction directe et constitutive de la R1 d'HSV avec la procaspase-8 inhibe l'apoptose induite par le TLR3 (**Fig. 1**). Toutefois, deux résultats suggèrent que la R1 d'HSV-2 inhibe la voie du TLR3 en interagissant également avec RIP1. Pour transmettre un signal pro-apoptotique TRIF doit absolument interagir via son domaine RHIM avec RIP1 (147, 186); or, nous avons montré que la R1 d'HSV-2 inhibe à la fois l'apoptose induite par la surexpression de TRIF et l'interaction entre RIP1 et TRIF surexprimés. Ces résultats suggèrent donc que la R1 d'HSV-2, probablement en interagissant avec RIP1, inhiberait l'interaction de TRIF avec RIP1 prévenant ainsi le recrutement subséquent de FADD et par conséquent l'activation de la procaspase-8 (**Fig. 1**).

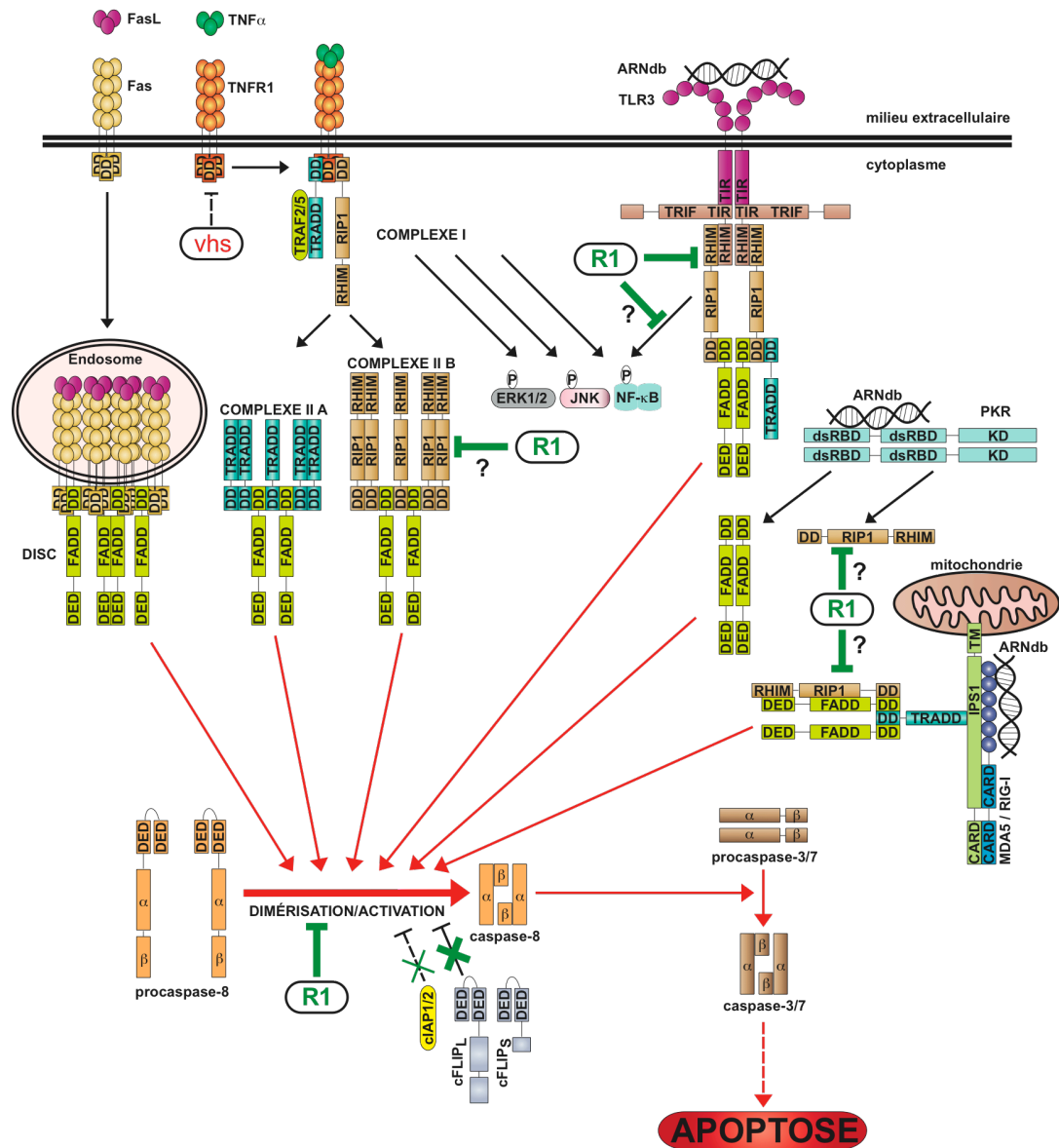


Figure 1 : Modèle d'inhibition de l'activation de la caspase-8 par la R1 d'HSV.

Le FasL et le TNF α produits par la réponse immunitaire anti-HSV activent les récepteurs Fas et TNFR1 qui déclenchent l'assemblage des complexes de mort. Le Fas induit la formation du DISC. Le TNFR1 stimulé déclenche l'assemblage du complexe I dont l'activité n'est pas affectée par la R1 d'HSV (activation de NF- κ B, JNK et ERK1/2) puis des complexes IIA et IIB ayant une activité pro-apoptotique. Les ARNdb produits dès le début de la transcription du génome des HSV stimulent les récepteurs intracellulaires aux ARNdb (MDA5, RIG-I et PKR) et le TLR3 qui détecte les ARNdb extracellulaires libérés lors de la lyse des cellules

infectées. L'infection diminue l'expression des inhibiteurs cellulaires de la caspase-8, cFLIP et cIAP1/2, mais la R1 d'HSV agit comme un inhibiteur viral de la procaspase-8. En interagissant directement avec la procaspase-8, la R1 d'HSV inhibe le recrutement à FADD, la dimérisation et donc l'activation de la procaspase-8 au niveau des différents complexes activateur de la caspase-8 qui sont assemblés en réponse à la stimulation du TNFR1, Fas, TLR3, RIG-I/MDA5 et PKR. La R1 d'HSV bloque également l'apoptose induite par le TLR3 en inhibant l'interaction dépendante des domaines RHIM entre TRIF et RIP1 probablement via son interaction avec RIP1. L'interaction entre RIP1 et la R1 d'HSV pourrait avoir d'autres rôles encore à préciser (e.g. cette interaction pourrait inhiber la formation du complexe IIB et affecter les autres fonctions de RIP1). La R1 d'HSV et l'endonucléase virale vhs agissent de concert pour inhiber la voie du TNFR1 puisque cette dernière dégrade l'ARNm du TNFR1 ce qui contribue à réduire son expression protéique.

PERSPECTIVES :

Création d'un mutant R1^{AA-RR+} :

Afin de faciliter l'étude du rôle de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV dans la pathogénèse virale, il serait utile de créer une R1 d'HSV mutante déficiente pour la fonction anti-apoptotique mais conservant une activité RR (nommée par la suite R1^{AA-RR+}). Pour cela, il est nécessaire de déterminer avec précision le ou les domaines impliqués dans la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV. Il est important de signaler que les domaines de la R1 d'HSV impliqués dans la protection contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort et les détecteurs aux ARNdb pourraient être différents. Notamment, il est possible que le site d'interaction entre la R1 d'HSV et la procaspase-8 (interaction directe) soit différent de celui impliqué dans l'interaction avec RIP1.

La cartographie de la R1 d'HSV-2 réalisée préalablement par notre laboratoire a permis d'identifier à l'aide de mutants de délétion deux régions importantes pour l'activité anti-apoptotique contre le TNF α (49). La première région coté N-terminal comprend une partie du domaine α -cristallin (région 1 ; acides aminés 319 à 393) et la seconde se situe dans le domaine RR coté C-terminal (région 2 : acides aminés 1081 à 1123) (49). Il serait intéressant de tester la capacité de ces mutants de délétion à inhiber l'apoptose induite par le poly(I:C) et à interagir avec RIP1 afin de déterminer si les régions 1 et 2 sont également impliquées dans la protection contre l'apoptose induite par les ARNdb et dans l'interaction avec RIP1.

Afin de déterminer les domaines impliqués dans la protection contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort et les détecteurs aux ARNdb, il pourrait être judicieux de comparer la séquence de la R1 d'HSV-1 et de la R1 d'HSV-2 avec celles de sous-unités R1 encodées par d'autres virus pouvant potentiellement présenter des propriétés anti-apoptotiques. Le séquençage du génome de plusieurs virus herpès infectant les singes de la famille des cercopithécidés (SA8, herpès-B, HP-2) a montré que la R1 de ces virus possède une extrémité N-terminale plus courte que celle des HSV car amputée de la séquence peu conservée chez les R1 d'HSV située entre les résidus 140 et 310 de la R1 d'HSV-2 (314, 399, 400). En revanche, ces R1 de virus herpès de cercopithécidés

présentent une importante homologie de séquence avec la R1 d'HSV-2 à partir du résidu 319 de cette dernière, elles pourraient donc posséder une activité anti-apoptotique permettant d'inhiber l'apoptose induite par le TNF α , le FasL et le poly(I:C). Nos travaux ont démontré que l'interaction de la R1 d'HSV-2 avec la procaspase-8 et RIP1 est nécessaire à la protection contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort et les détecteurs aux ARNdb. Par conséquent, les R1 de virus herpès de cercopithécidés et d'HSV pourraient être testées pour leur capacité à interagir avec la procaspase-8 et RIP1. La R1 d'EBV ne présente pas d'identité de séquence avec la région 1 (acides aminés 319 à 393 de la R1 d'HSV-2). En revanche, La R1 d'EBV qui possède une activité ribonucléotide réductase présente 65 % d'identité avec la région 2 (acides aminés 1081 à 1123 de la R1 d'HSV-2); cette homologie témoigne de la conservation au cours de l'évolution des séquences impliquées dans l'activité ribonucléotide réductase. Bien que notre étude ait montré que la R1 d'EBV n'interagit pas avec la procaspase-8, la conservation d'une certaine identité de séquence avec la région 2 de la R1 d'HSV-2 suggère qu'il serait important de tester si la R1 d'EBV interagit avec RIP1. De même, il serait intéressant de tester si les R1 d'HCMV et de MCMV (M45) interagissent avec la procaspase-8 en plus de RIP1. Cette stratégie consistant à comparer les séquences et les propriétés anti-apoptotiques de la R1 d'HSV et de différentes R1 virales devrait permettre d'identifier ou de préciser le(s) domaine(s) de la R1 d'HSV important(s) pour la fonction anti-apoptotique protégeant de l'apoptose induite par les récepteurs de mort et les détecteurs d'ARNdb.

Bien que la structure cristalline de la R1 d'HSV-2 ne soit pas disponible, sa structure tridimensionnelle pourrait être prédite par modélisation informatique. Ceci permettrait de s'assurer que les acides aminés à muter sont exposés à la surface de la protéine et en dehors du site d'interaction avec la R2 qui n'est pas impliqué dans l'activité anti-apoptotique contre le TNF α (49). De plus, l'identification des domaines de la procaspase-8 et de RIP1 impliqués dans l'interaction avec la R1 d'HSV-2 pourrait également donner des indices vis à vis des résidus à muter sur la protéine virale comme par exemple des domaines contenant des acides aminés hydrophobes qui sont souvent impliqués dans les interactions protéiques notamment celles impliquant les DED.

Les mutants devraient être créés par mutation ponctuelle dirigée plutôt que par délétion afin de minimiser les risques d'obtention d'une protéine insoluble. Une stratégie par mutation ponctuelle aléatoire pourrait être utilisée comme méthode alternative. Les mutants obtenus devraient être systématiquement testés pour vérifier leur expression, leur solubilité, leur activité RR, leur capacité à inhiber l'apoptose induite par les récepteurs de mort et le poly(I:C), leur capacité à interagir avec la procaspase-8 et/ou RIP1 et leur activité chaperonne. Les virus HSV-1 mutant R1^{AA-RR+} pourront ensuite être produits en utilisant la stratégie développée pour créer les mutants HSV-1 *hrR3* et *ICP6Δ* (130, 132). La création de mutants R1^{AA-RR+} fournirait un outil parfaitement adapté pour déterminer l'impact de la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV sur la pathogénèse virale *in vitro* dans les kératinocytes et les neurones ainsi qu'*in vivo* chez l'animal.

