

Université de Montréal

Étude des fonctions anti-apoptotique et de chaperon moléculaire de la sous-unité R1
de la ribonucléotide réductase du virus de l'herpès simplex de type-2

par

Stéphane Chabaud

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Juin, 2004

Copyright, Stéphane Chabaud, 2004



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des fonctions anti-apoptotique et de chaperon moléculaire de la sous-unité R1
de la ribonucléotide réductase du virus de l'herpès simplex de type-2

Présentée par :

Stéphane Chabaud

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Edward Bradley
Président-rapporteur

Yves Langelier
Directeur de recherche

Marie-Josée Hébert
Membre du jury

Louis Flamand
Examineur externe

Pierrette Gaudreau
Représentant du doyen de la FES

Résumé en français (561 mots)

Les virus de l'herpès simplex (HSV) établissent une phase de latence dans les neurones où ils peuvent être réactivés par des stimuli pro-apoptotiques. Ils infectent ensuite les tissus épithéliaux où ils modulent la réponse immunitaire de l'hôte. La ribonucléotide réductase (RR), constituée de 2 sous-unités (R1 et R2), est essentielle à la réactivation du virus dans les neurones qui n'expriment pas leur propre RR. HSV R1 possède une extension NH₂ unique de 400 acides aminés (a.a.) et une cinétique d'expression plus précoce que celle de R2. Le caractère pro-apoptotique du mutant R1(Δ 2-357) a permis de découvrir le potentiel anti-apoptotique de R1 contre cette protéine tronquée mais aussi contre les cytokines TNF et FasL. Mon projet étudie principalement ce potentiel mais aussi une activité de chaperon moléculaire découverte au cours de mon stage.

Nous avons démontré que le potentiel anti-apoptotique de R1, qui ne nécessite aucune autre protéine virale, est spécifique de la voie des récepteurs de mort cellulaire et agit en amont ou au niveau de l'activation de la procaspase-8. Au cours d'une infection herpétique, la protection contre la mort cellulaire induit par le TNF corrèle avec la cinétique d'expression de R1. L'utilisation d'un mutant viral délété pour R1 (ICP6 Δ) a permis d'établir que R1 contribue de façon importante à la protection contre le TNF des cellules infectées (perte de 50% de la protection contre le TNF avec ICP6 Δ).

Pour étudier cette fonction nous avons voulu délimiter le domaine anti-apoptotique, afin de générer un virus mutant déficient pour cette seule fonction. Une série de mutants de délétions de R1 indique que la région 357-1124 est suffisante et nécessaire pour assurer la protection contre la mort induite par le TNF. De plus, nous avons identifié que le domaine de liaison de R2 sur R1 était dispensable pour la protection contre la mort cellulaire induite par le TNF. Grâce à ces données et des comparaisons de séquences avec CMV R1, qui encode une RR non fonctionnelle mais possède un potentiel anti-apoptotique, des mutations ciblées pourront être introduites dans R1 pour générer un virus déficient uniquement pour la fonction anti-apoptotique de R1.

Les premières études sur le mécanisme d'action de R1 montrent que son expression n'a pas d'effet sur les protéines du complexe de signalisation induisant la mort (DISC), ni sur l'exportation à la membrane des récepteurs de la mort.

Des homologies de séquences avec les domaines α -cristallin (α CD) des petites protéines de choc thermique (sHsp) entre les a.a. 300 et 400 de R1 a permis de mettre en évidence des propriétés communes entre R1 et les sHsp. Notamment R1 peut former spontanément des structures oligomériques. Comme Hsp27, R1 démontre une activité de chaperon moléculaire *in vitro*, à l'opposé de son homologue humain dépourvu de α CD (et qui ne protège pas contre l'apoptose). Le rôle de cette activité au cours de l'infection pourrait être soit de protéger les protéines virales du choc thermique relié à la fièvre (ICP6 Δ se réplique moins bien à 39.5 °C qu'à 37 °C) soit de suppléer aux chaperons cellulaires pour permettre une synthèse plus abondante de protéines virales. La contribution du α CD de R1 dans l'apoptose est malaisée à évaluer : les délétions que nous y avons introduites rendent la protéine insoluble, suggérant que ce domaine joue un rôle important dans le repliement de la protéine. Ces travaux permettront une meilleure compréhension du contrôle de l'apoptose par les HSV.

Mots clés : Virus de l'herpès simplex, HSV, R1, ribonucléotide réductase, apoptose, TNF, chaperon moléculaire.

Abstract in english (410 words)

Herpes simplex viruses (HSV) establish latency in neurons where they could be reactivated by pro-apoptotic stimuli. Subsequently, they infect epithelial tissues where they modulate the host immune response. The 2 subunits (R1 and R2) of ribonucleotide reductase (RR) are essential for HSV reactivation in neuronal cells, which lack such an enzyme. HSV R1 possesses a unique NH₂ extension of about 400 amino-acids (a.a.) and an earlier kinetic than its R2 partner. The strong cytotoxicity of R1(Δ 2-357) revealed the anti-apoptotic potential of R1 not only against this truncated protein but also versus TNF and FasL. This thesis studies this potential and the R1 chaperone activity discovered during this work.

We showed that the R1 anti-apoptotic potential, which does not require other viral proteins, is specific for death receptor apoptotic pathway and blocks apoptosis at, or upstream of, procaspase-8 activation. During HSV infection, protection apparition correlates with R1 expression kinetic. The decrease of protection when we used ICP6 Δ , a viral R1 defective mutant, indicates that R1 plays an important role in protection versus TNF in HSV infected cells.

Study of this function implies the generation of a viral mutant defective for this potential, so we have to delineate the anti-apoptotic domain. A deletion program indicates that the 357-1124 domain is required for protection. The R2 binding surface on R1 could be excluded from this region. These data and sequence comparison between HSV- and CMV-R1 (a RR defective but anti-apoptotic homolog) will allow to create targeted mutations.

Preliminary studies to define the R1 anti-apoptotic molecular mechanism show that neither DISC proteins expression, nor receptor localization, is affected by R1.

Sequence homologies between α -crystallin domain (α CD) from small heat shock protein (sHsp) and a.a. 300 to 400 from R1 lead us to investigate common properties of sHsp and R1. Notably, R1 spontaneously forms oligomeric structures. R1 has an *in vitro* chaperone activity similar to the one of Hsp27 unlike its mammalian homolog, which lacks α CD and anti-apoptotic function. During an HSV infection, this activity could be involved in protection of viral proteins from fever heat shock (ICP6 Δ replicate slowly at 39.5°C than it does at 37°C) or to help cellular chaperones to

control the quality of the large amount of viral proteins. Contribution of R1 α CD to apoptosis modulation remains unclear because mutations inside this domain give insoluble products. This latter observation implies an important role for α CD in R1 folding.

These works give information for a better understanding of HSV modulation of apoptosis.

Key words : Herpes Simplex Virus, HSV, R1, ribonucleotide reductase, apoptosis, TNF, chaperone

Table des matières :

Résumé en français / mots clés	iii
Abstract in english / key words	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Sigles et abréviations	xv
Dédicace	xix
Remerciements	xx
Avant propos	1
Chapitre I : Introduction	2
1.1 Les Virus Herpès	3
1.1.1 Description des virus humains	3
1.1.1.1 Caractéristiques et maladies associées	3
1.1.1.2 Les virus de l'herpès simplex (HSV)	5
1.1.2 Latence et réactivation des HSV	8
1.1.3 Nucléosides anti-HSV et leur efficacité	12
1.2 L'apoptose	13
1.2.1 Mécanismes généraux	14
1.2.2 La voie mitochondriale	15
1.2.3 La voie des récepteurs	16
1.2.3.1 Dualité de la signalisation apoptotique via les récepteurs	19
1.2.3.2 Signalisation anti-apoptotique	20
1.2.3.3 FLIP	21
1.2.3.4 Signalisation pro-apoptotique	23
1.2.4 Autres voies apoptotiques	26
1.2.5 L'apoptose au cours de l'infection virale	26
1.2.5.1 Protéines pro-apoptotiques	27

1.2.5.2	Protéines ou facteurs anti-apoptotiques	27
1.2.5.3	HSV et la modulation de l'apoptose	27
1.3	La RR	29
1.3.1	La RR de <i>E. Coli</i>	30
1.3.1.1	Éléments de structure de R1	32
1.3.1.2	Régulation allostérique	33
1.3.2	La RR des mammifères	33
1.3.2.1	Expression et stabilité des sous-unités	33
1.3.2.2	Modèle alternatif de régulation allostérique	34
1.3.3	Les RR des virus herpès	36
1.3.3.1	La RR des HSV	37
1.3.3.2	Cinétiques d'expression au cours de l'infection	38
1.3.3.3	Autres fonctions de la sous-unité R1	38
1.3.3.4	Études sur des peptides inhibiteurs de l'activité enzymatique de la RR des HSV	39
1.4	Activité de chaperon moléculaire	40
1.4.1	Les protéines de choc thermique (Hsp)	40
1.4.2	Les petites protéines de choc thermique (sHsp)	41
1.4.3	Activité de chaperon moléculaire et apoptose	43
1.5	Description du projet de recherche	44
1.6	Rappel des résultats obtenus	44B
Chapitre II : Résultats		45
2.1	Article 1	46

La sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex protège les cellules de l'apoptose au niveau ou en amont de l'activation de la caspase-8 (The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. Auteurs: Yves Langelier, Stéphane Bergeron, Stéphane Chabaud, Julie Lippens, Claire Guilbault, A. Marie Josée Sasseville, Stéphan Denis, Dick D. Mosser et Bernard

Massie.)

2.2 Article 2	93
<i>La sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex a une activité de chaperon moléculaire similaire à celle de Hsp27 (The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. Auteurs: Stéphane Chabaud, Herman Lambert, A. Marie Josée Sasseville, Hugo Lavoie, Claire Guilbault, Bernard Massie, Jacques Landry et Yves Langelier.)</i>	
2.3 Article 3	115
<i>Le domaine RR de la sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex est essentiel pour la fonction anti-apoptotique de R1 (The Ribonucleotide Reductase Domain of the R1 Subunit of Herpes Simplex Virus type-2 Ribonucleotide Reductase Is Essential for R1 Anti-apoptotic Function Auteurs: Stéphane Chabaud, Mehdi Seyyed Elahi, A. Marie-Josée Sasseville, Antoine Caron, Antonio Nanci, Claire Guilbault, Bernard Massie et Yves Langelier.)</i>	
2.4 Résultats supplémentaires	156
Chapitre III : Discussion générale	164
3.1 Caractérisation de l'activité anti-apoptotique de HSV R1	165
3.1.1 Spectre d'action du potentiel anti-apoptotique de HSV R1	165
3.1.2 Potentiel anti-apoptotique de HSV R1 au cours d'une infection virale	167
3.1.3 Domaines impliqués dans le potentiel anti-apoptotique de HSV R1	168
3.1.4 Mécanisme d'action de HSV R1 pour protéger les cellules de l'apoptose	171
3.1.5 L'énigme de HSV R1(Δ 2-357)	171

3.2 Caractérisation de l'activité de chaperon moléculaire de HSV R1	173
3.2.1 HSV R1 a des caractéristiques similaires aux sHsp	173
3.2.2 Le domaine « α -cristallin » de HSV R1 en est-il un ?	174
3.2.3 Relation entre l'activité de chaperon moléculaire de HSV R1 et son potentiel anti-apoptotique	175
3.2.4 Importance du domaine α -cristallin pour le bon repliement de HSV R1	176
3.3 Rôle de HSV R1 dans l'infection	177
3.3.1 Potentiel anti-apoptotique	178
3.3.1.1 Importance du TNF- α dans le contrôle de l'infection	178
3.3.1.2 Rôle et importance de la fonction de R1 par rapport aux autres protéines	179
3.3.2 Activité de chaperon moléculaire	182
3.3.2.1 Importance au cours de fièvres	182
3.3.2.2 Importance pour la synthèse de protéines virales	183
3.4 Investigations pour définir le rôle du potentiel anti-apoptotique de HSV R1 dans la pathogenèse virale	183
3.4.1 Construction d'un mutant anti- β -RR ⁺	184
3.4.2 Étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	185
3.4.3 potentiel de HSV R1 dans les neurones	185
3.5 Investigations pour définir le mécanisme	186
3.5.1 Partenaires cellulaires de HSV R1	186
3.5.2 Caractérisation génétique	187
3.6 Etude de l'activité de chaperon moléculaire <i>in vivo</i>	187
3.7 Conclusion de l'ouvrage	188
Références bibliographiques	190

Listes des tableaux

Chapitre I

Tableau I : Traitements anti-HSV	13
----------------------------------	----

Chapitre II (2.3)

Table I : Solubility of R1 and mutant R1s	148
---	-----

Listes des figures

Chapitre I

Figure 1 : Structure du virus de l'herpès simplex	7
Figure 2 : Cycle lytique des HSV	10
Figure 3 : Activation des voies anti-apoptotiques suite à la stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR-1 (p55)	17
Figure 4: Activation des voies pro-apoptotiques suite à la stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR-1 (p55)	18
Figure 5 : Schéma des mécanismes d'activation de la procaspase-8 et inhibition par FLIP	22
Figure 6 : Structure de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase de <i>E. coli</i>	31
Figure 7 : Alignement schématique des sous-unités R1 des HSV-1 et -2, la sous-unité de HCMV (pour laquelle une activité anti-apoptotique a été démontrée), la sous-unité humaine (sans activité anti-apoptotique) et la protéine chaperonne Hsp27	35

Chapitre II

2.1 Article 1

Figure 1 : Full-length R1 prevents apoptosis induced by TNF	77
Figure 2 : HSV-2 R1 does not impair cell death induced by agents acting via the mitochondrial pathway	78
Figure 3 : HSV-2 R1 impairs caspase-8 activation	79
Figure 4 : HSV infection protects A549-tTA cells against TNF-induced apoptosis	80
Figure 5 : The R1 mutant ICP6 Δ has a reduced anti-apoptotic potential against TNF	81

Figure 6 : The R1 mutant ICP6 Δ is defective in blocking TNF-induced caspase-8 activation	82
Figure 7 : The HSV-2 R1 N-terminal domain is not anti-apoptotic by itself	83
Figure s1 : Doxycycline decreases R1 accumulation and R1-protection against TNF	90
Figure s2 : Protection against TNF and Fas is independent of the tTA or rtTA proteins and of the presence of CHX	91
Figure s3 : Ad proteins are not involved in the anti-apoptotic action of HSV-2 R1	92
2.2 Article 2	
Figure 1 : HSV R1s exhibit similarity to the α -crystallin domain of sHsps	111
Figure 2 : Gel filtration chromatography shows that HSV-2 R1 forms hexameric structure	112
Figure 3 : HSV-2 R1 but not mammalian R1 suppresses the thermal aggregation of CS	113
Figure 4 : HuR1 does not protect against apoptosis	114
2.3 Article 3	
Figure 1 : Schematic representation and summary of the characterization of the truncated HSV-2 R1s	149
Figure 2 : Proapoptotic and antiapoptotic activities of N-terminal truncated HSV-2 R1	150
Figure 3 : Formation of aggregates by N-terminal truncated HSV-2 R1s	151
Figure 4 : Electron micrographs illustrating the appearance of protein aggregates	152

Figure 5 : <i>In vivo</i> dynamics of spherule formation following the co-expression of the full-length R1-GFP with R1(Δ 2-357) visualized by time-lapse photomicroscopy	153
Figure 6 : Characterization of C-terminal truncated and GFP fusion HSV-2 R1 proteins	154
Figure 7 : Lack of effect of HSV-2 R2 and the peptidomimetic inhibitor BILD1633 on the R1 antiapoptotic potential	155

2.4 Résultats supplémentaires

Figure 1 : Les niveaux d'expression des composants du DISC ne sont pas modifiés par HSV R1	159
Figure 2 : HSV R1 ne modifie pas le niveau d'activation de NF- κ B	160
Figure 3 : Les niveaux d'expression des kinases ASK-1 et Akt ne sont pas modifiés par HSV R1 ni le niveau d'activation de Akt	162

Listes des sigles et abréviations

ACV	Acyclovir
ADN	Acide desoxyribonucleique
AICD	Mort cellulaire induite par l'activation (des lymphocytes)
AIF	Facteur induisant l'apoptose
AIP-1	Protéine interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose
AKT	Protéine kinase B
ALV	Virus de la leucémie aviaire
ANT	Transporteur de nucléotide à adénine
Apaf-1	Facteur associé à l'apoptose
ARN	Acide ribonucleique
ASK-1	Kinase régulant les signaux de l'apoptose
Bag	Athanogène associé à Bcl-2
Bcl	Protéine associé au leucémie des cellules B
BH3	Domaine d'homologie avec Bcl-2
BIR	Répétition de IAP de baculovirus
c-	Cellulaire
CAD	Nucléase activée par les caspases
CARD	Domaine de recrutement des caspases
CHX	Cycloheximide
CMV	Cytomégalo virus (H: humain, M: murin)
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
DMEM	Milieu essentiel modifié de Dubelco
DR	Récepteur de mort
dXDP	Déoxy(<i>nucléoside</i> *) diphosphate
dXTP	Déoxy(<i>nucléoside</i> *) triphosphate
EBV	Virus d'Epstein Barr

EHV	Virus de l'herpès équin
ERK	Kinase régulée par des signaux extra-cellulaire (MAPK)
FADD	Protéine à DD associé à Fas
FasL	Ligand de Fas
FLICE	Enzyme de conversion de l'interleukine-1 β reliée à Fas
FLIP	Protéine inhibant FLICE
GCK	Kinase reliée au centre germinal
GCKR	Kinase reliée à GCK
GFP	Protéine fluorescente verte
HBLV	Virus de l'herpès lymphotrope B
HEK	Rein embryonnaire huamain
HHV	Virus herpès humain
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
Hsp	Protéine de choc thermique (sHsp pour petite Hsp)
HSV	Virus de l'herpès simplex
IAP	Protéine inhibant l'apoptose
ICAD	Inhibiteur de CAD
ICP	Protéine induite dans les cellules infectées
IFN	Interféron
I κ B	Inhibiteur deNF- κ B
IKK	Kinase de I κ B
JNK	Kinase de la partie n-terminal de Jun
KSHV	Virus de l'herpès relié au sarcome de Kaposi
LAT	Transcrit associé à la latence
MAPK	Protéine kinase activée par des facteurs mitogènes
MAPKK	Kinase des MAPK
MEK	Kinase de ERK
MOI	Multiplicité d'infection
NF- κ B	Facteur nucléaire κ B

NGF	Facteur de croissance neuronal
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
NIK	Kinase induisant NF- κ B
PARP	Polymérase des poly (ADP-Ribose)
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PHN	Neuralgie post-herpétique
PK	Protéine kinase (A, B, ...)
PT	Pore de perméabilité de transition
R1	Grande sous-unité de la ribonucléotide réductase
R2	Petite sous-unité de la ribonucléotide réductase
RAIDD	Protéine avec un DD homologue à ICH-1(caspase-2) associé à RIP
RIP	Protéine interagissant avec le récepteur
RR	Ribonucléotide réductase
RSK	Kinase de la protéine ribosomale S6
SAPK	Kinase de protéine activée par le stress
SDS	Dodécyl-sulfate de sodium
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience aquirse
SODD	Silenceur du DD
STS	Staurosporine
TAK	Kinase activée par le TGF- β
TGF- β	Facteur de croissance transformant
TIF	Facteur induisant la transcription
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs
TNFR	Récepteur du TNF
TRADD	Protéine avec un domaine de mort, reliée au TNFR
tTA	Transactivateur à la tetracycline
TRAF	Facteur associé au TNFR
TUNEL	Marquage terminal au dUTP des fins de césure
UL	Protéine des HSV codée sur le bras long du génome

US	Protéine des HSV codée sur le bras court du génome
v-	Viral
VDAC	Canal à anions dépendant du voltage
vhs	Protéine du virus éteignant l'expression des gènes de l'hôte
VP	Protéine virale
VZV	Virus de la varicelle et du zona
XDP	(<i>Nucléoside*</i>) diphosphate
XTP	(<i>Nucléoside*</i>) triphosphate
ZF	Doigt de zinc

* Nucléoside: G=guanosine, A=Adénosine, T=Thymidine, C=Cytosine, U=Uracyl

À ma tante Patricia

Remerciements

Je tiens tout d'abord évidemment à remercier mon directeur de recherche, le Dr Yves Langelier, qui a accepté que j'effectue mes travaux dans son laboratoire et m'a encadré pour la réalisation de ce projet de recherche.

Je tiens également à remercier particulièrement le Dr Marc Prentki pour le soutien qu'il m'a accordé au cours des derniers semestres passés au laboratoire et sans lequel il ne m'aurait pas été possible de terminer dans d'aussi bonnes conditions.

Je remercie les Drs Ted Bradley, Marie-Josée Hebert, Louis Flamand et Pierrette Gaudreau d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse

Mes remerciements vont aussi aux personnes du laboratoire du docteur Langelier qui ont contribué à rendre possible ces travaux par leur contribution directe ou leur soutien : Dre Anne Marie-Josée Sasseville ; Céline Ablasou, Sonia Chiasson, Stéphan Denis, Christine Gadoury, Geneviève St-Onge et Janie Trépanier.

Mes remerciements vont tout spécialement à Claire Guilbault qui a eu de nombreuses fois la patience et la gentillesse d'endurer le flot de mes questions techniques sur les dosages d'activité ribonucléotide réductase mais aussi à tous les membres du laboratoire du Dr Bernard Massie et particulièrement aux Drs Medhi-Seyyed Elahi, Bernard Massie et Dick D Mosser. Je remercie aussi les membres du laboratoire du Dr Marc Prentki pour leur patience quand j'occupais pour de longues périodes leur laboratoire et pour leur soutien au cours des derniers mois: Drs Erik Joly, Marie-Lyne Peyot, Raphaël Roduit et Jean Buteau; Serge Hardy, Roxanne Lussier et Johanne Morin. Je remercie également Annie Barbeau et Ewa Przybytkowski qui m'ont fourni à quelques reprises des cellules pour des expériences urgentes (notamment les cellules MDA-MB231). Je tiens également à remercier les membres du laboratoire du Dr Bernard Brais : Dr Bernard Brais ; Marie-Josée Dicaire, Hugo Lavoie, Martin Pagé et Anik St-Denis. Je veux également remercier le laboratoire du Dre Pierrette Gaudreau avec qui j'ai partagé trois ans durant la salle de culture et bien des discussions enrichissantes : Dres Chantal Boisvert, Pierrette

Gaudreau et Christelle Veyrat-Durebex ; Sophie Dubuisson, Caroline Paré, Luc Pomerleau et Julie Strecko

Je tiens également à remercier mes voisins directs pour leur bonne humeur quotidienne et le réconfort moral qu'ils m'ont apporté : Drs Richard Bertrand, Alain-Théophile Sané et Estelle Schmitt ; Myriam Beauchemin, Stéphane Bergeron, Claudie Paquet et Nicolas Parent. Je remercie également le Dr Guy Charron et Geneviève Moreau qui partagèrent pendant plus d'un an la paillasse voisine dans le laboratoire et qui contribuèrent à maintenir une bonne ambiance tout au long de leur présence. Je veux également à remercier Martine Boutin du laboratoire du Dr Serge Dea, Christine Ogoudikpe du laboratoire du Dr Daniel Skup et les Drs Pascale Befly et Pellegrino Masiello pour leur bonne humeur communicative.

Je veux également remercier le Dr Jianping Wu pour le prêt de son rotor SW-60 qui m'a permis de réaliser toutes mes études de solubilité et de préparer les échantillons nécessaires pour les dosages d'activité ribonucléotide réductase. Je tiens aussi à remercier l'ensemble des chercheurs, stagiaires post-doctoraux, étudiants et personnel de l'ICM et du CR-CHUM - Hôpital Notre Dame.

Je tiens à remercier les membres du LCB-CNRS où j'ai effectué mes travaux de recherche de D.E.A. : particulièrement le Dr François Denizot qui m'a encadré dans mes travaux à Marseille ; mais bien sûr également les Drs Annick Guiseppi, Jacques Haiech, Marie-Laure Herbaud, Marie-Claude Kilhoffer et Yves Quentin.

Je voudrais remercier la faculté des études supérieures et la fondation Marc Bourgie qui m'ont octroyé des bourses. Mes remerciements vont également à la fondation Canderel pour son soutien financier.

Pour terminer je souhaite remercier avec beaucoup de reconnaissance et d'affection ma famille sans le soutien quotidien de laquelle je suis certain qu'il ne m'aurait sûrement pas été possible de passer à travers ces quatre dernières années :

En premier lieu ma Mère et mon Père, ma sœur Sandrine, mes frères Philippe et Frédéric, mes belles sœurs Chantal et Corinne, mes nièces Mélanie et Pauline, mon neveu Valentin, mes grand-mères et les beaux parents de mes frères.

Avant propos

Les virus de l'herpès simplex (*herpes simplex virus*, HSV) sont très répandus dans les populations humaines [1, 2]. Leur large distribution à l'échelle de la planète et leur persistance sont liées à leur relative bénignité, leur mode de dissémination par contact, même en absence de lésions visibles [rev. 3], et leur capacité à rester latent dans les neurones de ganglions sensitifs de l'hôte [rev. 4, rev. 5]. Malgré des recherches intensives sur ces virus, aucune thérapie qui permettrait leur élimination de l'organisme hôte n'a pu être mise au point à ce jour [rev. 6]. Les divers traitements existants ciblent, en effet, les phases actives des virus et notamment leur réplication (acyclovir et dérivés). Afin d'élaborer de nouvelles thérapies, plusieurs groupes de recherche ont travaillé ces trente dernières années sur la ribonucléotide réductase (RR), une enzyme essentielle à la réactivation des HSV dans les neurones [7-12]. En effet, les neurones étant dépourvus d'activité RR endogène, le virus doit exprimer sa propre activité enzymatique pour produire les déoxyribonucléotides essentiels à la synthèse de son matériel génétique.

La mise en évidence de la cytotoxicité d'un mutant de délétion de la sous-unité R1 de la RR de HSV-2, HSV-2 R1(D2-357) [13] a mené à la description du potentiel anti-apoptotique de la protéine sauvage [14]. Des études ont été menées pour le caractériser, découvrir son mécanisme et délimiter les régions de la protéine qui en étaient responsables [15]. Lors de l'étude fonctionnelle du domaine N-terminal de HSV-2 R1, une homologie de séquence entre HSV-2 R1 et la protéine H11 [16] (également appelée HspB8 ou Hsp22) a conduit à la découverte pour HSV-2 R1 d'une activité de chaperon moléculaire similaire à celle des petites protéines du choc thermique [17]. Cette activité n'avait pas été décrite ni étudiée à ce jour.

Le présent ouvrage étudie principalement les deux activités qui ont pu être associées à HSV R1 en plus de sa fonction ribonucléotide réductase : activité anti-apoptotique et de chaperon moléculaire.

Chapitre I : Introduction

1.1 Les Virus Herpès

Les virus herpès sont présents chez toutes les espèces animales, y compris les invertébrés [18]. La centaine de virus connus a été divisée, à fin de classification, en trois groupes (classes α , β et γ) [19] distingués par diverses propriétés biologiques comme leur tropisme, leur pathogénicité et leur comportement en culture cellulaire.

1.1.1 Description des virus humains

Huit virus herpès ont été identifiés à ce jour chez les humains. Bien qu'aucun de ces virus ne soit généralement associé, dans une population immunocompétente, à des maladies graves ou mortelles, tous en ont la potentialité [rev. 20].

1.1.1.1 Caractéristiques et maladies associées

Les virus du groupe α sont caractérisés par un cycle de réplication plus rapide et un tropisme plus étendu que ceux des deux autres classes. Ils détruisent efficacement les cellules infectées et se transmettent rapidement en culture cellulaire. Les virus de ce groupe établissent leur latence dans des ganglions neuronaux. Les HSV (-1 et -2), décrits plus en détail ci-après, en font partie, de même que le virus de la varicelle et du zona (*varicella zoster virus*, VZV) [rev. 21] qui provoque la varicelle chez les enfants, une maladie infantile commune entre quatre et dix ans et dont une des complications principales peut être des infections opportunistes aux sites des lésions. Le VZV, qui infecte l'organisme par la voie respiratoire, est dirigé vers le système lymphatique puis chemine avec des lymphocytes jusqu'au niveau de la peau avant d'entrer dans une phase de latence au niveau de ganglions neuronaux qui peuvent être communs à ceux où s'établissent les HSV [22]. Le zona est la forme récurrente de cette infection qui se manifeste surtout chez les personnes âgées ou immunodéprimées [23]. Ces récurrences sont toutefois moins fréquentes que celles des HSV. Les lésions apparaissent dans ou au voisinage des régions innervées par les neurones où a été établie la latence après la primo-infection. La douleur qui traduit la

destruction de tissus nerveux [rev. 21] est parfois intense et peut se prolonger sur plus d'une année (neuralgie post-herpétique ou PHN [24]).

Les virus du groupe β ont un tropisme moins large et un cycle de réplication relativement long, ils induisent une augmentation de la taille des cellules (cytomégalie) et l'infection progresse lentement en culture cellulaire. Ces virus établissent une phase de latence dans des glandes sécrétrices, des cellules lympho-réticulaires (amygdales, rate, appendice,...) ou dans le rein. Ce groupe comprend le cytomégalovirus (HCMV) responsable de sérieuses infections congénitales chez le fœtus (30 000 naissances affectées aux États-Unis dont 3 000 décès) [rev. 25] et qui, chez les enfants ou les adultes, donne des infections asymptomatiques mais peut parfois provoquer des mononucléoses. Les virus herpès humains (*human herpes virus*, HHV) -6 (sous type A et B) [rev. 26, rev. 27], agent responsable de la roséole infantile, ou HHV-7, généralement sans symptômes et très peu étudié, en font également partie. Ces deux derniers virus présentent une grande homologie entre eux. Bien que HHV-6/HBLV (*herpes B-lymphotropic virus*) ait été isolé à partir de leucocytes de patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus* HIV) associé au SIDA [28], aucune évidence ne permet de croire que l'évolution clinique de l'un puisse influencer celle de l'autre [rev. 29].

Enfin les virus du groupe γ ont un tropisme également étroit. Ils ciblent principalement les cellules lymphoblastiques et produisent peu de particules infectieuses lors de leur cycle lytique. Ce groupe comprend le virus d'Epstein Barr (EBV) très fréquent dans la population (plus de 90% de la population mondiale est infectée) et le HHV-8. L'EBV est responsable principalement de mononucléoses infectieuses. Bien qu'il soit capable d'immortaliser des lymphocytes B *in vitro* et *in vivo*, il est très rare de retrouver ces lymphocytes B circulant dans le sang de personnes infectées. Cet événement ayant une faible probabilité, les cellules sont rapidement éliminées par le système immunitaire. Dans un contexte d'infection chronique, il peut provoquer le lymphome de Burkitt [rev. 30]. La malaria agit comme un co-facteur important dans le développement de la maladie [31]. L'éradication du paludisme en Papouasie Nouvelle-Guinée corrèle en effet avec la

disparition du lymphome de Burkitt dans cette zone. L'EBV peut également provoquer le carcinome naso-pharyngé [rev. 32]. La carcinogenèse associée à ce virus se développe principalement dans les populations d'Asie du sud-est et le facteur déclenchant pourrait être lié à l'alimentation ou au mode de vie. Le syndrome de fatigue chronique et la sclérose multiple pourraient également être liés à ce virus. HHV-8 (ou *Kaposi's sarcoma associated herpes virus*, KSHV) est responsable du sarcome de Kaposi chez les personnes très âgées ou immunodéficientes [rev. 33]. Ce virus est très rare dans les populations et généralement retrouvé dans des groupes cibles comme les personnes infectées par le HIV. L'évolution clinique de l'infection par HHV-8 dépend pour beaucoup de l'évolution clinique de l'infection HIV.

1.1.1.2 Les virus de l'herpès simplex (HSV)

Les HSV sont des virus communs. La proportion de personnes atteintes peut varier beaucoup selon les groupes étudiés [34-37]. Il existe deux types de HSV. Le type-1 généralement associé à l'herpès labial et le type-2 à l'herpès génital. Toutefois, il est de plus en plus fréquent de retrouver le virus de l'herpès simplex de type-1 au niveau des lésions génitales [38-40]. La primo-infection à HSV-1 survient en général dans le cadre familial dès la petite enfance (entre 0 et 5 ans) [41]. Son temps d'incubation est de 3 à 10 jours et elle se traduit par une stomatite banale ou reste inapparente. Les stomatites aphteuses et les pharyngites qui peuvent néanmoins en résulter guérissent en 2 à 3 semaines. Les épisodes récurrents guérissent spontanément en 8 à 10 jours [41]. La primo-infection HSV-2 est surtout génitale et prend place au début de la vie sexuelle active. La période d'incubation de HSV-2 varie de 2 à 7 jours [41]. Si elle est souvent inapparente, lorsqu'elle se manifeste, elle est plus grave que lors des récurrences. Ces lésions, très contagieuses, se résorbent en 2 à 3 semaines [41]. Les épisodes récurrents sont plus fréquents que pour HSV-1. Les anticorps neutralisants apparaissent après 4 à 7 jours. En absence de traitement, la guérison survient 7 à 10 jours après le début de l'infection. L'infection par les HSV est caractérisée par la primo-infection suivie de la phase de latence puis de réactivations qui peuvent survenir tout au long de la vie du patient. Les HSV sont responsables de lésions

récurrentes induites par la réplication du virus après sa réactivation sous l'effet de stress physiologiques (Fig.1A). Dans certains cas, HSV-1 peut induire des lésions proches du site de la primo-infection en général au niveau des lèvres ou autour de la bouche (feux sauvages). L'infection récurrente peut dans des cas plus sévères s'étendre dans la bouche (gingivostomatite aiguë) ou au niveau des yeux [42] où elle peut alors conduire à la cécité. Elle peut aussi produire des méningites et encéphalites potentiellement mortelles [rev. 43, 44, 45]. Toutefois, ces cas graves sont rares et en général les récurrences sont bénignes. Pour HSV-2, les récurrences se produisent généralement au niveau des organes génitaux. Elles peuvent être plus douloureuses et plus traumatisantes que celles de HSV-1, surtout si elles sont fréquentes. Elles sont susceptibles d'entraîner des infections secondaires par *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Trichomonas* et *Candida albicans*. Lors de l'accouchement, une mère peut transmettre le virus à son enfant. On parle alors d'herpès néonatal qui est mortel dans la moitié des cas et provoque des séquelles neurologiques chez les rescapés [rev. 46]. Toutefois, un accouchement par césarienne ou un traitement à base d'acyclovir ou de ses dérivés peuvent prévenir une transmission du virus de la mère à l'enfant [47, rev. 48]. De plus, la séropositivité pour HSV-2 est également associée à un plus grand risque de transmission du HIV [rev. 49, rev. 50].

Chez les personnes immunodéficientes les conséquences d'une infection herpétique peuvent être plus sévères, en induisant de graves lésions épithéliales ou des infections généralisées (foie, rate, poumons, système nerveux central) pouvant être fatales.