Caractériser la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV dans les kératinocytes et les neurones :

Nous avons montré que la R1 d'HSV-1 et la R1 d'HSV-2 exercent une fonction anti-apoptotique dans différentes lignées cellulaires épithéliales (HeLa et A549) en bloquant l'activation de la caspase-8 induite par le TNF α , le FasL et le poly(I:C). Le contexte cellulaire peut influencer l'effet des protéines anti-apoptotiques et ce pourrait être le cas pour la R1 d'HSV même si l'interaction de la R1 d'HSV avec la procaspase-8 et RIP1 est probablement conservée. En effet, le groupe de Jerome a confirmé que la R1 d'HSV-2 protège les cellules HeLa de l'apoptose induite par le TNF α mais il a également montré que l'expression individuelle de la R1 d'HSV-2 et qu'une infection avec HSV-2 induit l'apoptose dans les cellules Jurkat (146). D'autre part, le groupe d'Aurelian a montré que la R1 d'HSV-2 mais pas la R1 d'HSV-1 bloque l'apoptose induite par la réplication virale dans les neurones hippocampaux (316). Il serait donc important de vérifier si la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV protège les kératinocytes et/ou les neurones de l'apoptose induite par des stimuli pro-apoptotiques extrinsèques [TNF α , FasL et poly(I:C)].

Étant donné l'extrême sensibilité des cellules HeLa infectées avec *ICP6Δ* vis à vis de l'apoptose induite par le poly(I:C), il est étonnant de constater que l'infection avec le mutant *ICP6Δ* ne produit pas une apoptose massive des cellules hôtes qui doivent

accumuler des ARNdb viraux. De plus, nos résultats montrent que la protéine ICP0 s'accumule de manière similaire dans les cellules infectées avec KOS ou ICP6 Δ suggérant que l'ARN d'ICP0 est produit ; or, celui-ci est le principal inducteur de l'apoptose induite par la réplication virale (352). Pourtant, lorsque des cellules A549tTa sont infectées pendant 24 h, le pourcentage de cellules apoptotiques suivant une infection avec ICP6 Δ est légèrement supérieur à celui observé lors d'une infection avec KOS suggérant que la R1 d'HSV pourrait participer à la pathogenèse virale via son activité anti-apoptotique (230). Les raisons de ce faible niveau d'apoptose observé lors d'une infection avec ICP6 Δ ne sont pas connues mais plusieurs explications peuvent être avancées. Tout d'abord, les HSV encodent plusieurs protéines anti-apoptotiques (ex : Us5/gJ, Us6/gD, Us3 et vhs) et plusieurs protéines capables d'inhiber à différents niveaux la production d'IFN et de cytokines inflammatoires induite par la réponse immune innée antivirale (ex : Us11, ICP γ 34.5, ICP0, ICP27 et vhs) (134, rev. 310). Ces protéines virales multifonctionnelles pourraient participer à l'inhibition de l'apoptose induite par les ARNdb. Par exemple, Us11 interagit avec PKR et inhibe ainsi l'apoptose induite par le blocage de la traduction mais Us11 pourrait également inhiber l'activation de la caspase-8 induite par PKR (66, 123, 153, 329). Toutefois, nos résultats montrent que ces protéines virales n'inhibent pas l'apoptose induite par le poly(I:C) transfecté lors d'une infection avec ICP6 Δ . D'autre part, l'induction de l'apoptose lors d'une infection avec ICP6 Δ pourrait dépendre du type cellulaire étudié. Ceci a déjà été observé avec le MCMV déficient pour M45 (Δ M45) dont l'infection induit la mort dans les cellules endothéliales et les macrophages mais pas dans les fibroblastes ou les hépatocytes (38). De manière similaire au virus Δ M45, le phénotype apoptotique d'ICP6 Δ pourrait être dépendant du type cellulaire ce qui met en évidence la limite de notre étude effectuée essentiellement avec les HeLa et les A549. Il serait très intéressant de tester si une infection de kératinocytes et/ou de neurones avec les virus R1 déficients (ICP6 Δ et *hrR3*) et R1^{AA-RR+} induit l'apoptose. En effet, les kératinocytes, notamment la lignée HaCat, expriment tous les détecteurs d'ARNdb (TLR3, RIG-I, MDA5 et PKR) et sont très sensibles à l'apoptose induite par le poly(I:C) extracellulaire utilisé seul ou transfecté (168, 189, 425). Plusieurs lignées neuronales (ex : NT2N et BE(2)-C/M) et les neurones primaires de rat expriment le TLR3, MDA5 et RIG-I et répondent au poly(I:C) en déclenchant une réponse immune innée antivirale (production d'IFN de type 1) (228, 313). Par conséquent, le phénotype pro-apoptotique d'une infection avec les virus ICP6 Δ , *hrR3*

et R1^{AA-RR+} pourrait être plus important dans ces cellules. De plus, les cellules de rat PC12 différenciées en neurones pourraient constituer un bon modèle d'étude d'autant que le TNF α induit l'apoptose dans ces cellules et que le CrmA, un inhibiteur de caspase encodé par le virus de la vaccine, bloque l'apoptose induite par le TNF α dans ces cellules (136, 284, 376). Caractériser la fonction anti-apoptotique de la R1 d'HSV dans les kératinocytes et les neurones permettrait d'étudier l'impact de cette fonction aux cours du cycle lytique dans les kératinocytes et au cours de la réactivation dans les neurones.

Inhibition de la nécrose programmée par la R1 d'HSV :

L'interaction de la R1 d'HSV-2 avec RIP1 inhibe l'interaction entre TRIF et RIP1 qui implique leur domaine RHIM respectif. Ce résultat suggère que l'interaction peut affecter la liaison de RIP1 avec d'autres protéines possédant un domaine RHIM comme RIP3. La mort cellulaire induite par le TNFR1 s'effectue communément en activant la voie apoptotique extrinsèque dans laquelle la caspase-8 joue un rôle essentiel. Toutefois, lorsque l'activation de la caspase-8 est bloquée, une voie alternative menant à la mort cellulaire nommée nécroptose ou nécrose programmée peut être activée. La nécroptose est indépendante des caspases mais dépendante de RIP1 (108) et de RIP3 (62, 154, 445). RIP3 ne possède pas de DD mais un domaine RHIM qui lui permet d'interagir directement avec RIP1 (383). Il a été montré que l'activité kinase et le domaine de RHIM de RIP1 et de RIP3 sont nécessaires pour l'induction de la nécroptose par le TNF α (62, 154). Lorsque la voie nécroptotique est activée par le TNF α , RIP1 est présent dans les deux types de complexe (I et II) alors que RIP3 s'associe uniquement au complexe II (62, 154). En activant des enzymes clés impliquées dans le métabolisme énergétique, RIP3 stimule la phosphorylation oxydative et donc la production de ROS qui induit, au moins partiellement, la mort cellulaire par nécroptose (108, 445). Il est intéressant de signaler que l'activation du TLR3 (par les ARNdb) dans des cellules Jurkat déficientes en caspase-8 ou en FADD induit la nécroptose selon un mécanisme dépendant de RIP1 ; le rôle de RIP3 n'a pas été testé dans cette étude (188). D'autre part, les travaux de Cho *et al* ont montré que chez les souris déficientes pour RIP3 le virus de la vaccine se réplique plus efficacement et induit une létalité plus importante que chez les souris sauvages (62). Ceci suggère que la nécroptose pourrait servir à la fois à éliminer les cellules infectées dans lesquelles la voie apoptotique

est bloquée et à disséminer dans l'organisme les PAMP viraux stimulant la réponse innée antivirale. L'importance de la nécroptose dans la pathogenèse virale a été récemment mise en évidence par une étude montrant que M45 inhibe la nécroptose induite par le TNF α (265, 403) et par le virus lui-même (403). Cette découverte est d'autant plus intéressante que les HSV, comme le HCMV, inhibe efficacement l'apoptose induite par le TNF α , le FasL et les ARNdb. La R1 d'HSV inhibant l'induction de l'apoptose et l'activation de la caspase-8 par les récepteurs de mort et le TLR3, il est possible que la nécroptose puisse prendre le relais pour induire la mort de la cellule infectée. Sachant que la R1 d'HSV interagit avec RIP1 et que ceci perturbe les interactions impliquant les domaines RHIM, au moins celle entre TRIF et RIP1 dans le cas de la R1 d'HSV-2, il est envisageable que la R1 d'HSV puisse inhiber la nécroptose en perturbant l'interaction de RIP1 avec RIP3. Dans ce cas, la R1 d'HSV jouerait sur un double front en inhibant l'apoptose et la nécroptose via son interaction avec la procaspase-8 et RIP1 respectivement. Il serait donc intéressant de vérifier dans un premier temps si la R1 d'HSV interagit avec RIP3 puis de tester si la R1 d'HSV inhibe l'interaction entre RIP1 et RIP3. Les expériences réalisées durant cette thèse ont été effectuées essentiellement avec deux lignées d'origine épithéliale (HeLa et A549) qui sont insensibles à la nécroptose induite par le TNF α . Pour étudier cette dernière, il faudrait utiliser des lignées sensibles telles que les L929, des fibroblastes de souris couramment utilisés dans la littérature, ou d'autres cellules telles que les NIH 3T3, les Jurkat ou les MEF. Dans ces cellules, la nécroptose peut être induite avec du TNF α seul (L929) ou du TNF α combiné avec du z-VAD-fmk ou des SMAC mimétiques (62, 108, 154). En exprimant de manière transitoire ou inductible la R1 d'HSV dans ces cellules, il serait possible de déterminer l'impact de la R1 d'HSV sur la nécroptose induite par le TNF α . Le FasL et le poly(I:C) pourraient également être testés puisqu'ils peuvent induire la nécroptose (157, 188). D'autre part, le virus Δ M45 induisant une mort cellulaire par nécroptose dans les fibroblastes (MEF, fibroblastes NIH 3T3 et 10.1) (265, 404), il serait intéressant de tester si une infection avec ICP6 Δ ou R1^{AA-RR+} pourrait également induire la nécroptose dans ces fibroblastes et dans les kératinocytes voir dans les neurones. Enfin, il serait intéressant de tester une infection avec HSV-1 et le mutant HSV-1 R1^{AA-RR+} dans les souris déficientes pour RIP3 qui contrairement à celles déficientes pour RIP1 sont viables (62).

Conclusion

L'importance de l'apoptose en tant que mécanisme de défense antivirale est illustrée par le fait qu'un même virus encode généralement plusieurs facteurs anti-apoptotiques agissant de manière redondante pour empêcher l'élimination de la cellule hôte et par conséquent favoriser la réplication. Par exemple, les CMV encodent plusieurs inhibiteurs de l'apoptose dont vICA (inhibiteur de l'activation de la caspase-8), vMIA (inhibiteur de Bax) et vIBO (inhibiteur de l'oligomérisation de Bak) (42, 129, 273, 371). Les HSV encodent plusieurs protéines anti-apoptotiques : vhs (230, 257), Us5/gJ (177), Us6/gD (276), Us3 (28) et la R1 d'HSV. Même si l'activité de ces protéines semble redondante il doit être considéré qu'elles ne sont pas toutes exprimées en même temps lors du cycle viral. Par exemple, les protéines Us3, Us6/gD et Us5/gJ sont exprimées tardivement (134). D'autre part, la présence de vhs, Us6/gD et Us3 dans la particule virale n'est pas suffisante pour inhiber l'apoptose induite par le TNF α ou le poly(I:C) (93, rev. 202, 230). Nos travaux passés et ceux présentés dans cette thèse suggèrent que la R1 d'HSV dont l'expression est précoce et se maintient à un haut niveau au cours du cycle viral joue un rôle essentiel dans la protection des cellules infectées contre l'apoptose induite par divers stimuli pro-apoptotiques activant la caspase-8. En interagissant directement avec la procaspase-8, la R1 d'HSV inhibe la dimérisation/activation de la procaspase-8 induite par le TNF α , FasL, les ARNdb intra et extracellulaires et pourrait ainsi inhiber d'autres stimuli activant la caspase-8 (**Fig. 1**). La R1 d'HSV se comporte comme un inhibiteur viral de la caspase-8 palliant ainsi à la disparition des inhibiteurs cellulaires de la caspase-8, notamment cFLIP, lors de l'infection. D'autre part, la R1 d'HSV inhibe l'apoptose induite par le TLR3 non seulement en bloquant la dimérisation/activation de la procaspase-8 mais également en prévenant l'interaction de TRIF avec RIP1, probablement via son interaction avec RIP1 (**Fig. 1**). La R1 d'HSV participe donc à l'inhibition de l'apoptose induite par la réponse innée antivirale ainsi que la réponse immune adaptative. Notre étude offre des perspectives de recherches qui devront être explorées pour compléter notre compréhension de l'activité anti-apoptotique de la R1 d'HSV et notamment déterminer si son inhibition pourrait constituer un moyen efficace de lutter contre l'infection.