La structure du virion (Fig.1B et C) est constituée de couches successives de matériel protégeant le génome viral et favorisant son entrée dans la cellule hôte. L'enveloppe externe du virus dérive de la membrane nucléaire ou du compartiment post-Golgi (voir cycle lytique ci-après). La bicouche lipidique contient de très nombreuses glycoprotéines virales (onze glycoprotéines de surface ont été identifiées pour HSV-1 et -2) [51]. Ces glycoprotéines virales influencent la capacité d'infection des virus herpès au cours des premières étapes : adsorption, fusion et pénétration. Cette enveloppe est sensible aux détergents, aux solvants et à la chaleur. L'altération de

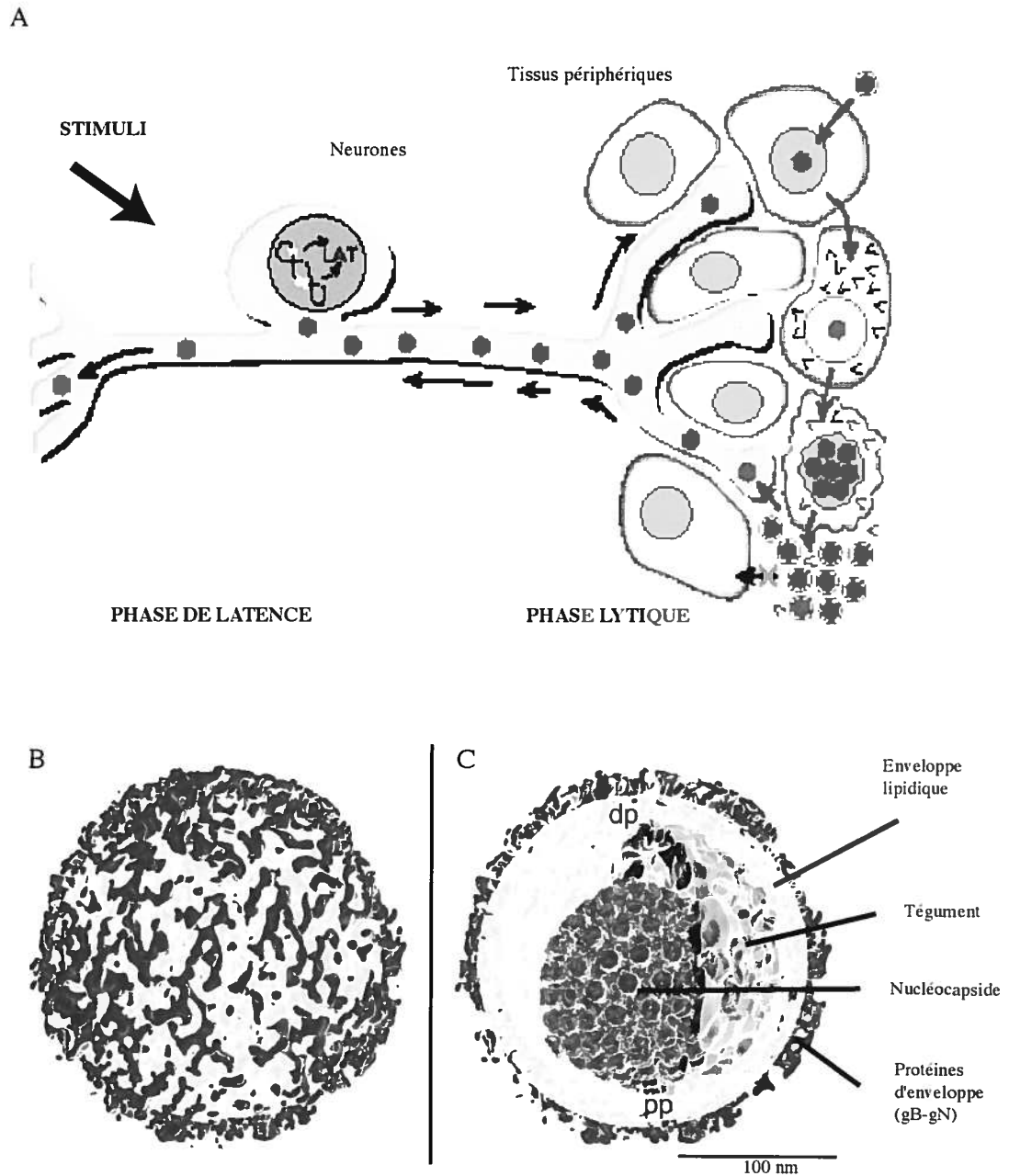


Figure 1 : Structure du virus de l'herpès simplex : A) Schéma illustrant la latence et la réactivation des HSV. (D'après les illustrations proposées sur le site internet du docteur E.K. Wagner : <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/>) B) Schéma de la surface externe d'une particule virale de HSV: l'enveloppe est représentée en gris clair et les glycoprotéines en gris foncé. C) Schéma des éléments constitutifs de la particule virale de HSV. Le pôle proximal est indiqué par pp, le pôle distal par dp (B et C d'après Grunewald *et al.* 2003).

l'enveloppe atténue la capacité d'infection du virus expliquant que ceux ci se transmettent essentiellement par des contacts humains très étroits. Ensuite vient le tégument qui entoure la capsid [52]. Il s'agit d'une couche asymétrique [53] et informe de protéines dont certaines jouent un rôle très important dans la réplication du virus (*vhs*, *virus host shut-off*, et α -TIF, *α trans-inducing factor*, par exemple). Enfin, la capsid virale comprend 162 capsomères. Elle présente une structure icosaédrique de 100 nm de coté environ. Elle renferme un brin d'ADN bicaténaire. Cet ADN est enroulé sur lui-même, protégé et accroché aux protéines de la capsid par un manchon de nucléoprotéines de structure fibrillaire [54-57]. Les HSV ont un génome constitué d'une molécule d'ADN double brin d'environ 150.000 paires de bases. Quatre vingt cinq gènes ont été identifiés à ce jour. Ils ont été répartis en trois groupes sur la base de leur profil d'expression au cours du cycle lytique, les gènes très précoces (ou IE pour « immediate early » ou encore α), les gènes précoces (ou E pour « early » ou encore β), et enfin les gènes tardifs (ou L pour « late » ou encore γ). Du fait de leur très grande similitude de taille et de structure, les virus herpès sont impossibles à distinguer en microscopie électronique et pour obtenir un diagnostic précis, on doit s'appuyer sur des marqueurs moléculaires ou biochimiques.

1.1.2 Latence et réactivation des HSV

Après une primo-infection au niveau épithélial, les virus vont subir un transport rétrograde à travers l'axone des neurones innervant la zone infectée pour rejoindre leurs corps cellulaires [58]. Par la suite au cours de la vie de l'individu infecté, le cycle des HSV se caractérisera par l'alternance de phases de réactivation (où la réplication virale produit des lésions dans les tissus périphériques) et de phases de latence (où le virus reste tapis dans le corps cellulaire des neurones hôtes) (Fig.1A). HSV-1 reste latent dans les neurones des ganglions trijumeaux et HSV-2 dans les ganglions sacrés. La phase de latence est caractérisée par la persistance du matériel génétique viral sous forme épisomale. L'ADN viral est circularisé et se lie à des histones [59-61]. Au cours de cette phase, seuls les transcrits associés à la latence (LAT, *latency associated transcript*), dont le cadre de lecture chevauche celui de $\alpha 0$

(ou ICP0, *infected cell protein 0*), sont transcrits sans expression d'aucune protéine virale [5]. L'induction du cycle lytique ou de l'entrée dans une phase latente pourrait dépendre au moins en partie de cette particularité. En effet, ICP0 inhibe la réparation de l'ADN et donc la circularisation de l'ADN viral [62], permettant l'entrée dans le cycle lytique. Si des facteurs cellulaires permettant l'expression de ICP0 ne sont pas présents rapidement, les LATs pourraient être exprimés et donc empêcheraient l'expression d'ICP0. Toutefois des résultats récents indiquent que la régulation pourrait être plus complexe, les niveaux d'ARNm des autres protéines IE étant également affectés par l'expression des LATs. [63].

Le passage de la phase de latence à une infection productive (ou cycle lytique) se fait par le processus de réactivation, suite à des stress physiologiques très divers [64-68]. Si certaines observations laissent à penser que les neurones hôtes sont détruits au cours de la réactivation des HSV [51], aucune démonstration directe n'a été faite et ce point reste sujet à controverse. En effet, d'autres observations tendent à suggérer que les neurones où se produit la réactivation sont préservés (notamment, absence de désensibilisation des zones atteintes). Les particules virales migrent alors le long de l'axone (transport axonal antérograde) puis infectent le tissu cutané où le virus parvient à moduler la réponse immunitaire de l'hôte pour permettre une réplication virale efficace [69]. Au cours du cycle lytique qui a lieu dans les neurones suite à la réactivation, le profil d'expression des gènes diffère de celui observé pour le cycle lytique dans les tissus épithéliaux notamment avec l'expression de protéines précoces durant la phase très précoce [70, 71]. Le cycle lytique des HSV (Fig.2) se caractérise par une cascade d'activation de gènes bien régulée [72-74, rev. 75]. Après l'adsorption et l'entrée du virus, la nucléocapside migre dans le cytoplasme jusqu'au noyau de la cellule où le matériel génétique du virus entre par un pore nucléaire. La protéine vhs contenue dans le tégment est également relâchée et va détourner la machinerie de l'hôte en faveur du virus. Une autre protéine virale contenue dans le tégment, α -TIF (ou VP16), active l'expression des gènes très précoces en se liant à des séquences consensus TAATGARAT [76-78] avec la protéine cellulaire oct-1. Ces gènes très précoces sont : ICP0 [79], ICP4 [80] et ICP27 [81] qui activent l'expression de gènes viraux ; ICP47 qui interfère avec la présentation d'antigènes

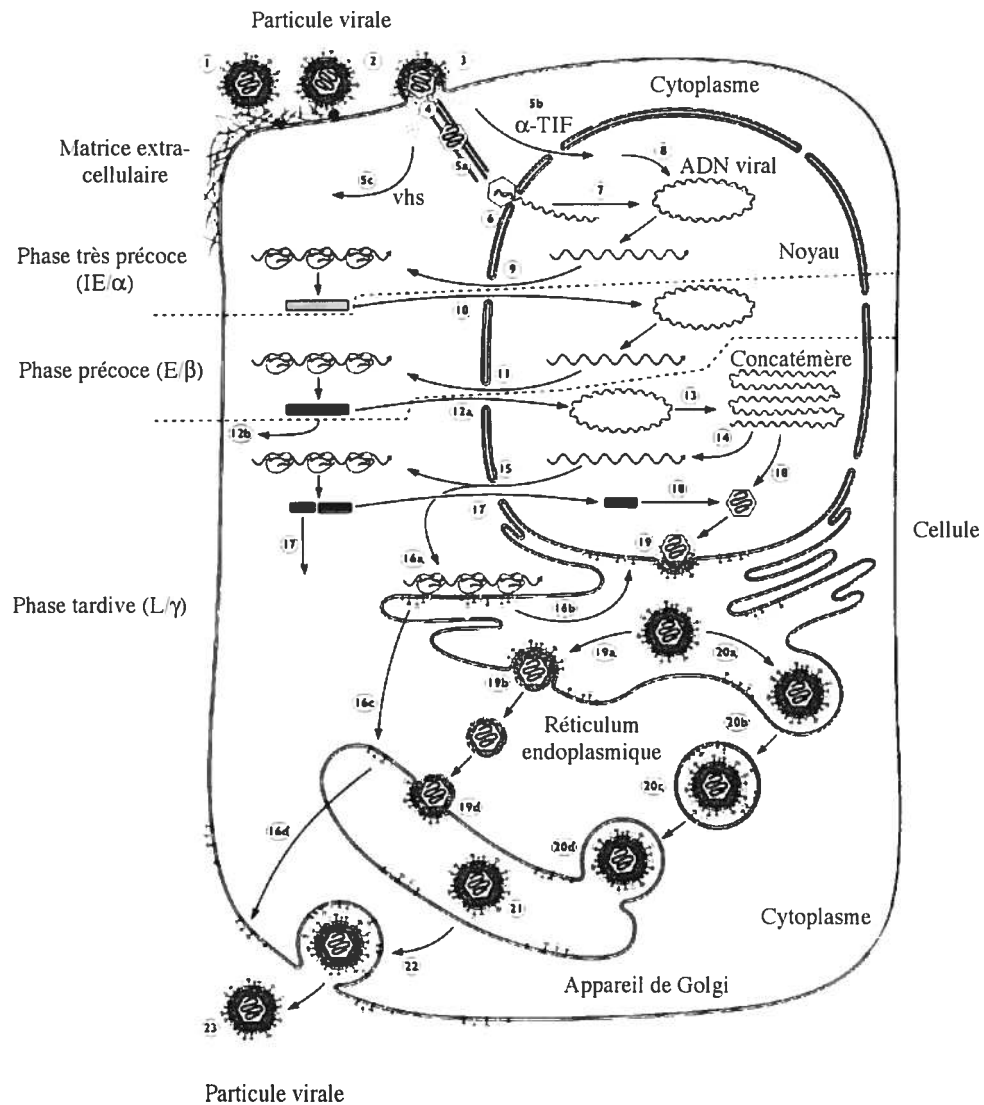


Figure 2: Cycle lytique des HSV : Après l'adsorption et l'entrée du virus (1-3), la nucléocapside migre dans le cytoplasme jusqu'au noyau de la cellule où le matériel génétique du virus entre par un pore nucléaire (5a, 6-7). La protéine vhs contenue dans le tégment est également relâchée et va détourner la machinerie de l'hôte en faveur du virus (5c). Une autre protéine virale contenue dans le tégment α -TIF va activer l'expression des gènes très précoces (5b, 8-9). Les gènes précoces sont ensuite activés (10-11). Par la suite, les gènes tardifs sont exprimés il s'agit d'environ 30 protéines de structure du virus ainsi que des protéines empaquetées dans le tégment comme vhs et α -TIF (14-15, 17). Le génome viral est encapsidé (18) puis ressort du noyau en bourgeonnant à partir de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Finalement les nouveaux virions sortent de la cellule infectée (19-23).

[82]; ICP22 un facteur de transcription relié au cycle cellulaire et dont le rôle est imprécis mais ne semble pas être essentiel pour l'infection dans plusieurs types de cellules [83]. L'expression de ces polypeptides ne nécessite pas la synthèse de protéines virales et elle atteint un pic entre 2 et 4 heures après l'infection [51]. La polymérase d'ARN de type II (ou B) est utilisée par le virus [84].

Les gènes précoces sont ensuite activés pour atteindre leur maximum d'expression entre 5 et 7 heures après l'infection [51]. Il s'agit de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réplication du génome viral. Ils peuvent être séparés en gènes indispensables *in vitro* et ceux qui sont accessoires. La réplication *in vitro* du génome des HSV nécessite une polymérase d'ADN (UL30), une protéine de liaison à l'ADN spécifique des simples brins (UL29, appelée également ICP8), une protéine qui lie l'ADN viral à proximité des origines de réplication (UL9), une protéine permettant la processivité de la polymérase en se liant à l'ADN simple brin (UL42) et enfin trois protéines UL5, UL8 et UL52 qui forment un complexe analogue à la primase et capable de fonction hélicase. D'autres protéines, non essentielles *in vitro*, sont également synthétisées durant cette phase : la thymidine kinase, une dUTPase, une exonucléase alcaline, une uracyl-ADN glycosylase et les deux sous-unités de la RR : UL39 pour la sous-unité R1 (ICP6 pour HSV-1 et ICP10 pour HSV-2) et UL40 pour la sous-unité R2. La synthèse de l'ADN viral s'effectue majoritairement entre trois et quinze heures après l'infection [85-88]. Il est à noter qu'une topoisomérase cellulaire (p170) est utilisée par le virus pour la réplication de son matériel génétique [89]. La réplication se fait par un mécanisme de cercle roulant, l'ADN étant ensuite découpé en unité de génome.

Par la suite, les gènes tardifs sont exprimés. Il s'agit d'environ 30 protéines de structure du virus ainsi que de protéines incluses dans le tégument comme vhs et VP16 [51]. Le génome viral est empaqueté dans des capsides pré-assemblées. Les génomes incomplets sont éliminés à cette étape : la capside qui les protège est retenue dans le noyau de la cellule hôte, probablement du fait d'interactions anormales entre protéines du tégument et de la capside [90]. Les capsides ressortent du noyau en bourgeonnant à partir de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire [91](Fig.2). Le mécanisme employé par le virus pour sortir de la cellule fait l'objet de

controverse. Deux thèses présentant des arguments sérieux sont en concurrence : soit il traverse le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sans changer d'enveloppe et la maturation de ses protéines d'enveloppe se fait *in situ* [92, 93], soit le virus fusionne avec la membrane du réticulum endoplasmique et se dote d'une nouvelle enveloppe au niveau de l'appareil de Golgi avant de sortir de la cellule [53, 94, 95].

1.1.3 Nucléosides anti-HSV et leur efficacité

Plusieurs composés ont été développés pour traiter les patients atteints par les HSV. Parmi les plus efficaces, le plus ancien d'entre eux est l'acyclovir (ACV) [rev. 96, 97, 98]. Il s'agit d'un analogue acyclique de nucléoside. Son nom dans la nomenclature est le 9-(2-hydroxyethoxyméthyl)-guanine. Commercialement il est principalement connu sous le nom de Zovirax. Ce composé possède une excellente sélectivité pour les virus herpès de la classe α (HSV-1 et -2 et VZV). Sa spécificité et son activité dans les cellules infectées sont liées à son activation par la thymidine kinase virale et à une sensibilité à l'ACV-triphosphate plus élevée de la polymérase à ADN virale par rapport à la polymérase cellulaire. L'incorporation d'ACV-monophosphate conduit à l'inactivation spécifique de l'enzyme virale en mettant fin à la synthèse de la molécule d'ADN. L'ACV peut également être utilisé pour traiter des infections à EBV ou CMV. Toutefois dans les cellules infectées par ces virus la spécificité et l'activité du produit diffèrent de celles trouvées pour les virus de la classe α . Toutefois, comme pour beaucoup de traitement des souches résistantes sont apparues et d'autres molécules basées sur le même principe ont été mises au point comme le valacyclovir [99, 100], qui est métabolisé en acyclovir que l'on peut retrouver chez la femme enceinte dans le lait maternel mais à des doses toutefois inférieures à celles utilisées dans le cadre thérapeutique [101], l'iodoxuridine [102], la trifluorothymidine [103] et la vidarabine [103]. Les traitements pour HSV, tels que recommandés par une étude récente, sont présentés dans le tableau suivant [104] :

Tableau 1 : Traitements anti-HSV

Infection	Traitement
HSV non génital (primo-infection ou récurrence)	Acyclovir (200 mg prise orale 5 fois par jour pour 5 à 10 jours) ou Acyclovir (5% application locale 5 fois par jour pour 5 jours) (herpes labial) ou Acyclovir (3% pommade ophtalmique 5 fois par jour pour 14 jours) (kératite)
HSV génital (primo-infection)	Acyclovir (200 mg prise orale 5 fois par jour pour 5 à 10 jours) ou Valacyclovir (500 mg prise orale deux fois par jour pour 5 à 10 jours)
HSV génital (récurrence)	Comme pour une primo-infection de HSV génital ou Famcyclovir (125 mg prise orale deux fois par jour pour 5 jours)
HSV (pour limiter les récurrences)	Acyclovir (200 mg prise orale 3 fois par jour ou 400 mg prise orale deux fois par jour jusqu'à 6 mois) ou Valacyclovir (500 mg prise orale 1 à 2 fois par jour jusqu'à 6 mois) ou Famcyclovir (250 mg prise orale deux fois par jour jusqu'à 6 mois)
Primo-infection HSV sévère ou encéphalite HSV	Acyclovir (5 à 10 mg/kg injection intraveineuse 3 fois par jour pour 7 à 21 jours). Un traitement à long terme à l'acyclovir peut être rendu nécessaire par des encéphalites récurrentes.

1.2 L'apoptose

Dès le développement de l'embryon et jusqu'à la mort, l'apoptose est un mécanisme crucial pour tous les organismes supérieurs. En éliminant des cellules lors de la croissance de l'embryon, elle contribue à modeler le corps des êtres vivants. Elle concourt également à éliminer les neurones non fonctionnels et permet la sélection

des connections synaptiques adéquates. Plus tard, elle permet d'éliminer les lymphocytes inadaptés (AICD, *activation-induced cell death*) [105], de maintenir l'homéostasie [rev. 106, rev. 107] et contribue à la défense de l'organisme en éliminant les cellules déviantes ou infectées. Une modification de la balance des divers facteurs qui constituent les voies apoptotiques peut conduire à une prolifération excessive des cellules et éventuellement à des cancers ou au contraire à des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), des maladies d'auto-immunité (arthrite rhumatoïde) ou d'immunodépression (SIDA).

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, se distingue de la nécrose par un très haut degré d'organisation et de régulation. La nécrose conduit généralement à un processus inflammatoire alors que l'apoptose n'induit pas une telle réponse [rev. 108]. Les cellules sont véritablement détruites de l'intérieur et disparaissent rapidement ce qui a longtemps retardé la découverte de ce mécanisme [rev. 109]. Dans un premier temps, la morphologie cellulaire va changer avec la formation de structures en bulles, un arrondissement des cellules (probablement lié à une désorganisation des filaments d'actine), une réduction du volume cytoplasmique, la fragilisation de la membrane des mitochondries, facilitant la libération de divers facteurs. La chromatine va se condenser et l'ADN va être fragmenté au niveau des nucléosomes, puis le noyau va se disloquer. Ultiment la cellule va disparaître en corps apoptotiques éliminés principalement par les macrophages.

1.2.1 Mécanismes généraux

Un certain nombre de mécanismes ont été décrits comme entrant en jeu dans la plupart des voies apoptotiques [rev. 110] (Fig.3 et 4). Suite à un stimulus pro-apoptotique, une cascade de protéases spécifiques est activée dans la cellule. Ces protéases sont appelées caspases (*cysteinyl aspartic acid proteases*) [rev. 111]. Les caspases sont produites sous formes de proenzymes qui doivent être clivées pour devenir actives (ex : Fig.5A pour la procaspase-8). Lors de leur synthèse, elles comprennent un prodomaine, court pour les procaspases-3,-6 et -7, plus long pour les autres, une grande sous-unité qui porte l'activité catalytique (17-21 kDa) et enfin une

petite sous-unité (10-14 kDa) nécessaire à cette activité [112, 113]. Ces protéases coupent alors les protéines au niveau d'acides aspartiques contenus dans une séquence consensus cible, définie pour chaque caspase. On peut classer les caspases impliquées dans l'apoptose en 2 groupes : les caspases initiatrices ou apicales, comme la caspase-8 (aussi appelée FLICE, MACH ou Mch 5) et la caspase-9 (ICE-LAP 6 ou Mch 6), dont le rôle principal est d'activer d'autres caspases, et les caspases effectrices, comme la caspase-3 (CPP32, Yama, apopain), qui vont agir sur des cibles plus en aval (caspases ou autres).

Les voies apoptotiques diffèrent selon la nature de l'inducteur et le type de cellule rendant très complexe leur étude. Deux grandes voies peuvent néanmoins être distinguées : la voie mitochondriale ou voie intrinsèque, et la voie des récepteurs de mort cellulaire ou voie extrinsèque. Il existe des passerelles entre ces deux voies et dépendamment du stimulus et du type cellulaire, il peut être délicat de les séparer. D'autres voies, plus mineures, ont également été décrites.

1.2.2 La voie mitochondriale

La voie mitochondriale semble être une des plus communes quelque soit le type cellulaire. Elle a été abondamment décrite [rev. 114]. Sous l'effet de stimuli très divers (irradiations aux rayons ultraviolets, dommages chimiques, etc.), des protéines de la famille Bcl (« Bcl-like » : Bax, Bak, Bad etc.. ou « BH3 only » : Bid, Bik etc..) agissent indépendamment ou complexées sur la mitochondrie [115, rev. 116] (Fig.4). Des pores de transition de perméabilité (PT, *permeability transition*), formés principalement de transporteur de nucléotide à adénine (ANT, *adenine nucleotide transporter*) à la membrane interne et de canaux à anions à ouverture dépendante du voltage (*voltage dependent anion channel*, VDAC) situés à la membrane externe de la mitochondrie, vont s'ouvrir entraînant sa dépolarisation par un mécanisme encore mal défini et la libération d'un certain nombre de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C. Ce dernier va alors se lier avec l'adaptateur Apaf-1 (*apoptosis associated factor-1*) et la procaspase-9. Ces deux derniers s'associent via un domaine homologue appelé CARD (*caspase recruitment domain*). En présence de dATP (ou

d'ATP mais moins efficacement), ce complexe, nommé apoptosome, entraîne l'activation par clivage de la procaspase-9 (Fig.4) qui à son tour va couper la procaspase-3 pour l'activer. La caspase-3 va alors dégrader ses substrats comme par exemple ICAD/DFF45, une protéine qui lie l'endonucléase CAD/DFF40 (*caspase associated dnase*) responsable de la fragmentation de l'ADN. Il existe également des voies indépendantes des caspases [117] qui sont activées notamment par le facteur AIF (*apoptosis inducing factor*) relâché par les mitochondries [118] (Fig.4). Divers régulateurs négatifs existent pour cette voie : les protéines de la famille de Bcl-2 (comme par exemple Bcl-x_L) [rev. 116] qui empêchent la dépolarisation de la membrane mitochondriale et les IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) qui inhibent le clivage des procaspases -9, -3 et -7 (pour c-IAP1 et 2). Les IAP sont des protéines qui comprennent plusieurs domaines : un à trois domaines appelés répétition de IAP de baculovirus (BIR, *baculovirus IAP repeat*) [rev. 119, rev. 120] (Fig.4) qui leur permettent de lier les caspases et de les inactiver, un domaine CARD et un domaine de liaison en doigt de zinc (ZF, *zinc finger*). Ces deux derniers domaines peuvent être absents chez certains IAP. Le domaine ZF permet l'ubiquitination des caspases et leur dégradation ultérieure par le protéasome [rev. 120, rev. 121] alors que le domaine CARD pourrait permettre une action des IAP au niveau de l'apoptosome. D'autres mécanismes très variés existent également comme, par exemple, la séquestration par la protéine 14.3.3 de Bad phosphorylé par AKT/PKB sur la sérine 136. Cette liaison empêche alors Bad de se lier à Bcl-x_L pour inactiver sa fonction protectrice.

1.2.3 La voie des récepteurs

La voie des récepteurs a également été très étudiée [rev. 122, rev. 123, rev. 124] (Fig.3 et 4). Une quinzaine de récepteurs de mort cellulaire de la famille des récepteurs du TNF (*tumor necrosis factor*) ont été identifiés à ce jour. Plusieurs sont bien connus; dans la suite du texte nous parlerons essentiellement de TNFR-1/p55 et Fas/Apo-1/CD95. Ils se caractérisent par un domaine extracellulaire composé de régions riches en cystéine (de 1 à 6), un domaine transmembranaire et par un

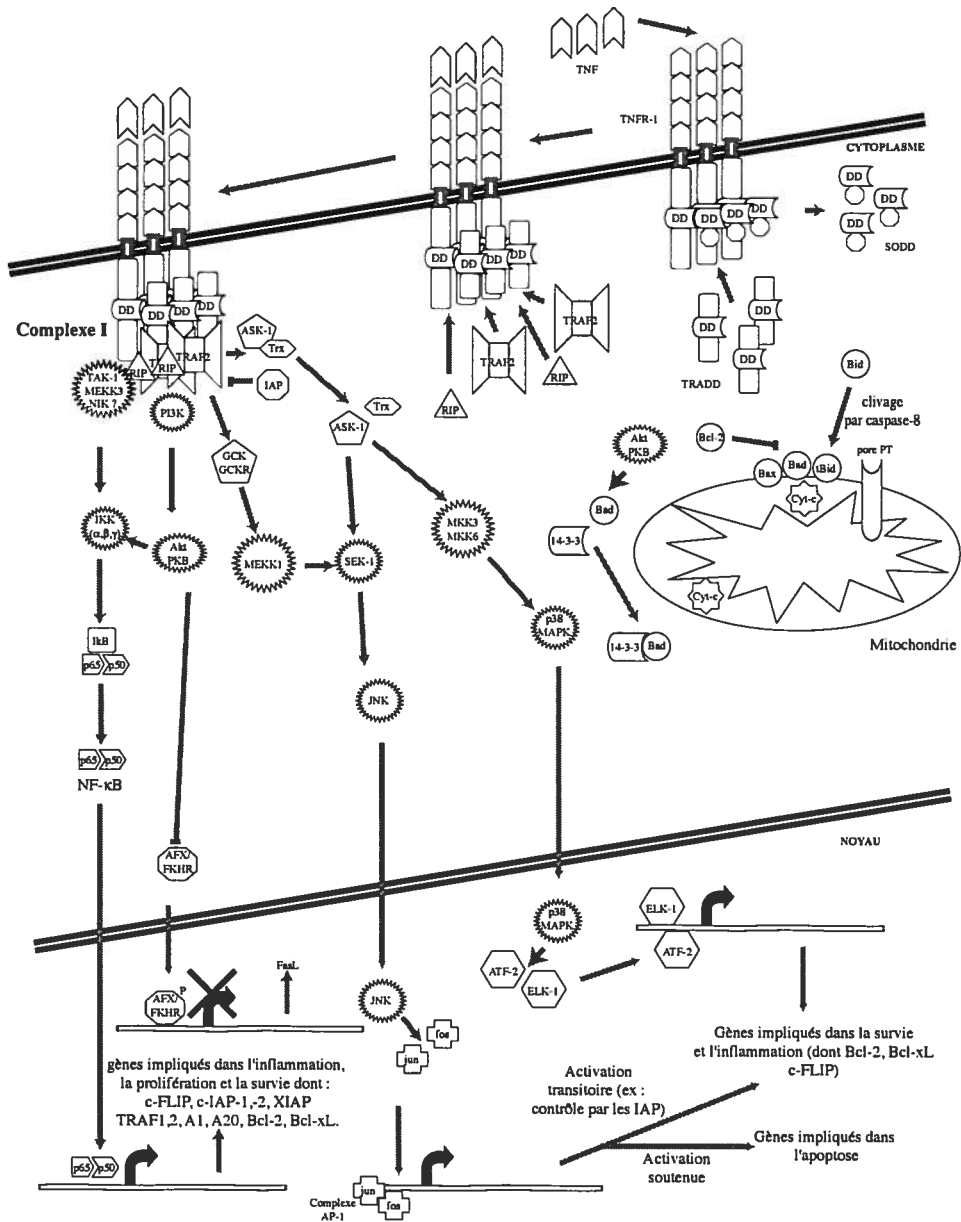


Figure 3 : Activation des voies anti-apoptotiques suite à la stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR-1 (p55).

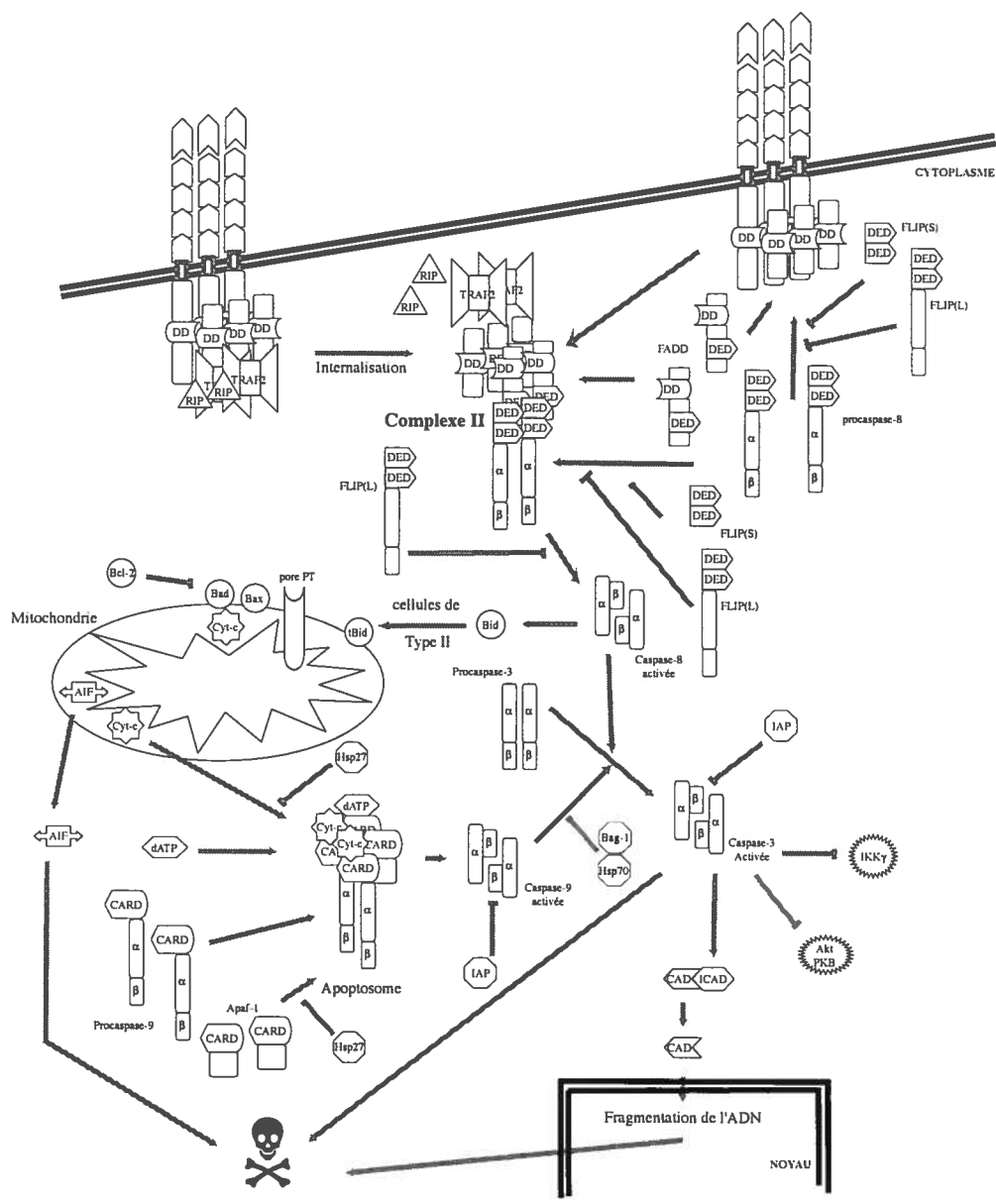


Figure 4 : Activation des voies pro-apoptotiques suite à la stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR-1 (p55).

domaine intracellulaire portant une région appelée *death domain* (DD). Situés à la membrane plasmique des cellules, ils sont regroupés dans des micro-domaines appelés radeaux lipidiques [125], soit sous forme monomérique soit sous forme trimérique [126, 127]. Le récepteur TNFR-1 non activé n'induit pas de signalisation cellulaire même sous forme multimérique car SODD (*silencer of DD*), une protéine qui entre en compétition avec les protéines dénommées adaptateurs pour la liaison au récepteur, empêche le déclenchement de la cascade qui aboutit à la signalisation cellulaire [128]. Les ligands des récepteurs de mort cellulaire sont, pour la plupart, des protéines transmembranaires qui doivent être, en général, mûries par protéolyse [129]. Une fois libérés ils vont agir sur leurs récepteurs. Le ligand de Fas (FasL) et la forme membranaire du TNF (mTNF qui se lie surtout à TNFR-2 [rev. 130]) peuvent toutefois agir sous forme transmembranaire. La fixation du ligand provoque la trimérisation (ou l'oligomérisation de trimères) qui entraîne un changement de conformation permettant pour le TNFR-1 la libération de SODD et le recrutement des molécules adaptatrices.

Les récepteurs du TNF, et dans une moindre mesure Fas [rev. 131], ont un large spectre de fonctions. Ces fonctions sont impliquées principalement dans la prolifération cellulaire, la survie et la mort cellulaire par apoptose, la différenciation cellulaire, l'inflammation et la réponse contre les micro-organismes (infections virales, bactériennes, fongiques et parasitaires) [rev. 132].

1.2.3.1 Dualité de la signalisation apoptotique via les récepteurs

Parmi ces fonctions, la modulation de l'apoptose nous intéressera plus particulièrement. Comme indiqué ci-dessus, l'activation des récepteurs de mort cellulaire ne conduit pas exclusivement à la mort des cellules ainsi activées. En effet, la large distribution de ces récepteurs parmi les cellules de l'organisme implique un système de régulation négative efficace de leur fonction pro-apoptotique pour limiter la destruction aux seules cellules qui doivent être éliminées. L'activation du TNFR-1 permet à la fois le déclenchement de cascades anti-apoptotique (Fig.3) et pro-apoptotique (Fig.4). Récemment les mécanismes moléculaires sous-jacents à la

signalisation induite par le TNF- α ont été décrits : suite à l'activation du TNFR-1, il y a formation séquentielle de deux complexes appelés complexe-I et -II [133]. Le complexe-II, pro-apoptotique, ne se forme que si la cellule échoue à former rapidement le complexe-I, anti-apoptotique ou si ce dernier est déstabilisé. Aussi pour expliquer comment une réponse cellulaire est privilégiée plutôt qu'une autre, il est possible d'envisager que le TNFR-2, jusqu'ici peu détaillé, joue un rôle. La stimulation de TNFR-2, préalablement à celle de TNFR-1, permettrait le recrutement à TNFR-2 de divers facteurs essentiels pour la réponse anti-apoptotique. Ces molécules seraient ainsi piégées et empêchées d'interagir avec TNFR-1 favorisant la formation du complexe-II [134, rev. 135]. La co-stimulation des deux récepteurs préserverait la balance intracellulaire entre les signaux de vie et de mort alors que la stimulation préalable de TNFR-1 pourrait permettre la prolifération. Il se peut aussi que les cellules cibles doivent se trouver dans un environnement où la concentration locale en cytokines soit très élevée. Cette stimulation très forte et prolongée permettant d'outrepasser la signalisation anti-apoptotique. Des stimulations conjointes avec le TNF- α et l'interféron γ (IFN γ) notamment, permettent également d'éliminer spécifiquement les cellules cibles [136-141].