Il y a plus de 200 ans, Charles Robert Darwin publiait la théorie de l'évolution. S'il avait connu l'existence des virus, il n'aurait probablement pas été surpris de constater qu'à l'image de leur hôte, ils évoluent et acquièrent de nouvelles fonctions facilitant leur réplication. François Jacob en conceptualisant la théorie de l'évolution moléculaire a complété les théories darwiniennes en décrivant la génération au cours de l'évolution de nouvelles protéines ou de nouvelles fonctions à partir de molécules existantes (174). La R1 d'HSV illustre parfaitement ce concept d'évolution moléculaire. En effet, la R1 d'HSV a conservé et modifié l'activité ribonucléotide réductase d'une sous-unité R1 ancestrale ; de plus, elle a acquis une fonction de chaperonne moléculaire stimulant entre autre la traduction ainsi qu'une activité anti-apoptotique protégeant de l'apoptose induite par divers stimuli (48, 230, 421). Les recherches sur la R1 d'HSV soulignent donc l'extraordinaire complexité des molécules virales qui exercent généralement plusieurs fonctions différentes affectant divers processus cellulaires dans le but de favoriser la réplication. L'étude de ces différentes fonctions est non seulement passionnante mais également nécessaire pour comprendre les processus complexes intervenant lors d'une infection virale.

Références bibliographiques :

1. **Adhikari, A., M. Xu, and Z. J. Chen.** 2007. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* **26**:3214-26.
2. **Aita, K., H. Irie, A. H. Koyama, A. Fukuda, T. Yoshida, and J. Shiga.** 2001. Acute adrenal infection by HSV-1: role of apoptosis in viral replication. *Arch Virol* **146**:2009-20.
3. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-8.
4. **Aoki, F. Y., M. Chernesky, and F. Coultée.** 2008. Infections génitales au virus herpès simplex (VHS). Lignes directrices canadiennes sur les infections transmissibles sexuellement, édition 2006. Agence de la santé publique du Canada. Mise à jour de janvier 2008.
5. **Asano, S., T. Honda, F. Goshima, Y. Nishiyama, and Y. Sugiura.** 2000. US3 protein kinase of herpes simplex virus protects primary afferent neurons from virus-induced apoptosis in ICR mice. *Neurosci Lett* **294**:105-8.
6. **Asano, S., T. Honda, F. Goshima, D. Watanabe, Y. Miyake, Y. Sugiura, and Y. Nishiyama.** 1999. US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *J Gen Virol* **80** (Pt 1):51-6.
7. **Ashkenazi, A., and V. M. Dixit.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-8.
8. **Aubert, M., and J. A. Blaho.** 2001. Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. *Microbes Infect* **3**:859-66.
9. **Aubert, M., and J. A. Blaho.** 1999. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol* **73**:2803-13.
10. **Aubert, M., and J. A. Blaho.** 2003. Viral oncoapoptosis of human tumor cells. *Gene Ther* **10**:1437-45.
11. **Aubert, M., Z. Chen, R. Lang, C. H. Dang, C. Fowler, D. D. Sloan, and K. R. Jerome.** 2008. The antiapoptotic herpes simplex virus glycoprotein J localizes to multiple cellular organelles and induces reactive oxygen species formation. *J Virol* **82**:617-29.
12. **Aubert, M., J. O'Toole, and J. A. Blaho.** 1999. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **73**:10359-70.
13. **Aubert, M., S. A. Rice, and J. A. Blaho.** 2001. Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human HEp-2 cells. *J Virol* **75**:1013-30.
14. **Averett, D. R., P. A. Furman, and T. Spector.** 1984. Ribonucleotide reductase of herpes simplex virus type 2 resembles that of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **52**:981-3.
15. **Averett, D. R., C. Lubbers, G. B. Elion, and T. Spector.** 1983. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex type 1 virus. Characterization of a distinct enzyme. *J Biol Chem* **258**:9831-8.

16. **Bagneris, C., A. V. Ageichik, N. Cronin, B. Wallace, M. Collins, C. Boshoff, G. Waksman, and T. Barrett.** 2008. Crystal structure of a vFlip-IKK γ complex: insights into viral activation of the IKK signalosome. *Mol Cell* **30**:620-31.
17. **Baines, J. D., and C. Duffy.** 2006. Nucleocapsid assembly and envelopment of herpes simplex virus. In: Sandri-Goldin, E.M. (Ed.), *Alpha Herpesviruses*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.:175-204.
18. **Balachandran, S., C. N. Kim, W. C. Yeh, T. W. Mak, K. Bhalla, and G. N. Barber.** 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J* **17**:6888-902.
19. **Balachandran, S., P. C. Roberts, L. E. Brown, H. Truong, A. K. Pattnaik, D. R. Archer, and G. N. Barber.** 2000. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**:129-41.
20. **Balachandran, S., E. Thomas, and G. N. Barber.** 2004. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* **432**:401-5.
21. **Balfour, H. H., Jr.** 1999. Antiviral drugs. *N Engl J Med* **340**:1255-68.
22. **Balmanno, K., and S. J. Cook.** 2009. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* **16**:368-77.
23. **Bao, Q., and Y. Shi.** 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**:56-65.
24. **Barnhart, B. C., E. C. Alappat, and M. E. Peter.** 2003. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* **15**:185-93.
25. **Barnhart, B. C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso, and M. E. Peter.** 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J* **23**:3175-85.
26. **Baud, V., and M. Karin.** 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**:372-7.
27. **Bell, J. K., I. Botos, P. R. Hall, J. Askins, J. Shiloach, D. M. Segal, and D. R. Davies.** 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10976-80.
28. **Benetti, L., J. Munger, and B. Roizman.** 2003. The herpes simplex virus 1 US3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol* **77**:6567-73.
29. **Benetti, L., and B. Roizman.** 2007. In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3. *J Virol* **81**:10242-8.
30. **Besch, R., H. Poeck, T. Hohenauer, D. Senft, G. Hacker, C. Berking, V. Hornung, S. Endres, T. Ruzicka, S. Rothenfusser, and G. Hartmann.** 2009. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* **119**:2399-411.
31. **Bevilacqua, P. C., and T. R. Cech.** 1996. Minor-groove recognition of double-stranded RNA by the double-stranded RNA-binding domain from the RNA-activated protein kinase PKR. *Biochemistry* **35**:9983-94.
32. **Blankenship, J. W., E. Varfolomeev, T. Goncharov, A. V. Fedorova, D. S. Kirkpatrick, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, D. Arnott, M. Aghajan, K. Zobel, J. F. Bazan, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, and D. Vucic.** 2009. Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* **417**:149-60.

33. **Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green, and G. S. Salvesen.** 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**:529-41.
34. **Bonnet, M. C., C. Daurat, C. Ottone, and E. F. Meurs.** 2006. The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. *Cell Signal* **18**:1865-75.
35. **Bowman, J. J., J. S. Orlando, D. J. Davido, A. S. Kushnir, and P. A. Schaffer.** 2009. Transient expression of herpes simplex virus type 1 ICP22 represses viral promoter activity and complements the replication of an ICP22 null virus. *J Virol* **83**:8733-43.
36. **Branco, F. J., and N. W. Fraser.** 2005. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J Virol* **79**:9019-25.
37. **Brandt, C. R., R. L. Kintner, A. M. Pumfery, R. J. Visalli, and D. R. Grau.** 1991. The herpes simplex virus ribonucleotide reductase is required for ocular virulence. *J Gen Virol* **72 (Pt 9)**:2043-9.
38. **Brune, W., C. Menard, J. Heesemann, and U. H. Koszinowski.** 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**:303-5.
39. **Bsibsi, M., C. Persoon-Deen, R. W. Verwer, S. Meeuwssen, R. Ravid, and J. M. Van Noort.** 2006. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* **53**:688-95.
40. **Bsibsi, M., R. Ravid, D. Gveric, and J. M. van Noort.** 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**:1013-21.
41. **Cai, W., T. L. Astor, L. M. Liptak, C. Cho, D. M. Coen, and P. A. Schaffer.** 1993. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J Virol* **67**:7501-12.
42. **Cam, M., W. Handke, M. Picard-Maureau, and W. Brune.** 2010. Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ* **17**:655-65.
43. **Cantin, E. M., D. R. Hinton, J. Chen, and H. Openshaw.** 1995. Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **69**:4898-905.
44. **Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed.** 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**:1318-21.
45. **Cartier, A., E. Broberg, T. Komai, M. Henriksson, and M. G. Masucci.** 2003. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ* **10**:1320-8.
46. **Cartier, A., T. Komai, and M. G. Masucci.** 2003. The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp Cell Res* **291**:242-50.
47. **Cassady, K. A., and M. Gross.** 2002. The herpes simplex virus type 1 U(S)11 protein interacts with protein kinase R in infected cells and requires a 30-amino-acid sequence adjacent to a kinase substrate domain. *J Virol* **76**:2029-35.
48. **Chabaud, S., H. Lambert, A. M. Sasseville, H. Lavoie, C. Guilbault, B. Massie, J. Landry, and Y. Langelier.** 2003. The R1 subunit of herpes simplex virus

- ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett* **545**:213-8.
49. **Chabaud, S., A. M. Sasseville, S. M. Elahi, A. Caron, F. Dufour, B. Massie, and Y. Langelier.** 2007. The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J Gen Virol* **88**:384-94.
 50. **Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo.** 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**:2351-4.
 51. **Chan, K. F., M. R. Siegel, and J. M. Lenardo.** 2000. Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity* **13**:419-22.
 52. **Chang, L., H. Kamata, G. Solinas, J. L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y. C. Liu, and M. Karin.** 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* **124**:601-13.
 53. **Chawla-Sarkar, M., D. J. Lindner, Y. F. Liu, B. R. Williams, G. C. Sen, R. H. Silverman, and E. C. Borden.** 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**:237-49.
 54. **Chen, S. H., D. A. Garber, P. A. Schaffer, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2000. Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation. *Virology* **278**:207-16.
 55. **Chen, S. H., M. F. Kramer, P. A. Schaffer, and D. M. Coen.** 1997. A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **71**:5878-84.
 56. **Chen, S. H., L. Y. Lee, D. A. Garber, P. A. Schaffer, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2002. Neither LAT nor open reading frame P mutations increase expression of spliced or intron-containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **76**:4764-72.
 57. **Chen, S. H., J. E. Oakes, and R. N. Lausch.** 1994. Synergistic anti-herpes effect of TNF- α and IFN- γ in human corneal epithelial cells compared with that in corneal fibroblasts. *Antiviral Res* **25**:201-13.
 58. **Chen, Z. J.** 2005. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* **7**:758-65.
 59. **Chew, T., K. E. Taylor, and K. L. Mossman.** 2009. Innate and Adaptive Immune Responses to Herpes Simplex Virus. *Viruses* **1**:979-1002.
 60. **Chiou, S. H., Y. P. Yang, J. C. Lin, C. H. Hsu, H. C. Jhang, Y. T. Yang, C. H. Lee, L. L. Ho, W. M. Hsu, H. H. Ku, S. J. Chen, S. S. Chen, M. D. Chang, C. W. Wu, and L. J. Juan.** 2006. The immediate early 2 protein of human cytomegalovirus (HCMV) mediates the apoptotic control in HCMV retinitis through up-regulation of the cellular FLICE-inhibitory protein expression. *J Immunol* **177**:6199-206.
 61. **Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, and D. R. Green.** 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* **13**:1396-402.
 62. **Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford, and F. K. Chan.** 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**:1112-23.
 63. **Choe, J., M. S. Kelker, and I. A. Wilson.** 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**:581-5.