1.2.3.2 Signalisation anti-apoptotique

L'adaptateur TRADD (*TNFR associated DD protein*) qui a remplacé SODD va recruter TRAF-2 (*TNFR associated factor-2*) et RIP (*receptor interacting protein*), une protéine kinase contenant un DD, pour former un premier complexe de signalisation [133](Fig.3). Ce complexe-I est capable d'activer plusieurs voies. Nous décrirons celle du facteur nucléaire p65/p50 (NF- κ B, *nuclear factor- κ B*) et de JNK/SAPK (*jun N-terminal kinase/stress associated protein kinase*) [rev. 142]. TRAF-2 et RIP activent les kinases TAK-1 (*TGF- β activating kinase*), MEKK3 (*mitogen activated protein kinase (MAPK/ERK) kinase (MAPKK/MKK/MEK) kinase*) ou NIK (*NF- κ B inducing kinase*) [rev. 143] qui permettent la phosphorylation de I κ B (*inhibitor of NF- κ B*) par IKK (*I κ B Kinase*) et la dissociation du complexe I κ B/p65/p50. I κ B est alors ubiquitiné et dégradé par le protéasome. NF- κ B peut alors

être transloqué au noyau et agir sur ses cibles. Ceci notamment en induisant l'expression de c-FLIP (*cellular-flice inhibitory protein*, également appelée FLAME-1, I-FLICE, Casper, CASH, MRIT, CLARP ou usurpin) [rev. 144] qui empêche la fixation de la procaspase-8 à l'adaptateur FADD/MORT1 (*Fas associated DD protein*) [145, rev. 146], mais également de c-IAP1 et 2, de XIAP, de TRAF-1 et-2 et diverses autres protéines anti-apoptotiques (Fig.3). TRAF-2 peut aussi activer les kinases ASK-1 (*apoptosis signal regulating kinase-1*) [rev. 142], et GCK (*germinal centre kinase*) ou GCKR (*GCK related*) (Fig.3). Ces kinases activent à leur tour SEK-1/MKK4 (via MEKK-1 pour GCK et GCKR, directement pour ASK-1). SEK-1 va ensuite activer JNK qui va réguler l'activité de divers facteurs de transcriptions. Il est à noter que la voie JNK peut être soit pro-apoptotique si l'activation est soutenue soit anti-apoptotique si l'activation est rendue transitoire par l'interaction de IAP avec TRAF-2 [147, 148]. ASK-1 peut également activer MKK3/MKK6 qui active la kinase p38MAPK [rev. 142] (Fig.3). L'activation de Fas peut également induire l'activation de NF- κ B [149, 150] via NIK et IKK [151] mais cette voie est moins bien décrite.

1.2.3.3 FLIP

Avant de détailler les mécanismes qui aboutissent à l'activation des caspases lors de la stimulation des récepteurs de mort cellulaire, il est nécessaire de rappeler un certain nombre de données sur la protéine c-FLIP mentionnée ci-dessus et qui semble jouer un rôle très important dans la balance entre la vie et la mort des cellules dont les récepteurs sont activés par le FasL ou le TNF- α . C'est l'homologue viral de c-FLIP, v-FLIP, qui a d'abord été découvert chez plusieurs virus herpès de la classe g, comme le virus de l'herpès saimiri (VHS) et HHV-8, démontrant, s'il en était besoin, l'importance des études menées sur la modulation de l'apoptose par les virus. La protéine virale est capable de bloquer l'apoptose induite par la stimulation de divers récepteurs de mort cellulaire comme TNFR-1, Fas, DR3 et DR4 [rev. 144]. Les gènes de c-FLIP et des caspases-8 et -10 se trouvent en étroite proximité dans le génome suggérant une évolution par duplication [152]. La régulation de l'expression de c-

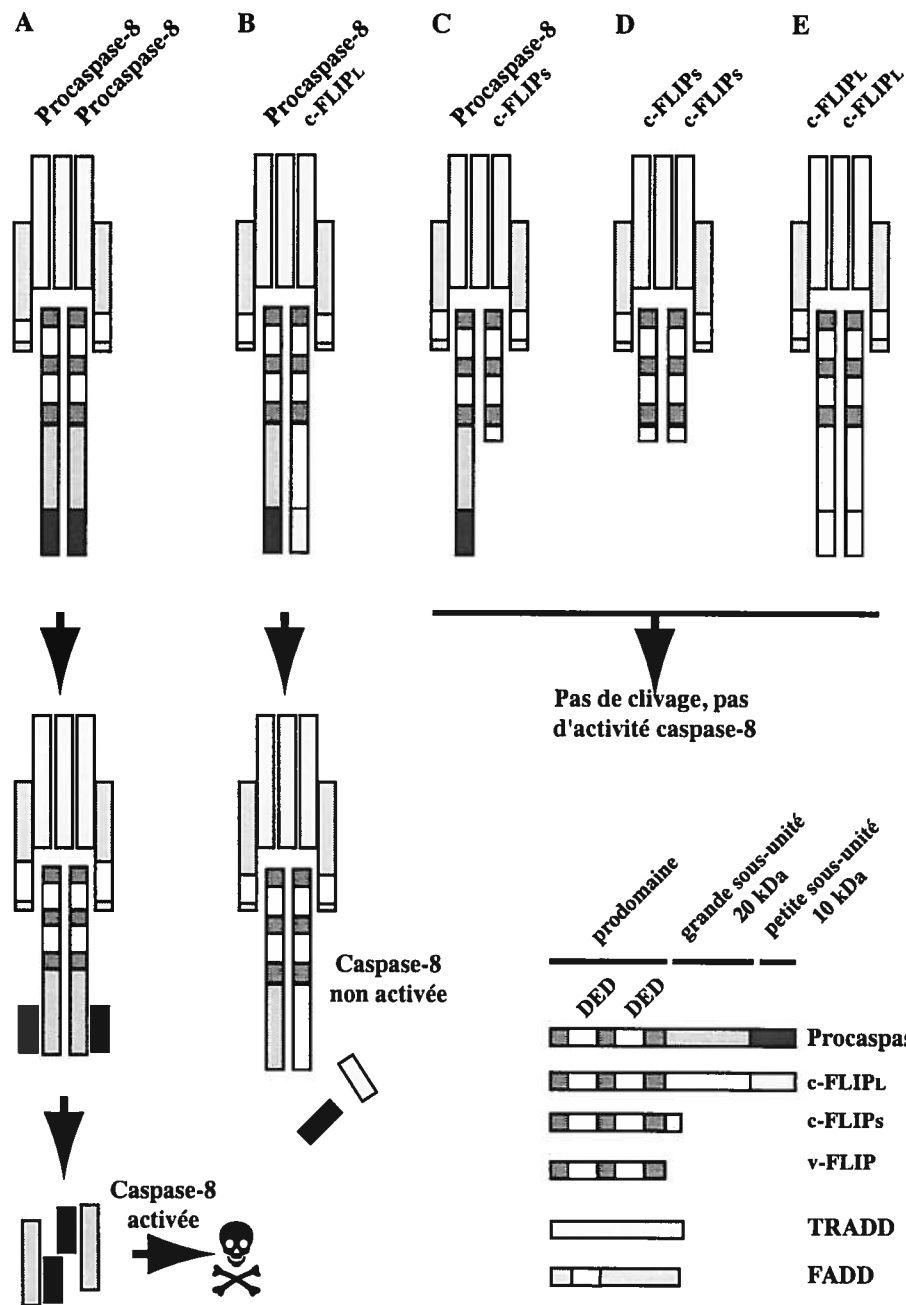


Figure 5 : Schéma des mécanismes d'activation de la procaspase-8 et inhibition par FLIP : La protéine c-FLIPs comprend un petit domaine C-terminal non homologue à la grande sous-unité de la procaspase-8. Les grande et petite sous-unités de c-FLIPL ne comprend pas les résidus essentiels à l'activité caspase. Il est à noter que dans chaque hétérodimère (grande et petite sous-unités), les sous-unités proviennent d'une procaspase différente.

FLIP n'est pas encore totalement connue mais il a été montré que NF- κ B joue un rôle important [153, 154]. Si plusieurs produits d'épissage alternatifs ont pu être détectés pour l'ARNm de FLIP, seuls deux isoformes de c-FLIP ont été mis en évidence à ce jour : la forme courte, c-FLIP_S, et la forme longue, c-FLIP_L (Fig.5). Ce dernier est peu stable dans la cellule et un traitement avec des agents inhibant la synthèse protéique, comme, par exemple, la cycloheximide, réduit fortement la concentration cellulaire de c-FLIP_L [155]. La forme longue de c-FLIP est très homologue à la procaspase-8 (Fig.5). Elle porte deux domaines DED (*death effector domain*) capable de lier la procaspase ou la protéine adaptatrice FADD et un domaine homologue au domaine catalytique de cette dernière mais sans les résidus nécessaires à l'activité protéasique. L'autre isoforme, c-FLIP_S ne comprend comme v-FLIP que les deux DED. Les isoformes de FLIP peuvent interagir non seulement avec FADD ou les procaspases-3, -8 et -10 mais aussi avec TRAF-1 et -2 et Bcl-x_L [rev. 144]. Il n'est pas clair si l'interaction entre c-FLIP (S et L), FADD ou les caspases se fait avant ou après la stimulation des récepteurs. c-FLIP (S et L), agissent comme un inhibiteur compétitif en empêchant le recrutement (en partie) et l'activation de la procaspase (Fig.5). Toutefois, même en présence de c-FLIP_L, la procaspase-8 peut être recrutée au niveau du complexe pro-apoptotique (DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) ou complexe-II) et éventuellement clivée. Ce clivage n'est toutefois pas complet et ne permet pas l'activation de la cascade pro-apoptotique [rev. 144] (Fig.5). La surexpression de c-FLIP_L dans certaines conditions a néanmoins permis de démontrer que cette protéine pouvait avoir une action pro-apoptotique [156, 157]. c-FLIP_L est également capable d'induire NF- κ B après son clivage par la caspase-8. Un fragment de c-FLIP_L, appelé p43, peut interagir avec TRAF-2 et induire l'activation de NF- κ B probablement par la phosphorylation de IKK par RIP [158].

1.2.3.4 Signalisation pro-apoptotique

Selon le type de cellules induites à entrer en apoptose, les mécanismes vont être différents : dans les cellules de type I (ex : HeLa), la cascade pro-apoptotique est rapide et insensible à une surexpression de Bcl-2 alors que pour les cellules de type II

(ex : Jurkat), la cascade est plus lente, démontre une activation de la procaspase-9 et est modulable par Bcl-2 [159]. Les mécanismes associés à l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire dans les cellules de type II semblent, en partie au moins, commun avec la voie mitochondriale mais le détail reste relativement imprécis (Fig.4). Dans les cellules de type I (Fig.4), les récepteurs activés vont recruter des molécules adaptatrices. Dans le cas du récepteur Fas, l'association avec la procaspase-8 est réalisée grâce à un adaptateur appelé FADD. Celui ci possède un domaine homologue avec chacun des partenaires [160] : DD avec le récepteur, DED avec la procaspase. Dans le cas du récepteur TNFR-1, qui lie le TNF- α , un adaptateur supplémentaire TRADD [161] est nécessaire pour joindre le récepteur à FADD. L'activité enzymatique de la procaspase dans ce complexe, appelé DISC [162] pour Fas et, éventuellement, complexe-II pour le TNF-R1, est alors suffisante pour cliver les proenzymes et libérer la caspase activée [rev. 163, 164] (Fig.5). Des données récentes nuancent cependant ce schéma d'activation. La dimérisation de la procaspase-8 pourrait en effet entraîner son activation par digestion intramoléculaire [165]. Ce mécanisme d'activation permet d'expliquer pourquoi c-FLIP_L peut avoir un potentiel pro-apoptotique si elle est associée avec un monomère de procaspase-8 [156, 157](Fig.5). Le clivage de la procaspase-8 en 2 sous-unités interviendrait plutôt pour stabiliser le dimère que comme une étape indispensable à l'activité catalytique de la caspase [166, 167]. Les substrats de la caspase-8 activée pourraient néanmoins être différents selon que le clivage en 2 sous-unités ait été effectué ou pas. Les dimères non stabilisés par le clivage ont un spectre de substrat moins important car uniquement situé dans le voisinage direct de la membrane plasmique [168, 169]. La caspase-8 pleinement activée va ensuite cliver la procaspase-3 mais également le facteur Bid qu'elle transforme en t-Bid (*truncated-Bid*) et qui va agir sur les mitochondries. Le niveau de cette activation pourrait être le chaînon reliant les mécanismes apoptotiques dans les cellules de types I et II. Dans les cellules qui expriment peu de procaspase-8 (i.e. : les cellules de type II), la cascade de caspases serait lente à se mettre en place et le clivage de Bid deviendrait par son action plus rapide sur la mitochondrie la forme prédominante alors que pour les cellules qui expriment plus de procaspase-8 (i.e. : les cellules de type I), le niveau

d'activation de celle-ci permettrait d'engager rapidement la cellule dans la cascade des caspases et l'activation de Bid ne serait plus qu'un événement marginal. Récemment, il a été démontré que la kinase JNK jouait un rôle dans l'apoptose dépendante des caspases induite par la TNF- α [170]. JNK activerait par phosphorylation une protéase inconnue qui serait capable de perturber la membrane des mitochondries via j-Bid, un nouveau produit de clivage de la protéine Bid, et de libérer spécifiquement la protéine Smac/Diablo. Celle-ci pourrait alors venir interagir avec les IAPs présentes dans le complexe I, anti-apoptotique, déstabilisant leur liaison avec TRAF-2 pour permettre le recrutement et l'activation de la procaspase-8 dans le complexe II, pro-apoptotique. Plus tardivement, lorsque la caspase-8 clivera Bid, Smac/Diablo interviendra également comme dans la voie intrinsèque pour permettre une amplification du signal pro-apoptotique en se liant aux IAPs. En effet le signal anti-apoptotique généré par l'activation des récepteurs de mort cellulaire peut conduire à la synthèse de IAPs (Fig.3) capables d'inhiber l'activation des procaspases effectrices ou même les caspases activées notamment par l'ubiquitination de celles-ci (Fig.4). Smac/Diablo en inhibant l'action des IAPs sur le complexe I peut également conduire à une activation plus soutenue de JNK, potentiellement inductrice de l'apoptose (Fig.3). Dans les cellules de type II, il interviendrait en se liant aux IAPs pour permettre l'activation de la procaspase-9 puis des caspases effectrices comme cela a été décrit pour la voie intrinsèque.

TRADD peut aussi recruter la kinase RIP et la protéine RAIDD pour activer la procaspase-2 [171] mais cette voie parallèle est relativement peu détaillée.

Le récepteur Fas activé peut également agir, suivant le contexte cellulaire, en activant la protéine Daxx. Celle-ci contribue à libérer la kinase ASK-1 de la thiorédoxine [172]. Cette kinase peut alors activer la voie SEK-1 et JNK ou MKK3/MKK6 et la p38/MAPK pour induire l'apoptose. Les récepteurs TNFR peuvent eux aussi activer ASK-1 via TRAF-2 et AIP-1 [rev. 173]. La protéine 14.3.3 peut inhiber cette dernière voie [rev. 174].

1.1.4 Autres voies apoptotiques

D'autres voies existent qui agissent différemment comme les granules perforine/granulysine-granzymeA qui induisent une apoptose indépendante des caspases [rev. 175], le granzymeB [176], qui une fois à l'intérieur des cellules, agit directement sur les caspases pour les activer, ou encore la voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique [177-179].

Il est probable que d'autres formes d'apoptose, associées ou non à l'activation des caspases, puissent exister. Il en va de même pour les régulateurs positifs et négatifs de l'apoptose. L'étude de ses facteurs nous permet donc une meilleure compréhension de cette mécanique complexe.

1.1.5 L'apoptose au cours de l'infection virale

Confrontés à une diversité immense de pathogènes les organismes évolués ont du mettre en place des systèmes relativement passe-partout pour éliminer cette menace. Les lignes de défenses successives de notre corps répondent à ce besoin et ont co-évolué avec les divers micro-organismes que nous rencontrons. L'apoptose fait partie des moyens de défense de notre organisme. Les cellules infectées sont tuées par diverses méthodes : production de cytokines comme le TNF- α ou FasL, libération via perforine/granulysine des granzymes A/B/C [rev. 175], etc.. Les pathogènes ont du s'adapter et trouver des parades en exprimant des protéines qui vont protéger de l'apoptose les cellules infectées (qui sont non seulement leur réservoir mais le site de leur réplication). Certains virus ont acquis des gènes leur permettant même de retourner le phénomène apoptotique contre l'organisme comme par exemple le HIV qui détruit les cellules du système immunitaire.

1.1.1.1 Protéines pro-apoptotiques

Nous parlerons principalement des protéines exprimées par les virus, les protéines exprimées par l'hôte ayant été décrites précédemment. Beaucoup de virus utilisent pour pénétrer dans les cellules des récepteurs membranaires susceptibles d'induire l'apoptose comme, par exemple, le récepteur CAR-1 pour le virus ALV [180]. Ces récepteurs constituent donc des facteurs induisant l'apoptose même s'il est probable que ce soit involontaire dans ce cas. Par contre un certain nombre de virus induisent l'apoptose par des mécanismes régulés dans le but de faciliter la libération des virions néoformés ou de contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte [rev. 181, rev. 182].

1.1.1.2 Protéines ou facteurs anti-apoptotiques

La nécessité de protéger les cellules où ils se répliquent a poussé les virus à acquérir des protéines anti-apoptotiques, souvent homologues de celles que l'on retrouve dans les cellules [182] comme, par exemple : des inhibiteurs de caspase activée comme la protéine p35 du baculovirus [183, 184] ou CrmA du virus de la vaccine [185, 186], des protéines homologues de Bcl-2 comme la protéine adénovirale E1B-19K [187, 188] ou encore des protéines ciblant la dégradation ou l'inactivation de p53 comme la protéine d'adénovirus E1B-55K [189] ou la protéine E6 [190] du virus du papillome humain.

1.1.1.3 HSV et la modulation de l'apoptose

Les HSV sont exposés à divers facteurs pro-apoptotiques. En effet les stimuli induisant la réactivation sont, pour un certain nombre, pro-apoptotiques et il peut donc être avantageux pour le virus d'exprimer très tôt des facteurs protecteurs. De même, lors du cycle lytique dans les cellules épithéliales, le virus est plus vulnérable

à la réponse immunitaire de l'hôte [191]. Coder pour des protéines modulant l'apoptose induite par les cytokines libérées lui permettrait de prolonger sa phase productive. Plusieurs de ces facteurs protecteurs ont été trouvés grâce à des mutants de délétion comme Us5/gJ [192], ICP27 [193], ICP22 [194] ou plus surprenant le transcrit LAT, premier ARN anti-apoptotique [195]. Il a été démontré pour certains une action directe comme HSV-2 UL14 [196], la glycoprotéine Us5/gJ qui protège de l'apoptose induite par le FasL et le granzymeB [197], la protéine kinase Us3 [192, 198] qui bloque l'activation de Bad et le clivage de Bid par le granzyme B [199], gD qui protège de l'activation de Fas [200] ou la sous-unité R1 de la RR, sujet du présent ouvrage.

Le mécanisme d'action de UL14 n'est pas encore connu, toutefois cette protéine présente une homologie avec la protéine de choc thermique Hsp70 et une activité de chaperon moléculaire. Hsp70 interagit avec Apaf-1 pour empêcher la formation de l'apoptosome [201, 202] et avec AIF pour inhiber sa fonction [203]. Il est probable que UL14 ait un mécanisme similaire. Le mécanisme de Us5/gJ n'a pas encore été élucidé mais c'est une protéine membranaire qui semble avoir un rôle au niveau des mitochondries [192, 197]. Les expériences de protection ont été réalisées en stimulant Fas dans des cellules Jurkat (de type II [159]), donc dans un contexte où l'apoptose résulte de l'activation de la voie mitochondriale. De plus les autres inducteurs testés sont les UV et le granzymeB qui clive Bid. Ces stimulations conduisent à une activation de mécanismes apoptotiques passant aussi par les mitochondries. Il est à noter que dans le cadre de transfection stable d'un plasmide permettant l'expression inductible de Us5/gJ dans des cellules Jurkat, gJ ne confère qu'une protection partielle d'environ la moitié des cellules transfectées bien que les auteurs reconnaissent se situer à une concentration supra-physiologique [197]. La délétion de Us5/gJ n'entraîne qu'une diminution de la protection contre l'apoptose médiée par le granzymeB ce qui indique que d'autres protéines virales sont impliquées [192]. La protéine ICP27 agirait au niveau de l'activation de NF- κ B. En effet, les mutants viraux délétés pour cette protéine montre une rétention de NF- κ B dans le cytoplasme alors que le virus sauvage entraîne une relocalisation du facteur de transcription dans le noyau de la cellule. Cette translocation est nécessaire pour protéger les cellules de

l'apoptose induite par l'activation de TNFR-1 par le TNF- α . En effet alors que des cellules infectées par HSV-1 présentent une corrélation entre la translocation au noyau de NF- κ B et la survie des cellules, les cellules non infectées ou infectées mais exprimant un dominant négatif de I κ B qui empêche l'inhibiteur de libérer NF- κ B montrent une absence de relocalisation nucléaire de ce facteur et aucune résistance à l'apoptose [204]. Enfin la dernière protéine bien caractérisée est la protéine kinase virale Us3. Des études ont démontré que Us3 phosphoryle Bad sur un site différent de ceux utilisés par Akt/PKB (ser 136), RSK-1 et PKA (ser 112) ou même la sérine 155. Ces trois modifications sont responsables de la liaison à la protéine 14.3.3. La phosphorylation de Bad par Us3 pourrait entraîner une dégradation indépendante du protéasome [198]. Us3 phosphoryle également la protéine pro-apoptotique Bid et empêche ainsi son clivage par le granzymeB pour protéger les cellules infectées par HSV [199].

1.3 La RR

Pour répliquer leur matériel génétique, toutes les cellules, procaryotes comme eucaryotes, ont besoin de déoxyribonucléotides, éléments de base de leurs molécules d'ADN. La synthèse de ces éléments résulte principalement de la voie de synthèse *de novo* impliquant la réduction des ribonucléotides par la RR. La voie de préservation (*salvage pathway*) qui réutilise des déoxyribonucléotides déjà synthétisés [205] est relativement marginale [206, 207] et capable de fournir qu'un nombre très limité de déoxyribonucléotides à la cellule [208].

La RR catalyse la réduction des ribonucléotides 5' di-phosphates (NDP) en déoxyribonucléotides 5'-diphosphates (dNDP) [rev. 209]. Les ribonucléotides réductases décrites à ce jour ont été regroupées en trois (ou quatre) classes sur la base des co-facteurs requis pour la réaction [rev. 210]: (i) pour la classe I le cofacteur est un radical tyrosyl stabilisé par un centre diférrique. L'enzyme humaine et celle encodée dans le génome des HSV appartiennent au groupe I comme celle de la

bactérie *Escherichia coli* qui en est le prototype. (ii) Le cofacteur de la classe II est une adénosylcobalamine. On retrouve cette RR notamment chez *Lactobacillus leichmannii*. Les enzymes de cette classe catalysent majoritairement la réduction des nucléotides triphosphates plutôt que les diphosphates [rev. 211]. (iii) Le cofacteur utilisé par les RR de la classe III est un radical glycyyl généré par la S-adenosylmethionine et un groupe FeS. Le prototype de ces RR est celle qu'utilise *E. coli* en mode anaérobie. (iv) Celui de la classe IV est un radical tyrosyl stabilisé par un centre di-manganique. On retrouve une RR de cette classe chez *Corynebacterium ammoniagenes* [212]. L'existence d'une quatrième classe ne fait toutefois pas l'objet d'un consensus et elle est parfois regroupée avec la classe I [213].

1.3.1 La RR de *E. Coli*

L'enzyme de *E. coli* est constituée de deux sous-unités non identiques formant un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$. Ces sous-unités sont dénommées R1 (ou grande sous-unité, un homodimère composé de deux polypeptides de 90 kDa) et R2 (ou petite sous-unité, également un homodimère formé de deux polypeptides de 45 kDa). Les deux sous-unités de la bactérie *E. coli* ont vu leur structure tridimensionnelle élucidée séparément par cristallisation. La structure de l'hétérotétramère n'a pu être élucidée à ce jour. Toutefois, un modèle théorique, s'appuyant sur la structure des 2 sous-unités et sur l'analyse de la liaison de peptides mimant l'interaction de R2 sur R1, permet de se faire une bonne idée de ce que doit être la structure 3D de l'hétérotétramère [214-216]. R1 porte le site catalytique qui contient trois résidus cystéine alors que la sous-unité R2 porte un radical tyrosyl essentiel à l'initiation de la réaction. Ce radical, étant par nature très réactif, il est stabilisé par un centre diferrique pour éviter d'endommager la protéine [217]. Le transfert du radical à partir de Y122 sur R2 vers C439 sur R1 se ferait par des atomes d'hydrogène le long d'une chaîne de résidus longue de 35 Å environ [218].

1.1.1.1 Éléments de structure de R1

La sous-unité R1 peut être divisée en trois parties [219] (Fig.6). Un domaine N-terminal qui s'étend sur environ 220 acides aminés puis une structure en tonneau formée d'hélices α et de feuillets β qui couvre à peu près 500 acides aminés et enfin une région C-terminale dotée d'une queue flexible intervenant dans le transfert d'atome d'hydrogène de thioredoxine vers le site catalytique de l'enzyme. Dans le domaine en tonneau, un sous-domaine appelé « petit domaine » fait une excursion hors de la structure principale. Il contient les éléments structurés suivants : α B, β 4, α 14, α 15 et β 5 [219]. Toutefois bien qu'on puisse la décomposer en différents sous domaines, la sous-unité R1 n'est pas une protéine modulaire et il existe de nombreuses interactions entre ses différents domaines : par exemple, il existe, entre les feuillets β H et β I, une structure comprenant deux feuillets anti-parallèles (β 10 et β 11) contactant le domaine N-terminal [215]. La première partie de la protéine contient, principalement, les sites de régulation allostérique. La structure en tonneau ([15], Fig.6A) est formée de deux séries de 5 feuillets β anti-parallèles. Elle renferme les cystéines du site catalytique. Chaque feuillet β est relié au suivant par (au moins) une hélice α . Les hélices α A et α B servent de points de contact pour la dimérisation des polypeptides de la sous-unité R1 (Fig.6). La dimérisation nécessite également la présence d'ions Mg^{2+} . Une longue boucle intramoléculaire unit les feuillets β E et β F. De nombreuses liaisons hydrogènes entre cette boucle et les feuillets β forment un réseau qui permet de solidifier la structure de R1. Des liaisons hydrogènes existent également entre les feuillets β A et β F et β J et β E. D'autres sont présentes entre les divers feuillets d'une même moitié du tonneau. Les cystéines catalytiques sont au voisinage les unes des autres dans la structure tridimensionnelle, C225 à la base de β A, C439 au sommet de la grande boucle intramoléculaire, C462 au milieu de β F. Une région de contact étroit permet l'interaction de R1 et R2 [216, 219]. Les régions impliquées dans l'association des sous-unités ont été définies grâce à l'interaction de peptide mimant la queue C-terminale de R2. Il s'agit de α I, α 13, α 21, α 22 et du « petit domaine » [219].

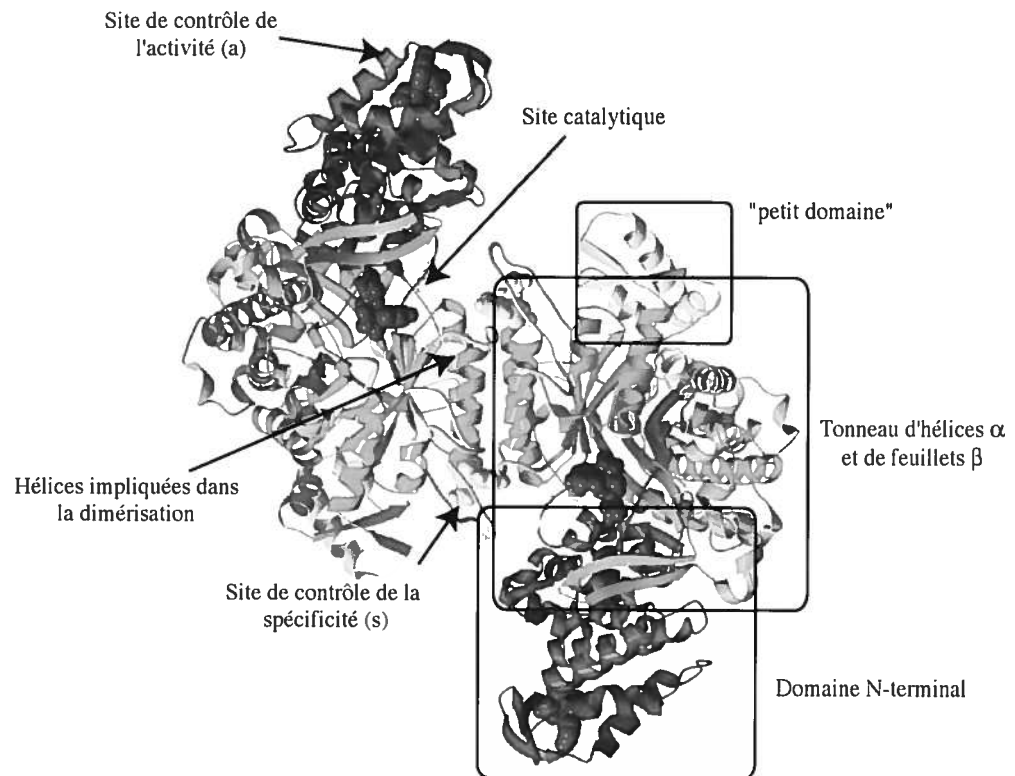


Figure 6 : Structure de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase de *E. coli*: Structure de la sous-unité R1 de *E. Coli* déterminée par des études de cristallisation. (D'après Eriksson *et al.*)

réseau qui permet de solidifier la structure de R1. Des liaisons hydrogènes existent également entre les feuillets βA et βF et βJ et βE . D'autres sont présentes entre les divers feuillets d'une même moitié du tonneau. Les cystéines catalytiques sont au voisinage les unes des autres dans la structure tridimensionnelle, C225 à la base de βA , C439 au sommet de la grande boucle intramoléculaire, C462 au milieu de βF . Une région de contact étroit permet l'interaction de R1 et R2 [216, 219]. Les régions impliquées dans l'association des sous-unités ont été définies grâce à l'interaction de peptide mimant la queue C-terminale de R2. Il s'agit de αI , $\alpha 13$, $\alpha 21$, $\alpha 22$ et du « petit domaine » [219].

1.3.1.2 Régulation allostérique

La réplication de l'ADN est un mécanisme précis qui doit limiter autant que possible les erreurs qui pourraient être dommageables à la cellule et à l'organisme [220]. Aussi est-il nécessaire que les quantités des quatre déoxyribonucléotides soient balancées, un excès ou une pénurie de l'un d'eux pouvant entraîner des erreurs de la polymérase.

La sous-unité R1 porte des sites de régulation allostérique, utilisant les ribonucléotides et les déoxyribonucléotides, qui permettent un approvisionnement adéquat de la machinerie de réplication [221]. Le site de contrôle général de l'activité de l'enzyme, site a, est sous le contrôle du dATP qui inhibe l'enzyme alors que le site de spécificité, site s, qui permet de balancer les concentrations de chacun des déoxyribonucléotides est régulé par les niveaux de dTTP, dGTP, dATP et ATP. L'ATP stimule la réduction du CDP et de l'UDP, le dTTP stimule la réduction du dGDP. Le dGTP stimule la réduction de l'ATP. Enfin le dATP joue le rôle d'inhibiteur. Seul le dCTP n'intervient pas dans la régulation de l'activité enzymatique.

1.3.1.2 Régulation allostérique

La réplication de l'ADN est un mécanisme précis qui doit limiter autant que possible les erreurs qui pourraient être dommageables à la cellule et à l'organisme [220]. Aussi est-il nécessaire que les quantités des quatre déoxyribonucléotides soient balancées, un excès ou une pénurie de l'un d'eux pouvant entraîner des erreurs de la polymérase.

La sous-unité R1 porte des sites de régulation allostérique, utilisant les ribonucléotides et les déoxyribonucléotides, qui permettent un approvisionnement adéquat de la machinerie de réplication [221]. Le site de contrôle général de l'activité de l'enzyme, site a, est sous le contrôle du dATP qui inhibe l'enzyme alors que le site de spécificité, site s, qui permet de balancer les concentrations de chacun des déoxyribonucléotides est régulé par les niveaux de dTTP, dGTP, dATP et ATP. L'ATP stimule la réduction du CDP et de l'UDP, le dTTP stimule la réduction du dGDP. Le dGTP stimule la réduction de l'ATP. Enfin le dATP joue le rôle d'inhibiteur. Seul le dCTP n'intervient pas dans la régulation de l'activité enzymatique.

1.3.2 La RR des mammifères

1.3.2.1 Expression et stabilité des sous-unités

Les modèles de structure prévoient la conservation de la plupart des éléments trouvés chez *E. coli* pour les RR de mammifère. Toutefois, un certain nombre de points permettent de les distinguer. La dimérisation des polypeptides composant la R1 de souris nécessite la présence de nucléotides, ce qui n'est pas le cas pour la sous-unité bactérienne (ni herpétique comme on le verra plus tard). L'expression des gènes des sous-unités R1 et R2 est liée au cycle cellulaire; les protéines sont exprimées presque exclusivement lors de la synthèse de l'ADN [222]. R1 est une protéine ayant une demi-vie de 24 heures alors que R2 est rapidement dégradée [222]. De ce fait l'activité RR dans les cellules humaines est également contrôlée par la présence ou

l'absence de R2 [223, 224], R1 jouant un rôle moindre à ce niveau [225, 226]. Les cellules quiescentes, comme les neurones par exemple, sont dépourvues d'une activité ribonucléotidase réductase suffisante pour permettre la synthèse d'une molécule d'ADN. Il a été démontré chez l'humain l'existence d'un homologue de R2 dont l'expression est sous le contrôle de p53 et qui servirait à fournir des déoxyribonucléotides pour effectuer des réparations d'urgence des molécules d'ADN [227]. Ceci implique un niveau basal d'expression du gène de R1. En effet, aucun homologue de R1, éventuellement inductible par p53, n'a été décelé dans le génome à ce jour. La sous-unité p53R2 aurait une localisation nucléaire à l'opposé des sous-unités R1 et R2 qui sont elles cytoplasmiques [228] : ceci implique une relocalisation de R1 en cas de réparation.

1.3.2.2 Modèle alternatif de régulation allostérique

Récemment, un nouveau modèle de régulation allostérique [229-231] propose l'existence d'un nouveau site de régulation (site d'hexamérisation ou site h). Ce modèle apporte également des changements majeurs dans la dynamique et la topologie d'association des sous-unités. D'après ce modèle, la sous-unité R1 existerait sous trois formes : dimère (transition contrôlée par le site s), tétramère (R1_{4a} et R1_{4b}, cette dernière étant la moins active des 2 mais la plus abondante) (transition contrôlée par le site a) et hexamère (transition contrôlée par le site h).

Les complexes formés par R2₂ et R1₂ ou R1₆ sont les deux formes actives de l'enzyme; la forme hexamérique est la plus active alors que la forme dimérique serait utilisée pour les synthèses nucléaires de déoxyribonucléotides consommés pour la réparation de l'ADN. Le passage entre les différents états d'oligomérisation des sous-unités serait contrôlé par le rapport ATP/dATP, l'ATP déplaçant l'équilibre en faveur des formes les plus actives.

Le modèle tridimensionnel proposé obligerait à redéfinir la surface de contact entre R1 et R2. En effet dans ce modèle les régions de R1 où se fixe R2 sont à l'intérieur d'un cylindre creux formé par les R1. Les auteurs ont défini un site permettant l'association pour R2 à la périphérie de cette structure mais il semble très peu

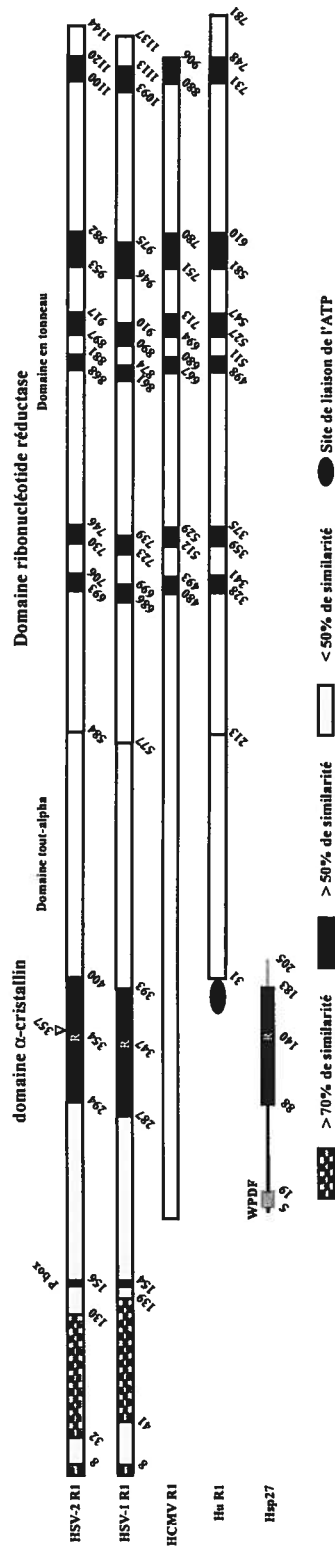


Figure 7 : Alignement schématique des sous-unités R1 des HSV-1 et -2, la sous-unité de HCMV (pour laquelle une activité anti-apoptotique a été démontrée), la sous-unité humaine (sans activité anti-apoptotique) et la protéine chaperonne Hsp27. L'indication P box correspond à un enchainement de résidus proline. La région en noir représente le domaine alpha-cristallin. Le résidu R est une arginine qui semble jouer un rôle très important dans la stabilité du domaine α -cristallin. Le domaine tout-alpha correspond à l'extrémité N-terminale chez *E. coli*. Le domaine en tonneau correspond au domaine en tonneau d'hélices α et de feuillets β (ces deux derniers domaines sont représentés dans la Fig. 6). Le domaine WPDF présent dans Hsp27 semble jouer un rôle dans l'oligomérisation des sHsp. Il est à noter que le domaine de régulation allostérique de l'activité ribonucleotide réductase a été remplacé par une extension amino-terminale pour les sous unités virale.

probable qu'une telle association soit fonctionnelle car la chaîne de résidus indispensables au transfert du radical réactif n'est pas alors conservée. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour valider le modèle et il sera nécessaire de bâtir une structure tridimensionnelle qui respecte l'association de R1 et R2 pour former une enzyme active.

1.3.3 Les RR des virus herpès

On peut diviser les virus herpès en deux groupes sur la base de l'existence d'une activité ribonucléotide réductase d'origine virale : les virus des classes α et γ , connus à ce jour, encodent tous dans leur génome les gènes nécessaires à une activité ribonucléotide réductase [232] alors que les virus herpès de la classe β (HCMV, HHV-6 et HHV-7) possèdent des homologues de HSV R1 [rev. 233, rev. 234, 235, 236] sans qu'un cadre de lecture n'ait pu être détecté pour un homologue de R2 [237, 238]. L'analyse de leur séquence nucléotidique a fait apparaître que des résidus catalytiques leur faisaient défaut. [232, 237]. Leur fonction n'est pas la réduction des déoxyribonucléotides [239], même si dans un premier temps cette hypothèse avait été envisagée pour l'homologue de la sous-unité R1 chez le CMV murin [240] (l'activité détectée étant en fait une modulation de l'activité ribonucléotide réductase cellulaire [239]). Comme ces virus n'ont pas la nécessité de maintenir une activité RR, la conservation au cours de l'évolution des virus herpès de la seule sous-unité R1 plaide pour qu'une autre fonction lui soit associée. Il a été démontré que M45, l'homologue de R1 chez MCMV, possède un potentiel anti-apoptotique contre l'action du virus lui-même dans les cellules endothéliales [238]. De plus la délétion de UL45 (l'homologue de R1 chez HCMV) sensibilise les cellules à l'apoptose induite par l'activation de Fas [241].

Les sous-unités des virus et des mammifères bien que partageant de nombreux points communs sont incapables de s'associer pour former une enzyme active [242]. L'association hétérologue de sous-unités provenant de virus herpès (même voisins) peut donner des activités partielles ou nulles : par exemple l'association de la R1 de HSV-1 avec la R2 de EHV-4 (un virus herpès de classe α) donne une activité presque

nulle là où l'association de la R1 de EHV-4 avec la R2 de HSV-1 conserve les deux tiers de l'activité [243].

1.3.2.1 La RR des HSV

Une activité RR différente de celle présente normalement dans les cellules humaines a pu être détectée dans les cellules infectées par les HSV [244], ses caractéristiques majeures étant une insensibilité à la rétro inhibition par le dTTP et le fait que cette activité ne requérait pas de Mg^{2+} . Cette activité distincte fut confirmée par la suite [245], puis l'enzyme partiellement purifiée et caractérisée [246]. Toutefois, on ne pouvait dire s'il s'agissait d'une activité virale ou d'une activité humaine induite par l'infection virale. La confirmation que les HSV codent pour leur propre RR est venue de la reconstitution de l'activité enzymatique à partir de virus thermosensibles [247] et du séquençage du génome viral [248]. La RR des HSV est une enzyme essentielle pour leur réactivation dans les neurones [249-251].

A la différence des sous-unités décrites ci-dessus, HSV R1 possède une extension amino-terminale d'environ 400 acides aminés appelé domaine NH_2 [252] : cette extension n'est retrouvée pour aucun des homologues de HSV R1 chez les virus herpès connus à ce jour. HSV R1 a la particularité de migrer sur gel dénaturant autour de 140 kDa bien qu'elle ait un poids moléculaire de 125 kDa en raison de la présence de résidus chargés dans son extension N-terminale. Ce domaine n'est pas requis pour l'activité enzymatique [253] mais il interagirait avec le domaine réductase [254]. De plus, aucun site de contrôle allostérique n'est conservé pour la sous-unité herpétique. Il a été observé que HSV R1 était plus stable à la chaleur que son homologue cellulaire [242].

L'association des deux dimères pour former le tétramère actif engendre un changement conformationnel qui permet un contact encore plus étroit entre les polypeptides de chacune des sous-unité [255].

Il a été établi, par immunofluorescence et grâce à des protéines fusionnées à la protéine fluorescente verte (GFP), que la localisation de HSV R1 est cytoplasmique [15, 256], bien que des articles anciens ait rapporté une localisation péri-membranaire

ou trans-membranaire [257, 258]. Toutefois le même groupe a également rapporté une localisation cytoplasmique (forme phosphorylée de la protéine et protéine dans la phase tardive de l'infection) [259]. Dans la particule virale mature, HSV R1 pourrait être présente dans le tégument [260]. Cette observation est renforcée par le fait que l'homologue de HSV R1 chez le HCMV est retrouvé lui aussi dans le tégument du virion [239, 241].

1.3.2.2 Cinétiques d'expression au cours de l'infection

Au cours d'une infection herpétique, bien que classée comme précoce, la sous-unité R1 de la RR (nommée ICP6 pour HSV-1, ICP10 pour HSV-2) commence à être détectable dans la phase très précoce [72, 74] en absence de son partenaire R2 [256]. Elle s'accumule à haut niveau jusqu'à la fin du cycle lytique. HSV R1 possède en effet un site consensus pour α -TIF (là où les autres protéines IE en possèdent plusieurs) ainsi que des sites de régulation de gène E [261]. En plus d'être exprimée plus précocement que son partenaire R2, HSV R1 et R2 sont produites en excès (\approx dix fois) par rapport au niveau requis pour la réduction des déoxyribonucléotides. Il en est de même d'ailleurs pour la RR de BHV-2 [262].

Au cours de la réactivation du virus dans les neurones, il est à noter que le patron d'expression des gènes est considérablement modifié. Des gènes précoces sont exprimés comme des gènes très précoces. Parmi ces gènes, celui de la sous-unité R1 va s'exprimer avant que les protéines IE ne soit détectables [70, 71].

1.3.2.3 Autres fonctions de la sous-unité R1

Le caractère unique du domaine NH₂ ainsi que la cinétique de R1 au cours de l'infection rendent possible une ou des fonction(s) supplémentaire(s) pour HSV R1 dans laquelle pourrait être impliquée son extension N-terminale. Plusieurs laboratoires ont essayé de les définir. Pour étudier la fonction de HSV R1, le gène entier [251] ou le domaine réductase seulement (par insertion du gène lacZ à la position 434 [250]) ont été délétés (mutants ICP6 Δ ou *hrR3*). Ces travaux ont

confirmé le caractère essentiel de l'enzyme pour la multiplication du virus dans des cellules quiescentes [249, 251]. D'autres résultats indiquent que le virus mutant pousse moins bien à 39,5 °C qu'à 37 °C dans des cellules en croissance exponentielle. Est-ce dû à la disparition d'un facteur compensatoire (i.e. la RR cellulaire) ou à la perte d'une fonction de R1 qui pourrait être essentielle en cas de fièvre par exemple? (Activité de chaperon moléculaire ? La question sera abordée plus en détail dans la discussion générale). Les travaux concernant ces derniers résultats n'ont pas été poursuivis mais ces mutants sont utilisés dans des essais comme virus oncolytiques en thérapie anti-cancéreuse [263, 264].

Une activité protéine kinase (PK) [265], suggérée par la présence de séquences consensus de PK au sein du domaine NH₂, a été écartée par une série d'expériences menées par divers laboratoires [266, 267]. Cette activité kinase résulte en fait de la copurification de PK cellulaires. L'implication de HSV R1 dans les voies de signalisation intracellulaire (potentiel oncogénique [258, 268-270], apoptose [271-275]) a également été étudiée mais la plupart des travaux font référence à la supposée activité protéine kinase de HSV R1 ou à une localisation transmembranaire de cette protéine.

Une protéine tronquée de son extension amino-terminale a été produite dans un système adénoviral pour essayer de réaliser des travaux de cristallographie (les préparations purifiées de la protéine sauvage se prêtant mal aux contraintes de cette technique d'analyse). Cette protéine s'est révélée être non seulement peu soluble mais aussi très fortement pro apoptotique [13]. Cette observation a permis de postuler une fonction pour R1 dans la modulation de l'apoptose [276].

1.3.2.4 Études sur des peptides inhibiteurs de l'activité enzymatique de la RR des HSV

Dans le but d'inhiber l'activité enzymatique de la RR des HSV-2, des anticorps neutralisants dirigés contre l'extrémité C-terminale de HSV-2 R2 ont été générés grâce à un nonapeptide. Ce nonapeptide s'est révélé être lui-même inhibiteur de l'activité enzymatique [9]. Cette découverte a donné lieu à une série d'études visant à

mettre au point des analogues de ce peptide qui pourrait être utilisés comme agents thérapeutiques [12]. Même si, finalement, aucun médicament anti-viral n'a été développé à partir de ce peptide, celui-ci a eu des applications très intéressantes notamment en cristallographie [219]. En effet, l'association d'un peptide mimant l'extrémité C-terminale de la R2 de *E. coli* avec la sous-unité R1 bactérienne a permis sa résolution en stabilisant la structure de la protéine. Le peptide inhibiteur se fixe dans un sillon formé par les hélices αI et $\alpha 13$ et établit des contacts avec la seconde moitié de la structure en tonneau ainsi que le petit domaine [219].

1.4 Activité de chaperon moléculaire

L'existence d'une protéine peut être divisée en plusieurs phases : sa synthèse (comprenant son éventuel transport et sa maturation), sa phase d'activité biologique (plus ou moins longue) et sa dégradation (éventuellement préjudiciable à la cellule). Au cours de ces différentes phases, des molécules vont aider les protéines pour : (i) assurer leur repliement pour atteindre leur état natif, (ii) rejoindre des complexes multi protéiques et le cas échéant les orienter vers leur dégradation, (iii) les maintenir dans un état de repliement correct suite à des stress et les renaturer , (iv) permettre leur élimination par des processus acceptables pour la cellule [rev. 277]. Parmi ces molécules, les protéines dotées d'une activité de chaperon moléculaire jouent un rôle majeur. La plupart de ces protéines sont également des protéines de choc thermique.

1.4.1 Les protéines de choc thermique (Hsp)

Les cellules isolées ou au sein d'organismes sont soumises à des chocs ou des stress qui pourraient leur être dommageables. Il est nécessaire pour toute cellule d'avoir un ensemble de mécanismes de réparation. Ceux-ci sont bien connus pour l'ADN. Pour les protéines, le système majeur est composé des protéines de choc thermique. Plusieurs familles ont été définies [rev. 277]. Elles sont classées en fonction de leur poids moléculaire mais elles correspondent également à des fonctions biologiques différentes. Protéines de 90 kDa (Hsp90), de 70kDa (Hsp70, DnaK, ..), de 60 kDa

(Hsp60, GroEL, ..) et de 40 kDa (Hsp40, DnaJ, ..). La fonction biologique des protéines de type Hsp60 et 70 nécessite l'hydrolyse d'ATP. Ces diverses protéines forment souvent des complexes et il semble que ces oligomères sont la forme active ou au moins plus active de ces protéines. Il existe également des co-chaperons qui jouent un rôle important dans ces processus. Les protéines de type Hsp70 participent au bon repliement des protéines néo-synthétisées et au repliement de protéines dénaturées par un stress.

Les mécanismes employés pour replier les protéines correctement que ce soit en cours de synthèse ou après un choc semblent être les mêmes [278]. Les chaperons moléculaires lient des surfaces hydrophobes de la protéine, qui indûment exposées pourraient conduire à des agrégations ou à la formation de structures non appropriées (repliement incorrect). Elles libéreront ces surfaces lorsque la structure formée par les autres résidus permettra que les régions ainsi séquestrées prennent place de façon appropriée dans la protéine. Le rôle des chaperons moléculaires est beaucoup plus important pour les protéines de haut poids moléculaire ou constitué de domaines que pour les protéines de faible poids moléculaire. La délétion de GroEL chez *E. coli* entraîne des erreurs de repliement pour environ le tiers des protéines bactériennes [279]. Les protéines de choc thermique sont exprimées à un niveau basal dans les cellules et leur expression est fortement activée suite à un stress. Le bon repliement des protéines n'est pas le seul rôle que l'on ait assigné aux chaperons moléculaires. Par exemple, récemment, un rôle dans l'architecture cellulaire a été proposé pour ces protéines [rev. 280, rev. 281, 282].

Deux autres classes de Hsp existent. Les 100 kDa et les petites Hsp qui sont détaillées ci-dessous. Elles sont également impliquées dans les processus de repliement des protéines. Les Hsp de 100 kDa (Hsp104, ClpA) ont un mécanisme pour l'instant mal défini et semblent être capables de solubiliser certains agrégats.

1.4.2 Les petites protéines de choc thermique (sHsp)

La principale caractéristique des sHsp est la présence du domaine α -cristallin [rev. 283] (environ 100 acides aminés situés près du domaine C-terminal qui est

généralement très court). Le domaine α -cristallin est constitué de feuillet β qui forment une structure semblable aux immunoglobulines [284]. La superposition des deux moitiés du domaine ressemble à un sandwich de feuillet β capable de lier les surfaces hydrophobiques exposées des protéines dénaturées. La structure des protéines comprenant un domaine α -cristallin les rend extrêmement stables ce qui leur permet d'agir comme protéines de première ligne après un stress cellulaire. Originellement leur nom leur vient de la découverte dans le cristallin de l'œil, tissu particulièrement concentré en protéines, de polypeptides permettant d'empêcher la formation d'agrégats propres à gêner la vision (α A et α B cristallin). Les protéines avec un domaine α -cristallin sont particulièrement nombreuses chez les plantes où certaines possèdent même plusieurs domaines [285]. Cette particularité pourrait être lié au fait que les plantes étant statiques subissent plus d'agressions environnementales que les animaux.

Plusieurs maladies ou désordres ont été associés à la mutation du domaine α -cristallin : par exemple la cataracte héréditaire [286] et la myopathie liée à la desmine [287, 288]. Toutefois, tous les tissus n'expriment pas les sHsp, il ne semble pas que leur présence soit absolument essentielle aux cellules (au moins en culture et dans certains organes).

Les sHsp, qui ont un poids moléculaire de 12 à 43 kDa, remplissent diverses fonctions biologiques (comme par exemple ce qui nous intéressera par la suite, la modulation de l'apoptose). Au moment du choc thermique, elles vont lier rapidement les protéines en train de se dénaturer pour les maintenir dans un état compétent pour être renaturées par les Hsp de plus haut poids moléculaire [289, 290]. Elles évitent ainsi la formation d'agrégats insolubles qui pourraient conduire les cellules à la mort. A la différence des Hsp de plus haut poids moléculaire, elles sont ATP indépendantes. Ces protéines forment des structures oligomériques de taille variable (9 à 32 sous-unités, homo ou hétéro oligomères). Cet état de multimérisation semble essentiel pour certaines des sHsp [291] mais pas absolument nécessaire pour d'autres [292]. Les seules structures 3D qui sont disponibles sont celles de Hsp16.6 de *Methanococcus jannaschii* [293] et de TaHsp16.9 du blé [294]. Le multimère de Hsp16.6 forme une sphère creuse constituée par 24 sous-unités. La surface de la

sphère est composée par l'association de domaines α -cristallin. Le domaine N-terminal semble être à l'intérieur de la sphère alors que le domaine C-terminal est à l'extérieur.

1.4.3 Activité de chaperon moléculaire et apoptose

Les Hsp semblent intervenir à de multiples niveaux dans les mécanismes apoptotiques le plus souvent comme régulateurs négatifs mais aussi parfois positivement.

Contrôle de la voie intrinsèque : Hsp90 peut agir sur la voie mitochondriale en modulant la formation de l'apoptosome [295]. De plus elle lie directement Akt pour la stabiliser [296]. Hsp70 joue également un rôle de régulateur positif de la voie Akt [297]. Cette Hsp lie Apaf-1 via son domaine CARD pour empêcher le clivage de la procaspase-9 [298]. Elle peut également antagoniser l'effet de AIF [203]. Récemment une protéine du tégument de HSV, UL14, qui possède une activité de chaperon moléculaire et une homologie avec Hsp70 [299], a été décrite comme une protéine anti-apoptotique [196]. La forme cytosolique de Hsp60 est capable de lier Bax pour l'inactiver [300]. Hsp27, le prototype des sHsp, joue un rôle dans le contrôle de l'apoptose provoquée par de nombreux inducteurs [rev. 301, rev. 302] ; son effet sur la voie intrinsèque a été étudiée (ex : liaison au cytochrome C) [295, 303]. Le domaine α -cristallin seul est capable lui aussi de prévenir l'apoptose, par exemple, celle induite dans le cristallin par les rayons UVA [305]. Récemment le caractère pro-apoptotique de la surexpression de la sHsp H11 a été démontré; de plus un mutant de cette protéine H11W51C est capable d'inhiber cette apoptose [306].

Contrôle de la voie extrinsèque : Hsp90 peut également intervenir sur la voie des récepteurs en liant RIP pour le stabiliser (favorisant le complexe I) [307]. Elle peut également stabiliser, avec cdc37, le complexe IKK qui va permettre de générer une réponse anti-apoptotique [308]. Hsp70 est connue pour réguler l'activation de la voie JNK, ce qui permet une régulation au niveau de la voie Bid-dépendante mais aussi sur l'expression des gènes régulés in fine par cette kinase [309, 310]. l'action de Hsp27 sur l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire a également été

décrite notamment pour le ligand de Fas (ex : en prévenant la translocation de daxx) [311, 312].

À un niveau plus tardif au cours de la cascade apoptotique il a été démontré que Hsp60 pouvait intervenir dans la maturation de la procaspase-3 par un mécanisme dépendant de l'ATP suggérant l'implication de son activité de chaperon moléculaire [313]. Hsp70/Hsp40 semblent également intervenir dans la formation du complexe ICAD/CAD, un des substrats de la caspase-3 et qui est responsable une fois activé de la fragmentation de l'ADN [314].

1.5 Description du projet de recherche

Le développement à partir des HSV de nouveaux vecteurs viraux utilisables en thérapie génique rend nécessaire la compréhension de la fonction des différentes protéines encodées par le génome de ces virus. Le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 présente dans ce cadre un intérêt bien compréhensible surtout du fait que certains de ces vecteurs sont défectifs pour cette protéine. L'exemple de v-FLIP nous montre également qu'il peut se révéler très intéressant de comprendre le mécanisme d'action de HSV R1 afin de mieux appréhender le phénomène de l'apoptose en général. Enfin la connaissance des différents éléments qui contribuent à la pathogénicité des HSV pourrait, peut être à plus long terme, permettre d'envisager de nouvelles formes de traitement contre ces virus. Pour ces raisons, il faut être à même de mesurer la contribution réelle des différentes fonctions de HSV R1 à la pathogénicité du virus. Des études *in vitro* sur des lignées de cellules ou sur des cultures primaires de cellules cibles du virus constituent une première étape avant d'utiliser des modèles animaux coûteux.

L'objectif global du projet de recherche est de définir le rôle de la fonction anti-apoptotique de HSV-2 R1 dans la pathogénèse virale. Le premier objectif intermédiaire est de caractériser la fonction anti-apoptotique de R1 découverte précédemment. C'est à dire de déterminer son spectre d'action, de préciser à quel niveau intervient ce potentiel dans la cascade apoptotique, de vérifier que la fonction est propre à R1 et que ce potentiel est conservé lors d'une infection herpétique. Le

deuxième objectif était de générer un mutant viral déficient pour le potentiel anti-apoptotique mais conservant son activité ribonucléotidase réductase. Pour réaliser cet objectif nous voulions délimiter aussi finement que possible la (ou les) région(s) impliquée(s) dans le potentiel de R1. Nous avons alors planifié une série de délétions dans le domaine N-terminal unique de HSV R1, dont on sait qu'il n'est pas nécessaire pour l'activité enzymatique, que nous avons étendue à la protéine dans son entier. Ensuite, cette étude fut précisée par une approche alternative à savoir l'utilisation de la R2 qui lie R1 sur une de ses surfaces. Enfin, nous avons comme troisième objectif d'élucider le mécanisme d'action de R1 : pour guider notre travail nous savions que R1 agissait en amont ou au niveau de l'activation de la procaspase-8.

La découverte en cours de projet d'une homologie de séquence entre la région \approx 300-400 de HSV R1 et le domaine α -cristallin des sHsp nous a conduit à examiner s'il existerait une relation entre la protection contre l'apoptose conférée par HSV R1 et son activité de chaperon moléculaire.

1.6 Rappel des résultats obtenus

Nous avons démontré que HSV R1 possède un potentiel anti-apoptotique et que celui-ci était spécifique de la voie des récepteurs de mort cellulaire. HSV R1 agit au niveau ou en amont de l'activation de la procaspase-8 [14]. La région de la protéine impliquée semble être constituée par la plus grande partie du domaine RR à l'exception de la surface liant HSV R2 [15]. Des régions un peu en amont du domaine RR pourraient être impliqués mais cela reste difficile à démontrer. HSV R1 possède également une activité de chaperon moléculaire qui pourrait être portée par une région homologue au domaine α -cristallin du α B-cristallin [17]. Ce domaine joue en effet un rôle très important dans le bon repliement de la protéine [15].

Chapitre II : Résultats (articles et résultats supplémentaires)

2.1 : La sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex protège les cellules de l'apoptose au niveau ou en amont de l'activation de la caspase-8 (*The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation.* Auteurs: Yves Langelier, Stéphane Bergeron, Stéphane Chabaud, Julie Lippens, Claire Guilbault, A. Marie Josée Sasseville, Stéphan Denis, Dick D. Mosser et Bernard Massie.)

Contribution personnelle: En transférant le gène de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase du virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2 R1) au moyen de vecteurs adénoviraux, des travaux préalables à mon arrivée au laboratoire avaient démontré le potentiel anti-apoptotique de HSV-2 R1. J'ai démontré que: i) aucune protéine adénovirale n'était nécessaire en transférant le gène de HSV-2 R1 par transfection (Fig.s3). ii) la protection conférée par HSV-2 R1 était spécifique de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort cellulaire en testant différents agents pro-apoptotiques induisant la mort cellulaire par activation des voies intrinsèques (voie mitochondriale) ou extrinsèques (Fig.2). iii) HSV-2 R1 bloquait l'activation de la caspase 8 par le TNF et ceci par différentes approches (Fig.3). iv) lors d'une infection herpétique, les virus HSV-1 et -2 étaient capables de protéger les cellules de l'apoptose induite par le TNF et que la cinétique d'apparition de cette protection était compatible avec la cinétique d'expression de HSV-2 R1 (Fig.4). v) un mutant déficient pour R1 n'était capable de bloquer l'apoptose induite par le TNF que de façon partielle, indiquant l'importance de HSV-2 R1 mais aussi l'implication d'autres gènes viraux dans la protection des cellules au cours d'une infection herpétique (Fig.5 et 6). vi) le domaine amino-terminal de HSV-2 R1 seul n'était pas suffisant pour conférer une protection aux cellules (Fig.7)

Contribution des co-auteurs:

Stéphane Bergeron, un étudiant qui a réalisé sa maîtrise dans le laboratoire du docteur Langelier, a été le premier à démontrer l'existence du potentiel anti-apoptotique de la sous-unité R1 (Fig.1). Il a également déterminé le niveau minimal de HSV-2 R1 requis pour avoir une protection efficace (Fig.s1). Il a ensuite démontré que le transactivateur (tTA) n'était pas requis pour la protection en exprimant la protéine

HSV-2 R1 sous le contrôle d'un promoteur constitutif de cytomégalo virus (CMV5) dans des lignées cellulaires n'exprimant pas le tTA (Fig.s2).

Les autres co-auteurs ont apporté leur contribution pour la construction de vecteurs recombinants, production de stock viraux, aide technique pour la réalisation de certaines expériences, pour la rédaction de l'article et pour la conception et la direction du travail.

Journal of General Virology (2002), 83, 2779–2789.

The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation

Yves Langelier,^{1,2} Stéphane Bergeron,¹ Stéphane Chabaud,¹ Julie Lippens,^{†1} Claire Guilbault,^{1,3} A. Marie-Josée Sasseville,¹ Stéphan Denis¹, Dick D. Mosser^{‡3} and Bernard Massie^{2,3,4}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

²Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal, Québec, Canada

³Institut de recherche en biotechnologie, 6100 ave Royalmount, Montréal, Canada, H4P 2R2

⁴INRS-IAF Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

Author for correspondence: Yves Langelier (at Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal).

Fax +1 514 412 7590. E-mail: yves.langelier@umontreal.ca

[†]**Present address:** Shire-Biochem inc., 275, Armand-Frappier Blvd, Québec, Canada H7V 4A7

[‡]**Present address:** Molecular Biology and Genetics, The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1

Summary

The R1 subunit of herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase, which in addition to its C-terminal reductase domain possesses a unique N-terminal domain of about 400 amino acids, is thought to have an additional, yet unknown, function. Here, we report that the full-length HSV-2 R1 has an anti-apoptotic function able to protect cells against death triggered by the expression of R1(Δ 2-357), an HSV-2 R1 subunit with its first 357 amino acids deleted. We further substantiate the R1 anti-apoptotic activity by showing that its accumulation at low level could completely block apoptosis induced by TNF-receptor family triggering. Activation of caspase-8 induced either by TNF or by Fas ligand expression was prevented by the R1 protein. As HSV R1 did not inhibit cell death mediated by several agents acting via the mitochondrial pathway (Bax overexpression, etoposide, staurosporine and menadione), it is proposed that it functions to interrupt specifically death receptor-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation. The N-terminal domain on its own did not exhibit anti-apoptotic activity, suggesting that both domains of R1 or part(s) of them are necessary for this new function. Evidence for the importance of HSV R1 in protecting HSV-infected cells against cytokine-induced apoptosis was obtained with the HSV-1 R1 deletion mutants ICP6 Δ and *hrR3*. These results show that, in addition to its ribonucleotide reductase function, which is essential for viral reactivation, HSV R1 could contribute to viral propagation by preventing apoptosis induced by the immune system.

Introduction

The mechanisms for the establishment of latent infection by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in neurons and the subsequent reactivation are poorly understood. During latency, a single HSV gene, the latency associated transcript (LAT) gene, is transcribed and is essential for efficient reactivation. Recently, it was shown that LAT promotes neuronal survival after HSV-1 infection by impairing apoptosis (Ahmed *et al.*, 2002, Perng *et al.*, 2000). During reactivation, the pattern of gene expression is different from that observed in the lytic cycle: the expression of early (E) genes, notably the gene for the R1 subunit of ribonucleotide reductase (RR), begins several hours before detectable expression of the immediate early (IE) genes (Nichol *et al.*, 1996, Talsinger *et al.*, 1997). In animal models, HSV can be reactivated by numerous stress conditions including NGF deprivation and hyperthermia, which are also known to induce neuronal cell apoptosis. Therefore, it might be advantageous for the virus to encode a protein(s), that is able to block the apoptotic pathways activated by these stimuli. Hence, it is not surprising that several HSV genes, including the E protein kinase U_S3, the glycoprotein gJ (U_S5), the IE proteins ICP22 and ICP27, have been shown to be involved in the inhibition of apoptosis induced by diverse stimuli such as osmotic or thermal shock (Koyama & Miwa, 1997, Leopardi & Roizman, 1996), the anticancer drug cisplatin (Zachos *et al.*, 2001) or by the virus itself (Asano *et al.*, 1999, Aubert & Blaho, 1999, Jerome *et al.*, 1999, Leopardi *et al.*, 1997). In addition, such proteins could be important in counteracting the action of cytotoxic T lymphocytes and cytokines that limit virus dissemination in cells of the mucosal epithelia where the virus replicates after being released from neurons (Jones *et al.*, 2000, Nash, 2000). Thus, it has been shown that HSV renders infected cells resistant to cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis (Jerome *et al.*, 1998).

The HSV RR converts ribonucleoside diphosphates to the corresponding deoxyribonucleotides and plays a key role in the synthesis of viral DNA (reviewed in Conner *et al.*, 1994). The association of two homodimeric subunits, denoted R1 and R2, the former containing the active site, forms the holoenzyme. The R1 subunits of HSV-1 and HSV-2 possess an N-terminal domain of about 400 amino acids that is

not found in R1 of other species (Nikas *et al.*, 1986). Because of its unique N-terminal domain and a pattern of expression different from that of its R2 partner, it has been suggested that HSV R1 could have a dual function. Interestingly, the cytomegalovirus (CMV)-encoded R1, which is thought not to be involved in ribonucleotide reduction, was recently shown to play a role in the control of apoptosis induced by the virus itself in endothelial cells (Brune *et al.*, 2001). A study of the homologous gene of a related β -herpesvirus, human herpesvirus 7 (HHV-7), revealed that the gene does not express a functional RR subunit, and it was concluded that R1 could have a different function not only in HHV-7 but also in other β -herpesviruses (Sun & Conner, 1999).

Studies with HSV-1 R1 mutants, first carried out with cultured cells, showed that the enzyme is required for efficient replication in non-dividing cells. Subsequently, experiments using animal models demonstrated that the enzyme is required for efficient pathogenicity and is essential for virus reactivation from the neurons, but is not essential for the establishment of latency (Goldstein & Weller, 1988a, Goldstein & Weller, 1988b, Jacobson *et al.*, 1989, Brandt *et al.*, 1991). The observations that a mutant virus bearing a deletion of the RR domain of the R1 gene (*hrR3*) exhibited the same phenotype in cell culture or in animal models as another virus with a deletion of both the N-terminal and RR domains (ICP6 Δ) have suggested that the N-terminal domain may play only a minor role in viral pathogenesis (Goldstein & Weller, 1988a, Goldstein & Weller, 1988b, Jacobson *et al.*, 1989). However, viral mutants that contain deletions only of the R1 N-terminal domain have not yet been characterized for their capacity to reactivate. Therefore, an important role of this domain in HSV reactivation could have been masked by the RR deficiency of the two mutants, which by itself completely prevents virus replication in the latently infected neurons.

The view that a protein kinase activity could be intrinsic to the unique N-terminal domain of the HSV R1 (Chung *et al.*, 1989, Cooper *et al.*, 1995, Paradis *et al.*, 1991) has recently been ruled out by extensive biochemical work showing that R1 does not possess such an activity but rather is a good substrate for co-purifying protein kinases (Conner, 1999, Langelier *et al.*, 1998). Following our unsuccessful

attempts to select standard recombinant adenovirus (Ad) constitutively expressing an HSV-2 R1 bearing a deletion in its N-terminal domain, R1(Δ 2-357), we subsequently produced Ad recombinants using a tetracycline-regulated expression cassette, which led us to discover that this protein is cytotoxic (Massie *et al.*, 1998a). Here, we show that the full-length HSV-2 R1 has an anti-apoptotic function that is able to protect the cells against apoptosis induced by expression of R1(Δ 2-357) or by death receptor triggering. We also found that the R1 protein acts at, or upstream, of caspase-8 activation. Using HSV-1 R1 deletion mutants, we obtained evidence for the importance of HSV R1 in protecting HSV-infected cells against cytokine-induced apoptosis.

METHODS

■ **Cells, plasmids, Ad recombinants and HSV.** The conditions for the culture of human 293A, 293S, HeLa S3 and A549 cells and for the selection of A549-tTA, HeLa-rtTA and HeLa-tTA cell lines to complement the tetracycline (Tet)-regulated expression cassette were as described previously (Massie *et al.*, 1998a). A549-tTA cells were maintained in medium containing 30 µg/ml phleomycin until one passage before the experiments, whereas medium for HeLa-tTA and HeLa-rtTA contained 350 µg/ml G-418.

The recombinants Ad5TR5-R1 and Ad5CMV5-R1 for expression of the R1 of the HSV-2 RR, Ad5TR5-R1(Δ2-357), an Ad recombinant expressing a truncated R1 with amino acids 2-357 deleted, and Ad5TR5-GFP_Q, an Ad recombinant expressing a mutated green fluorescent protein (GFP_Q), have been described previously (Massie *et al.*, 1998a, b). AdTR5-R1(1-398), AdTR5-R1(1-446)-GFP_Q, and AdTR5-R1(1-496) are Ad recombinants expressing mutants of R1 deleted at various positions in the N-terminal domain and were constructed as detailed previously (Massie *et al.*, 1998b). Ad5CMV-Fas-L is a recombinant expressing the rat Fas ligand (Fas-L) under the control of the CMV IE promoter. Ad5TR5-Bax expresses the mouse Bax protein under the control of the TR5 promoter. Plasmids pAdTR5-R1-K7-GFP_Q, pAdTR5-p35-K7-GFP_Q, pAdTR5-19K-K7-GFP_Q were obtained by inserting the coding sequences of the HSV-2 R1, the baculovirus p35 and the adenovirus E1B-19K genes in the *Bam*HI site of the pAdTR5-K7-GFP_Q transfer vector (Massie *et al.*, 1998b).

Adenovirus stocks were prepared by infecting 293S cells in suspension culture and titrated by plaque assay on 293A cells. To ensure optimal entry of the virus, the adsorption conditions for infection and titration were based on the protocol described by Mittereder *et al.* (1996). High titer stocks of HSV-1 (strain F) and HSV-2 (strain HG-52) were prepared by infecting confluent BHK-21/C13 cells with a low m.o.i. as described previously (Langelier & Buttin, 1981). The RR null HSV-1 mutants ICP6Δ and *hr*R3 (Goldstein & Weller, 1988a, b) and its parental strain KOS were propagated and titrated on subconfluent Vero cells. The HSV-1 deletion mutant

of the viral host shut off gene (pvhs⁺) is derived from the KOS strain (Jones *et al.*, 1995).

■ **Apoptosis assays.** Cells were seeded 1 day before infection either in 6-well plates at 3×10^5 cells per well, in 60-mm dishes at 1×10^6 cells per dish or in 96-well plates at 5×10^3 cells per well. The Ad recombinants Ad5TR5-R1(Δ 2-357) or Ad5CMV-Fas-L suspended in 1 ml of medium were adsorbed on to the cells for 18 h. For the co-infection experiments with Ad5TR5-R1 or Ad5CMV5-R1, these recombinants were first adsorbed on to the cells for 7 h. HSV was adsorbed on to the cells for 1 h. Doxycycline was added at 30 ng/ml, when used to inhibit the recombinant protein synthesis in tTA-expressing cells, and at 3 μ g/ml to induce protein expression in rtTA-expressing cells. To trigger apoptosis, cycloheximide (CHX ; 30 μ g/ml) plus either human recombinant tumor necrosis factor (TNF) (2.5 ng/ml; Sigma) or anti-Human Fas mAb CH-11 (50ng/ml; Upstate Biotechnology) were used.

To quantify the percentage of apoptotic cells, the detached cells, which had a strong tendency to aggregate, were dispersed by gently pipetting the medium. The cells were then counted in at least five randomly selected fields in each duplicate dish using a Nikon Diaphot inverted photomicroscope (magnification X200). The percentage of apoptotic cells was evaluated by dividing the number of cells with apoptotic morphology by the total number of cells. Cell viability was also assessed using the Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) with cells seeded in 96-well plates (four wells per assay). For protein analysis, cells were scraped, washed with PBS, resuspended in 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 6 M urea and frozen at -80 °C until extraction.

■ **Protein extraction for SDS-PAGE and Western blot analyses.** SDS-PAGE and Western blotting of total protein extracts were performed as described previously (Lamarche *et al.*, 1996). For HSV R1 detection, 168R1, a rabbit polyclonal anti-R1 antiserum (Langelier *et al.*, 1998) or 932, a mouse mAb (Ingemarson & Lankinen, 1987) were used; P9 a polyclonal antiserum directed against the HSV R2 C terminus (Cohen *et al.*, 1986), was used for HSV R2; the mouse mAb C15 (Scaffidi *et al.*, 1997) was used for caspase-8; the mouse mAb PARP(Ab-2) (Calbiochem) was used for poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Quantification of the percentage of

recombinant protein was carried out as detailed by Lamarche *et al.* (1996) and Poon *et al.* (1996).