64. **Chong, K. L., L. Feng, K. Schappert, E. Meurs, T. F. Donahue, J. D. Friesen, A. G. Hovanessian, and B. R. Williams.** 1992. Human p68 kinase exhibits growth suppression in yeast and homology to the translational regulator GCN2. *EMBO J* **11**:1553-62.
65. **Chou, J., J. J. Chen, M. Gross, and B. Roizman.** 1995. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10516-20.
66. **Chou, J., and B. Roizman.** 1994. Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5247-51.
67. **Chowdhury, I., B. Tharakan, and G. K. Bhat.** 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**:10-27.
68. **Chung, T. D., J. P. Wymer, M. Kulka, C. C. Smith, and L. Aurelian.** 1990. Myristylation and polylysine-mediated activation of the protein kinase domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Virology* **179**:168-78.
69. **Chung, T. D., J. P. Wymer, C. C. Smith, M. Kulka, and L. Aurelian.** 1989. Protein kinase activity associated with the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *J Virol* **63**:3389-98.
70. **Cohen, E. A., J. Charron, J. Perret, and Y. Langelier.** 1985. Herpes simplex virus ribonucleotide reductase induced in infected BHK-21/C13 cells: biochemical evidence for the existence of two non-identical subunits, H1 and H2. *J Gen Virol* **66 (Pt 4)**:733-45.
71. **Cohen, G. M.** 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326 (Pt 1)**:1-16.
72. **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 (Pt 6)**:1471-6.
73. **Conner, J., A. Cross, J. Murray, and H. Marsden.** 1994. Identification of structural domains within the large subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *J Gen Virol* **75 (Pt 12)**:3327-35.
74. **Conner, J., J. Macfarlane, H. Lankinen, and H. Marsden.** 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 (Pt 1)**:103-12.
75. **Conner, J., J. Murray, A. Cross, J. B. Clements, and H. S. Marsden.** 1995. Intracellular localisation of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase subunits during infection of cultured cells. *Virology* **213**:615-23.
76. **Cuddihy, A. R., S. Li, N. W. Tam, A. H. Wong, Y. Taya, N. Abraham, J. C. Bell, and A. E. Koromilas.** 1999. Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* **19**:2475-84.
77. **Cuddihy, A. R., A. H. Wong, N. W. Tam, S. Li, and A. E. Koromilas.** 1999. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* **18**:2690-702.

78. **Cunningham, A. L., R. J. Diefenbach, M. Miranda-Saksena, L. Bosnjak, M. Kim, C. Jones, and M. W. Douglas.** 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* **194 Suppl 1**:S11-8.
79. **Dar, A. C., T. E. Dever, and F. Sicheri.** 2005. Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* **122**:887-900.
80. **Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg.** 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**:231-41.
81. **de Bouteiller, O., E. Merck, U. A. Hasan, S. Hubac, B. Benguigui, G. Trinchieri, E. E. Bates, and C. Caux.** 2005. Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem* **280**:38133-45.
82. **DeBiasi, R. L., B. K. Kleinschmidt-DeMasters, S. Richardson-Burns, and K. L. Tyler.** 2002. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis* **186**:1547-57.
83. **Decman, V., P. R. Kinchington, S. A. Harvey, and R. L. Hendricks.** 2005. Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J Virol* **79**:10339-47.
84. **Desai, P., R. Ramakrishnan, Z. W. Lin, B. Osak, J. C. Glorioso, and M. Levine.** 1993. The RR1 gene of herpes simplex virus type 1 is uniquely trans activated by ICP0 during infection. *J Virol* **67**:6125-35.
85. **Dey, M., C. Cao, A. C. Dar, T. Tamura, K. Ozato, F. Sicheri, and T. E. Dever.** 2005. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* **122**:901-13.
86. **Dhanasekaran, D. N., and E. P. Reddy.** 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**:6245-51.
87. **Dida, F., Y. Li, A. Iwao, T. Deguchi, E. Azuma, and Y. Komada.** 2008. Resistance to TRAIL-induced apoptosis caused by constitutional phosphorylation of Akt and PTEN in acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol* **36**:1343-53.
88. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, M. W. Douglas, and A. L. Cunningham.** 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* **18**:35-51.
89. **Dix, M. M., G. M. Simon, and B. F. Cravatt.** 2008. Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell* **134**:679-91.
90. **Dobbs, M. E., J. E. Strasser, C. F. Chu, C. Chalk, and G. N. Milligan.** 2005. Clearance of herpes simplex virus type 2 by CD8+ T cells requires gamma interferon and either perforin- or Fas-mediated cytolytic mechanisms. *J Virol* **79**:14546-54.
91. **Donze, O., J. Deng, J. Curran, R. Sladek, D. Picard, and N. Sonenberg.** 2004. The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. *EMBO J* **23**:564-71.
92. **Drolet, B. S., G. C. Perng, J. Cohen, S. M. Slanina, A. Yukht, A. B. Nesburn, and S. L. Wechsler.** 1998. The region of the herpes simplex virus type 1 LAT gene involved in spontaneous reactivation does not encode a functional protein. *Virology* **242**:221-32.
93. **Dufour, F., L. Bertrand, A. Pearson, N. Grandvaux, and Y. Langelier.** 2010. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus type 1 and 2 protect cells against poly(I:C)-induced apoptosis. manuscript in preparation.

94. **Dufour, F., A. M. Sasseville, S. Chabaud, B. Massie, M. R. Siegel, and Y. Langelier.** 2010. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. Submitted at Apoptosis.
95. **Ea, C. K., L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, and Z. J. Chen.** 2006. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**:245-57.
96. **Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, and F. L. Scott.** 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**:988-94.
97. **Eklund, H., U. Uhlin, M. Farnegardh, D. T. Logan, and P. Nordlund.** 2001. Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* **77**:177-268.
98. **Elgadi, M. M., C. E. Hayes, and J. R. Smiley.** 1999. The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts. *J Virol* **73**:7153-64.
99. **Ellermann-Eriksen, S.** 2005. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol J* **2**:59.
100. **Eramo, A., M. Sargiacomo, L. Ricci-Vitiani, M. Todaro, G. Stassi, C. G. Messina, I. Parolini, F. Lotti, G. Sette, C. Peschle, and R. De Maria.** 2004. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol* **34**:1930-40.
101. **Ermolaeva, M. A., M. C. Michallet, N. Papadopoulou, O. Utermohlen, K. Kranidioti, G. Kollias, J. Tschopp, and M. Pasparakis.** 2008. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol* **9**:1037-46.
102. **Esaki, S., F. Goshima, S. Katsumi, D. Watanabe, N. Ozaki, S. Murakami, and Y. Nishiyama.** 2010. Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Arch Virol*.
103. **Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson.** 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**:2207-16.
104. **Falschlehner, C., C. H. Emmerich, B. Gerlach, and H. Walczak.** 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:1462-75.
105. **Feldman, L. T., A. R. Ellison, C. C. Voytek, L. Yang, P. Krause, and T. P. Margolis.** 2002. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:978-83.
106. **Fernandes-Alnemri, T., R. C. Armstrong, J. Krebs, S. M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L. C. Fritz, J. A. Trapani, K. J. Tomaselli, G. Litwack, and E. S. Alnemri.** 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7464-9.
107. **Festjens, N., S. Cornelis, M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele.** 2006. Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem* **387**:1005-16.
108. **Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, and P. Vandenabeele.** 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* **14**:400-10.

109. **Filippova, M., M. M. Johnson, M. Bautista, V. Filippov, N. Fodor, S. S. Tungteakkhun, K. Williams, and P. J. Duerksen-Hughes.** 2007. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* **81**:4116-29.
110. **Filippova, M., L. Parkhurst, and P. J. Duerksen-Hughes.** 2004. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* **279**:25729-44.
111. **Fischer, U., C. Stroh, and K. Schulze-Osthoff.** 2006. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* **25**:152-9.
112. **Friboulet, L., C. Gourzones, S. W. Tsao, Y. Morel, C. Paturel, S. Temam, C. Uzan, and P. Busson.** 2010. Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* **10**:327.
113. **Friboulet, L., C. Pioche-Durieu, S. Rodriguez, A. Valent, S. Souquere, H. Ripoche, A. Khabir, S. W. Tsao, J. Bosq, K. W. Lo, and P. Busson.** 2008. Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis. *Neoplasia* **10**:1183-94.
114. **Fruh, K., K. Ahn, H. Djaballah, P. Sempe, P. M. van Endert, R. Tampe, P. A. Peterson, and Y. Yang.** 1995. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* **375**:415-8.
115. **Funami, K., M. Sasai, Y. Ohba, H. Oshiumi, T. Seya, and M. Matsumoto.** 2007. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *J Immunol* **179**:6867-72.
116. **Galluzzi, L., C. Brenner, E. Morselli, Z. Touat, and G. Kroemer.** 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* **4**:e1000018.
117. **Galluzzi, L., O. Kepp, E. Morselli, I. Vitale, L. Senovilla, M. Pinti, L. Zitvogel, and G. Kroemer.** 2010. Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *J Intern Med* **267**:526-42.
118. **Galvan, V., and B. Roizman.** 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 U S A* **95**:3931-6.
119. **Garber, D. A., P. A. Schaffer, and D. M. Knipe.** 1997. A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **71**:5885-93.
120. **Gibson, T., P. Stockwell, M. Ginsburg, and B. Barrell.** 1984. Homology between two EBV early genes and HSV ribonucleotide reductase and 38K genes. *Nucleic Acids Res* **12**:5087-99.
121. **Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban.** 2000. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* **19**:1369-78.
122. **Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban.** 1999. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* **19**:4653-63.
123. **Gil, J., and M. Esteban.** 2000. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**:3665-74.

124. **Gil, J., M. A. Garcia, and M. Esteban.** 2002. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* **529**:249-55.
125. **Gil, J., M. A. Garcia, P. Gomez-Puertas, S. Guerra, J. Rullas, H. Nakano, J. Alcami, and M. Esteban.** 2004. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* **24**:4502-12.
126. **Gillis, P. A., L. H. Okagaki, and S. A. Rice.** 2009. Herpes simplex virus type 1 ICP27 induces p38 mitogen-activated protein kinase signaling and apoptosis in HeLa cells. *J Virol* **83**:1767-77.
127. **Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond, and M. Colonna.** 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8459-64.
128. **Goh, K. C., M. J. deVeer, and B. R. Williams.** 2000. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J* **19**:4292-7.
129. **Goldmacher, V. S., L. M. Bartle, A. Skaletskaya, C. A. Dionne, N. L. Kedersha, C. A. Vater, J. W. Han, R. J. Lutz, S. Watanabe, E. D. Cahir McFarland, E. D. Kieff, E. S. Mocarski, and T. Chittenden.** 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12536-41.
130. **Goldstein, D. J., and S. K. Weller.** 1988. An ICP6::lacZ insertional mutagen is used to demonstrate that the UL52 gene of herpes simplex virus type 1 is required for virus growth and DNA synthesis. *J Virol* **62**:2970-7.
131. **Goldstein, D. J., and S. K. Weller.** 1988. Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant. *Virology* **166**:41-51.
132. **Goldstein, D. J., and S. K. Weller.** 1988. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J Virol* **62**:196-205.
133. **Golks, A., D. Brenner, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik.** 2006. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med* **203**:1295-305.
134. **Goodkin, M. L., E. R. Morton, and J. A. Blaho.** 2004. Herpes simplex virus infection and apoptosis. *Int Rev Immunol* **23**:141-72.
135. **Goodkin, M. L., A. T. Ting, and J. A. Blaho.** 2003. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **77**:7261-80.
136. **Goswami, R., J. Kilkus, B. Scurlock, and G. Dawson.** 2002. CrmA protects against apoptosis and ceramide formation in PC12 cells. *Neurochem Res* **27**:735-41.
137. **Griffin, D. E., and J. M. Hardwick.** 1997. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annu Rev Microbiol* **51**:565-92.
138. **Groskreutz, D. J., M. M. Monick, L. S. Powers, T. O. Yarovinsky, D. C. Look, and G. W. Hunninghake.** 2006. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* **176**:1733-40.