■ **In vitro caspase assays.** The ApoAlert (Clontech) caspase-3 and -8 fluorescent assay kits, which detect the shift in fluorescence emission of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC), were used to evaluate caspase-3 and -8 activity by measuring the initial rate of release of free AFC with a 96-well plate fluorometer.

RESULTS

HSV-2 R1 protects cells against cytokine-induced apoptosis

In previous studies, we had observed that the inducible expression of R1(Δ 2-357), an HSV-2 R1 subunit with its first 357 amino acids deleted, resulted in cell death by apoptosis (Massie *et al.*, 1998a). Subsequently, we found that the full-length HSV-2 R1 has an anti-apoptotic function able to protect the cells against death triggered by the expression of the R1(Δ 2-357) (data not shown). As R1(Δ 2-357) is not a natural degradation product of R1, the physiological relevance of the above-described observation was at first sight not evident. However, since it has been reported that HSV could block apoptosis induced by diverse stimuli, we first tested whether R1 could block apoptosis induced by activation of receptors of the TNF family. To this end, A549-tTA and HeLa cells, which are sensitive to Fas- and TNF-mediated apoptosis, were chosen, as their normally flat morphology facilitates the scoring of apoptotic cells, characterized by membrane blebbing and cell body condensation. Hoechst staining indicated that cells scored apoptotic by morphology also exhibited nuclear condensation and fragmentation (data not shown).

A549-tTA cells massively undergo apoptosis when exposed to TNF in the presence of CHX, more than 95 % of the cells being seen floating in the medium 18 h after the treatment. In contrast, no more than 5 % of the cells that had been infected with Ad5TR5-R1 for 7 h prior to the application of the pro-apoptotic stimulus exhibited apoptotic morphological appearance (Fig. 1A). Similar results were obtained with HeLa-rtTA cells when they were infected in the presence of doxycycline to induce R1 expression (data not shown). The protection conferred to A549-tTA cells by Ad5TR5-R1 infection was confirmed by the observation that the TNF-induced PARP cleavage was prevented in infected cells (Fig. 1B). Moreover, as shown in Fig. 1(C), the curve showing the decrease in the percentage of apoptotic cells as a function of the m.o.i. of Ad5TR5-R1 was similar to the curve of the percentage of cells expected to be infected by the Ad recombinant according to the Poisson distribution. This result indicates that infection by only one infectious virion was sufficient to confer protection against TNF. Evidence that R1 expression is necessary for the protective effect came from the observation that infection with

Ad5TR5-R1 in the presence of 30 ng/ml doxycycline (not shown) or with Ad5TR5-GFP_Q (Fig. 1C) did not protect cells. By repressing R1 expression with doxycycline, the minimal amount necessary for protection was evaluated to be ~0.06 % [available as supplementary data (Fig. s1) at JGV Online (<http://vir.sgmjournals.org>)]. During an HSV-2 infection, a similar R1 level can be attained at 3 h post-infection and at its maximal value the R1 accumulation can reach 1 % of total cell protein.

The R1 anti-apoptotic potential against death receptor activation was further demonstrated by showing that it could block cell death induced either by Fas triggering with the anti-Fas antibody CH11 in the presence of CHX in A549-tTA and HeLa-rtTA cells or when apoptosis was induced by more physiological conditions (without CHX) with an Ad recombinant that expresses Fas-L. Infecting HeLa cells or MDA-MB 231 breast cancer cells with the recombinant Ad5CMV5-R1, a constitutive Ad with an improved CMV-based expression cassette (Massie *et al.*, 1998a), ruled out the possible involvement of the tTA protein in the protective effect of the R1 [supplementary data (Fig. s2) at JGV Online (<http://vir.sgmjournals.org>)]. Taken together these results demonstrate that the HSV-2 R1 expressed at physiological levels is able to protect several types of cells against apoptosis induced by the activation of death receptors.

Adenovirus proteins are not involved in the anti-apoptotic action of HSV-2 R1

The involvement of Ad protein(s) in the protective effect was ruled out by transfecting HeLa-tTA cells with the shuttle plasmids used to construct the Ad recombinants. These experiments described in detail in supplementary data [Fig. s3; JGV Online (<http://vir.sgmjournals.org>)] showed that the R1 protective activity did not require the co-expression of any Ad protein and that it was as potent as the two well-known anti-apoptotic proteins Ad E1B-19K and baculovirus p35.

HSV-2 R1 blocks caspase-8 activation induced by TNF and Fas-L

Two principal pathways for apoptosis have been described: the mitochondrial (intrinsic) pathway requires the participation of mitochondria, which activate caspases by releasing *cytC*, and the death receptor (extrinsic) pathway, in which

mitochondria can be bypassed and caspases are activated directly by the triggering of death receptors. Both pathways converge on effector pro-caspases such as pro-caspase-3 (reviewed in Ashkenazi & Dixit, 1998). In several types of cell, the death receptor pathway is amplified by the mitochondrial pathway through the cleavage of the protein Bid by caspase-8 (Korsmeyer *et al.*, 2000). Signaling through death receptor results in the assembly of the death inducing signaling complex (DISC), which leads to the recruitment of the pro-caspase form of caspase-8 through adapter death-domain-containing proteins FADD and TRADD. Oligomerization of the pro-caspase leads to its auto-proteolytic activation (Ashkenazi & Dixit, 1998). Indication that HSV-2 R1 could act specifically in the extrinsic pathway came from testing the effect of the protein against stimuli known to induce cell death via the intrinsic pathway: Bax overexpression (Gross *et al.*, 1999), etoposide (Engels *et al.*, 2000), menadione (Samali *et al.*, 1999) or staurosporine (Li *et al.*, 2000). For these experiments, as some of these agents as menadione are known to induce cell death both by apoptosis and necrosis (Samali *et al.*, 1999), cell killing was scored not only by microscopic observation of cells but also using the colorimetric WST-1 viability assay. As shown in Fig. 2A, both scorings indicated that R1 expression could not prevent cell death induced by any of these stimuli. For staurosporine, cell death was even increased in the presence of R1.

To elucidate further the molecular mechanism underlying the R1 anti-apoptotic activity, we evaluated the activation of caspase-8 induced either by CHX + TNF or by Fas-L expression in A549-tTA cells with or without prior infection with Ad5TR5-R1. Caspase-8 activation was monitored by immunoblot analysis with a mAb visualizing the inactive 56-kDa pro-form and the active 18-kDa species (Fig. 3A) and by an *in vitro* assay using IETD-AFC as a caspase-8-specific fluorescent substrate (Fig. 3B, C). In Fig. 3(A), caspase-8 activation induced by an 8 h CHX + TNF treatment is clearly evidenced by the complete disappearance of the inactive 56-kDa pro-form and the presence of the 18-kDa active species. Time-course studies of the IETD-AFC substrate cleavage (Fig. 3B, C) showed that the activation reached a maximum between 4 and 6 h post-treatment and was no longer detectable at 16 h, a time when most of the cells had been destroyed. Both caspase assays revealed that R1

protein expression impaired the activation of caspase-8 induced either by CHX + TNF or Fas-L expression. Additional experiments using increasing m.o.i. of Ad5TR5-R1, as for the experiment described in Fig. 1(C), showed that the percentage of protection correlated with the extent of caspase-8 impairment (data not shown).

The R1 segment 190-240 contains sequences exhibiting weak similarities with preferred recognition motifs of some caspases. Also, we observed previously that both the HSV-1 and -2 R1 were cleaved after one of these motifs at HSV-2 position 240. These facts led us to assess a possible inhibitory effect of the purified RR-active R1 on mature caspases 8 and 3. Our experiments demonstrated that purified HSV-2 R1 added up to 2 μ M was unable on its own to inhibit these enzymatic activities in tube assays (data not shown). These results suggest that R1, which does not act by preventing caspase-8 enzymatic activity, specifically functions to interrupt death receptor-mediated signaling at, or upstream of caspase-8 activation. Additional evidence in favor of that conclusion was provided by an experiment aimed at determining whether R1 could influence the activation of caspases induced by staurosporine. It has been recently demonstrated that, in staurosporine-induced apoptosis, caspase-8 is activated by a *cytC*-dependent activation of caspase-3 (Engels *et al.*, 2000, Tang *et al.*, 2000). As expected from the observation that staurosporine-induced cell death was increased by R1 (Fig. 2A), caspase-3 activity measured using DEVD-AFC as specific substrate was higher in cells expressing R1 than in mock-infected cell control (Fig. 2B). Surprisingly, the activation of caspase-8 was also increased in the presence of R1. In control cells treated in parallel with CHX + TNF, the activation of these two caspases was blocked. Thus, it can be concluded that R1, which efficiently interferes with death receptor dependent activation of caspase-8, cannot block the caspase-3-dependent activation of caspase-8 that is triggered by staurosporine.

HSV inhibits TNF-induced apoptosis

We next investigated whether, during HSV infection, the HSV R1 protein could prevent apoptosis induced by TNF. In a first series of experiments, A549-tTA or HeLa cells were infected with either HSV-1 strains KOS and F or HSV-2 strain HG-

52 at an m.o.i. of 10 for 8 h before the addition of CHX + TNF. Apoptosis was scored 20 h later by microscopic examination of the cells. The three HSV strains diminished the level of apoptosis from 95 % in mock-infected control to 15-25 %, levels that were similar to those obtained in HSV-infected cells treated only with CHX (see Fig. 4 for A549-tTA cells). The protective effect was confirmed by the observation that these viruses prevented the TNF-induced PARP cleavage (see Fig. 5B for KOS strain, and data not shown). In order to determine the time course of the appearance of the protective effect in HSV infected cells, A549-tTA cells were infected for increasing periods of time before the addition of the lethal cocktail. As can be seen in Fig. 4, protection became detectable between 2.5 and 4 h, and appeared about 1-2 h earlier with the HSV-2 strain. However, for all three of the strains tested, maximal protection was reached within 6 h when the levels of apoptosis became comparable with those obtained 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).

Protection against TNF is reduced in cells infected by ICP6 Δ and *hrR3*, two R1 deletion mutant viruses

Next, the effect of deleting the HSV-1 R1 gene was studied by infecting A549-tTA cells with increasing m.o.i.s of either ICP6 Δ or its WT parent, KOS. At the three m.o.i.s tested, ICP6 Δ showed a roughly 2-fold decreased protection against CHX + TNF (Fig. 5A). In similar experiments, the extent of apoptosis was also evaluated by examining PARP cleavage. These experiments, as the one presented in Fig. 5(B), showed that the TNF-induced PARP degradation was completely impaired in KOS-infected cells but only partially in ICP6 Δ -infected cells. In addition, as it was reported previously that the R1 deletion does not affect the synthesis of other viral polypeptides (Goldstein & Weller, 1988a, b), we could compare the infectivity of both viruses by measuring the accumulation of R2 (the other subunit of RR). As similar levels were detected in both series of infected cells at 7 h post-infection, we conclude that the anti-apoptotic defect of the ICP6 Δ viral stock was not due to a lower infectivity. Finally, the effect of viral infection on caspase-8 activation induced by the CHX + TNF treatment was monitored by measuring the cleavage of the

caspase-8-specific substrate at 4 and 24 h post-treatment (Fig. 6). The caspase-8 activation induced by the cytokine was completely blocked in A549-tTA cells infected with the WT virus, KOS. In sharp contrast, it occurred significantly at the two different time points in cells infected with the mutant ICP6 Δ , the activity measured being at least 3-fold higher than in the corresponding KOS-infected cells. Therefore, it can be concluded that the R1 null mutant is partially defective in blocking TNF-induced caspase-8 activation. Taken together, these results, which demonstrate that HSV-1 R1 plays an important role in the protection of HSV-infected cells against TNF, also indicate that other viral protein(s) are involved.

The HSV-2 R1 N-terminal domain is not anti-apoptotic by itself.

When the protection assays were performed with *hrR3*, the mutant expressing the first 428 amino acids of R1 fused to β -galactosidase, results similar to those observed with ICP6 Δ were obtained (data not shown). This suggested that the N-terminal domain by itself could not be sufficient for the R1 anti-apoptotic activity. Using Ad recombinants that express variable lengths of the R1 N-TERMINAL domain (1-398, 1-446-GFP_Q, and 1-496), we confirmed this hypothesis. The three proteins, which were found to be as soluble as the WT R1 as determined by centrifugation (Fig. 7B) or immunofluorescence (not shown), were not protective at all, neither against apoptosis induced by cytokines (Fig. 7A for CHX + TNF, not shown for Fas-L). Hence, both the N-terminal domain and the RR domain or parts of them, contribute to the HSV-2 R1 anti-apoptotic activity.

DISCUSSION

The major finding of the present work is that the HSV-2 R1 very efficiently prevents apoptosis induced by activation of death receptors. It came from the serendipitous observation that a large deletion in the N-terminal domain of HSV-2 R1 produces a pro-apoptotic protein. Our data supporting an anti-apoptotic function for HSV-2 R1 were accumulated using mostly Ad recombinants. Thus, effects of gene expression can be observed with high reproducibility in a larger proportion of cells than what can be attained by transfection. Moreover, the inducible Ad5TR5 system is very powerful as it permits the regulatable expression of a gene of interest in nearly 100 % of the cells. Hence, using doxycycline to repress R1 expression we were able to determine that maximal protection against TNF could be seen at R1 levels ~20-fold lower than what is maximally accumulated during an HSV infection. However, as Ad does express some of its genes, even in non-permissive cells, one could suspect the involvement of Ad genes in the observed phenomenon. Here, it was clearly shown that the R1 protective effect did not necessitate the co-expression of any Ad protein because R1 protein expression from transfected plasmids conferred protection against CHX + TNF to most of the transfected cells.

The majority of cell lines, including A549, HeLa and MDA-MB-231 cells, which naturally express low levels of TNF receptor and Fas at their surface, are resistant to TNF and Fas cytotoxicity unless co-treated with protein or RNA synthesis inhibitors, such as CHX and actinomycin D. The sensitizing effect of these inhibitors has been recently ascribed to a direct strong down-regulation of accumulation of apoptosis regulatory proteins such as FLIP or RIP (Fulda *et al.*, 2000, Kreuz *et al.*, 2001, Wajant *et al.*, 2000). Most of our data demonstrating the R1 anti-apoptotic potential were obtained with CHX to increase the cytotoxicity of TNF or Fas agonist mAb. However, even when apoptosis was induced by infecting cells with the Ad5CMV-Fas-L recombinant without the use of CHX, pre-infection by Ad5TR5-R1 was fully protective. Therefore, it can be concluded that the R1 anti-apoptotic action is not dependent on the inhibition of the synthesis of short-lived regulatory proteins.

The second important observation of the present work is that the HSV-2 R1 prevents

caspase-8 activation induced via death receptor triggering. HSV-2 R1 did not inhibit : (i) cell death mediated by a variety of agents acting via the mitochondrial pathway (Bax overexpression, etoposide, staurosporine and menadione); (ii) active caspase-8 and -3 in tube assays; and (iii) the caspase-3-dependent activation of caspase-8 induced by staurosporine in A549-tTA cells; thus, it is most likely that HSV-2 R1 specifically interrupt death receptor-mediated signaling at, or upstream of, caspase-8 activation. The mechanism by which the HSV-2 R1 impairs the process of caspase-8 activation is currently unknown. One possible mode of action of the R1 protein could be that, through an interaction with either caspase-8 itself or the adapter molecules TRADD, FADD or FLASH, it prevents pro-caspase-8 oligomerization. This mechanism could be similar to viral or cellular FLIP proteins that act by inhibition of caspase-8 recruitment to the DISC (Krueger *et al.*, 2001). However, our co-immunoprecipitation studies could not detect HSV-2 R1 interacting with pro-caspase-8 using conditions similar to those recently used to detect interaction between this caspase and the CMV anti-apoptotic protein vICA (Skaletskaya *et al.*, 2001).

Our data with A549-tTA cells showing that activation of caspase-3 and -8 induced by staurosporine was not blocked by R1 contradict a recent report indicating that 293 cells constitutively expressing HSV-2 R1 exhibited resistance to staurosporine-induced apoptosis, as shown by an absence of caspase-3 activation and PARP cleavage (Perkins *et al.*, 2002). The reason for this discrepancy is unknown. As we were also unable to observe protection either in HeLa or 293A cells transiently expressing HSV-2 R1 or in 293S stable cell lines inducibly expressing the protein (S. Chabaud, C. Ablasou, L. Bourget, B. Massie and Y. Langelier, unpublished results), it is unlikely that it could be attributable to the use of different cell lines.

The third important finding of the present work is that both HSV-1 and HSV-2 infection impairs apoptosis induced by TNF-R or Fas activation in the presence of CHX. The role of the R1 protein in this protection was substantiated by our data showing that the protective effect appears in both HSV-1 and HSV-2 infected cells with a time-course compatible with the synthesis of IE or E viral protein(s), and, that deleting R1 in the HSV-1 strain KOS (ICP6 Δ and *hrR3* mutants) decreased the anti-apoptotic potential by 50 %. Our observation that half of the cells infected with the

R1 null mutants were resistant to TNF treatment suggests that other viral gene(s) also contribute to the phenomenon. Among them, the vhs gene appears to play a significant role as we have observed that deleting it reduced the anti-apoptotic potential by about 30 % (C. Guilbault and Y. Langelier, unpublished observations). The vhs protein, by inhibiting cellular protein synthesis, could act, for example, by decreasing the amount of cytokine receptors at the cell surface. Direct evidence has also been provided that the HSV glycoprotein gJ can also antagonize Fas-induced apoptosis (Jerome *et al.*, 2001). Other viral genes, which have been shown to be involved in the control of apoptosis induced by diverse stimuli, could also contribute to the partial resistance of the HSV R1 mutants. Among them are the protein kinase Us3, which acts through the phosphorylation of the apoptosis regulatory protein Bad (Munger & Roizman, 2001), the glycoprotein gD and the IE gene ICP27 (Aubert *et al.*, 1999).

Recent observations showing the predominance of TNF in the trigeminal ganglion during primary infection and following reactivation suggest that the protection of HSV-infected cells against TNF could be important during the establishment of latency and/or reactivation (Kodukula *et al.*, 1999, Shimeld *et al.*, 1999, Shimeld *et al.*, 1997). As, HSV R1 begins to be synthesized at an early stage during both lytic cycle and reactivation, and accumulates throughout the productive cycle in amounts larger than needed for DNA replication (N. Lamarche and Y. Langelier, unpublished observations) it could contribute to slowing down the antiviral activity of TNF-family cytokines. It could also counteract the action of cytotoxic lymphocytes that are maintained for long periods at mucosal sites of viral shedding (Liu *et al.*, 2000, Nash, 2000, Posavad *et al.*, 2000). Further work to assess the role of the R1 anti-apoptotic domain in latency will require an HSV mutant defective in R1 anti-apoptotic activity, without being pro-apoptotic as R1(Δ 2-357), but still functional in RR activity, since the R1 RR domain is required to allow deoxyribonucleotide synthesis, which is essential to viral DNA replication during reactivation in animal ganglion neurons.

Finally, our initial thought that the anti-apoptotic function could be circumscribed to its unique N-terminal domain has proven to be wrong and studies are under way to delineate which parts of the two domains are important for the control of apoptosis.

As the R1 protein does not exhibit clear homology to any of the known anti-apoptotic proteins, it could act through a new mechanism of action. Our results indicate that the HSV R1 possesses an anti-apoptotic function, which we propose is important in HSV pathogenesis. Further understanding of this mechanism may suggest new approaches to control HSV pathogenicity and contribute to a better understanding of the control of apoptosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Sandra Weller for providing us with the HSV-1 mutants ICP6 Δ and *hrR3*, James Smiley for the viral host shut off mutant *pvhs*⁻, Marcus Peter for the anticaspase-8 antibody, Lars Thelander for 932 mAb, Nadine Pavloff for the Ad5CMV-Fas-L recombinant, and Gordon Shore for the mouse bax cDNA. We also thank Nadine Jabbour for the construction of Ad5TR5-Bax .

This work was supported by grant MT-14686 from the Canadian Institutes of Health Research to YL and by an operation grant to BM from the National Research Council of Canada (NRC). This is a NRC publication no. 37697.

REFERENCES

- Ahmed, M., Lock, M., Miller, C. G. & Fraser, N. W. (2002). Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J Virol* **76**, 717-29.
- Asano, S., Honda, T., Goshima, F., Watanabe, D., Miyake, Y., Sugiura, Y. & Nishiyama, Y. (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**, 51-6.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8.
- Aubert, M. & Blaho, J. A. (1999). The Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP27 Is Required for the Prevention of Apoptosis in Infected Human Cells. *J Virol* **73**, 2803-2813.
- Aubert, M., O'Toole, J. & Blaho, J. A. (1999). Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **73**, 10359-70.
- Brandt, C. R., Kintner, R. L., Pumfery, A. M., Visalli, R. J. & Grau, D. R. (1991). The herpes simplex virus ribonucleotide reductase is required for ocular virulence. *Journal of General Virology* **72**, 2043-9.
- Brune, W., Menard, C., Heesemann, J. & Koszinowski, U. H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**, 303-5.
- Chung, T. D., Wymer, J. P., Smith, C. C., Kulka, M. & Aurelian, L. (1989). Protein kinase activity associated with the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Journal of Virology* **63**, 3389-98.
- Cohen, E. A., Gaudreau, P., Brazeau, P. & Langelier, Y. (1986). Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *Journal of Virology* **60**, 1130-3.
- Conner, J. (1999). The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in Escherichia coli. *J Gen Virol* **80**, 1471-6.

- Conner, J., Marsden, H. & Clements, B. H. (1994). Ribonucleotide reductase of herpesviruses. *Rev. Med. Virol.* **4**, 25-34.
- Cooper, J., Conner, J. & Clements, J. B. (1995). Characterization of the novel protein kinase activity present in the R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *Journal of Virology* **69**, 4979-85.
- Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Janicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. & Wesselborg, S. (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug- induced apoptosis. *Oncogene* **19**, 4563-73.
- Fulda, S., Meyer, E. & Debatin, K. M. (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1- converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res* **60**, 3947-56.
- Goldstein, D. J. & Weller, S. K. (1988a). 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.
- Goldstein, D. J. & Weller, S. K. (1988b). 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. *Journal of Virology* **62**, 196-205.
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911.
- 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**, 417-22.
- Jacobson, J. G., Leib, D. A., Goldstein, D. J., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Weller, S. K. & Coen, D. M. (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.
- Jerome, K. R., Chen, Z., Lang, R., Torres, M. R., Hofmeister, J., Smith, S., Fox, R., Froelich, C. J. & Corey, L. (2001). HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol* **167**, 3928-35.
- Jerome, K. R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A. E., Lee, H. & Corey, L. (1999). Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* **73**, 8950-7.
- Jerome, K. R., Tait, J. F., Koelle, D. M. & Corey, L. (1998). Herpes Simplex Virus Type 1 Renders Infected Cells Resistant to Cytotoxic T-Lymphocyte-Induced Apoptosis. *Journal of Virology* **72**, 436-441.
- Jones, C. M., Cose, S. C., Coles, R. M., Winterhalter, A. C., Brooks, A. G., Heath, W. R. & Carbone, F. R. (2000). Herpes simplex virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte arming occurs within lymph nodes draining the site of cutaneous infection. *J Virol* **74**, 2414-9.
- Jones, F. E., Smibert, C. A. & Smiley, J. R. (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.
- Kodukula, P., Liu, T., Rooijen, N. V., Jager, M. J. & Hendricks, R. L. (1999). Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* **162**, 2895-905.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J. & Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**, 1166-73.
- Koyama, A. H. & Miwa, Y. (1997). Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *Journal of Virology* **71**, 2567-71.
- 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**, 3964-73.

- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **21**, 8247-54.
- 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**, 129-35.
- Langelier, Y. & Buttin, G. (1981). Characterization of ribonucleotide reductase induction in BHK-21/C13 Syrian hamster cell line upon infection by herpes simplex virus (HSV). *Journal of General Virology* **57**, 21-31.
- 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**, 1435-43.
- Leopardi, R. & Roizman, B. (1996). The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9583-7.
- Leopardi, R., Van Sant, C. & Roizman, B. (1997). The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7891-6.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X. & Williams, R. S. (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **101**, 389-99.
- Liu, T., Khanna, K. M., Chen, X., Fink, D. J. & Hendricks, R. L. (2000). CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons [see comments]. *J Exp Med* **191**, 1459-66.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F. & Langelier, Y. (1998a). Inducible overexpression of a toxic

- protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* **72**, 2289-96.
- Massie, B., Mosser, D. D., Koutroumanis, M., Vitté-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chahla, D., Jolicoeur, P. & Langelier, Y. (1998b). New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* **28**, 53-54.
- Mittereder, N., March, K. L. & Trapnell, B. C. (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* **70**, 7498-509.
- Munger, J. & Roizman, B. (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 USA* **98**, 10410-5.
- Nash, A. A. (2000). T cells and the regulation of herpes simplex virus latency and reactivation [comment]. *J Exp Med* **191**, 1455-8.
- Nichol, P. F., Chang, J. Y., Johnson, E. M. & Olivo, P. D. (1996). Herpes Simplex Virus Gene Expression In Neurons - Viral Dna Synthesis Is a Critical Regulatory Event In the Branch Point Between the Lytic and Latent Pathways. *Journal of Virology* **70**, 5476-5486.
- Nikas, I., McLauchlan, J., Davison, A. J., Taylor, W. R. & Clements, J. B. (1986). Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins* **1**, 376-84.
- Paradis, H., Gaudreau, P., Massie, B., Lamarche, N., Guilbault, C., Gravel, S. & Langelier, Y. (1991). Affinity purification of active subunit 1 of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase exhibiting a protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 9647-51.
- Perkins, D., Pereira, E. F., Gober, M., Yarowsky, P. J. & 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**, 1435-49.
- Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B. & Wechsler, S. L.

- (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* **287**, 1500-3.
- Poon, R. Y., Toyoshima, H. & Hunter, T. (1996). On the masking of signals on immunoblots by cellular proteins. *J Immunol Methods* **199**, 155-8.
- Posavad, C. M., Huang, M. L., Barcy, S., Koelle, D. M. & Corey, L. (2000). Long term persistence of herpes simplex virus-specific CD8⁺ CTL in persons with frequently recurring genital herpes. *J Immunol* **165**, 1146-52.
- Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E. & Orrenius, S. (1999). A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant- induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 6-11.
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* **272**, 26953-8.
- Shimeld, C., Easty, D. L. & Hill, T. J. (1999). Reactivation of herpes simplex virus type 1 in the mouse trigeminal ganglion: an in vivo study of virus antigen and cytokines. *J Virol* **73**, 1767-73.
- Shimeld, C., Whiteland, J. L., Williams, N. A., Easty, D. L. & Hill, T. J. (1997). Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78**, 3317-25.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7829-34.
- Sun, Y. & Conner, J. (1999). The U28 ORF of human herpesvirus-7 does not encode a functional ribonucleotide reductase R1 subunit. *J Gen Virol* **80**, 2713-8.
- Talsinger, R., Lasner, T. M., Podrzucki, W., Skokotas, A., Leary, J. J., Berger, S. L. & Fraser, N. W. (1997). Gene Expression During Reactivation Of Herpes Simplex Virus Type 1 From Latency In the Peripheral Nervous System Is Different From That During Lytic Infection Of Tissue Cultures. *Journal of Virology* **71**, 5268-5276.

- Tang, D., Lahti, J. M. & Kidd, V. J. (2000). Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 9303-7.
- Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, 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**, 24357-66.
- Zachos, G., Koffa, M., Preston, C. M., Clements, J. B. & Conner, J. (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.

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1. Full-length R1 prevents apoptosis induced by TNF. (A) Morphological appearance of cells photographed using a phase-contrast microscope. A549-tTA cells were mock-infected (Mock) or infected for 7 h with Ad5TR5-R1 (R1) at an m.o.i. of 5 PFU/cell. The cells received 7 h later new medium either without any additive (Control), with 30 $\mu\text{g/ml}$ CHX (CHX) or with 30 $\mu\text{g/ml}$ CHX plus 2.5 ng/ml TNF (CHX + TNF). Photographs were taken 18 h later. (B) Celllysates were prepared from the cell populations described in (A) and analyzed for PARP (116K) cleavage by immunoblotting. (C) A549-tTA cells were infected with increasing MOIs of Ad5TR5-R1 (■, □) or Ad5TR5-GFP (▲) and received 7 h later CHX (□) or CHX + TNF (■, ▲) as in (A); mock-infected untreated control (○). The percentage of apoptosis was evaluated from 24 to 26 h after the first infection by counting under microscopic observation apoptotic and non-apoptotic cells. The dotted line (right axis) represents the percentage of cells expected to be infected by the Ad recombinant according to the Poisson distribution.

Fig. 2. HSV-2 R1 does not impair cell death induced by agents acting via the mitochondrial pathway. (A) A549-tTA cells infected for 24 h with an m.o.i. of 25 PFU of Ad5TR5-R1 (R1+) or mock infected (R1-) were either reinfected with Ad5TR5-Bax with an m.o.i. of 200 PFU (Bax) or treated with 100 μM menadione, 400 μM etoposide, 250nM staurosporine, 30 $\mu\text{g/ml}$ CHX (CHX control) or 30 $\mu\text{g/ml}$ CHX + 2.5 ng/ml TNF (CHX + TNF). The percentage of viability was determined 24 h after treatment by scoring cells exhibiting normal morphology under microscopic observation in ten randomly selected fields (gray bars) or by the cell viability WST-1 assay (black bars). Results are expressed as percentage of the control value without R1 infection; for CHX + TNF, the value of CHX treated cells was used as control. (B) HSV-2 R1 does not block staurosporine-induced caspase activation. A549-tTA cells infected or not with Ad5TR5-R1 were treated with staurosporine or CHX + TNF as described in (A). At the indicated times, cells were harvested for caspase-8 (gray bars) and -3 (black bars) determination with the ApoAlert™ kits.

Fig. 3. HSV-2 R1 impairs caspase-8 activation. A549-tTA cells were either mock-infected (MOCK) or infected with the recombinant Ad5TR5-R1 (R1) at an m.o.i. of 5 for 7 h before the addition of CHX (CHX), CHX + TNF (CHX + TNF), control medium (Control) or reinfection with Ad5CMV-Fas-L (Fas L) at an m.o.i. of 25. After 8 h, 16 h or at the indicated time points in the time-course experiment presented in panel (B), % apoptosis (\diamond , gray bars) was scored as described in Fig. 1C, and cells were harvested and cytoplasmic extracts were prepared for caspase-8 determination. Caspase-8 activation was monitored either in panel (A) by immunoblotting 20 μ g of protein extract with the monoclonal antibody mAb C15 or in panels (B and C) by measuring caspase-8 activity with the ApoAlertTM kit (\square , black bars).

Fig. 4. HSV infection protects A549-tTA cells against TNF induced apoptosis. A549-tTA cells were mock-infected (\times , Δ , \blacktriangle) or infected with either the HSV-1 strains KOS (\square , \blacksquare) and F (\circ , \bullet) or the HSV-2 strain HG-52 (\diamond , \blacklozenge) at MOIs of 10 for increasing periods before the addition of either CHX (Δ , \square , \circ , \diamond), CHX + TNF (\blacktriangle , \blacksquare , \bullet , \blacklozenge) or control medium (\times). Apoptosis was scored 20 h after the addition of the lethal cocktail.

Fig. 5. The R1 mutant ICP6 Δ has a reduced anti-apoptotic potential against TNF. A549-tTA cells were either mock-infected (\circ , \bullet , \blacksquare) or infected with increasing MOIs of either the parental HSV-1 KOS (\diamond , \blacklozenge) or the R1 null mutant ICP6 Δ (Δ , \blacktriangle) for 7 h before the addition of either control medium (\circ , \diamond , Δ), CHX (\bullet , \blacklozenge dotted line, \blacktriangle dotted line), or CHX + TNF (\blacklozenge full line, \blacktriangle full line). (A) Apoptosis was scored 20 h after the addition of the lethal cocktail. (B) PARP cleavage and R2 protein were detected by immunoblotting of protein extracts harvested at 20 h post-infection from cells infected at 7.5 or 20 PFU/cell. Extracts of cells infected with Ad5TR5-R1 (AdR1) at an m.o.i. of 5 for 7 h before the addition of CHX or CHX + TNF were added as control.

Fig. 6. The R1 mutant ICP6 Δ is defective in blocking TNF-induced caspase-8 activation. A549-tTA cells were either mock-infected (MOCK) or infected at an

m.o.i. of 10 with either the parental HSV-1 KOS (KOS) or the R1 null mutant ICP6 Δ (ICP6 Δ) for 8 h before the addition or not (Control) of CHX + TNF (CHX + TNF). % apoptosis (gray bars) and caspase-8 activity (black bars) were measured at 4 h and 24 h after the addition of the lethal cocktail.

Fig. 7. The HSV-2 R1 N-TERMINAL domain is not anti-apoptotic by itself. A549-tTA cells were infected at an m.o.i. of 25 with the Ad recombinants Ad5TR5-R1 [R1], Ad5TR5-R1(1-398) [R1(1-398)], Ad5TR5-R1(1-446)-GFP_Q [R1(1-446)-GFP_Q], Ad5TR5-R1(1-496) [R1(1-496)] or mock-infected (Mock). In panel (A) the cells received 7 h later medium containing CHX (gray bars) or CHX + TNF (black bars). Apoptosis was scored 14 h later. In panel (B) extracts from the CHX treated cells were centrifuged at 100 000 x g for 1 h at 4 °C; supernatants and pellets were analyzed for recombinant protein expression by immunoblotting. Extract containing the R1(Δ 2-357) was included as reference for a low solubility protein.