139. **Grunewald, K., P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister, and A. C. Steven.** 2003. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* **302**:1396-8.
140. **Gu, H., Y. Liang, G. Mandel, and B. Roizman.** 2005. Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7571-6.
141. **Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, M. A. Garcia, A. Zaballos, and M. Esteban.** 2006. Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* **281**:18734-45.
142. **Guicciardi, M. E., and G. J. Gores.** 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J* **23**:1625-37.
143. **Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke, and P. Meier.** 2008. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* **10**:1309-17.
144. **Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin.** 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**:204-7.
145. **Halford, W. P., B. M. Gebhardt, and D. J. Carr.** 1996. Persistent cytokine expression in trigeminal ganglion latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Immunol* **157**:3542-9.
146. **Han, J. Y., S. A. Miller, T. M. Wolfe, H. Pourhassan, and K. R. Jerome.** 2009. Cell type-specific induction and inhibition of apoptosis by Herpes Simplex virus type 2 ICP10. *J Virol* **83**:2765-9.
147. **Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang, and H. B. Shu.** 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**:15652-61.
148. **Handler, C. G., R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 1996. Oligomeric structure of glycoproteins in herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**:6067-70.
149. **Hardarson, H. S., J. S. Baker, Z. Yang, E. Purevjav, C. H. Huang, L. Alexopoulou, N. Li, R. A. Flavell, N. E. Bowles, and J. G. Vallejo.** 2007. Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H251-8.
150. **Hardy, S., G. G. St-Onge, E. Joly, Y. Langelier, and M. Prentki.** 2005. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* **280**:13285-91.
151. **Hargett, D., T. McLean, and S. L. Bachenheimer.** 2005. Herpes simplex virus ICP27 activation of stress kinases JNK and p38. *J Virol* **79**:8348-60.
152. **Harper, N., M. Hughes, M. MacFarlane, and G. M. Cohen.** 2003. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**:25534-41.
153. **He, B., M. Gross, and B. Roizman.** 1997. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the

- shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:843-8.
154. **He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, and X. Wang.** 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**:1100-11.
 155. **Heldwein, E. E., and C. Krumpfenner.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:1653-68.
 156. **Hill, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, and D. Johnson.** 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**:411-5.
 157. **Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp.** 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**:489-95.
 158. **Holzerlandt, R., C. Orengo, P. Kellam, and M. M. Alba.** 2002. Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome. *Genome Res* **12**:1739-48.
 159. **Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann.** 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**:994-7.
 160. **Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel.** 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**:387-96.
 161. **Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel.** 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**:299-308.
 162. **Hufner, K., T. Derfuss, S. Herberger, K. Sunami, S. Russell, I. Sinicina, V. Arbusow, M. Strupp, T. Brandt, and D. Theil.** 2006. Latency of alpha-herpes viruses is accompanied by a chronic inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**:1022-30.
 163. **Hughes, M. A., N. Harper, M. Butterworth, K. Cain, G. M. Cohen, and M. MacFarlane.** 2009. Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* **35**:265-79.
 164. **Hunter, J. C., C. C. Smith, D. Bose, M. Kulka, R. Broderick, and L. Aurelian.** 1995. Intracellular internalization and signaling pathways triggered by the large subunit of HSV-2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Virology* **210**:345-60.
 165. **Huszar, D., and S. Bacchetti.** 1981. Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. *J Virol* **37**:580-8.
 166. **Ingemarson, R., and H. Lankinen.** 1987. The herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase is a tight complex of the type alpha 2 beta 2 composed of 40K and 140K proteins, of which the latter shows multiple forms due to proteolysis. *Virology* **156**:417-22.
 167. **Ingemarson, R., and L. Thelander.** 1996. A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **35**:8603-9.
 168. **Iordanov, M. S., J. D. Kirsch, O. P. Ryabinina, J. Wong, P. N. Spitz, V. B. Korcheva, A. Thorburn, and B. E. Magun.** 2005. Recruitment of TRADD,

- FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs). *Apoptosis* **10**:167-76.
169. **Iordanov, M. S., O. P. Ryabinina, P. Schneider, and B. E. Magun.** 2005. Two mechanisms of caspase 9 processing in double-stranded RNA- and virus-triggered apoptosis. *Apoptosis* **10**:153-66.
 170. **Irie, H., A. Kiyoshi, and A. H. Koyama.** 2004. A role for apoptosis induced by acute herpes simplex virus infection in mice. *Int Rev Immunol* **23**:173-85.
 171. **Ishikawa, T., H. Yamada, A. Oyamada, F. Goshima, Y. Nishiyama, and Y. Yoshikai.** 2009. A protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *J Virol*.
 172. **Jack, C. S., N. Arbour, J. Manusow, V. Montgrain, M. Blain, E. McCrea, A. Shapiro, and J. P. Antel.** 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* **175**:4320-30.
 173. **Jackson, A. C., J. P. Rossiter, and M. Lafon.** 2006. Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. *J Neurovirol* **12**:229-34.
 174. **Jacob, F.** 1977. Evolution and tinkering. *Science* **196**:1161-6.
 175. **Jacobson, J. G., D. A. Leib, D. J. Goldstein, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, S. K. Weller, and D. M. Coen.** 1989. A herpes simplex virus ribonucleotide reductase deletion mutant is defective for productive acute and reactivatable latent infections of mice and for replication in mouse cells. *Virology* **173**:276-83.
 176. **Jacquemont, B., and B. Roizman.** 1975. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *J Virol* **15**:707-13.
 177. **Jerome, K. R., Z. Chen, R. Lang, M. R. Torres, J. Hofmeister, S. Smith, R. Fox, C. J. Froelich, and L. Corey.** 2001. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol* **167**:3928-35.
 178. **Jerome, K. R., R. Fox, Z. Chen, A. E. Sears, H. Lee, and L. Corey.** 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* **73**:8950-7.
 179. **Jiang, Q., H. Wei, and Z. Tian.** 2008. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* **8**:12.
 180. **Johns, H. L., E. Bensaude, S. A. La Rocca, J. Seago, B. Charleston, F. Steinbach, T. W. Drew, H. Crooke, and H. Everett.** 2010. Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from pIpC-mediated apoptosis. *J Gen Virol* **91**:1038-46.
 181. **Johnson, P. A., A. Miyanohara, F. Levine, T. Cahill, and T. Friedmann.** 1992. Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **66**:2952-65.
 182. **Jones, C.** 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* **16**:79-95.
 183. **Jones, F. E., C. A. Smibert, and J. R. Smiley.** 1995. Mutational analysis of the herpes simplex virus virion host shutoff protein: evidence that vhs functions in the absence of other viral proteins. *J Virol* **69**:4863-71.
 184. **Junttila, M. R., S. P. Li, and J. Westermarck.** 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* **22**:954-65.
 185. **Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different

- toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**:863-9.
186. **Kaiser, W. J., and M. K. Offermann.** 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* **174**:4942-52.
 187. **Kalai, M., V. Suin, N. Festjens, A. Meeus, A. Bernis, X. M. Wang, X. Saelens, and P. Vandenabeele.** 2007. The caspase-generated fragments of PKR cooperate to activate full-length PKR and inhibit translation. *Cell Death Differ* **14**:1050-9.
 188. **Kalai, M., G. Van Loo, T. Vanden Berghe, A. Meeus, W. Burm, X. Saelens, and P. Vandenabeele.** 2002. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ* **9**:981-94.
 189. **Kalali, B. N., G. Kollisch, J. Mages, T. Muller, S. Bauer, H. Wagner, J. Ring, R. Lang, M. Mempel, and M. Ollert.** 2008. Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol* **181**:2694-704.
 190. **Kariko, K., P. Bhuyan, J. Capodici, and D. Weissman.** 2004. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* **172**:6545-9.
 191. **Kariko, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman.** 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**:12542-50.
 192. **Karin, M., and E. Gallagher.** 2009. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* **228**:225-40.
 193. **Kashlan, O. B., and B. S. Cooperman.** 2003. Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry* **42**:1696-706.
 194. **Kataoka, T., R. C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsics, and J. Tschopp.** 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* **10**:640-8.
 195. **Kather, A., M. J. Raftery, G. Devi-Rao, J. Lippmann, T. Giese, R. M. Sandri-Goldin, and G. Schonrich.** 2010. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol* **84**:1034-46.
 196. **Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**:19-28.
 197. **Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita, and S. Akira.** 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**:1601-10.
 198. **Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira.** 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**:101-5.

199. **Kawai, T., and S. Akira.** 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1143**:1-20.
200. **Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**:981-8.
201. **Keller, N., J. Mares, O. Zerbe, and M. G. Grutter.** 2009. Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* **17**:438-48.
202. **Kelly, B. J., C. Fraefel, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res* **145**:173-86.
203. **Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-57.
204. **Khobar, K. S., M. Dhalla, Y. Siddiqui, A. Zhou, M. N. Al-Ahdal, S. D. Der, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2000. Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *J Interferon Cytokine Res* **20**:653-9.
205. **Khanna, K. M., R. H. Bonneau, P. R. Kinchington, and R. L. Hendricks.** 2003. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* **18**:593-603.
206. **Khanna, K. M., A. J. Lepisto, V. Decman, and R. L. Hendricks.** 2004. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* **16**:463-9.
207. **Khanna, K. M., A. J. Lepisto, and R. L. Hendricks.** 2004. Immunity to latent viral infection: many skirmishes but few fatalities. *Trends Immunol* **25**:230-4.
208. **Khoo, D., C. Perez, and I. Mohr.** 2002. Characterization of RNA determinants recognized by the arginine- and proline-rich region of Us11, a herpes simplex virus type 1-encoded double-stranded RNA binding protein that prevents PKR activation. *J Virol* **76**:11971-81.
209. **Kim, J. C., S. Y. Lee, S. Y. Kim, J. K. Kim, H. J. Kim, H. M. Lee, M. S. Choi, J. S. Min, M. J. Kim, H. S. Choi, and J. K. Ahn.** 2008. HSV-1 ICP27 suppresses NF-kappaB activity by stabilizing IkappaBalpha. *FEBS Lett* **582**:2371-6.
210. **Kim, Y. S., R. F. Schwabe, T. Qian, J. J. Lemasters, and D. A. Brenner.** 2002. TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology* **36**:1498-508.
211. **Kimberlin, D. W., C. Y. Lin, R. F. Jacobs, D. A. Powell, L. M. Frenkel, W. C. Gruber, M. Rathore, J. S. Bradley, P. S. Diaz, M. Kumar, A. M. Arvin, K. Gutierrez, M. Shelton, L. B. Weiner, J. W. Sleasman, T. M. de Sierra, S. J. Soong, J. Kiell, F. D. Lakeman, and R. J. Whitley.** 2001. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. *Pediatrics* **108**:223-9.
212. **Knipe, D. M., and A. Cliffe.** 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* **6**:211-21.
213. **Koromilas, A. E., S. Roy, G. N. Barber, M. G. Katze, and N. Sonenberg.** 1992. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **257**:1685-9.

214. **Kosz-Vnenchak, M., D. M. Coen, and D. M. Knipe.** 1990. Restricted expression of herpes simplex virus lytic genes during establishment of latent infection by thymidine kinase-negative mutant viruses. *J Virol* **64**:5396-402.
215. **Koyama, A. H., and A. Adachi.** 1997. Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78 (Pt 11)**:2909-12.
216. **Koyama, A. H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, and A. Adachi.** 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect* **2**:1111-7.
217. **Koyama, A. H., H. Irie, T. Fukumori, S. Hata, S. Iida, H. Akari, and A. Adachi.** 1998. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection. *J Med Invest* **45**:37-45.
218. **Koyama, A. H., and Y. Miwa.** 1997. Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* **71**:2567-71.
219. **Kramer, M. F., S. H. Chen, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 1998. Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. *J Virol* **72**:1177-85.
220. **Kramer, M. F., and D. M. Coen.** 1995. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **69**:1389-99.
221. **Kreuz, S., D. Siegmund, P. Scheurich, and H. Wajant.** 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* **21**:3964-73.
222. **Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner.** 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**:99-163.
223. **Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**:3-11.
224. **Kumar, A., J. Zhang, and F. S. Yu.** 2006. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology* **117**:11-21.
225. **Kumar, M. V., C. N. Nagineni, M. S. Chin, J. J. Hooks, and B. Detrick.** 2004. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* **153**:7-15.
226. **Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green, and D. D. Newmeyer.** 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**:331-42.
227. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69.
228. **Lafon, M., F. Megret, M. Lafage, and C. Prehaud.** 2006. The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *J Mol Neurosci* **29**:185-94.
229. **Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens, and P. Vandenabeele.** 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**:358-61.

230. **Langelier, Y., S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbault, A. M. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, and B. Massie.** 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* **83**:2779-89.
231. **Langelier, Y., and G. Buttin.** 1981. Characterization of ribonucleotide reductase induction in BHK-21/C13 Syrian hamster cell line upon infection by herpes simplex virus (HSV). *J Gen Virol* **57**:21-31.
232. **Langelier, Y., L. Champoux, M. Hamel, C. Guilbault, N. Lamarche, P. Gaudreau, and B. Massie.** 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**:1435-43.
233. **Langelier, Y., M. Dechamps, and G. Buttin.** 1978. Analysis of dCMP deaminase and CDP reductase levels in hamster cells infected by herpes simplex virus. *J Virol* **26**:547-53.
234. **Larralde, O., R. W. Smith, G. S. Wilkie, P. Malik, N. K. Gray, and J. B. Clements.** 2006. Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. *J Virol* **80**:1588-91.
235. **Lavrik, I. N., A. Golks, D. Riess, M. Bentele, R. Eils, and P. H. Krammer.** 2007. Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. *J Biol Chem* **282**:13664-71.
236. **Lavrik, I. N., T. Mock, A. Golks, J. C. Hoffmann, S. Baumann, and P. H. Krammer.** 2008. CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *J Biol Chem* **283**:26401-8.
237. **Lebre, M. C., A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong.** 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* **127**:331-41.
238. **Lee, K. H., C. Feig, V. Tchikov, R. Schickel, C. Hallas, S. Schutze, M. E. Peter, and A. C. Chan.** 2006. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* **25**:1009-23.
239. **Lee, N. K., and S. Y. Lee.** 2002. Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *J Biochem Mol Biol* **35**:61-6.
240. **Lee, S. B., R. Bablanian, and M. Esteban.** 1996. Regulated expression of the interferon-induced protein kinase p68 (PKR) by vaccinia virus recombinants inhibits the replication of vesicular stomatitis virus but not that of poliovirus. *J Interferon Cytokine Res* **16**:1073-8.
241. **Lee, S. B., Z. Melkova, W. Yan, B. R. Williams, A. G. Hovanessian, and M. Esteban.** 1993. The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology* **192**:380-5.
242. **Lee, S. B., D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, and M. Esteban.** 1997. The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology* **231**:81-8.
243. **Legler, D. F., O. Micheau, M. A. Doucey, J. Tschopp, and C. Bron.** 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* **18**:655-64.
244. **Lei, Y., C. B. Moore, R. M. Liesman, B. P. O'Connor, D. T. Bergstralh, Z. J. Chen, R. J. Pickles, and J. P. Ting.** 2009. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One* **4**:e5466.

245. **Leib, D. A., M. A. Machalek, B. R. Williams, R. H. Silverman, and H. W. Virgin.** 2000. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6097-101.
246. **Lembo, D., and W. Brune.** 2009. Tinkering with a viral ribonucleotide reductase. *Trends Biochem Sci* **34**:25-32.
247. **Lembo, D., M. Donalisio, A. Hofer, M. Cornaglia, W. Brune, U. Koszinowski, L. Thelander, and S. Landolfo.** 2004. The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J Virol* **78**:4278-88.
248. **Lemmers, B., L. Salmena, N. Bidere, H. Su, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. S. Ohashi, A. Jurisicova, M. Lenardo, R. Hakem, and A. Hakem.** 2007. Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. *J Biol Chem* **282**:7416-23.
249. **Leonard, J. N., R. Ghirlando, J. Askins, J. K. Bell, D. H. Margulies, D. R. Davies, and D. M. Segal.** 2008. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:258-63.
250. **Leopardi, R., and B. Roizman.** 1996. The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9583-7.
251. **Leopardi, R., C. Van Sant, and B. Roizman.** 1997. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7891-6.
252. **Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, and S. J. Korsmeyer.** 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**:183-92.
253. **Li, H., M. Kobayashi, M. Blonska, Y. You, and X. Lin.** 2006. Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **281**:13636-43.
254. **Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan.** 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501.
255. **Li, H. M., D. Fujikura, T. Harada, J. Uehara, T. Kawai, S. Akira, J. C. Reed, A. Iwai, and T. Miyazaki.** 2009. IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by caspase-8 activation. *Cell Death Differ*.
256. **Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang.** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**:95-9.
257. **Liang, L., and B. Roizman.** 2006. Herpes simplex virus 1 precludes replenishment of the short-lived receptor of tumor necrosis factor alpha by virion host shutoff-dependent degradation of its mRNA. *J Virol* **80**:7756-9.
258. **Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, and Z. G. Liu.** 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**:2514-26.
259. **Liu, T., K. M. Khanna, X. Chen, D. J. Fink, and R. L. Hendricks.** 2000. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* **191**:1459-66.
260. **Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo.** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**:487-501.
261. **Lokensgard, J. R., S. Hu, W. Sheng, M. vanOijen, D. Cox, M. C. Cheeran, and P. K. Peterson.** 2001. Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and

- IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J Neurovirol* **7**:208-19.
262. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.
263. **Lundberg, P., P. V. Welander, C. K. Edwards, 3rd, N. van Rooijen, and E. Cantin.** 2007. Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol* **81**:1451-60.
264. **Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang.** 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**:481-90.
265. **Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune.** 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3094-9.
266. **Mahrus, S., J. C. Trinidad, D. T. Barkan, A. Sali, A. L. Burlingame, and J. A. Wells.** 2008. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell* **134**:866-76.
267. **Manche, L., S. R. Green, C. Schmedt, and M. B. Mathews.** 1992. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* **12**:5238-48.
268. **Margolis, T. P., F. L. Elfman, D. Leib, N. Pakpour, K. Apakupakul, Y. Imai, and C. Voytek.** 2007. Spontaneous reactivation of herpes simplex virus type 1 in latently infected murine sensory ganglia. *J Virol* **81**:11069-74.
269. **Massie, B., F. Couture, L. Lamoureux, D. D. Mosser, C. Guilbault, P. Jolicoeur, F. Belanger, and Y. Langelier.** 1998. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* **72**:2289-96.
270. **Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya.** 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**:3154-62.
271. **Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya.** 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **293**:1364-9.
272. **McAllister, C. S., and C. E. Samuel.** 2009. The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J Biol Chem* **284**:1644-51.
273. **McCormick, A. L., A. Skaletskaya, P. A. Barry, E. S. Mocarski, and V. S. Goldmacher.** 2003. Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology* **316**:221-33.
274. **McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**:90-104.
275. **McKimmie, C. S., N. Johnson, A. R. Fooks, and J. K. Fazakerley.** 2005. Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:925-33.
276. **Medici, M. A., M. T. Sciortino, D. Perri, C. Amici, E. Avitabile, M. Ciotti, E. Balestrieri, E. De Smaele, G. Franzoso, and A. Mastino.** 2003. Protection by

- herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* **278**:36059-67.
277. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**:222-34.
278. **Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, N. S. Thomas, I. M. Kerr, B. R. Williams, and A. G. Hovanessian.** 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**:379-90.
279. **Meurs, E. F., J. Galabru, G. N. Barber, M. G. Katze, and A. G. Hovanessian.** 1993. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:232-6.
280. **Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp.** 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**:503-7.
281. **Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp.** 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167-72.
282. **Michallet, M. C., E. Meylan, M. A. Ermolaeva, J. Vazquez, M. Rebsamen, J. Curran, H. Poeck, M. Bscheider, G. Hartmann, M. Konig, U. Kalinke, M. Pasparakis, and J. Tschopp.** 2008. TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**:651-61.
283. **Micheau, O., and J. Tschopp.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**:181-90.
284. **Mielke, K., and T. Herdegen.** 2002. Fatal shift of signal transduction is an integral part of neuronal differentiation: JNKs realize TNFalpha-mediated apoptosis in neuronlike, but not naive, PC12 cells. *Mol Cell Neurosci* **20**:211-24.
285. **Mikloska, Z., V. A. Danis, S. Adams, A. R. Lloyd, D. L. Adrian, and A. L. Cunningham.** 1998. In vivo production of cytokines and beta (C-C) chemokines in human recurrent herpes simplex lesions--do herpes simplex virus-infected keratinocytes contribute to their production? *J Infect Dis* **177**:827-38.
286. **Milne, R. S., A. V. Nicola, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **79**:6655-63.
287. **Minami, M., M. Kita, X. Q. Yan, T. Yamamoto, T. Iida, K. Sekikawa, Y. Iwakura, and J. Imanishi.** 2002. Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection. *J Interferon Cytokine Res* **22**:671-6.
288. **Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, A. Aggarwal, B. Tijono, F. J. Rixon, R. J. Diefenbach, and A. L. Cunningham.** 2009. Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons. *J Virol* **83**:3187-99.
289. **Morgan, M. J., Y. S. Kim, and Z. G. Liu.** 2009. Membrane-Bound Fas Ligand Requires RIP1 for Efficient Activation of Caspase-8 within the Death-Inducing Signaling Complex. *J Immunol*.
290. **Mulvey, M., V. Camarena, and I. Mohr.** 2004. Full resistance of herpes simplex virus type 1-infected primary human cells to alpha interferon requires both the Us11 and gamma(1)34.5 gene products. *J Virol* **78**:10193-6.
291. **Munger, J., and B. Roizman.** 2001. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-

- induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10410-5.
292. **Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**:5998-6004.
 293. **Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit.** 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**:2926-30.
 294. **Nallagatla, S. R., J. Hwang, R. Toroney, X. Zheng, C. E. Cameron, and P. C. Bevilacqua.** 2007. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* **318**:1455-8.
 295. **Nash, A. A.** 2000. T cells and the regulation of herpes simplex virus latency and reactivation. *J Exp Med* **191**:1455-8.
 296. **Neznanov, N., K. P. Chumakov, A. Ullrich, V. I. Agol, and A. V. Gudkov.** 2002. Unstable receptors disappear from cell surface during poliovirus infection. *Med Sci Monit* **8**:BR391-6.
 297. **Nicola, A. V., and S. E. Straus.** 2004. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol* **78**:7508-17.
 298. **Niimi, K., K. Asano, Y. Shiraishi, T. Nakajima, M. Wakaki, J. Kagyo, T. Takihara, Y. Suzuki, K. Fukunaga, T. Shiomi, T. Oguma, K. Sayama, K. Yamaguchi, Y. Natori, M. Matsumoto, T. Seya, M. Yamaya, and A. Ishizaka.** 2007. TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol* **178**:489-95.
 299. **Nikas, I., J. McLauchlan, A. J. Davison, W. R. Taylor, and J. B. Clements.** 1986. Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins* **1**:376-84.
 300. **Nishiyama, Y.** 2004. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Med Virol* **14**:33-46.
 301. **Nordlund, P., and P. Reichard.** 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**:681-706.
 302. **Nordlund, P., B. M. Sjoberg, and H. Eklund.** 1990. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* **345**:593-8.
 303. **Oganesyan, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng.** 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**:208-11.
 304. **Ogg, P. D., P. J. McDonell, B. J. Ryckman, C. M. Knudson, and R. J. Roller.** 2004. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* **319**:212-24.
 305. **Ogle, W. O., and B. Roizman.** 1999. Functional anatomy of herpes simplex virus 1 overlapping genes encoding infected-cell protein 22 and US1.5 protein. *J Virol* **73**:4305-15.
 306. **Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito.** 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**:667-76.
 307. **Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya.** 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**:161-7.