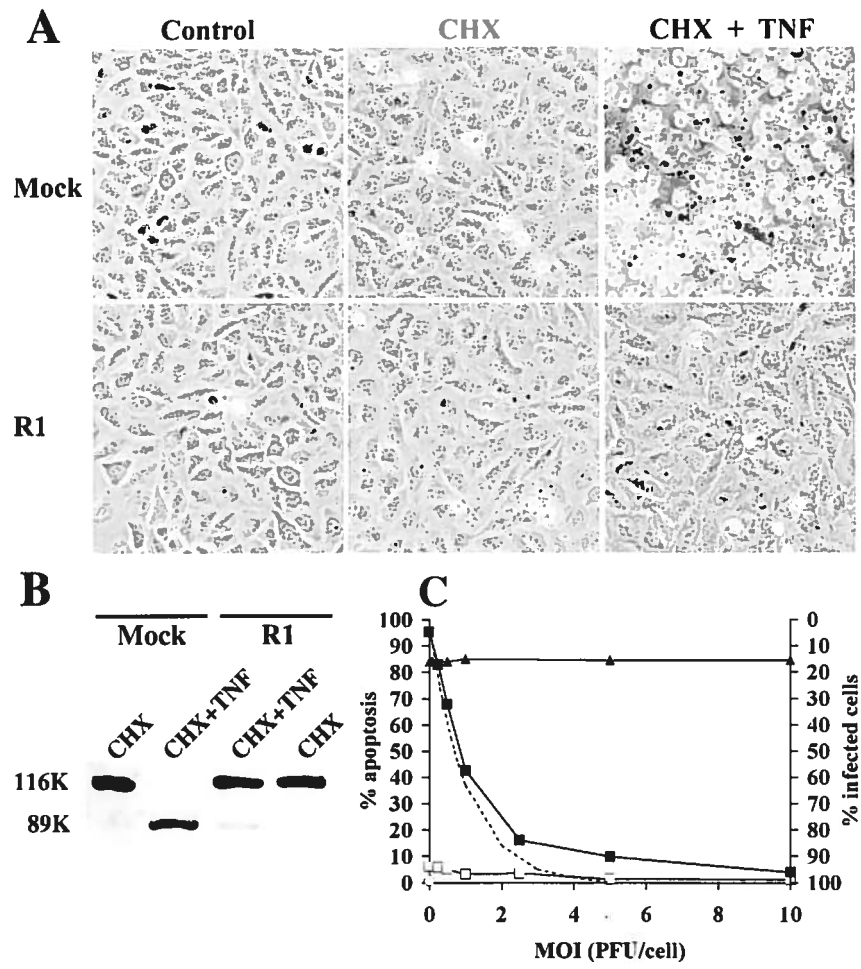


Fig.1

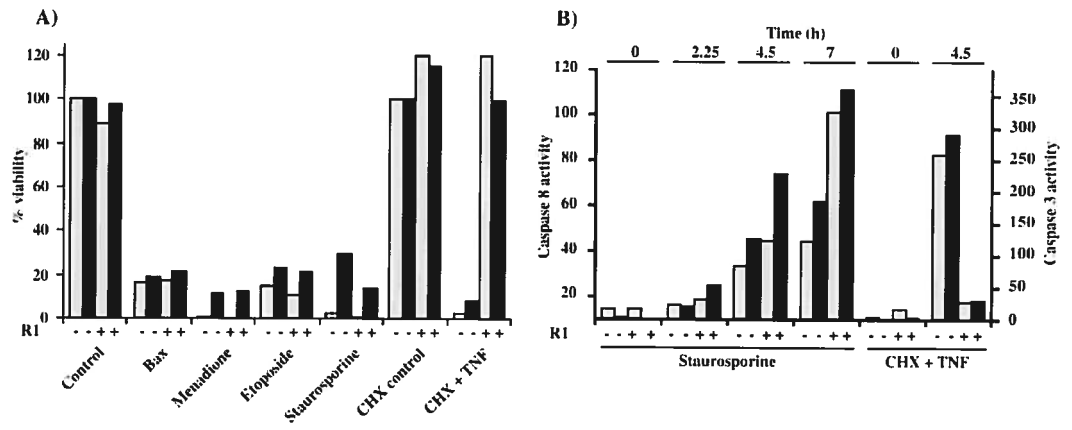


Fig.2

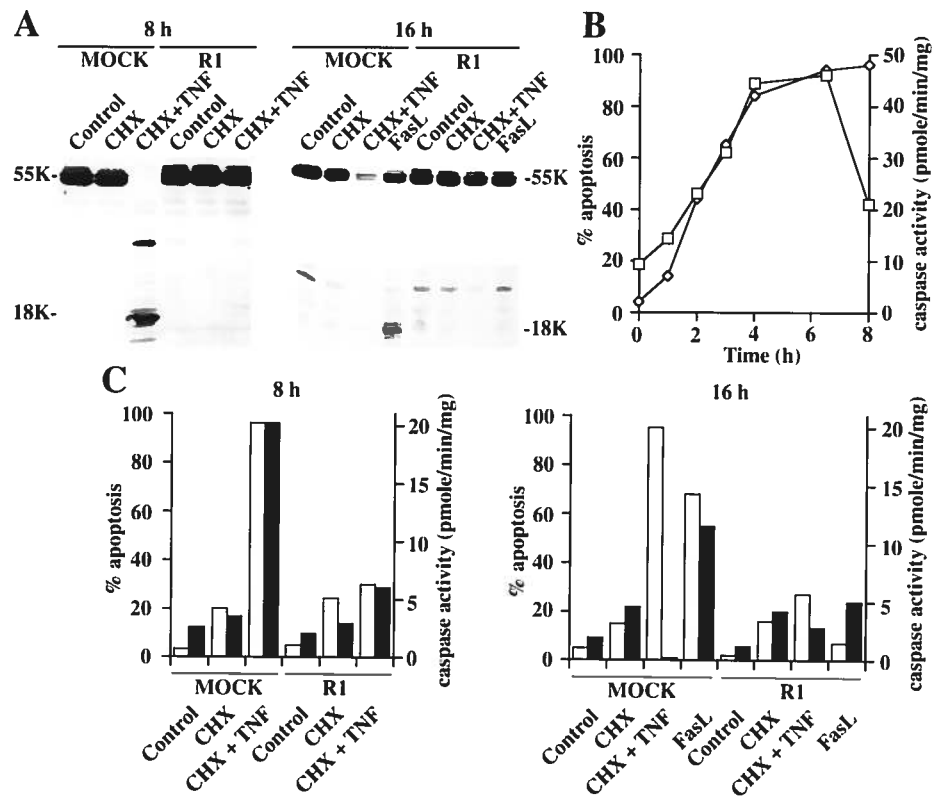


Fig.3

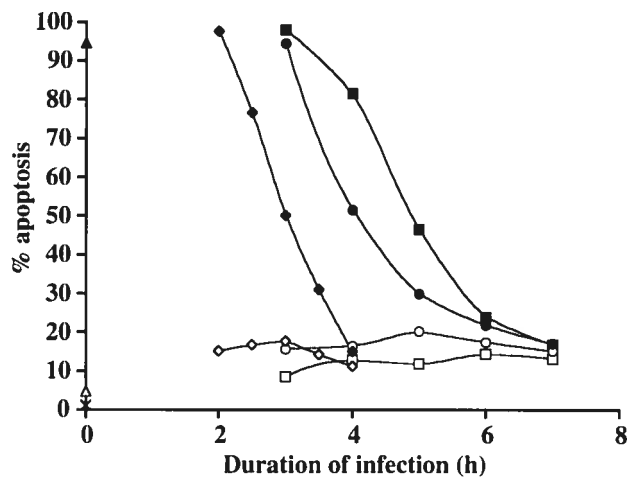


Fig.4

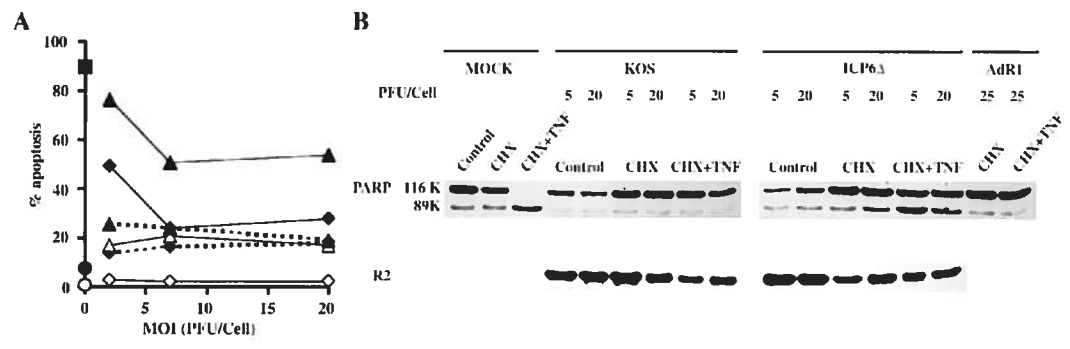


Fig.5

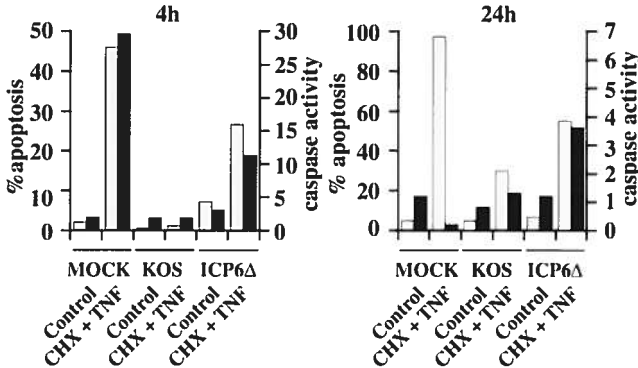


Fig.6

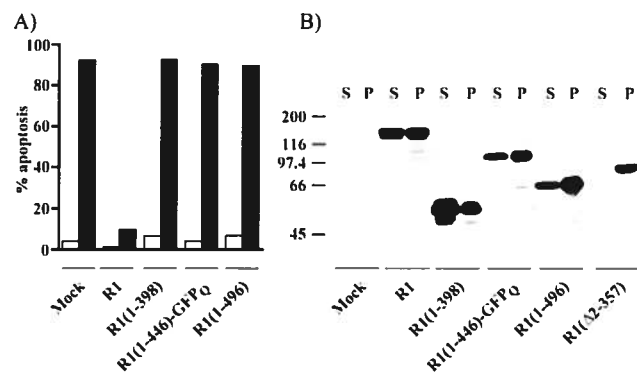


Fig.7

SUPPLEMENTARY DATA

METHODS

Transfection experiments HeLa-tTA cells were seeded in six-well plates (1.5×10^5 cells per well) 24 h before transfection with different plasmids (2 μg) in the presence of 6 μl of FuGENE 6 following the provider's protocol (Roche Diagnostics). After 36 h, the cells received new medium containing either CHX or CHX + TNF as indicated in the published paper or no additives for the control cultures and apoptosis was scored 14 h later. Percentage transfection (% GFP-positive cells in control cultures that were co-transfected with 2 μg of the tested plasmid and 0.5 μg of pAdCMV5-GFP_Q) was determined with an EPICS XL-MCL flow cytometer.

RESULTS

Physiologic amount of R1 is sufficient for protection

To determine the minimal amount of R1 necessary for protection, A549-tTA cells were infected at 5 PFU/cell in the presence of increasing concentrations of doxycycline (Fig. s1A). Quantification of the R1 concentration by immunoblotting using purified R1 as a standard revealed that a doxycycline concentration of 0.1 ng/ml, which reduced the level of protection only slightly (Fig. s1A), decreased the R1 concentration from 0.4 % total cell protein in the control without doxycycline (not shown) to 0.06 % (Fig. s1B). During the course of an HSV-2 infection of BHK 21/C13 cells, a similar R1 level is attained at approximately 3 h post-infection; at 12 h, when the R1 accumulation reaches its maximal value, it represents 1 % total cell protein (data not shown). Together, these results indicated that R1 expressed at physiological levels could effectively protect cells against the death inducing cytokine TNF.

Full-length R1 inhibits Fas receptor-induced apoptosis

To further characterize the anti-apoptotic potential of R1 against death receptor activation, its action against Fas triggering was studied. The anti-Fas antibody CH11 in the presence of CHX was as effective as TNF in mediating apoptosis with HeLa-rtTA or parental HeLa cells but was less potent with A549-tTA cells, only 35 % of the cells being scored apoptotic at 48 h. Ad5TR5-R1 infection of HeLa-rtTA and A549-tTA cells blocked Fas receptor-induced apoptosis as efficiently as it did in TNF-treated cells (data not shown). To rule out the possible involvement of the tTA protein in the protective effect of the R1, HeLa cells were infected with the recombinant Ad5CMV5-R1, a constitutive Ad with an improved CMV-based expression cassette. The results shown in Fig. s2A indicated that full protection occurred in these cells against both TNF and anti-Fas antibody. Protection against TNF was also observed in MDA-MB-231 breast cancer cells infected with the recombinant Ad5CMV5-R1 (data not shown). These observations demonstrate that

the R1 anti-apoptotic activity does not require the presence of the tTA or rtTA protein and is functional in several types of cells.

To determine whether protection could be observed when apoptosis was induced by more physiological conditions (without CHX), Ad5CMV-Fas-L, an Ad recombinant that expresses Fas-L under the control of the standard CMV promoter, was used. At 72 h post-infection with this recombinant, apoptosis occurred in more than 90 % of A549-tTA cells. In sharp contrast, when they had been pre-infected for 7 h with Ad5TR5-R1, they were efficiently protected, the level of apoptosis being similar to that seen in mock-infected control (Fig. s2B). Adding doxycycline throughout the infection considerably reduced the protection. Together these results demonstrate that HSV-2 R1 is able to protect cells against apoptosis induced by activation of death receptors.

Ad proteins are not involved in the anti-apoptotic action of HSV-2 R1

At the low m.o.i. of Ad recombinants used in the present study the level of expression of Ad genes should be extremely low due to the absence of Ad replication. However, the involvement of Ad protein(s) in the protective effect, even if highly unlikely, could not be completely ruled out. To study this possibility, HeLa-tTA cells were transfected with different transfer vectors expressing either the R1 protein or, for comparison, two well-known anti-apoptotic proteins, Ad E1B 19K or baculovirus p35. These cells were chosen as they could be transfected \approx 10-fold more efficiently than A549 cells. However, on infection with the Ad5TR5-GFP_Q recombinant, they express the recombinant protein at a lower level probably due to a lower level of tTA protein expression (data not shown). In a first series of experiments, the expression of the recombinant proteins was driven by the regulatable TR5 promoter present in double cassette plasmids. As can be seen in Fig. s3(A), the R1 plasmid protected cells against apoptosis induced by CHX + TNF more efficiently (66 % of transfected cells) than the p35 plasmid (42 % of transfected cells) but less efficiently than the E1B 19K plasmid (87 % of transfected cells). For the three plasmids, transfection in the presence of doxycycline to repress recombinant protein expression decreased the protection. Quantification of the R1 concentration in pAd5TR5-R1 transfected cells

(0.05 %) suggested that some of the transfected cells could not have been protected due to limiting R1 expression. This possibility was confirmed in transfection experiments where R1 expression was driven by the constitutive CMV5 promoter. As shown in Fig. s3(B), cells transfected with pAdCMV5-R1 expressed R1 at a higher level and most of them (93 % of transfected cells) were protected. The control plasmid pAdCMV5-GFP_Q did not afford any protection. From these results, we could conclude that the R1 protective activity does not require co-expression of any Ad protein.

LEGENDS

Fig. s1 Doxycycline decreases R1 accumulation and R1-protection against TNF. (A) A549-tTA cells were infected with Ad5TR5-R1 at an m.o.i. of 5 in the presence of increasing concentrations of doxycycline (filled triangle) or mock-infected (filled square); after 7 h CHX+TNF were added. Percentage apoptosis was evaluated at 24 h post-infection. (B) Increasing amounts of proteins extracted from harvested cells were immunoblotted with an anti-R1 serum (representative experiment shown). Quantification was by densitometric comparison with a purified R1 standard. From three independent blots, the calculated mean values, expressed as a percentage of total cell protein for the 0.1, 0.3 and 1.0 ng/ml doxycycline samples, were 0.06 %, 0.01 % and < 0.002 %, respectively.

Fig. s2 Protection against TNF and Fas is independent of the tTA or rtTA proteins and of the presence of CHX. (A) HeLa cells were infected with increasing m.o.i.s of Ad5CMV5-R1; after 7 h control medium (open circle) or medium containing CHX (open triangle), or CHX + TNF (filled square) or anti-Fas antiserum (filled diamond) and apoptosis was scored from 24 to 26 h post-infection. (B) A549-tTA cells were first infected with Ad5TR5-R1 at an m.o.i. of 10 in the absence (open triangle, cross) or the presence (filled circle) of doxycycline or mock-infected (open square, filled square). They were reinfected (open triangle, filled circle, filled square) or not (open square, cross) 7 h later with Ad5CMV-Fas-L at an m.o.i. of 10. Apoptosis was scored at the indicated times after Ad5TR5-R1 infection.

Fig. s3 Ad proteins are not involved in the anti-apoptotic action of HSV-2 R1. HeLa-tTA cells were transfected with different plasmids (2 μ g) in the presence of FuGENE 6. After 36 h, CHX (gray bars) or CHX + TNF (black bars) were added and 14 h later apoptosis was scored under microscopic observation. The histogram values, expressed as a percentage of non-apoptotic cells, are the mean of two independent experiments. Cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting for R1 quantification or PARP (116 kDa) cleavage. In panel (A), the plasmids used were

pAdTR5-R1-K7-GFP_Q (R1), pAdTR5-p35-K7-GFP_Q (p35), pAdTR5-19K-K7-GFP_Q (19K); some dishes (+) contained doxycycline throughout the experiment. In panel (B), the plasmids used were pAdCMV5-GFP_Q (GFP_Q) and pAdCMV5-R1 (R1). The percentage transfection was determined as described in the published paper.

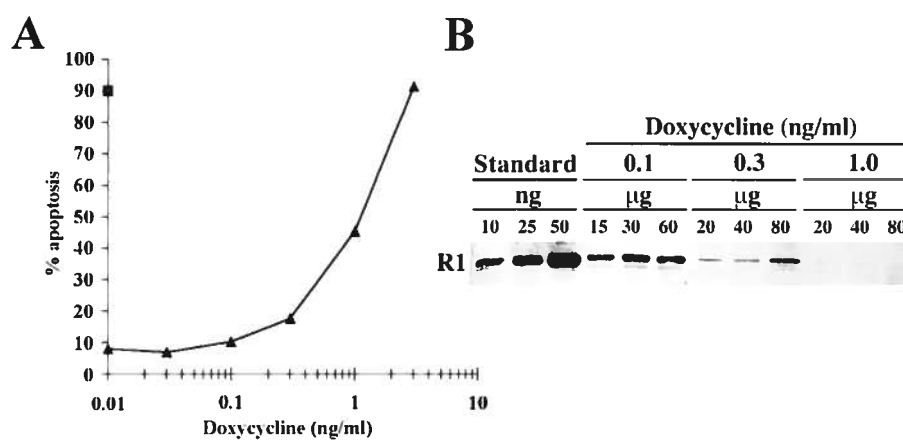


Fig.s1

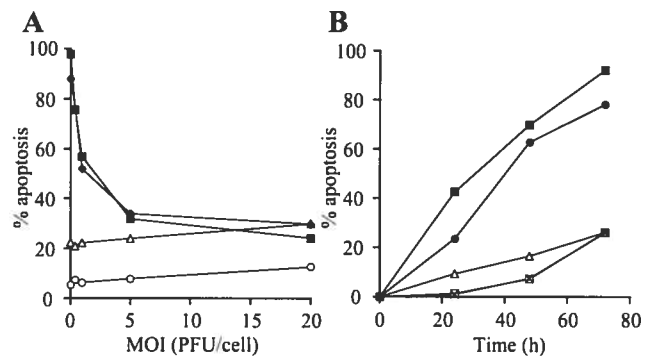


Fig.s2

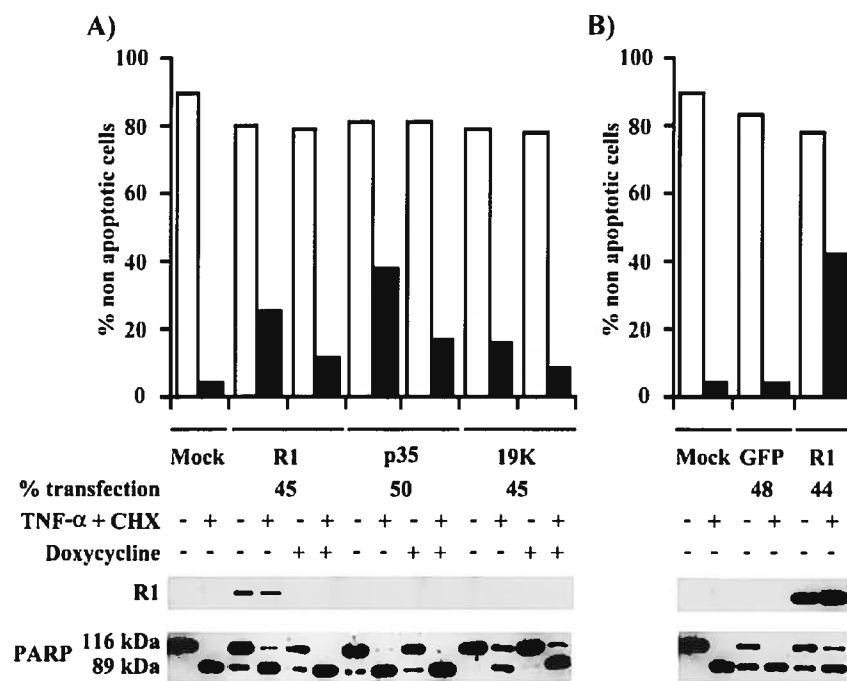


Fig.s3

2.2 : La sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex a une activité de chaperon moléculaire similaire à celle de Hsp27 (*The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27*. Auteurs: Stéphane Chabaud, Herman Lambert, A. Marie Josée Sasseville, Hugo Lavoie, Claire Guilbault, Bernard Massie, Jacques Landry et Yves Langelier.)

Contribution personnelle: J'ai démontré que: i) HSV-2 R1 était capable de former des structures oligomériques comme les petites protéines de choc thermique par des essais de filtration sur gel (Fig.2). ii) la sous-unité R1 humaine, sur-exprimée par transfection, ne permet pas de protéger les cellules traitées au TNF à la différence de son homologue HSV-2 R1 (Fig.4).

Contribution des co-auteurs:

Hugo Lavoie a réalisé l'alignement de séquence entre les sous-unités R1 herpétiques et les différentes sHsp (Fig.1a).

Herman Lambert du laboratoire du docteur Jacques Landry a réalisé les expériences démontrant que la sous-unité R1 possédait une activité de chaperon moléculaire à la différence de son homologue murin. (Fig.3)

Les autres co-auteurs ont contribué à la construction de vecteurs plasmidiques ou à la rédaction de l'article et la conception et la direction du travail.

The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27

Stéphane Chabaud^a, Herman Lambert^b, A. Marie-Josée Sasseville^a, Hugo Lavoie^a, Claire Guilbault^{a,c}, Bernard Massie^{c,d,e}, Jacques Landry^b, Yves Langelier^{a,d,*}

^a*Centre de recherche du Centre hospitalier, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H2L 4M1*

^b*Centre de recherche en cancérologie, Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, Laval, QC, Canada, G1R 2J6*

^c*Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, QC, Canada H4P 2R2*

^d*Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H2L 4M1*

^e*INRS-IAF, Université du Québec, Laval, QC, Canada H7N 4Z3*

Abstract HSV-2 R1, the R1 subunit of herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase, protects cells against apoptosis. Here, we report the presence in HSV-2 R1 of a stretch exhibiting similarity with the α -crystallin domain of the small heat shock proteins, a domain known to be important for oligomerization and cytoprotective activities of these proteins. Also, the HSV-2 R1 protein, which forms multimeric structures in the absence of nucleotide, displayed chaperone ability as good as Hsp27 in a thermal denaturation assay using citrate synthase. In contrast, mammalian R1, which does not contain α -crystallin domain, have neither chaperone nor anti-apoptotic activity. Thus, we propose that the chaperone activity of HSV-2 R1 could play an important role in viral pathogenesis.

Key words: Herpes simplex virus; ribonucleotide reductase R1; anti-apoptotic function; α -crystallin domain; chaperone activity; Hsp27

*Corresponding author. Hôpital Notre-Dame, Y-5603, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Canada, H2L 4M1. Fax: (1)-514-412-7590. E-mail address: yves.langelier@umontreal.ca (Y.Langelier)

1. Introduction

The herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1, -2) ribonucleotide reductase (RR), which converts ribonucleoside diphosphates to the corresponding deoxyribonucleotides, plays a key role in the synthesis of viral DNA in resting cells (reviewed in [1]). The association of two subunits, denoted R1 and R2, the former of which contains the active site, forms the holoenzyme. Based on studies of *Escherichia coli* RR, the HSV holoenzyme is typically depicted as an R1₂R2₂ heterotetramer. The HSV RRs differ from their mammalian homologues by being produced in excess over their requirement for viral DNA synthesis (N. Lamarche and Y. Langelier, unpublished results) and by being unresponsive to allosteric nucleotide effectors [1]. Moreover, whereas mammalian R1 is monomeric in the absence of added ligands [2-4], HSV R1 like *E. coli* R1 [5] is believed to be dimeric. For *E. coli* R1, two α -helices located in the first third of the protein provide essential contacts for dimerization [6].

Two observations suggest that the HSV R1s could be proteins with more than one function: (i) they possess a unique NH₂ domain of ~400 amino acids that is dispensable for ribonucleotide reduction [7], and (ii) their synthesis begins before the one of their R2 partners [8]. The long-standing view that their unique NH₂ domain could possess an intrinsic protein kinase activity [9-12] was ruled out by the demonstration that both HSV-1 R1 and HSV-2 R1 do not possess such an activity [13,14]. We previously found that the HSV-2 R1 protects the cells from death receptor-induced apoptosis, suggesting that it could contribute to viral propagation by preventing apoptosis induced by the immune system. The R1 NH₂ domain expressed on its own does not exhibit anti-apoptotic activity, suggesting that both domains of R1 or part(s) of them are necessary for this new function [15].

The reports of homology between HSV-2 R1 and the small heat shock protein (sHsp), HspB8, [16,17] led us to observe in HSV R1 a stretch exhibiting similarity with the α -crystallin domain of sHsps. In these proteins, the C-terminal α -crystallin domain is flanked by a short flexible tail and by a variable N-terminal domain. The 3D structures of Hsp16.5 from *Methanococcus jannaschii* and of Hsp16.9 from wheat

show that, despite low level of identity (~20%), the α -crystallin domains of these evolutionary distantly related proteins adopt a similar immunoglobulin G-like-fold [18,19]. A group of 25 proteins of the *Arabidopsis* genome were reported to contain one or more α -crystallin domains at variable positions in their polypeptide chain [20]. The α -crystallin domain acts as a flexible structural building block for the formation by sHsps of high molecular mass structures. sHsps exhibit the in vitro ability to bind unfolded proteins and to prevent their aggregation in an ATP-independent manner (reviewd in [21]). Recent genetic data demonstrated a correlation between sHsp function in vivo and chaperone activity in vitro [22]. Also, the chaperone as well as other more specific activities of several sHsps are likely responsible for their cytoprotective and anti-apoptotic activity against several cytotoxic treatments including activation of the death receptors [23,24].

It was recently found that the α -crystallin domain and the cochaperone of Hsp90, p23, which has the same 3D folding as the α -crystallin domain, show a pattern of conserved residues suggesting a common evolutionary origin for both domains. p23-like domains were detected in several families of proteins fused with other domains in several multidomain proteins [25].

Here, we show that the anti-apoptotic HSV-2 R1 with its α -crystallin domain forms a hexameric structure in the absence of nucleotide and has a chaperone activity as potent as Hsp27. Devoid of such a domain, the mammalian R1 does not have chaperone activity and does not protect cells from apoptosis induced by death receptor activation.

2. Material and methods

2.1 Materials

The conditions for the culture of human HeLa and A549-tTA cells were as reported [26]. The plasmids, pAdCMV5-HSV-2 R1 for the expression of the HSV-2 R1 and pAdCMV5-GFP for the expression of a mutated green fluorescent protein, were described [26,27]. The plasmid pAdCMV5-HuR1 for the expression of the human R1 (HuR1) was constructed by inserting in pAdCMV5 the HuR1 coding sequence taken from the plasmid pJVETLZ-HuR1. Recombinant HSV-2 R1 was purified by peptide affinity as described [13]. Recombinant mouse R1 (mR1), purified by peptide affinity [28], was kindly provided by Barry Cooperman. Recombinant Chinese hamster Hsp27 and Δ 5-23Hsp27, a chaperone inactive mutant of Hsp27 (H. Lambert and J. Landry, unpublished results), were obtained from glutathione S-transferase-Hsp27 fusion proteins. The fusion proteins were affinity purified on glutathione-Sepharose beads, treated with thrombin to release the Hsp27 proteins and further purified to homogeneity by anion exchange chromatography [29].

2.2 Gel Filtration

For the experiment with 0.7 μ M HSV-2 R1, the purified protein was slightly labeled with [γ - 32 P]ATP taking advantage of traces of contaminating protein kinase(s) as described [13]. Samples (100 μ l) were loaded on a Superdex 200 hr10/10 column with 50 mM Hepes (pH 7.9), 2 mM dithiothreitol containing either 150 mM NaCl (standard buffer) or 1 M NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. The radioactivity was measured by Cerenkov counting. Blue dextran (2000 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase, (158 kDa) and bovine serum albumin (65 kDa) were used as molecular mass standards.

2.3 Chaperone activity

The kinetics of thermal denaturation of citrate synthase (CS) were measured using a Varian spectrophotometer (model Cary 1 Bio) equipped with a temperature-controlled cell holder. CS was diluted to 75 nM (dimer) in 50 mM Hepes (pH 7.5) in the absence or presence of Hsp27, HSV-2 R1 or mR1. Light scattering was measured at 320 nm at 43 °C.

2.4 Induction and analysis of apoptosis

HeLa cells were seeded in 6-well plates (1.5×10^5 cells/well) 24 h before transfection with increasing amounts of plasmids using the calcium phosphate technique. After 36 h, the cells received new medium containing either 15 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (CHX) or 15 $\mu\text{g/ml}$ CHX plus 2.5 ng/ml tumor necrosis factor (TNF) or no additives for the control cultures. After 7 h, the percentage of apoptotic cells was determined under microscopic observation in 10 randomly selected fields as recently detailed [15]. Briefly, percent apoptosis was calculated by dividing the number of cells with apoptotic morphology (exhibiting membrane blebbing and/or cell body condensation) by the total number of cells. In control experiments, Hoechst staining had indicated that cells scored apoptotic by morphology also exhibited nuclear condensation and fragmentation. Caspase 3 and caspase 8 activities were evaluated using the ApoAlertTM (Clontech) fluorescent assay kits as described [15].

2.5 Protein extraction and immunoblot analyses

Protein extracts were prepared as described [13]. For HSV R1 and HuR1 detection, 168R1 a rabbit polyclonal anti-HSV-2 R1 antiserum and a monoclonal antibody specific for HuR1 kindly provided by Mike Cordingley were used, respectively. Quantification of the percent recombinant protein in total protein extracts was done by immunoblotting using as standards purified HSV-2 R1 or extracts of 293 cells overexpressing the HuR1.

3. Results

3.1 HSV R1 possesses a domain with similarity with the α -crystallin domain of sHsps

Recently, a protein, first described as having homology with the amino-terminal domain of the HSV-2 R1 [16], was later demonstrated to be a member of the sHsp family and named HspB8 [17]. These observations prompted us to scrutinize R1 for the presence of α -crystallin domain. A Clustal W alignment of the α -crystallin domains of nine human sHsps was used to generate a profile that was compared with the HSV-1 and HSV-2 R1 sequences. The best similarity detected spans from amino acids 300 to 400. The alignment presented in Fig. 1A, which results from improvement by manual editing, shows that many consensus residues are conserved in the R1 sequences. Noteworthy are four residues (indicated by triangles): L325, R354, G380 and L382 in HSV-2 R1. The Leu residue corresponding to L325, when changed by even a relatively conservative Ala mutation in *Synechocystis* Hsp16.6, caused severe loss of HSP16.6 function in vivo [22]. The R354 residue corresponds to a mutation site in two human genetic disorders: R116C mutation in α A-crystallin and R120G mutation in α B-crystallin respectively causes autosomal dominant cataract [30] and desmin-related myopathy [31]. The G380 and L382 residues present in the HSV-2 R1 hydrophobic motif, GLLNY, are the most conserved amino acids among all known sHsps [20,32]. However, some other consensus residues are not conserved in the R1 sequences explaining why the R1 α -crystallin domain is not detected by standard profiles such as the 'heat shock hsp20 proteins family profile' of Prosite. These replacements could result from constraints imposed by the presence on one side of the unique NH2 domain exhibiting a low level of similarity between the two HSV R1 (< 50%) and on the other side of the large highly homologous RR domain (Fig. 1B).

3.2 HSV-2 R1 forms high molecular weight complexes

The α -crystallin-domain in HSV-2 R1 suggested a chaperone function. As the chaperone activity of sHsps is often related to their capacity to oligomerize [18,22], we first determined the molecular mass of HSV-2 R1 by gel filtration on a Superdex-

200 column in physiologic salt conditions without adding any nucleotide. For an R1 concentration of 0.7 μM , we observed with either unlabeled R1 detected by optical density (data not shown) or ^{32}P -labeled R1 (Fig. 2A) a major broad peak corresponding to molecular masses ≥ 750 kDa, the value expected for an R1 hexamer, and a minor one at ~ 250 kDa, the value expected for an R1 dimer. At a five-fold higher R1 concentration, the peak corresponding to the dimer disappeared, indicating that the formation of multimers is dependent of the concentration of the protein (Fig. 2B). Adding 1 M NaCl to the protein and the eluent produced a drastic shift of the peak to a position slightly higher than for the dimer (Fig. 2B), suggesting that oligomerization involved complementary ionic charges.

3.3 HSV-2 R1 suppresses the thermal aggregation of CS

We next investigated the HSV-2 R1 chaperone activity by measuring the effect of adding it in increasing concentration on the kinetics of denaturation of CS at 43 °C. The α -crystallin-domain containing protein Hsp27 and an inactive mutant of Hsp27, $\Delta 5$ -23Hsp27, were used as positive and negative controls, respectively. At concentrations higher than 4 $\mu\text{g/ml}$, HSV-2 R1 totally inhibited the denaturation and aggregation of CS at 43 °C as measured from the light scattering of the CS solution (Fig. 3A) or the amount of CS pelletable at 17000 X g after 30 min of heating (data not shown). The IC_{50} (the concentration required to inhibit 50% of CS denaturation) value was 1.1 $\mu\text{g/ml}$ for HSV-2 R1 as compared to an IC_{50} of 3.2 $\mu\text{g/ml}$ for Hsp27. $\Delta 5$ -23Hsp27 had no effect at concentrations up to 25 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3B). Considering that at the low effective concentration of HSV-2 R1 it was present as a mixture of hexamer and dimer with masses between 750 kDa and 250 kDa whereas Hsp27 forms a 24-mer of 600 kDa, it can be estimated that R1 ($\text{IC}_{50} = 1.5$ -4.5 nM) has a chaperone activity as good as if not better than Hsp27 ($\text{IC}_{50} = 5.3$ nM).

3.4 Cellular R1 does not protect against apoptosis and does not possess chaperone activity

Attempts to determine the functional importance of the HSV-R1 α -crystallin domain in the HSV-2 R1 anti-apoptotic activity by deleting it completely or in part have been hampered by obtaining either pro-apoptotic proteins such as R1($\Delta 2$ -357) [13] or fully insoluble products such as R1($\Delta 2$ -398), R1($\Delta 2$ -496), R1($\Delta 378$ -445) and

R1(Δ 107-446) (unpublished data). Thus, to get a first insight into the importance of the α -crystallin domain in both anti-apoptotic and chaperone activities of HSV R1, we asked whether mammalian R1, an R1 without α -crystallin domain, would exhibit such activities. To study the anti-apoptotic activity, HeLa cells were transfected with plasmids expressing either the HSV-2 R1 or HuR1 and the extent of apoptosis was measured by microscopic observation (Fig. 4A) and determination of caspase 3 and caspase 8 activities (Fig. 4B). Whereas the HSV-2 R1 efficiently protected cells against apoptosis induced by TNF+CHX as previously observed [15], the HuR1 was not protective at all. Protein quantification performed using appropriate standards for the samples transfected with 50 μ g/ml of plasmids showed that both R1 proteins were produced in roughly similar amount (Fig. 4C).

The ability of purified mR1 to suppress the thermal aggregation of CS was studied in the conditions used to demonstrate the chaperone activity of HSV-2 R1 (Fig. 3C). These experiments showed that the mR1 (13.5 μ g/ml) not only did not impair the aggregation of CS but also that it was self-aggregating when heated at 43 °C. Similar results were obtained in the presence of 4 mM ATP plus MgCl₂ (Fig. 3D). These R1 ligands are necessary for mammalian RR activity [33] and it has been shown that at these concentrations they cause R1 oligomerization [2,3]. These data showed that mammalian R1, an R1 without α -crystallin domain, have neither chaperone nor anti-apoptotic activity.

4. Discussion

Here, we have shown that the HSV-2 R1, which contains a domain exhibiting similarity to the α -crystallin domain of sHsps, has a chaperone activity similar to Hsp27, a sHsp. To our knowledge, HSV R1 is the first protein produced by human cells identified as containing one α -crystallin domain followed by another functional domain, herein a RR domain. Only plant proteins have been reported to contain an α -crystallin domain at variable positions in their polypeptide chains. For none of these plant proteins, which are unrelated to sHsps, has a function been ascribed to this structural motif [20]. Interestingly, for some of the proteins containing p23-like domains such as B5+B5R flavo-hemo cytochrome NAD(P)H oxidoreductase, this motif is present as a hinge between the cytochrome and the reductase domains. From what is known about the function of the p23-like domain in the different protein families in which it is present, it was postulated that the p23 domain is involved in stabilizing folding structure and/or in mediating protein-protein interaction [25].

The position of the α -crystallin domain in HSV R1, where it replaces the allosteric regulatory site able to bind ATP or dATP present in non-viral R1 (Fig. 1B), suggests that it could be important for multimerization that occurs in the absence of nucleotide. mR1, which is devoid of an α -crystallin domain, sediments mainly as a monomer in the absence of nucleotide [2-4], and requires ATP concentrations above 1 mM to form hexamers [3]. By comparison with what is known for sHsps and p23 domain-containing proteins, we propose as model for HSV R1 that the α -crystallin domain could contribute to the protein quaternary structure by providing additional point(s) of interaction between the two monomers, thus stabilizing the dimer. Additionally or alternatively the domain could provide point(s) of contact essential for multimerization. Our observation that the HSV-2 R1 form multimeric structure at relatively low concentration in the absence of any added nucleotide is in favor of this model.

The chaperone mechanism of sHsp appears to involve temperature-regulated exposure of hydrophobic binding sites present mainly in their α -crystallin domain [18,19]. As we have shown that the HSV R1 but not mR1 exhibited chaperone

activity, it can be suggested that the presence of the α -crystallin domain is important for the chaperone activity. In addition, α -crystallin domains are thought to play an important role in preventing sHsp self-aggregation during heat stress [18]. Hence, we have observed that HSV R1 did not aggregate during heating at 43 °C whereas mR1 readily formed insoluble precipitate. Also, noteworthy is the observation that the RR activity of HSV R1 is far more resistant to heat inactivation than that of mammalian R1, a 20 min heat treatment at 50 °C inactivating only 10% of the former and more than 99% of the latter [34]. Direct evidence for the importance of the α -crystallin domain in the newly discovered HSV R1 activities has so far proven difficult to obtain because partial or total deletion of the domain alters the solubility of the protein. More specific mutations such as substitution of conserved residues R354 and L382 could be helpful as similar substitutions in sHsp have been shown to reduce their chaperone activity [35,36]. The deleterious effect of deleting the α -crystallin domain on R1 protein solubility suggests that this domain could also play an important role in the polypeptide folding.