308. **Ozaki, N., Y. Sugiura, M. Yamamoto, S. Yokoya, A. Wanaka, and Y. Nishiyama.** 1997. Apoptosis induced in the spinal cord and dorsal root ganglion by infection of herpes simplex virus type 2 in the mouse. *Neurosci Lett* **228**:99-102.
309. **Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer, and D. B. Donner.** 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**:82-5.
310. **Paladino, P., and K. L. Mossman.** 2009. Mechanisms Employed by HSV-1 to Inhibit the Interferon Response. *J Interferon Cytokine Res.*
311. **Panka, D. J., T. Mano, T. Suhara, K. Walsh, and J. W. Mier.** 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* **276**:6893-6.
312. **Patrone, M., E. Percivalle, M. Secchi, L. Fiorina, G. Pedrali-Noy, M. Zoppe, F. Baldanti, G. Hahn, U. H. Koszinowski, G. Milanesi, and A. Gallina.** 2003. The human cytomegalovirus UL45 gene product is a late, virion-associated protein and influences virus growth at low multiplicities of infection. *J Gen Virol* **84**:3359-70.
313. **Peltier, D. C., A. Simms, J. R. Farmer, and D. J. Miller.** 2010. Human neuronal cells possess functional cytoplasmic and TLR-mediated innate immune pathways influenced by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *J Immunol* **184**:7010-21.
314. **Perelygina, L., L. Zhu, H. Zurkühlen, R. Mills, M. Borodovsky, and J. K. Hilliard.** 2003. Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) from a rhesus monkey. *J Virol* **77**:6167-77.
315. **Perkins, D., K. A. Gyure, E. F. Pereira, and L. Aurelian.** 2003. Herpes simplex virus type 1-induced encephalitis has an apoptotic component associated with activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Neurovirol* **9**:101-11.
316. **Perkins, D., E. F. Pereira, and L. Aurelian.** 2003. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) functions as a dominant regulator of apoptosis in hippocampal neurons involving activation of the ERK survival pathway and upregulation of the antiapoptotic protein Bag-1. *J Virol* **77**:1292-305.
317. **Perkins, D., E. F. Pereira, M. Gober, P. J. Yarowsky, and L. Aurelian.** 2002. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J Virol* **76**:1435-49.
318. **Perkins, D., Y. Yu, L. L. Bambrick, P. J. Yarowsky, and L. Aurelian.** 2002. Expression of herpes simplex virus type 2 protein ICP10 PK rescues neurons from apoptosis due to serum deprivation or genetic defects. *Exp Neurol* **174**:118-22.
319. **Pesola, J. M., J. Zhu, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2005. Herpes simplex virus 1 immediate-early and early gene expression during reactivation from latency under conditions that prevent infectious virus production. *J Virol* **79**:14516-25.
320. **Peter, M. E., R. C. Budd, J. Desbarats, S. M. Hedrick, A. O. Hueber, M. K. Newell, L. B. Owen, R. M. Pope, J. Tschopp, H. Wajant, D. Wallach, R. H. Wiltrott, M. Zornig, and D. H. Lynch.** 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* **129**:447-50.
321. **Peter, M. E., and P. H. Kramer.** 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**:26-35.
322. **Peters, G. A., D. Khoo, I. Mohr, and G. C. Sen.** 2002. Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* **76**:11054-64.

323. **Petryshyn, R., J. J. Chen, and I. M. London.** 1984. Growth-related expression of a double-stranded RNA-dependent protein kinase in 3T3 cells. *J Biol Chem* **259**:14736-42.
324. **Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa.** 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**:997-1001.
325. **Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo, and E. S. C. Reis.** 2009. Activation of MDA5 requires higher order RNA structures generated during virus infection. *J Virol*.
326. **Pobezinskaya, Y. L., Y. S. Kim, S. Choksi, M. J. Morgan, T. Li, C. Liu, and Z. Liu.** 2008. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat Immunol* **9**:1047-54.
327. **Pop, C., P. Fitzgerald, D. R. Green, and G. S. Salvesen.** 2007. Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry* **46**:4398-407.
328. **Pop, C., and G. S. Salvesen.** 2009. Human caspases: Activation, specificity and regulation. *J Biol Chem*.
329. **Poppers, J., M. Mulvey, D. Khoo, and I. Mohr.** 2000. Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* **74**:11215-21.
330. **Posavad, C. M., M. L. Huang, S. Barcy, D. M. Koelle, and L. Corey.** 2000. Long term persistence of herpes simplex virus-specific CD8⁺ CTL in persons with frequently recurring genital herpes. *J Immunol* **165**:1146-52.
331. **Prehaud, C., F. Megret, M. Lafage, and M. Lafon.** 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**:12893-904.
332. **Pucci, B., M. Indelicato, V. Paradisi, V. Reali, L. Pellegrini, M. Aventaggiato, N. O. Karpnich, M. Fini, M. A. Russo, J. L. Farber, and M. Tafani.** 2009. ERK-1 MAP kinase prevents TNF-induced apoptosis through bad phosphorylation and inhibition of Bax translocation in HeLa Cells. *J Cell Biochem* **108**:1166-74.
333. **Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb.** 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**:3100-12.
334. **Rasmussen, S. B., S. B. Jensen, C. Nielsen, E. Quartin, H. Kato, Z. J. Chen, R. H. Silverman, S. Akira, and S. R. Paludan.** 2009. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* **90**:74-8.
335. **Rasmussen, S. B., L. N. Sorensen, L. Malmgaard, N. Ank, J. D. Baines, Z. J. Chen, and S. R. Paludan.** 2007. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol* **81**:13315-24.
336. **Raven, J. F., D. Baltzis, S. Wang, Z. Mounir, A. I. Papadakis, H. Q. Gao, and A. E. Koromilas.** 2008. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* **283**:3097-108.
337. **Raven, J. F., and A. E. Koromilas.** 2008. PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* **7**:1146-50.
338. **Reichard, P.** 1988. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**:349-74.

339. **Rey, F. A.** 2006. Molecular gymnastics at the herpesvirus surface. *EMBO Rep* **7**:1000-5.
340. **Roizman, B., H. Gu, and G. Mandel.** 2005. The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle* **4**:1019-21.
341. **Roizman, B., D. M. Knipe, and R. J. Whitley.** 2007. Herpes simplex viruses. In : Knipe, D.M., Howley, P (Eds), *Fields Virology*, 5th edition Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.:2501-2601.
342. **Rothenfusser, S., N. Goutagny, G. DiPerna, M. Gong, B. G. Monks, A. Schoenemeyer, M. Yamamoto, S. Akira, and K. A. Fitzgerald.** 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**:5260-8.
343. **Roulston, A., R. C. Marcellus, and P. E. Branton.** 1999. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* **53**:577-628.
344. **Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, R. Haase, A. Sing, H. Weighardt, G. Hacker, B. Holzmann, and J. Heesemann.** 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* **173**:3320-8.
345. **Saffran, H. A., G. S. Read, and J. R. Smiley.** 2010. Evidence for translational regulation by the herpes simplex virus virion host shutoff protein. *J Virol* **84**:6041-9.
346. **Saha, S. K., E. M. Pietras, J. Q. He, J. R. Kang, S. Y. Liu, G. Oganessian, A. Shahangian, B. Zarnegar, T. L. Shiba, Y. Wang, and G. Cheng.** 2006. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**:3257-63.
347. **Saito, K., K. Meyer, R. Warner, A. Basu, R. B. Ray, and R. Ray.** 2006. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* **80**:4372-9.
348. **Saito, T., and M. Gale, Jr.** 2008. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J Exp Med* **205**:1523-7.
349. **Salaun, B., I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque, and T. Renno.** 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* **176**:4894-901.
350. **Samaniego, L. A., L. Neiderhiser, and N. A. DeLuca.** 1998. Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J Virol* **72**:3307-20.
351. **Sandu, C., G. Morisawa, I. Wegorzewska, T. Huang, A. F. Arechiga, J. M. Hill, T. Kim, C. M. Walsh, and M. H. Werner.** 2006. FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ.*
352. **Sanfilippo, C. M., and J. A. Blaho.** 2006. ICP0 Gene Expression Is a Herpes Simplex Virus Type 1 Apoptotic Trigger. *J Virol* **80**:6810-21.
353. **Sanfilippo, C. M., F. N. Chirimuuta, and J. A. Blaho.** 2004. Herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression is required for the induction of apoptosis in human epithelial HEp-2 cells. *J Virol* **78**:224-39.
354. **Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya.** 2005. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* **174**:27-30.
355. **Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi.** 2000. Distinct

- and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**:539-48.
356. **Sato, S., H. Sanjo, K. Takeda, J. Ninomiya-Tsuji, M. Yamamoto, T. Kawai, K. Matsumoto, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**:1087-95.
357. **Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**:4304-10.
358. **Savill, J., and V. Fadok.** 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**:784-8.
359. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**:1675-87.
360. **Scheuner, D., R. Patel, F. Wang, K. Lee, K. Kumar, J. Wu, A. Nilsson, M. Karin, and R. J. Kaufman.** 2006. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **281**:21458-68.
361. **Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez, and H. Steller.** 2008. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev* **22**:2256-66.
362. **Scott, F. L., B. Stec, C. Pop, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher, and S. J. Riedl.** 2009. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* **457**:1019-22.
363. **Sergerie, Y., S. Rivest, and G. Boivin.** 2007. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* **196**:853-60.
364. **Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen.** 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**:669-82.
365. **Shen, W., M. Sa e Silva, T. Jaber, O. Vitvitskaia, S. Li, G. Henderson, and C. Jones.** 2009. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol* **83**:9131-9.
366. **Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, and S. Ghosh.** 2005. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* **19**:2668-81.
367. **Shimeld, C., J. L. Whiteland, N. A. Williams, D. L. Easty, and T. J. Hill.** 1997. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78 (Pt 12)**:3317-25.
368. **Shimeld, C., J. L. Whiteland, N. A. Williams, D. L. Easty, and T. J. Hill.** 1996. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in the mouse trigeminal ganglion: an in vivo study of virus antigen and immune cell infiltration. *J Gen Virol* **77 (Pt 10)**:2583-90.
369. **Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, D. A. Zacharias, F. K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R. Y. Tsien, and M. J. Lenardo.** 2000. Fas preassociation required for

- apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**:2354-7.
370. **Siegel, R. M., J. R. Muppidi, M. Sarker, A. Lobito, M. Jen, D. Martin, S. E. Straus, and M. J. Lenardo.** 2004. SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* **167**:735-44.
371. **Skaletskaya, A., L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McCormick, E. S. Mocarski, and V. S. Goldmacher.** 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7829-34.
372. **Smibert, C. A., B. Popova, P. Xiao, J. P. Capone, and J. R. Smiley.** 1994. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol* **68**:2339-46.
373. **Smith, C. C., and L. Aurelian.** 1997. The large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is associated with the virion tegument and has PK activity. *Virology* **234**:235-42.
374. **Smith, C. C., J. Nelson, L. Aurelian, M. Gober, and B. B. Goswami.** 2000. Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *J Virol* **74**:10417-29.
375. **Smith, R. W., P. Malik, and J. B. Clements.** 2005. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. *Biochem Soc Trans* **33**:499-501.
376. **Soeda, S., T. Ochiai, L. Paopong, H. Tanaka, Y. Shoyama, and H. Shimeno.** 2001. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* **69**:2887-98.
377. **Soliman, T. M., R. M. Sandri-Goldin, and S. J. Silverstein.** 1997. Shuttling of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 between the nucleus and cytoplasm mediates the expression of late proteins. *J Virol* **71**:9188-97.
378. **Srivastava, S. P., K. U. Kumar, and R. J. Kaufman.** 1998. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**:2416-23.
379. **Stevens, J. G., E. K. Wagner, G. B. Devi-Rao, M. L. Cook, and L. T. Feldman.** 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**:1056-9.
380. **Stiles, K. M., R. S. Milne, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and C. Krummenacher.** 2008. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after trans-interaction with glycoprotein D. *Virology* **373**:98-111.
381. **Stojdl, D. F., N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B. D. Lichty, E. G. Brown, N. Sonenberg, and J. C. Bell.** 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* **74**:9580-5.
382. **Su, H., N. Bidere, L. Zheng, A. Cubre, K. Sakai, J. Dale, L. Salmena, R. Hakem, S. Straus, and M. Lenardo.** 2005. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* **307**:1465-8.
383. **Sun, X., J. Yin, M. A. Starovasnik, W. J. Fairbrother, and V. M. Dixit.** 2002. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem* **277**:9505-11.

384. **Sun, Y., and J. Conner.** 1999. The U28 ORF of human herpesvirus-7 does not encode a functional ribonucleotide reductase R1 subunit. *J Gen Virol* **80** (Pt 10):2713-8.
385. **Sun, Y., and D. W. Leaman.** 2005. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem* **280**:15561-8.
386. **Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**:441-6.
387. **Swain, M. A., and D. A. Galloway.** 1986. Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminal transcripts. *J Virol* **57**:802-8.
388. **Symons, A., S. Beinke, and S. C. Ley.** 2006. MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* **27**:40-8.
389. **Sze, P., and R. C. Herman.** 1992. The herpes simplex virus type 1 ICP6 gene is regulated by a 'leaky' early promoter. *Virus Res* **26**:141-52.
390. **Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3516-21.
391. **Taddeo, B., W. Zhang, and B. Roizman.** 2009. The virion-packaged endoribonuclease of herpes simplex virus 1 cleaves mRNA in polyribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:12139-44.
392. **Takahashi, K., T. Kawai, H. Kumar, S. Sato, S. Yonehara, and S. Akira.** 2006. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* **176**:4520-4.
393. **Takahasi, K., M. Yoneyama, T. Nishihori, R. Hirai, H. Kumeta, R. Narita, M. Gale, Jr., F. Inagaki, and T. Fujita.** 2008. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* **29**:428-40.
394. **Tang, G., Y. Minemoto, B. Dibling, N. H. Purcell, Z. Li, M. Karin, and A. Lin.** 2001. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**:313-7.
395. **Theil, D., T. Derfuss, I. Paripovic, S. Herberger, E. Meinel, O. Schueler, M. Strupp, V. Arbusow, and T. Brandt.** 2003. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* **163**:2179-84.
396. **Thompson, C. B.** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-62.
397. **Timmer, J. C., and G. S. Salvesen.** 2007. Caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**:66-72.
398. **Tohyama, M., X. Dai, K. Sayama, K. Yamasaki, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, S. Tokumaru, Y. Yahata, L. Yang, H. Nagai, A. Takashima, and K. Hashimoto.** 2005. dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **335**:505-11.
399. **Tyler, S. D., G. A. Peters, and A. Severini.** 2005. Complete genome sequence of cercopithecine herpesvirus 2 (SA8) and comparison with other simplexviruses. *Virology* **331**:429-40.

400. **Tyler, S. D., and A. Severini.** 2006. The complete genome sequence of herpesvirus papio 2 (Cercopithecine herpesvirus 16) shows evidence of recombination events among various progenitor herpesviruses. *J Virol* **80**:1214-21.
401. **Uhlin, U., and H. Eklund.** 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* **370**:533-9.
402. **Umbach, J. L., M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen.** 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**:780-3.
403. **Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski.** 2008. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J Biol Chem* **283**:16966-70.
404. **Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski.** 2010. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* **7**:302-13.
405. **Valyi-Nagy, T., S. Deshmane, A. Dillner, and N. W. Fraser.** 1991. Induction of cellular transcription factors in trigeminal ganglia of mice by corneal scarification, herpes simplex virus type 1 infection, and explantation of trigeminal ganglia. *J Virol* **65**:4142-52.
406. **Van Damme, P., L. Martens, J. Van Damme, K. Hugelier, A. Staes, J. Vandekerckhove, and K. Gevaert.** 2005. Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat Methods* **2**:771-7.
407. **van Lint, A. L., L. Kleinert, S. R. Clarke, A. Stock, W. R. Heath, and F. R. Carbone.** 2005. Latent infection with herpes simplex virus is associated with ongoing CD8+ T-cell stimulation by parenchymal cells within sensory ganglia. *J Virol* **79**:14843-51.
408. **Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit, and D. Vucic.** 2007. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**:669-81.
409. **Varfolomeev, E., T. Goncharov, A. V. Fedorova, J. N. Dynek, K. Zobel, K. Deshayes, W. J. Fairbrother, and D. Vucic.** 2008. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **283**:24295-9.
410. **Varfolomeev, E., and D. Vucic.** 2008. (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell Cycle* **7**:1511-21.
411. **Varfolomeev, E. E., and A. Ashkenazi.** 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**:491-7.
412. **Venkataraman, T., M. Valdes, R. Elsby, S. Kakuta, G. Caceres, S. Saijo, Y. Iwakura, and G. N. Barber.** 2007. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* **178**:6444-55.
413. **Vercammen, E., J. Staal, and R. Beyaert.** 2008. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* **21**:13-25.
414. **Vilela, M. C., G. K. Lima, D. H. Rodrigues, N. Lacerda-Queiroz, D. S. Mansur, A. S. de Miranda, M. A. Rachid, E. G. Kroon, L. Q. Vieira, M. A. Campos, M. M. Teixeira, and A. L. Teixeira.** 2010. TNFR1 plays a critical role in the control of severe HSV-1 encephalitis. *Neurosci Lett* **479**:58-62.
415. **Vince, J. E., W. W. Wong, N. Khan, R. Feltham, D. Chau, A. U. Ahmed, C. A. Benetatos, S. K. Chundururu, S. M. Condon, M. McKinlay, R. Brink, M. Leverkus, V. Tergaonkar, P. Schneider, B. A. Callus, F. Koentgen, D. L. Vaux,**

- and J. Silke.** 2007. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. *Cell* **131**:682-93.
416. **Visintin, A., A. Mazzone, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal.** 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **166**:249-55.
417. **Wagner, E. K., J. F. Guzowski, and J. Singh.** 1995. Transcription of the herpes simplex virus genome during productive and latent infection. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **51**:123-65.
418. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich.** 2003. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:53-66.
419. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**:45-65.
420. **Wales, S. Q., B. Li, J. M. Laing, and L. Aurelian.** 2007. The herpes simplex virus type 2 gene ICP10PK protects from apoptosis caused by nerve growth factor deprivation through inhibition of caspase-3 activation and XIAP up-regulation. *J Neurochem* **103**:365-79.
421. **Walsh, D., and I. Mohr.** 2006. Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes Dev* **20**:461-72.
422. **Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin, Jr.** 1998. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**:1680-3.
423. **Wang, L., F. Du, and X. Wang.** 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* **133**:693-703.
424. **Wang, Q. Y., C. Zhou, K. E. Johnson, R. C. Colgrove, D. M. Coen, and D. M. Knipe.** 2005. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16055-9.
425. **Weber, A., Z. Kirejczyk, R. Besch, S. Potthoff, M. Leverkus, and G. Hacker.** 2009. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell Death Differ*.
426. **Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan.** 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**:5059-64.
427. **Whitley, R. J., and B. Roizman.** 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**:1513-8.
428. **Willoughby, K., M. Bennett, R. A. Williams, C. McCracken, and R. M. Gaskell.** 1997. Sequences of the ribonucleotide reductase-encoding genes of felid herpesvirus 1 and molecular phylogenetic analysis. *Virus Genes* **15**:203-18.
429. **Wilson, A. C., K. LaMarco, M. G. Peterson, and W. Herr.** 1993. The VP16 accessory protein HCF is a family of polypeptides processed from a large precursor protein. *Cell* **74**:115-25.
430. **Wolter, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi, and R. J. Youle.** 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**:1281-92.
431. **Wong, G. H., L. A. Tartaglia, M. S. Lee, and D. V. Goeddel.** 1992. Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor [corrected]. *J Immunol* **149**:3350-3.

432. **Wymer, J. P., C. M. Aprhys, T. D. Chung, C. P. Feng, M. Kulka, and L. Aurelian.** 1992. Immediate early and functional AP-1 cis-response elements are involved in the transcriptional regulation of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Virus Res* **23**:253-70.
433. **Wymer, J. P., T. D. Chung, Y. N. Chang, G. S. Hayward, and L. Aurelian.** 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**:2773-84.
434. **Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai, and H. B. Shu.** 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**:727-40.
435. **Yamada, Y., H. Kimura, T. Morishima, T. Daikoku, K. Maeno, and Y. Nishiyama.** 1991. The pathogenicity of ribonucleotide reductase-null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Infect Dis* **164**:1091-7.
436. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-3.
437. **Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita.** 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**:2851-8.
438. **Yoshida, R., G. Takaesu, H. Yoshida, F. Okamoto, T. Yoshioka, Y. Choi, S. Akira, T. Kawai, A. Yoshimura, and T. Kobayashi.** 2008. TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem* **283**:36211-20.
439. **Youle, R. J., and A. Strasser.** 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:47-59.
440. **Yu, J. W., and Y. Shi.** 2008. FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* **27**:6216-27.
441. **Zachos, G., M. Koffa, C. M. Preston, J. B. Clements, and J. Conner.** 2001. Herpes simplex virus type 1 blocks the apoptotic host cell defense mechanisms that target Bcl-2 and manipulates activation of p38 mitogen-activated protein kinase to improve viral replication. *J Virol* **75**:2710-28.
442. **Zamanian-Daryoush, M., T. H. Mogensen, J. A. DiDonato, and B. R. Williams.** 2000. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* **20**:1278-90.
443. **Zarubin, T., and J. Han.** 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**:11-8.
444. **Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer.** 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**:619-28.
445. **Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong, and J. Han.** 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* **325**:332-6.
446. **Zhang, P., J. O. Langland, B. L. Jacobs, and C. E. Samuel.** 2009. Protein kinase PKR-dependent activation of mitogen-activated protein kinases occurs through

- mitochondrial adapter IPS-1 and is antagonized by vaccinia virus E3L. *J Virol* **83**:5718-25.
447. **Zhang, S. Y., E. Jouanguy, V. Sancho-Shimizu, H. von Bernuth, K. Yang, L. Abel, C. Picard, A. Puel, and J. L. Casanova.** 2007. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev* **220**:225-36.
448. **Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chappier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cogne, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Heron, L. Vallee, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova.** 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**:1522-7.
449. **Zheng, X., and P. C. Bevilacqua.** 2004. Activation of the protein kinase PKR by short double-stranded RNAs with single-stranded tails. *RNA* **10**:1934-45.
450. **Zhou, G., V. Galvan, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 2000. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol* **74**:11782-91.
451. **Zhou, G., and B. Roizman.** 2001. The domains of glycoprotein D required to block apoptosis depend on whether glycoprotein D is present in the virions carrying herpes simplex virus 1 genome lacking the gene encoding the glycoprotein. *J Virol* **75**:6166-72.
452. **Zhu, J., D. M. Koelle, J. Cao, J. Vazquez, M. L. Huang, F. Hladik, A. Wald, and L. Corey.** 2007. Virus-specific CD8⁺ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med* **204**:595-603.