Since viruses are obligate intracellular parasites, the folding of viral proteins is generally accommodated by host chaperones that are often induced upon viral infection. An increasing number of viruses have been described to encode chaperones of diverse families including homologues of Hsp70, DnaJ and GroES [37]. However, HSV is the first virus described to code for a protein having a structural domain and chaperone activity similar to sHsp. The importance of this new function of HSV R1 in viral pathogenesis remains to be studied. One possibility is the protection of viral polypeptides during HSV reactivation triggered by fever. Thus, by assisting cellular chaperones in protecting viral proteins during heat stress, HSV R1 could contribute to the efficiency of virus production. In favor of that are observations made with the HSV-1 R1 null mutant ICP6 Δ . When tested in exponentially growing Vero cells where the cellular RR complemented the defect in viral reductase, this mutant grew as well as the WT at 33 °C. In contrast at 39.5 °C, the growth of the mutant was severely compromised whereas the one of the WT was only slightly affected [38]. Another possibility is that even at 37°C HSV R1, which accumulates at high level

(2% of total proteins), could be necessary to prevent protein aggregation during the high rate of viral protein synthesis.

In summary, the anti-apoptotic HSV-2 R1, which possesses a domain distantly related to the α -crystallin domain of sHsps, has also a chaperone activity similar to that of sHsps. In contrast, without an α -crystallin domain mammalian R1 does not have chaperone activity. As we have also observed that the HuR1 could not impair apoptosis induced by death receptor activation, it is tempting to speculate that the α -crystallin domain is important for the HSV R1 anti-apoptotic activity. It could act either directly via its role for chaperone activity or oligomer formation or indirectly by being necessary for an efficient folding of the protein. Formation of large oligomers involving the α -crystallin domain has been shown to be important for the anti-apoptotic activity of some sHsps [39,40].

Acknowledgements

We are grateful to Lars Thelander for 932 monoclonal antibody, to Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd. for the anti-human R1 monoclonal antibody, to Barry Cooperman for purified mR1 and to Gilles Matton for HSV R1 purification. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grants MT-14686 to YL and MT-7088 to JL, and by National Research Council of Canada (NRCC) Grant to BM. This is a NRCC publication no. 37702.

References

- [1] Conner, J., Marsden, H. and Clements, B.H. (1994) *Rev. Med. Virol.* 4, 25-34.
- [2] Thelander, L., Eriksson, S. and Akerman, M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7426-32.
- [3] Kashlan, O.B., Scott, C.P., Lear, J.D. and Cooperman, B.S. (2002) *Biochemistry* 41, 462-74.
- [4] Ingemarson, R. and Thelander, L. (1996) *Biochemistry* 35, 8603-8609.
- [5] Brown, N.C. and Reichard, P. (1969) *J. Mol. Biol.* 46, 25-38.
- [6] Uhlin, U. and Eklund, H. (1994) *Nature* 370, 533-9.
- [7] Conner, J., Macfarlane, J., Lankinen, H. and Marsden, H. (1992) *J. Gen. Virol.* 73, 103-12.
- [8] Conner, J., Murray, J., Cross, A., Clements, J.B. and Marsden, H.S. (1995) *Virology* 213, 615-623.
- [9] Chung, T.D., Wymer, J.P., Smith, C.C., Kulka, M. and Aurelian, L. (1989) *J. Virol.* 63, 3389-98.
- [10] Paradis, H., Gaudreau, P., Massie, B., Lamarche, N., Guilbault, C., Gravel, S. and Langelier, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 9647-51.
- [11] Luo, J.H. and Aurelian, L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 9645-53.
- [12] Cooper, J., Conner, J. and Clements, J.B. (1995) *J. Virol.* 69, 4979-85.
- [13] Langelier, Y., Champoux, L., Hamel, M., Guilbault, C., Lamarche, N., Gaudreau, P. and Massie, B. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1435-43.
- [14] Conner, J. (1999) *J. Gen. Virol.* 80, 1471-6.
- [15] Langelier, Y. et al. (2002) *J. Gen. Virol.* 83, 2779-2789.
- [16] Smith, C.C., Yu, Y.X., Kulka, M. and Aurelian, L. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 25690-9.
- [17] Kappe, G., Verschuure, P., Philipsen, R.L., Staalduinen, A.A., Van de Boogaart, P., Boelens, W.C. and De Jong, W.W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1520, 1-6.
- [18] van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C. and Vierling, E. (2001) *Nat. Struct. Biol.* 8, 1025-30.

- [19] Kim, K.K., Kim, R. and Kim, S.H. (1998) *Nature* 394, 595-9.
- [20] Scharf, K.D., Siddique, M. and Vierling, E. (2001) *Cell Stress Chaperones* 6, 225-37.
- [21] MacRae, T.H. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 899-913.
- [22] Giese, K.C. and Vierling, E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 46310-8.
- [23] Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. and Kroemer, G. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 433-42.
- [24] Charette, S.J., Lavoie, J.N., Lambert, H. and Landry, J. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 7602-12.
- [25] Garcia-Ranea, J.A., Mirey, G., Camonis, J. and Valencia, A. (2002) *FEBS Lett.* 529, 162-7.
- [26] Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Bélanger, F. and Langelier, Y. (1998) *J. Virol.* 72, 2289-96.
- [27] Massie, B. et al. (1998) *Cytotechnology* 28, 53-54.
- [28] Scott, C.P., Kashlan, O.B., Lear, J.D. and Cooperman, B.S. (2001) *Biochemistry* 40, 1651-61.
- [29] Lambert, H., Charette, S.J., Bernier, A.F., Guimond, A. and Landry, J. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 9378-85.
- [30] Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W. and Weleber, R.G. (1998) *Hum. Mol. Genet.* 7, 471-4.
- [31] Vicart, P. et al. (1998) *Nat. Genet.* 20, 92-5.
- [32] de Jong, W.W., Caspers, G.J. and Leunissen, J.A. (1998) *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 151-62.
- [33] Thelander, L. and Reichard, P. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* 48, 133-58.
- [34] Cohen, E.A., Charron, J., Perret, J. and Langelier, Y. (1985) *J. Gen. Virol.* 66, 733-45.
- [35] Kumar, L.V., Ramakrishna, T. and Rao, C.M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 24137-41.
- [36] Mao, Q. and Chang, Z. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1257-61.
- [37] Sullivan, C.S. and Pipas, J.M. (2001) *Virology* 287, 1-8.

- [38] Goldstein, D.J. and Weller, S.K. (1988) *Virology* 166, 41-51.
- [39] Rogalla, T. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18947-56.
- [40] Bruey, J.M. et al. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 645-52.

Figure legends

Fig. 1 HSV R1s exhibit similarity with the α -crystallin domain of sHsps. A: Alignment of the α -crystallin domains of the two HSV R1s, nine of the known human sHsps, wheat Hsp16.9 and *M. jannaschii* Hsp16.5. Conserved residues in at least six of the 13 sequences are in black. The bottom lines show the β -strands present in the secondary structures of TaHsp16.9 and MjHsp16.5, respectively [18,19]. The human sHsps are here designated as 'HspB 1-9' as proposed by Kappé *et al.* [17] and by their corresponding old nomenclature. B: Schematic representation of the domains present in HSV R1s, HuR1 and Hsp27. For HSV R1s, regions exhibiting > 70 % similarity between the two HSV types are depicted by dark gray boxes and < 50% by hatched boxes. The reductase domain contains two sub-domains termed all alpha domain (Pfam, ribonuc_red_lg) and barrel domain (Pfam, ribonuc_red_lgC). The α -crystallin domain shown in black is absent in HuR1 where the amino terminal part forms a nucleotide binding site. The WDPF domain in Hsp27 is responsible for intermolecular Hsp27 interactions [29] and essential for chaperone activity (H. Lambert and J. Landry, unpublished results).

Fig. 2 Gel filtration chromatography shows that HSV-2 R1 forms hexameric structure. A: Purified ^{32}P -labelled HSV-2 R1 (0.7 μM) was loaded on a Superdex 200 column and radioactivity in each fraction was measured. B: HSV-2 R1 (3.5 μM) was loaded in standard buffer (Control) or in the presence of 1 M NaCl (NaCl) and the absorbance at 280 nM was recorded. The elution volume of protein standards and blue dextran (V_0) are shown above.

Fig. 3 HSV-2 R1 but not mammalian R1 suppresses the thermal aggregation of CS. A: Kinetics of denaturation of CS. Solutions containing CS alone (●), HSV-2 R1 (9.4 $\mu\text{g/ml}$) + CS (■), Hsp27 (14.2 $\mu\text{g/ml}$) + CS (○) or $\Delta 5$ -23Hsp27 (12.4 $\mu\text{g/ml}$) + CS (□) were heated at 43 °C for up to 30 min. Light scattering at 320 nm is indicated in relative arbitrary units. B: Dose-dependent protection of denaturation as shown by the relative light scattering at 30 min as a function of the concentration of the chaperones. Symbols are as in A. C: Kinetics of denaturation of CS. Solutions

containing CS alone (●), mR1 (13.5 $\mu\text{g/ml}$) + CS (■) or mR1 alone (▲) were processed as described in A. D: The experiment described in C was repeated in the presence of 4 mM ATP plus 10 mM MgCl_2 .

Fig. 4 HuR1 does not protect against apoptosis. HeLa cells were transfected with increasing amount of the plasmids pAdCMV5-HSV-2R1 (■, □) or pAdCMV5-HuR1 (●, ○). After 36 h, CHX (□, ○) or CHX + TNF (■, ●) were added for 7 h. A: The % of apoptotic cells was evaluated under microscopic observation. Values represent the means of 10 random-selected fields. B: Caspase 3 (solid lines) and caspase 8 (dashed lines) activities are expressed in pmole/min/mg. C: The amounts of HSV-2 R1 and HuR1 accumulated in cells transfected with 50 $\mu\text{g/ml}$ of plasmid were evaluated with an immunoblot analysis by comparison with standards.

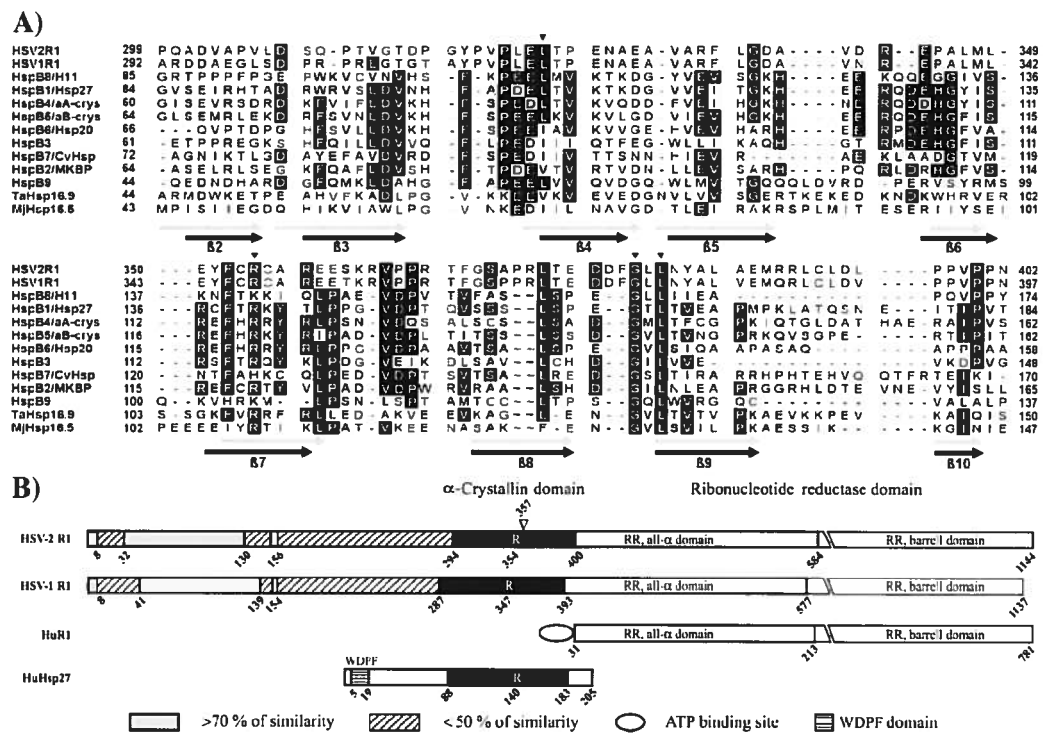


Fig.1

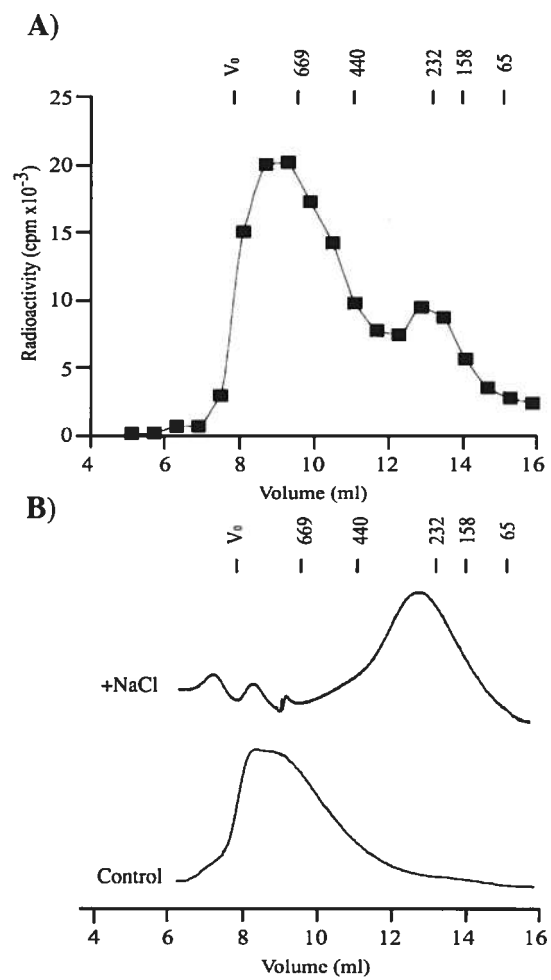


Fig.2

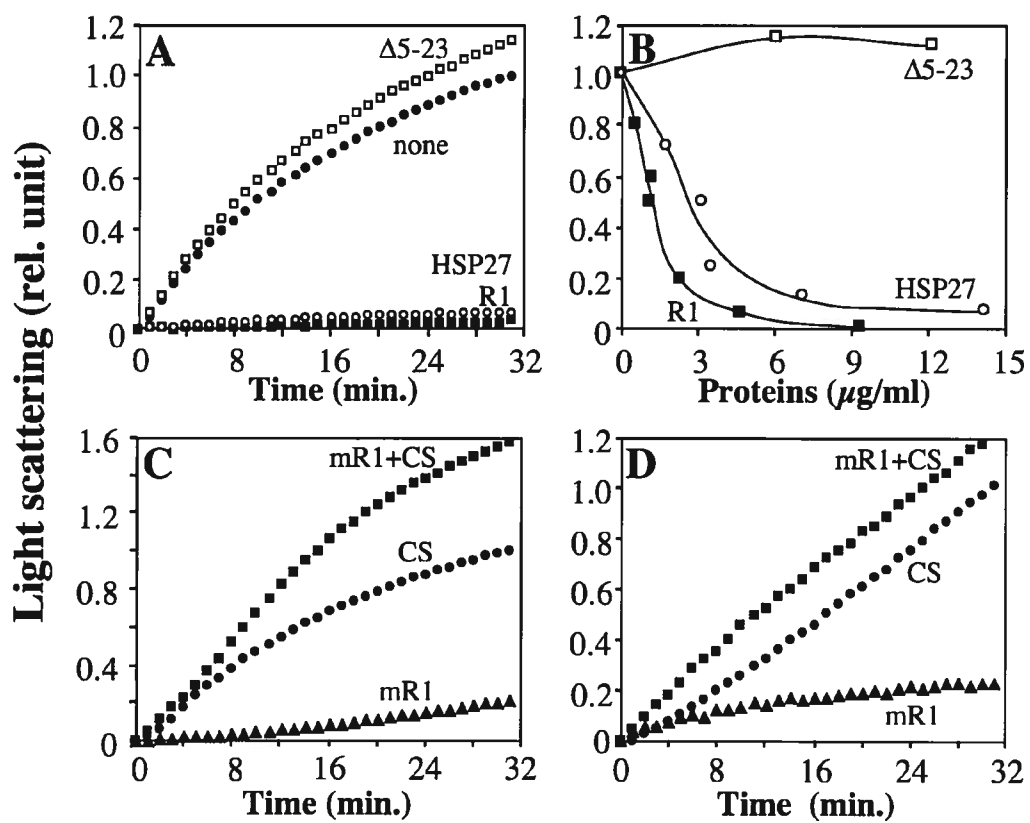


Fig.3

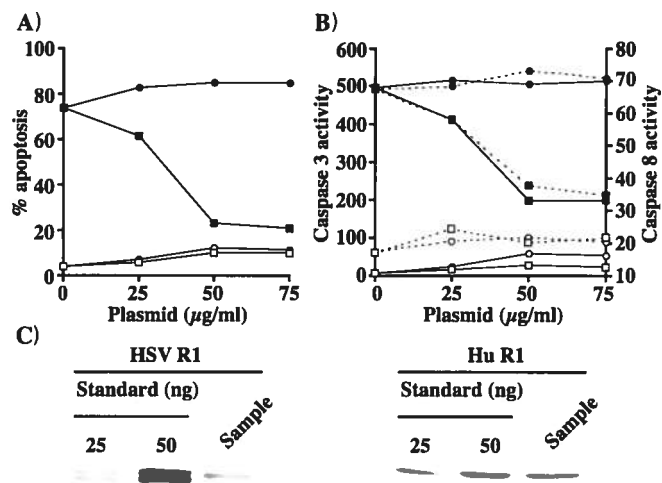


Fig.4

2.3 : Le domaine RR de la sous-unité R1 de la RR du virus de l'herpès simplex est essentiel pour la fonction anti-apoptotique de R1 (The Ribonucleotide Reductase Domain of the R1 Subunit of Herpes Simplex Virus type-2 Ribonucleotide Reductase Is Essential for R1 Anti-apoptotic Function Auteurs: Stéphane Chabaud, Mehdi Seyyed Elahi, A. Marie-Josée Sasseville, Antoine Caron, Antonio Nanci, Claire Guilbault, Bernard Massie et Yves Langelier.)

Contribution personnelle:

J'ai réalisé: i) les études de structure-activité notamment la caractérisation des potentiels pro- et anti-apoptotique des diverses constructions (Fig.2 et 6) ainsi que leur solubilité (Table 1) ii) les travaux d'immuno-fluorescence ou de fluorescence directe (pour les fusions GFP) (Fig.3). iii) les travaux qui ont démontré que la surface de liaison de R2 sur R1 n'était pas importante pour l'activité anti-apoptotique de cette dernière protéine et j'ai montré que ce n'était pas au niveau de la liaison du C-terminus de R2 sur R1 en utilisant des peptides mimant cette région de R2 (Fig. 7). iv) J'ai préparé les échantillons nécessaires aux travaux de microscopie réalisés au laboratoire du Dr Nanci (Fig.4).

Contribution des co-auteurs:

Les travaux de microscopie électronique ont été réalisés au laboratoire du Dr Nanci (Fig.4).

Les autres co-auteurs ont apporté leur contribution à la construction de vecteurs plasmidiques, adénoviraux ou de la lignée stable de cellules A549-tTA exprimant HSV R1-GFP, à la rédaction de l'article et la conception et la direction du travail.

The Ribonucleotide Reductase Domain of the R1 Subunit of Herpes Simplex Virus type-2 Ribonucleotide Reductase Is Essential for R1 Antiapoptotic Function

Running Title: ANTIAPOPTOTIC DOMAIN OF HSV RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE R1

Stéphane Chabaud,¹ Seyyed Mehdy Elahi,² A. Marie-Josée Sasseville,¹ Claire Guilbault,² Antoine Caron,² Antonio Nanci,³ Bernard Massie,^{2,4,5} and Yves Langelier^{1,4,6*}

Centre de recherche du CHUM and Institut du cancer de Montréal,¹ Department of stomatology,³ Department of Medicine,⁶ and Department of microbiology and immunology,⁴ Université de Montréal, Montréal, Québec; Institut de recherche en biotechnologie,² Montréal, Québec; and INRS-IAF,⁵ Université du Québec, Laval, Québec

*To whom correspondence should be addressed: Hôpital Notre-Dame, Y-5603, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Canada, H2L 4M1. Phone: 514-890-8000 #26827. FAX: 514-412-7590. E-mail: yves.langelier@umontreal.ca

ABSTRACT

HSV-2 R1, the R1 subunit of herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase, which in addition to its C-terminal reductase domain possesses a unique NH₂ domain of about 400 amino acids, protects cells against apoptosis. As the NH₂ domain on its own was not antiapoptotic we postulated recently that both domains of R1 or part(s) of them could be necessary to this function. Here, N- and C-terminal deletions were introduced in HSV-2 R1 to map the domain(s) involved in its antiapoptotic potential. The results show that, whereas most of the NH₂ domain including a part of the recently described α -crystallin domain is dispensable for antiapoptotic activity, it is rather the integrity of the structured ribonucleotide reductase domain that is required for protection. As the α -crystallin domain appears to play an important role in protein folding and oligomerization, the amino terminal boundary of the antiapoptotic domain could not be precisely defined. In addition, we provided evidence that overexpressing R2 up to 30 fold over R1 did not decrease protection from TNF, indicating that the R1 surface where R2 binds is not involved in antiapoptotic activity. Furthermore, this result suggests that the coexpression of both ribonucleotide reductase subunits during the lytic cycle does not affect protection from cytokines.

INTRODUCTION

The successful persistence of herpesviruses involves genes controlling cell cycle and apoptosis. In contrast to the promotion of cell progression into the S phase required for small DNA virus replication, an S phase environment is not necessary for the replication of many herpesvirus species. The herpesviruses of the α and γ sub-families encode a DNA polymerase, as well as enzymes involved in generating deoxyribonucleotides notably ribonucleotide reductase (RR), an enzyme consisting of two subunits (R1 and R2). Therefore, they can replicate without the need of these cellular S-phase enzymes. Also, they can prevent competition with the cellular DNA replication machinery for the limiting deoxyribonucleotides pools by encoding inhibitors of cellular DNA replication (rev. in 20). Another important aspect of the sophisticated herpesvirus molecular pathogenesis is that several of the viral proteins possess multiple functions (57).

α -Herpesviruses, herpes simplex virus (HSV) and varicella zoster virus (VZV), establish latency in non-dividing neuronal cells. Because these neurons have shut down the synthesis of their own RR, the virally encoded R1 protein through association with its complementary viral R2 subunit is essential for reactivation by providing deoxyribonucleotides for viral DNA replication (25, 26). The R1 of HSV-1 and HSV-2 possess an NH2 domain of about 400 amino acids that is not found in R1 of other species (45). Because i) the unique NH2 domain is dispensable for RR activity (12, 39) and ii) the HSV R1 begins to be expressed earlier in the lytic cycle than its R2 partner (8, 51), it has been suggested that the protein through its NH2 domain could have additional function(s) (13).

The hypothesis that a protein kinase activity could be intrinsic to the unique NH2 domain of the HSV R1 (7, 15) has been ruled out by extensive biochemical work showing that the protein does not possess such an activity but rather is a good substrate for co-purifying protein kinases (11, 35). Two novel activities were recently associated with HSV-2 R1 (6, 34, 49). Firstly, we showed that HSV-2 R1 expressed on its own protects epithelial cells against TNF- and FasL-induced apoptosis (34). Evidence was also provided from infection experiments with two HSV-1 R1 deletion mutants (*hrR3* and *ICP6 Δ*) that, in addition to its RR function essential for viral

reactivation, the HSV R1 could contribute to viral propagation by preventing apoptosis induced by cytokines of the TNF family (34). The R1 NH2 domain *per se* does not exhibit protection from cytokine-induced apoptosis, suggesting that both domains of R1 or part(s) of them are necessary for the function (34). Others have shown that neuronally differentiated PC12 cells and neuronal primary murine cultures transfected with an expression vector for HSV-2 R1 were protected from cell death resulting from nerve growth factor withdrawal (50). Secondly, the presence in the HSV R1s of a stretch exhibiting weak similarity with the α -crystallin domain of the small heat shock proteins (sHsp) led us to demonstrate that the HSV-2 R1 protein displays a chaperone activity as efficient as Hsp27 in a thermal denaturation assay using citrate synthase. As in contrast the mammalian R1, which does not exhibit similarity with an α -crystallin domain, does not have neither chaperone nor antiapoptotic activities, it was proposed that the α -crystallin domain of HSV-2 R1 could play an important role in the structural organization and antiapoptotic function of the protein (6).

From the 3-D structure of the *E. coli* R1, a model of the HSV R1 RR domain was build (17, 46, 55). Based on this model and referring to the numbering of the structural elements of *E. coli* R1, the HSV R1 RR domain would be composed of three domains: one helical N-terminal domain, one ten-stranded α/β -barrel domain, and a small $\alpha+\beta$ C-terminal domain. These domains are inter-related by numerous contacts between domains: *e.g.*, a long antiparallel hairpin β_{10} - β_{11} at the end of the α/β -barrel domain forms interactions with the N-terminal domain. The first two α -helices of the α/β -barrel domain, α_A and α_B provide the contacts for dimerization by forming a four-helix bundle. The allosteric activity site located at the N-terminal of the *E. coli* R1 (19) is replaced in HSV R1 by the α -crystallin domain explaining in part why the HSV R1 is insensitive to allosteric control.

Sequencing of the genomes of several β -herpesviruses including the human, chimpanzee, mouse, rat and tupaia cytomegalovirus (CMV) as well as human herpesvirus (HHV)-6 and -7 identified an ORF with homology to R1. As an ORF for R2 was not found, it was suggested that these viruses do not express a functional RR enzyme. Multiple sequence alignments indicated that several essential RR catalytic

residues are missing in these β -herpesvirus R1s and biochemical characterization of the HHV-7 R1, human CMV (HCMV) R1 and murine CMV (MCMV) R1 demonstrated that these proteins are not reductase active (36, 47, 53). Random transposon mutagenesis of the MCMV genome surprisingly identified the R1 gene as blocking apoptosis induced by the virus itself in endothelial cells (5). Evidence was also recently provided that the HCMV R1 could contribute to protection from cytokine-induced apoptosis (47).

Studies to assess the role of the R1 antiapoptotic function in HSV pathogenesis, including reactivation from latency, will require an HSV mutant defective in R1 antiapoptotic activity. However, since the RR activity is required for viral DNA replication during reactivation in animal ganglion neurons, this mutant must be functional in RR activity without being proapoptotic as R1(Δ 2-357). Here, by doing N-terminal and C-terminal deletions in HSV-2 R1, we mapped the domains of HSV-2 R1 involved in its antiapoptotic potential. Interestingly, the domain defined as being essential to protection corresponds to the domain common to all the seven known β -herpesviruses R1s. In addition, we provided evidence that the R2 binding surface is not involved in protection from TNF-induced apoptosis.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines, plasmids and viruses. The conditions for the culture of human HeLa, A549-tTA and 293-rtTA cells were as described previously (39). The transfer vector pAdTR5-R1-DC-GFP was constructed by inserting into the *Bgl*III site of pAdTR5-DC-GFP (41) the *Bam*HI fragment excised from pAdCMV5-R1 that encodes the full length HSV-2 R1 (39). The vectors pAdTR5-R1(1-983)-DC-GFP and pAdTR5-R1(1-1081)-DC-GFP were constructed by inserting oligonucleotide linkers that introduce a stop codon after Ser 983 in a *Bgl*III site and His 1081 (changed to Arg 1081) in a *Bcl*II site of pAdTR5-R1-DC-GFP, respectively. To construct pAdTR5-R1-GFP (where GFP is fused to the C-terminus of R1), a PCR was performed over pAdTR5-R1-DC-GFP to remove the stop codon of R1 and add in frame an *Nhe*I restriction site at the end of the R1 gene. The PCR fragment was digested with *Bcl*II and *Nhe*I and swapped into the *Bcl*II/*Nhe*I digested pAdTR5-R1-

DC-GFP plasmid. To construct pAdCMV5-GFP-R1 (where GFP is fused at the N-terminus of R1), the *Bam*HI fragment containing the R1 coding sequence was excised from pAdCMV5-R1 and first cloned into pQBI 25/50-fC3 (Qbiogene Inc. Canada) to generate pQBI-R1. In a second step, pAdCMV5-GFP (41) was digested with *Bst*BI, treated by the Klenow enzyme and then digested with *Nhe*I. The resulting vector was used for the insertion of the GFP-R1 gene that had been excised from pQBI-R1 by *Nhe*I and *Eco*RV digestion.

The transfer vectors pAdCMV5-R1(Δ 2-249), pAdCMV5-R1(Δ 2-357), pAdTR5-R1(Δ 2-398), pAdTR5-R1(Δ 2-496) and pAdTR5-R1(1-496) were constructed through a number of intermediate modifications and cloning steps based on methods previously described (39). For the vector pAdCMV5-R1(Δ 2-312), the *Pme*I/*Sa*II fragment of pAdCMV5-R1 was swapped by a PCR-generated *Pme*I/*Sa*II fragment encoding the deleted R1(Δ 2-312) fragment. For the three other constructions, the *Bam*HI R1 fragment from pAdCMV5-R1 was inserted into pBluescript to allow the use of unique restriction sites, giving the plasmid pBS-R1. To generate pAdCMV5-R1(1-1113) and pAdCMV5-R1(1-1123), the *Bcl*II/*Eco*RI fragment of pBS-R1 was swapped by PCR-generated *Bcl*II/*Eco*RI fragments encoding the deleted cDNA. The *Bam*HI R1(1-1113) and R1(1-1123) were then reinserted into pAdCMV5. For pAdCMV5-R1(Δ 107-446), the pBS-R1 *Nar*I/*Stu*I fragment was removed and replaced by an oligonucleotide linker to obtain the desired protein. For pAdCMV5-R1(Δ 378-445), the *Bam*HI/*Stu*I fragment of pAdCMV5-R1 containing the ATG start codon (R1-NH2) was inserted into the corresponding sites of pBluescript. This latter vector was then digested by *Eco*NI and *Stu*I and ligated by an oligonucleotide linker. The *Bam*HI/*Stu*I resulting fragment was then inserted into the pAdCMV5-R1 digested by *Bam*HI and *Stu*I. The constructs were then sequenced. Some of the above vectors were co-transfected with the adenoviral genome in 293A cells to generate recombinant adenoviruses as described for AdTR5-R1 (39).

For the R2 co-infection experiments, an HSV-2 R2 expressing virus, AdCR5-R2, was used in combination with a virus expressing a new transactivator, AdCMV-cTA, derived from the Cumate inducible system (A. Mullick, R. Warren, C. Guilbault, M. Koutroumanis, F. Malenfant, L. Lamoureux, N. Jabbour, Y. Xu, P.-A.

Moiset, P. Jolicoeur, P. Lau and B. Massie, in preparation). Modeled on the tet-inducible system, the cTA transactivator contains the CymR binding domain in place of TetR and its binding to the Cumate operator in the CR5 promoter is regulated by cumate. AdCMV-cTA was constructed using standard recombination in 293 cells (39) whereas AdCR5-R2 containing the HSV-2 R2 gene derived from pSVRR₂^{HSV}-16 (31) was constructed using the new positive selection method recently described by Elahi et al (18).

Construction of adenovirus library expressing GFP-tagged C-terminal truncated R1 mutants. The procedure to construct a mini-library of adenoviruses expressing R1-GFP chimeras will be detailed elsewhere (S. M. Elahi, S. Chabaud, C. Guilbault, A. M.-J. Sasseville, Y. Langelier and B. Massie, in preparation). Briefly, the R1 gene present in the pAdTR5-R1-DC-GFP_Q transfer vector described above was digested at a unique BglII site near the R1 carboxyl terminus, followed by Exo III digestion during various periods and blunt end ligation with the GFP gene downstream of the IRES. By screening for individual recombinants expressing GFP, the procedure insures that only chimeras containing C-terminal truncated R1 mutants in-frame with GFP (R1-GFP) are selected. Sequencing of the R1-GFP junction determines the extent of the truncation.

Transfection. HeLa cells were seeded one day before transfection in 60 mm dishes at 5×10^5 cells/dish or in 6-well plates at 1.5×10^5 cells/well. The calcium phosphate technique was used to transfect 25 μ g/ml of pAdCMV5-R1 or pAdCMV5-R1(Δ 2-249) plasmids, 50 μ g per ml of pAdCMV5 (empty vector used as control), pAdCMV5-R1(Δ 2-312), pAdCMV5-R1(Δ 2-357) or 100 μ g per ml of pAdCMV5-R1(1-1113) or pAdCMV5-R1(1-1123). After 24 h, the cells were washed twice with sterile PBS and received 1 ml (well) or 2.5 ml (dish) of fresh medium with appropriate concentration of tet system approved serum (TSA-FCS) from Clontech.

Infection. A549-tTA cells were plated at 3×10^5 cells/well (6-well plate) or 1×10^6 cells/dish (60 mm dish) one day before the experiment. Cells were infected in a reduced medium volume (0.3 ml/well, 1 ml/dish) with rocking for 7 h to enhance adsorption of viral particles as described (43). Then, the medium was removed and 1 ml (well) or 2.5 ml (dish) of fresh medium with appropriate TSA-FCS concentration

was added. The MOIs of AdTR5-R1 (5 PFU/cell), AdTR5-R1-GFP (25 PFU/cell), AdTR5-R1(Δ 2-357) (25 PFU/cell), AdTR5-R1(Δ 2-398) (50 PFU/cell), AdTR5-R1(Δ 2-496) (50 PFU/cell), AdTR5-R1(1-983) (50 PFU/cell) and AdTR5-R1(1-1081) (100 PFU/cell) were chosen to obtain similar levels of expression of the different recombinant proteins.

To evaluate the effect of R2 overexpression on the R1 antiapoptotic potential, A549-tTA cells were seeded as described above and coinfecting with increasing MOIs of AdCR5-R2 and 50 PFU/cell of AdCMV5-cTA. The medium was withdrawn 24 h later and the cells were re-infected for 7 h with 5 PFU/cell of AdTR5-R1 or mock infected. When used, the peptidomimetic inhibitor of HSV RR BILD1633 (37, 44), kindly provided by Boehringer Ingelheim Ltd. (Canada), was added 6 h before infection and maintained throughout the assay.

Apoptosis assays. To determine the antiapoptotic potential of the proteins, apoptosis was induced 7 h after infection or 30 h after transfection by the addition of 1 ml (well) or 2.5 ml (dish) of medium containing cycloheximide (CHX) (15 μ g/ml, Sigma) or CHX (15 μ g/ml) plus human recombinant tumor necrosis factor (TNF) (2.5 ng/ml, Sigma). After 7 h of treatment, apoptosis was scored under microscopic observation in at least ten random-selected fields as described (34). Cells were harvested for caspase activity assay using the ApoAlertTM (Clontech) caspase-3 fluorescent assay kit and protein expression analysis as described (34). To determine the proapoptotic activity of the recombinant proteins, cells were incubated with 1 ml (well) or 2.5 ml (dish) of fresh medium containing 0.5% TSA-FCS for 9 h after infection or 30 h after transfection.

Immunoblot analysis and protein solubility. Crude total protein extracts were obtained by a 2 min sonication in 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS and 6 M urea. SDS-PAGE and immunoblotting were performed with 10 μ g of protein/well as described previously (32). For HSV-2 R1 detection, the rabbit polyclonal anti HSV-2 R1 antiserum 168R1 (35) or an anti HSV R1 mouse monoclonal Ab 932 (mAb 932) (28) were used. For HSV-2 R2 detection, the polyclonal antibody P9 (pAb P9) was used (9). The Super-signal detection kit (Pierce) was used according to the manufacturer's instructions. To determine protein solubility, cell extracts in 50 mM

Hepes, 2 mM DTT (HD) or HD with 1 M NaCl (HD + NaCl) were sonicated and centrifuged at $100\,000 \times g$ for 1 h at 4°C. Cell extracts in 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF (RIPA) were incubated for 15 min at 4°C before sonication followed by centrifugation at $16\,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The supernatant fraction was removed and stored at -80°C. The pellet fraction was resuspended in the same buffer as the supernatant and homogenized by sonication before storage. The percentage of solubility was evaluated by immunoblotting appropriate amounts of both fractions with the antiserum 168 R1 as described (34).

RR assay. To determine the RR activity of the different R1 proteins, infected A549tTA cells or transfected HeLa cells were used to prepare crude protein extracts by sonication in HD buffer followed by centrifugation at $100\,000 \times g$ for 1 h at 4°C as described (33). The activity of the R1 subunit was determined by adding to limiting amounts of R1 subunit excess amounts of HSV-2 R2 subunit produced by 293 cells infected with the recombinant adenovirus Ad5BM5-R2 and purified as described (specific activity, 200 units/mg) (33, 40). One unit of RR was defined as the amount of enzyme generating 1 nmol of dCDP/min.

Electron microscopy. Cells were washed in PBS and processed for embedding as previously detailed (4). Briefly, they were fixed in 5% glutaraldehyde buffered with 0.06 M sodium cacodylate, pH 7.2. After washing with 0.1M sodium cacodylate, pH 7.2, they were post fixed with potassium ferrocyanide reduced osmium tetroxide and embedded in Taab 812 epoxy resin. Thin (80-100 nm) sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a JEOL JEM 2000FX-II transmission electron microscope. The high-resolution protein A-gold technique was used for the immunocytochemical localization of the full length R1 with the mAb 932 (2). For this, cells fixed with 4% paraformaldehyde plus 0.1% glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) were processed for embedding in LR White resin as previously detailed (4).

Time-lapse imaging. A549-tTA cells were grown and infected in heated glass-bottom dishes (Bioptechs). Culture medium was replaced with Leibowitz's L15 medium containing 5% FBS prior to imaging. Multi-field time lapse images were

obtained using a 40x N-Plan objective (0.55NA) on a Leica DMIRB inverted microscope equipped with motorized stage, focus and filter wheels (Ludl) and a Retiga1350EX 12-bit monochrome CCD camera (Qimaging), all under the control of the Openlab 3 software (Improvision).

RESULTS

A major part of the NH2 domain is not essential for HSV-2 R1 antiapoptotic activity. The functional importance of the NH2 domain of HSV-2 R1 in the control of cell death had been first suggested by the cytotoxicity of R1(Δ 2-357), an HSV-2 R1 subunit with its first 357 amino acids deleted (39). Subsequently, we found that the full-length HSV-2 R1 was able to protect cells from apoptosis triggered either by R1(Δ 2-357) expression or by death receptor activation and, we provided evidence that, in the later case, the R1 protein acts at, or upstream of, caspase-8 activation (34). However, the observation that the NH2 domain *per se* was insufficient for protection from TNF-induced apoptosis indicated that both domains of R1 or part(s) of them were necessary for antiapoptotic activity (34).

To better assess the importance of different segments of the NH2 domain, including the recently described α -crystallin-like domain (6), a series of deletion mutants were constructed either as CMV5 promoter-driven expression plasmids or as TR5-inducible adenovirus recombinants as illustrated in Fig. 1. The concentration of plasmids transfected in HeLa cells and the MOIs of adenovirus recombinants used to infect A549-tTA cells were adjusted to obtain roughly equivalent amount of recombinant proteins (Fig. 2A). By measuring apoptosis by microscopic observation and an *in vitro* caspase-3 activity assay, the proapoptotic activity (Fig. 2B) and protection from TNF (Fig. 2C) of the different truncated proteins were evaluated. As our previous works had shown that R1(Δ 2-357) was mostly insoluble (39), protein solubility was also assessed by immunoblot analysis after fractionation by centrifugation in HD or in RIPA buffer (Table I).

The deletion $\Delta 2-249$, which ablates three N-terminally conserved segments and a large part of the hydrophilic region located between residues 130 and 294 (as illustrated in Fig. 1), gave a non-cytotoxic soluble protein with full antiapoptotic activity. The deletion $\Delta 2-312$, which removes all the residues preceding the α -crystallin domain, gave also a non-cytotoxic soluble protein but with a slight decrease in antiapoptotic activity. Included rather as a negative control in our analysis of the antiapoptotic potential, the strongly cytotoxic and barely soluble $R1(\Delta 2-357)$ gave the unexpected result that most of the cells resisting to its strong cytotoxicity were protected from TNF. Other deletions where the α -crystallin domain was removed either completely as in $R1(\Delta 2-398)$, $R1(\Delta 2-496)$ and $R1(\Delta 107-446)$ or in part as in $R1(\Delta 378-445)$ gave fully insoluble products. None of these four truncated proteins was neither proapoptotic nor protective from TNF-induced apoptosis (data not shown for $R1(\Delta 107-446)$ and $R1(\Delta 378-445)$). Altogether, these results indicate that nearly all the NH2 domain including the first two third of the α -crystallin domain is dispensable for the antiapoptotic function. The data suggest also that the α -crystallin domain could play a role in protein folding and/or oligomerization. Finally, the fact that four NH2 deletion mutants have no phenotype in spite of the aggregation of their protein products suggests that neither the cytotoxicity, nor the protection induced by $R1(\Delta 2-357)$ appears to be related to an unspecific cell response to the stress created by the accumulation of protein aggregates.

The α -crystallin domain is important for protein folding and oligomerization. Studies were performed to further characterize the aggregates formed by $R1(\Delta 2-357)$ and the other insoluble truncated proteins in search of an explanation for the differences observed in their biological activities. The wild type RR activity of the small fraction of $R1(\Delta 2-357)$ recovered in soluble form in HD buffer, which does not contain detergent, suggested that this protein could fold properly (39), whereas the complete insolubility of $R1(\Delta 2-398)$, $R1(\Delta 2-496)$, $R1(\Delta 107-446)$ and $R1(\Delta 378-445)$ suggested that these other truncated proteins could be misfolded. To test this hypothesis, the effect of detergents or high salt concentration on the solubility of $R1(\Delta 2-357)$, $R1(\Delta 2-398)$ and $R1(\Delta 2-496)$ was first

examined. When RIPA, a detergent containing buffer was used instead of HD, only the solubility of R1(Δ 2-357) was slightly increased. When 1 M NaCl was added to HD buffer without detergents, R1(Δ 2-398) and R1(Δ 2-496) proteins remained completely insoluble whereas ~50 % of R1(Δ 2-357) became soluble (Table 1). Moreover, when analyzed on glycerol gradient in HD buffer containing 1 M NaCl, the R1(Δ 2-357) extracted in 1 M NaCl sedimented as monomers as the full-length R1 did (data not shown). These results confirm that the completely insoluble truncated proteins form aggregates of misfolded molecules whereas the slightly soluble R1(Δ 2-357) forms aggregates of aberrant oligomers. In addition, as the addition of ions by charge shielding is thought to reduce the productive charge interactions at the interface of proteins (16), the effect of salt on R1(Δ 2-357) suggests that electrostatic complementarity could play a significant role in its aberrant oligomerization.

To further characterize the differences between R1(Δ 2-357) and the completely insoluble truncated proteins, the intracellular formation and distribution of aggregates were visualized by immunofluorescence, fluorescence of GFP chimeras and electron microscopy. Immunofluorescence first demonstrated that, in contrast to the full length R1 which exhibited a diffuse staining as expected for a soluble protein, all the low solubility proteins expressed individually accumulated at the periphery of the nucleus in large pericentrosomal structures resembling aggresome (Fig. 3A for R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398), R1(Δ 2-496) and, data not shown for R1(Δ 107-446) and R1(Δ 378-446)). The aggresome is a recently defined structure composed of clustered aggregates of misfolded proteins, when such proteins have been overexpressed or their degradation has been inhibited (rev. in 22, 30). In the course of coinfection experiments with AdTR5-R1 and AdTR5-R1(Δ 2-357) performed to analyze the antiapoptotic potential of the full-length HSV-2 R1, we made the striking observation of the formation throughout the cytoplasm of numerous giant spherical structures. These large structures, which were decorated by a mAb specific for the full length R1 (Fig. 3A), were easily visible by phase contrast microscopy (see for example Fig 4, last photo). To better visualize the formation of these structures, a chimera of the full length R1 and green fluorescent protein (GFP) was engineered by expressing GFP in phase at the carboxy-terminus of R1. As

shown in Fig 3B, the full length R1-GFP expressed alone exhibited a diffuse fluorescence whereas during coinfection with AdTR5-R1(Δ 2-357), giant spherical structures were observed. Observation by time lapse microscopy of cells first infected with AdTR5-R1-GFP followed 6 h later by AdTR5-R1(Δ 2-357) revealed as shown in Fig. 4 that the R1-GFP fluorescence, first diffuse, began to accumulate in small spherical structures throughout the cytoplasm around 6 h after the infection with AdTR5-R1(Δ 2-357). In previous experiments, where cells only expressed R1-GFP, no spherule could be seen in the cytoplasm (Fig 3B, first photo) even though it was the same time post-infection as the photograph taken at the end of the time lapse (presented in Fig. 50, then no time lapse experiment was performed for R1-GFP expression alone as control. These highly mobile spherules exhibit a slow enlargement often resulting from the fusion between individual spherules. They accumulated at the periphery of nucleus often forming giant balloons. During this period, nearly all the diffuse R1-GFP fluorescence disappeared from the cytoplasm as being trapped by the spherules. In striking contrast, co-expression of the full length R1-GFP with the insoluble proteins R1(Δ 2-398) or R1(Δ 2-496) never produced spherules as did R1(Δ 2-357) (Fig. 3B). In control experiments where the GFP protein was first expressed followed by R1(Δ 2-357), R1(Δ 2-398) or R1(Δ 2-496), spherules were also undetectable (Fig. 3C). The two others insoluble proteins R1(Δ 107-446) and R1(Δ 378-446) gave results similar than those obtained with R1(Δ 2-398) or R1(Δ 2-496) (data not shown).

Electron microscopy analyses demonstrated that the aggregates formed by the non-cytotoxic proteins R1(Δ 2-398) (Fig. 4A) or R1(Δ 2-496) (data not shown) were different from the one formed by the cytotoxic R1(Δ 2-357) (Fig. 4A). As seen in our immunofluorescence assay, no aggregates were detectable by electron microscopy in mock infected or AdTR5-R1 infected cells (data not shown). In R1(Δ 2-398) or R1(Δ 2-496) expressing cells, large amorphous electron-dense structures, which were not enclosed by membranes, were found in the vicinity of the nucleus and Golgi vesicles as described for aggresomes (rev. in 22, 30) (Fig. 4A). In R1(Δ 2-357) expressing cells, the same cytoplasmic area contained dozens to hundreds of electron-dense structures differing from aggresome by their smaller size (~30 to 80

nm). These non-uniform but rather spherical structures, which were separated by different cytoplasmic components, were often regrouped in small clusters (Fig. 4B). The large spherical structures resulting from the co-expression of the full-length R1 with R1(Δ 2-357) appeared at the ultrastructural level as spheres with centers containing diluted cytosolic components. Their thick electron-dense walls seemed to be formed by the close packing of the small spherules seen in cells expressing R1(Δ 2-357) alone (Fig. 4C). Ultrastructural immunodetection with mAb 932 specific for full-length R1 and protein A-gold complex (8–10 nm diameter) suggests that this protein was abundant in the electron-dense walls but absent in the electron lucent centers (Fig. 4D). This conclusion is supported by a stronger fluorescent signal in the periphery of GFP positive spherule formed during R1-GFP + R1(Δ 2-357) coinfection which could be seen in some cells (Fig. 3B or in Fig. 5B). Altogether, these findings indicate that the α -crystallin domain plays important role(s) in the folding and oligomerization of the R1 polypeptide.

Only the C-terminus tail is dispensable for protection against TNF. As the N-terminal domain alone could not prevent TNF-induced apoptosis (34), we postulated that the homo-dimerization of R1 mediated by α A (597 to 615) and α B (637 to 650) helices was important for protection. To rapidly map which part of the RR domain was important in antiapoptotic activity, a subset of seventeen R1-GFP chimeras selected from a mini-library of recombinant adenoviruses was used. The shortest chimera tested here ends at amino acid 649 and the longest one at 834 (Fig. 6, A and B). We first verified whether adding GFP either at the N or C terminus of R1 altered its antiapoptotic activity. The data obtained with these two recombinants indicated that free termini were not required for the function (Fig. 6B). Interestingly, the addition of GFP at the C-terminus produced a chimeric protein completely devoid of RR activity, probably by creating steric hindrance to R2 binding. Moreover, these results allowed us to select by micromanipulation (5) the stable cell line A549-tTA-HSV-R1-GFP, which inducibly expresses the R1-GFP protein. As expected, A549-tTA-HSV-R1-GFP cells, which in the OFF state (+ anhydrotetracyclin) were destroyed by CHX+TNF treatment, became resistant upon anhydrotetracyclin

removal with a time course paralleling the appearance of the GFP fluorescence (Fig. 6C).

When evaluated by epifluorescence microscopy, all the seventeen chimeras exhibited as the full-length R1 diffuse cytoplasmic localization indicating that they were soluble (Fig. 6D for R1(1-776)-GFP and R1(1-834)-GFP and data not shown). Unfortunately, when tested for protection from TNF, none of the chimeras exhibited antiapoptotic activity (Fig. 6B), suggesting that these proteins lack important functional elements. Then, four longer truncated proteins including potentially important structural elements were generated without fusion to GFP. Only R1(1-1123), the longest one that includes all the structured parts of R1 exhibited protection from TNF (Fig. 6E). The 2-fold reduction in protection of R1(1-1123) is probably due to a lower solubility of the protein that did not render it proapoptotic. Altogether, the data show that only the flexible tail, which contains the cysteine pair essential to catalysis *in vivo* (1), is dispensable for antiapoptotic activity.

The R2 binding face of HSV-2 R1 is not important for antiapoptotic function. As another approach to map the R1 surface(s) that are important for antiapoptotic function, we tested the effect of R1 binding molecules. As upon its binding to R1, R2 covers a large surface known as the R2 binding face of R1, it could compete with the binding of cellular protein(s) controlling apoptosis. In order to accumulate R2 in large excess over R1, A549-tTA cells were first infected with the Ad recombinant AdCR5-R2 for 24 h at two MOIs before a 7 h infection with AdTR5-R1 (Fig. 7A). Precise quantification of each protein done by comparison with purified R1 and R2 standards showed that the R2/R1 ratio was >30 at the higher MOI of AdCR5-R2 tested. This large R2 overproduction did not produce any decrease in protection from TNF. HSV-2 R2 expressed alone in parallel controls was not protective (data not shown). This result indicated that the R2 binding surface on R1 is not involved in its antiapoptotic activity. Furthermore, as the R2 C-terminus binds to R1 in a crevice formed between α I and other parts of the protein (3, 10), we tested the effect of BILD1633, a peptidomimetic inhibitor of HSV RR that binds within this crevice (37, 44). This compound, which exhibits an EC_{50} of 0.3 μ M against HSV in cell culture (37, 44), added up to 10 μ M did not alter the R1

antiapoptotic activity against TNF (Fig. 7B). In this experiment, the level of R1 was about 10-fold lower than the one accumulated during an HSV-2 lytic cycle. As 10 μ M BILD1633 produced a more than 100-fold reduction in virus yield (data not shown), it certainly accumulated in vast excess over R1 in the experiment presented Fig. 7B. This result confirms that the R1 surface interacting with the R2 C-terminus is not involved in protection.

DISCUSSION

Our serendipitous observation that R1(Δ 2-357), an HSV-2 R1 with its first 357 residues deleted, was proapoptotic (39) led to the finding that the full-length HSV-2 R1 has an antiapoptotic function that can protect cells from apoptosis induced by either the expression of R1(Δ 2-357) or death receptor triggering. The subsequent demonstration that the NH2 domain on its own was not antiapoptotic ruled out our initial hypothesis that the new function could be confined to the ablated domain and we postulated that both domains of R1 or part(s) of them could be necessary to the function (34). However, the present work shows that most of the NH2 domain including a part of the α -crystallin domain is dispensable for antiapoptotic activity and that it is rather the integrity of the structured RR domain which is required for protection.

The mini-library of adenoviruses expressing R1-GFP-chimeras done to determine the importance of the RR domain for the antiapoptotic activity led to the observation that adding GFP either at the N or C terminus of R1 did not alter this function. The addition of GFP at the C-terminus produced a chimeric protein devoid of RR activity, probably by creating steric hindrance to R2 binding. Unfortunately, none of the seventeen R1-GFP-chimeras tested for antiapoptotic activity were positive. All these proteins were soluble as judged from microscopic observation of GFP fluorescence and confirmed, for some of them, by solubility analyses. Subsequently, a set of four C-terminally truncated proteins showed that the entire structured RR domain was required for protection, only the C-terminal flexible tail being dispensable (Fig. 6). Based on the HSV-1 R1 RR model and referring to the numbering of the structural elements of *E. coli* R1, the inactive R1(1-1113) would end after α I, whereas the active R1(1-1123) would include β J. β J could be important either for interacting with proteins involved in apoptotic pathways and/or for its involvement in stabilizing other parts of the R1 structure. The crystallographic structure of *E. coli* R1 and the 3-D model of the HSV R1 RR domain show that the three domains of these proteins are inter-related by numerous contacts between domains (17, 46, 55). As several residues in β J interact on one side with α I and on

the other side with residues in α D, β E and notably with the catalytic Cys 439, it is likely that the most important role of β J in the antiapoptotic function is through stabilization of the R1 structure. In favor of that is the observation that R1(1-1113) has a lower solubility than R1(1-1123).

The R1-GFP chimeric protein, which is antiapoptotic but RR null, could be an important tool for complementation study aimed at determining the role of the antiapoptotic function. It was used here to isolate the inducible cell line A549-tTA-HSV-R1-GFP. These cells upon switching on expression showed resistance to cytokine-induced apoptosis as cells transiently expressing R1-GFP either from transfection or adenoviral infection. However, they exhibited a more homogeneous level of recombinant protein expression and, when compared to expression driven by recombinant adenovirus, all the non-specific issues due to adenoviral infection are avoided. Moreover, as these cells have been selected in the absence of continuous R1-GFP expression, they would be more useful for studies on the R1 mechanism of action than cells that, constitutively expressing the protein for several generations, could have undergone several modifications through adaptation to its expression (49).

The data obtained with N-terminal deletions demonstrated that the first 312 residues of R1 are not necessary for protection from TNF and R1(Δ 2-357). This result, for unknown reason, differs from the observation that the protection afforded by HSV-2 R1 from neuronal cell death resulting from growth factor withdrawal required the NH2 domain (48-50). It is possible that the domain(s) of R1 implicated in the control of apoptosis could differ regarding the proapoptotic stimuli or the cell types used. However, it must be cautioned that the conclusions of Perkins et al. (48-50) are largely based on experiments with an HSV-2 mutant expressing an R1 with a large deletion (Δ 107-446) in its NH2 domain and that, in our hands, a similarly truncated protein is strikingly completely insoluble (Table I).

The results obtained with the deletions involving the α -crystallin domain are more complicated to interpret as these deletions affected the protein solubility. These truncated insoluble R1s can be grouped in two categories: four of them are completely insoluble products without neither proapoptotic nor antiapoptotic

activities and the other one, R1(Δ 2-357), is slightly soluble and both proapoptotic and antiapoptotic. A deeper analysis of the aggregates formed by representatives of these two categories strongly suggests that the insoluble mutant proteins are misfolding polypeptides whereas R1(Δ 2-357), which fold correctly as evidenced by its wild type RR activity (39), has a strong tendency to form abnormal oligomers. When observed under light microscopy both categories of proteins appear to accumulate in the same type of aggresome-like structures. However, ultrastructural examination shows a clear difference between the two categories. The completely insoluble proteins formed densely packed aggregates as it has been reported for misfolded proteins accumulating in aggresomes (21, 22, 24, 29). From the fact that all these four mutant proteins are lacking the α -crystallin domain either totally or in part, it can be hypothesized that this domain is important for protein folding. Such a role has been demonstrated for the α -crystallin domain of sHsps (rev. in 38, 52) and suggested for the homolog domain present in p23, a cochaperone of Hsp90 (23). Moreover, Conner et al. (14) have provided evidence that the region encompassing amino acids 349-373 in HSV-1 R1 was important for the overall protein conformation.

In the second category, the slightly soluble R1(Δ 2-357) protein forms non-uniform but rather spherical structures of smaller size (~30 to 80 nm). The exact nature of these individual structures remains to be determined but the observation that the aggregates of R1(Δ 2-357) solubilized by NaCl treatment behave on glycerol gradient as the full-length R1 is a strong indication that they are composed of aberrant multimers of correctly folded molecules. Similar defects in the multimerization process of sHsps have been often reported for deletion or mutation in their α -crystallin domain (rev. in 38, 52). However, in the absence of knowledge of the 3-D structure of HSV R1, more subtle mutations should be done to better document this hypothesis.

The aggregation of proteins is thought to be involved in the pathogenesis of the so-called conformational diseases, and both toxic and protective roles have been proposed (30). Aggresome formation is thought to be a protective response to the accumulation of misfolded proteins (30, 54). For the short-term experiments (24 h)

reported here R1(Δ 2-398), R1(Δ 2-496), R1(Δ 107-446) and R1(Δ 378-446) proteins did not exhibit cytotoxicity even if they accumulated at the same level than the proapoptotic R1(Δ 2-357). The mechanism underlying the strong cytotoxicity of R1(Δ 2-357) is currently unknown. Caspase-8 activation is the first activation detected in the cascade of caspase activation induced by R1(Δ 2-357) and expressing first the full-length R1 blocks caspase-8 activation (S. Chiasson, B. Massie and Y. Langelier, unpublished data) as it does in TNF treated cells (34). Taking into account that cells resisting to R1(Δ 2-357) toxicity are resistant to TNF, it can be suggested that this truncated protein, as TNF (rev. in 27), could induce both a death process via activation of caspase-8 and a survival response via NF- κ B-induced synthesis of antiapoptotic molecules such as TRAF-1, TRAF-2, IAP-1, IAP-2 and notably c-Flip (42, 56). Depending on the balance between these two signals, cells will engage either in apoptosis or survival. It remains also to be determined whether the formation of the large spherules seen in cells coexpressing R1 and R1(Δ 2-357) are involved in protection by sequestering the proapoptotic R1(Δ 2-357) oligomers.

Interestingly, the domain defined here as being essential to protection corresponds to the domain common to all the seven known β -herpesviruses R1s (data not shown). These R1s, which are not involved in ribonucleotide reduction (53), would be rather implicated in the control of apoptosis as demonstrated recently for the MCMV-and HCMV encoded R1s (5, 47). The observation that R2 overexpression did not decrease R1 antiapoptotic activity demonstrated that the R2-binding surface (~30% of the total surface of R1) is not involved in this function. The lack of effect obtained with the R2 C-terminus peptidomimetic shows that the crevice formed between α I and other parts of the protein where this compound binds (3) is also not involved in protection. Furthermore, the absence of decrease in protection from TNF when coexpressing R2 demonstrated that the coexpression of both proteins during the lytic cycle does not affect the R1 antiapoptotic activity.

A multiple sequence alignment of the two HSV R1s with the seven known herpesvirus R1s, which are RR inactive, revealed that the most conserved (globally >30 % similarity) part of the protein is located toward the COOH terminus between HSV-2 R1 amino acids 834-971. A modelization of the surface-exposed residues in

this segment using the HSV-1 R1 model provided by H. Ecklund revealed that most of the conserved residues are located on the face opposite to the R2 binding face (T. Sulea and Y. Langelier, unpublished data). Given its conservation, this segment could be important for the antiapoptotic activity. Further site-specific mutagenesis will be required to determine the putative role of these residues in apoptosis protection as well as the one of the α -crystallin domain. These works should take into account that studying the role of the R1 antiapoptotic function in latency will require an HSV mutant defective in R1 antiapoptotic activity but producing a soluble and RR active protein, since the R1 RR domain is required to allow deoxyribonucleotide synthesis that is essential to viral DNA replication during reactivation in animal ganglion neurons. Furthermore, the effect of these mutations on the recently discovered chaperone activity should also be determined.

References

1. Aberg, A., S. Hahne, M. Karlsson, A. Larsson, M. Ormo, A. Ahgren, and B. M. Sjoberg. 1989. Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 264:12249-52.
2. Bendayan, M. 1995. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-159.
3. Bonneau, A. M., P. Kibler, P. White, C. Bousquet, N. Dansereau, and M. G. Cordingley. 1996. Resistance Of Herpes Simplex Virus Type 1 to Peptidomimetic Ribonucleotide Reductase Inhibitors - Selection and Characterization Of Mutant Isolates. *Journal of Virology* 70:787-793.
4. Bosshardt, D. D., and A. Nanci. 2003. Immunocytochemical characterization of ectopic enamel deposits and cementicles in human teeth. *Eur J Oral Sci* 111:51-9.
5. 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.
6. 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.
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). *Journal of Virology* 63:3389-98.
8. Clements, J. B., R. J. Watson, and N. M. Wilkie. 1977. Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 transcription: location of transcripts on the viral genome. *Cell* 12:275-85.
9. 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. *Journal of Virology* 60:1130-3.
10. Cohen, E. A., P. Gaudreau, P. Brazeau, and Y. Langelier. 1986. Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by a nonapeptide derived from the carboxy terminus of subunit 2. *Nature* 321:441-3.
 11. Conner, J. 1999. The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* 80:1471-6.
 12. 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. *Journal of General Virology* 73:103-12.
 13. Conner, J., H. Marsden, and B. H. Clements. 1994. Ribonucleotide reductase of herpesviruses. *Rev. Med. Virol.* 4:25-34.
 14. 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* 213:615-623.
 15. Cooper, J., J. Conner, and J. B. Clements. 1995. Characterization of the novel protein kinase activity present in the R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *Journal of Virology* 69:4979-85.
 16. Dorfman, R., and P. N. Walsh. 2001. Noncovalent interactions of the Apple 4 domain that mediate coagulation factor XI homodimerization. *J Biol Chem* 276:6429-38.
 17. 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.
 18. Elahi, S. M., W. Oualikene, L. Naghdi, M. O'Connor-McCourt, and B. Massie. 2002. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther* 9:1238-46.

19. Eriksson, M., U. Uhlin, S. Ramaswamy, M. Ekberg, K. Regnstrom, B. M. Sjoberg, and H. Eklund. 1997. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* 5:1077-92.
20. Flemington, E. K. 2001. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol* 75:4475-81.
21. Garcia-Mata, R., Z. Bebok, E. J. Sorscher, and E. S. Sztul. 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera [In Process Citation]. *J Cell Biol* 146:1239-54.
22. Garcia-Mata, R., Y. S. Gao, and E. Sztul. 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* 3:388-96.
23. Garcia-Ranea, J. A., G. Mirey, J. Camonis, and A. Valencia. 2002. p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett* 529:162-7.
24. Gautreau, A., B. T. Fievet, E. Brault, C. Antony, A. Houdusse, D. Louvard, and M. Arpin. 2003. Isolation and Characterization of an Aggresome Determinant in the NF2 Tumor Suppressor. *J Biol Chem* 278:6235-42.
25. 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.
26. 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. *Journal of Virology* 62:196-205.
27. Gupta, S. 2002. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol* 22:185-94.
28. 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.

29. Johnston, J. A., C. L. Ward, and R. R. Kopito. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883-98.
30. Kopito, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524-30.
31. Lamarche, N., B. Massie, M. Richer, H. Paradis, and Y. Langelier. 1990. High level expression in 293 cells of the herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase subunit 2 using an adenovirus vector. *Journal of General Virology* 71:1785-92.
32. 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. *Biochemical Journal* 320:129-135.
33. 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* 320:129-35.
34. 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* 83:2779-2789.
35. 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.
36. 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.

37. Liuzzi, M., R. Deziel, N. Moss, P. Beaulieu, A. M. Bonneau, C. Bousquet, J. G. Chafouleas, M. Garneau, J. Jaramillo, R. L. Krogsrud, and et al. 1994. A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity in vivo. *Nature* 372:695-8.
38. MacRae, T. H. 2000. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci* 57:899-913.
39. 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.
40. Massie, B., J. Dionne, N. Lamarche, J. Fleurent, and Y. Langelier. 1995. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y)* 13:602-8.
41. Massie, B., D. D. Mosser, M. Koutroumanis, I. Vitté-Mony, L. Lamoureux, F. Couture, L. Paquet, C. Guilbault, J. Dionne, D. Chahla, P. Jolicoeur, and Y. Langelier. 1998. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* 28:53-54.
42. Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-90.
43. Mittereder, N., K. L. March, and B. C. Trapnell. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 70:7498-509.
44. Moss, N., P. Beaulieu, J. S. Duceppe, J. M. Ferland, M. Garneau, J. Gauthier, E. Ghiro, S. Goulet, I. Guse, J. Jaramillo, M. Llinas-Brunet, E. Malenfant, R. Plante, M. Poirier, F. Soucy, D. Wernic, C. Yoakim, and R. Deziel. 1996. Peptidomimetic inhibitors of herpes simplex virus ribonucleotide reductase with improved in vivo antiviral activity. *J Med Chem* 39:4173-80.
45. Nikas, I., J. McLauchlan, A. J. Davison, W. R. Taylor, and J. B. Clements. 1986. Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins* 1:376-84.

46. Nordlund, P., B. M. Sjöberg, and H. Eklund. 1990. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345:593-8.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Preston, V. G., A. J. Davison, H. S. Marsden, M. C. Timbury, J. H. Subak-Sharpe, and N. M. Wilkie. 1978. Recombinants between herpes simplex virus types 1 and 2: analyses of genome structures and expression of immediate early polypeptides. *Journal of Virology* 28:499-517.
52. Studer, S., M. Obrist, N. Lentze, and F. Narberhaus. 2002. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *Eur J Biochem* 269:3578-86.
53. 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* 80:2713-8.

54. Taylor, J. P., F. Tanaka, J. Robitschek, C. M. Sandoval, A. Taye, S. Markovic-Plese, and K. H. Fischbeck. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* 12:749-57.
55. Uhlin, U., and H. Eklund. 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1 [see comments]. *Nature* 370:533-9.
56. Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680-3.
57. Whitley, R. J., and B. Roizman. 2002. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 110:145-51.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Lars Thelander for the 932 monoclonal antibody, Boehringer Ingelheim for their generous gift of the two peptidomimetics and Hans Ecklund for the HSV-1 R1 3-D model. We thank Ms. Micheline Fortin for her technical assistance with electron microscope analyses. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grants MT-14686 to YL, and by National Research Council of Canada (NRCC) Grant to BM. This is a NRCC publication no. xxxx.

LEGENDS OF FIGURES

FIG. 1. Schematic representation and summary of the characterization of the truncated HSV-2 R1s. The NH2 domain contains three regions exhibiting >70% similarity between the two HSV types (black boxes) and regions exhibiting <50% similarity (light grey boxes). The α -crystallin-like domain (6) shown in dark grey precedes the RR domain that contains two Pfam sub-domains termed all alpha domain (white box) and barrel domain (hatched box). Protection from TNF and toxicity was determined as described in Fig. 2. RR activity for the soluble recombinant proteins was determined as described in experimental procedures; all the recombinant proteins lacking the cys pair 1140, 1142 might be inactive *in vivo* (1). Localization, immuno-fluorescence or microscopic observation in the case of GFP chimeric proteins. C, cytoplasmic localization; A, aggregates; D, diffuse; ND, not determined.

FIG. 2. Proapoptotic and antiapoptotic activities of N-terminal truncated HSV-2 R1: Cells were either transfected with plasmid pAdCMV5 (Empty vector), pAdCMV5-R1 (R1), pAdCMV5-R1(Δ 2-249) (249), pAdCMV5-R1(Δ 2-312) (312), pAdCMV5-R1(Δ 2-357) (357), or mock-infected (Mock), or infected with AdTR5-R1 (R1), AdTR5-R1(Δ 2-357) (357), AdTR5-R1(Δ 2-398) (398), AdTR5-R1(Δ 2-496) (496) as described in material and methods. (A) The level of recombinant protein expression was evaluated 30 h after transfection or 8 h after infection by immunoblotting with the anti R1 polyclonal antibody 168R1. (B) Proapoptotic activity (grey bars) was scored under microscopic observation 30 h after transfection or 8 h after infection. Then, cells were harvested in Pharmigen lysis buffer for caspase-3 assays. Caspase-3 activity (black bars) is expressed in pmole/min/mg. (C) Protection from TNF was evaluated 30 h after transfection or 7 h after infection, CHX (15 μ g/ml) or CHX (15 μ g/ml) + TNF (2.5 ng/ml) were added and, 7 h later, apoptosis and caspase-3 activity were determined as above. % TNF-specific apoptosis (grey bars) was evaluated the following formula which eliminates the intrinsic toxicity of some proteins and CHX = $100\% - [\% \text{ non-apoptotic cells in CHX+TNF treated cells} \times (100\% \div \% \text{ non-apoptotic cells in CHX treated cells})]$; TNF-specific caspase-3 activity (black bars) =

caspase-3 activity in CHX+TNF – caspase-3 activity in CHX-treated cells.

FIG. 3 Formation of aggregates by N-terminal truncated HSV-2 R1s. (A) A549-tTA cells infected for 24 h with AdTR5-R1 (R1), AdTR5-R1(Δ 2-357) (R1(Δ 357)), AdTR5-R1(Δ 2-398) (R1(Δ 398)), AdTR5-R1(Δ 2-496) (R1(Δ 496)) as in Fig. 2 or first infected with AdTR5-R1 for 7 h and re-infected with AdTR5-R1(Δ 2-357) at 100 PFU/cell for 17 h (R1+R1(Δ 357)) were fixed and stained with the anti-HSV-2 R1 polyclonal antiserum 168R1. (B) A549-tTA cells were infected for 24 h with AdTR5-R1-GFP at 25 PFU/cell (R1-GFP) or with AdTR5-R1(Δ 2-357)-GFP for 7 h (R1(Δ 357)-GFP). The co-infections were performed as described in A. GFP fluorescence in living cells was photographed by conventional epifluorescence microscopy. In panel C, AdTR5-GFP was used at 25 PFU/cell to express GFP as control.

FIG 4 Electron micrographs illustrating the appearance of protein aggregates. A549-tTA cells infected for 24 h with (A) AdTR5-R1(Δ 2-398), (B) AdTR5-R1(Δ 2-357) or (C, D) first infected with AdTR5-R1 for 7 h and re-infected with AdTR5-R1(Δ 2-357) at 100 PFU/cell for 17 h. Panel A shows large amorphous electron-dense structures (*) ranging from 200 to 600 nm typical of those accumulating in aggresomes. They were seen uniquely in cells expressing R1(Δ 2-398) or R1(Δ 2-496) (data not shown). Panel B shows in cells expressing R1(Δ 2-357) the presence of small (~30 to 80 nm) electron dense structures (arrows) differing from aggresome. Panel C and D show in cells co-expressing the full-length R1 with the R1(Δ 2-357) large spherical structures with electron-dense walls and electron-lucent centers. In panel D, ultrastructural immunodetection with mAb 932 specific for full-length R1 and protein A-gold complex (8–10 nm diameter) demonstrates that this protein is abundant in the electron-dense walls. Er, endoplasmic reticulum membranes; Nu, nucleus; Bars, 200 nm

Fig 5. *In vivo* dynamics of spherule formation following the co-expression of the full-length R1-GFP with R1(Δ 2-357) visualized by time-lapse photomicroscopy. Cells

infected with 25 PFU/cell of AdTR5-R1-GFP for 15 h were re-infected with 100 PFU/cell of AdTR5-R1(Δ 2-357) and 6 h later individual frames were collected every 2 min for a period of 3 h. Individual pictures taken at 8 min interval were selected from the movie file using QuickTimePro 6.2 software and are shown from top to the bottom of the fig.

FIG 6 Characterization of C-terminal truncated and GFP fusion HSV-2 R1 proteins. (A) Schematic representation of structural elements in HSV-2 R1 RR domain. b-strands are depicted in light grey and α -helices in dark grey. The positions for R1/GFP junction in chimeras and C-terminal deletions are indicated on the top of the panel. (B) Expression of chimeras and protection from TNF. A549-tTA cells were infected with amount of recombinant adenoviruses yielding more than 80% of GFP positive cells. Protection from TNF was evaluated 16 h later as described in fig. 2. CHX treated cell extracts were analyzed by immuno-blot with the mouse monoclonal antibody 932. Results of protection are indicated at the bottom of the blot. (C) Before seeding in 6 well-plates, A549-tTA-HSV-R1-GFP cells were washed twice with medium containing (OFF) or not (ON) anhydrotetracyclin (15 ng/ml). At the indicated times, cells were treated with CHX or CHX+TNF as described in Fig. 2. Percentage apoptosis was determined as described in B; \square , ON-state; \circ , OFF-state. Percentage GFP-positive cells (\blacklozenge) was determined by fluorescence observation. (D) Microscopic observation of GFP fluorescence of chimeras. A549-tTA cells were infected for 24 h at an MOI of 25 PFU/cell and GFP fluorescence in living cells was photographed by conventional epifluorescence microscopy. (E) The major part of the RR domain is required for protection from TNF. A549-tTA cells were infected or HeLa cells transfected in order to express the same level of proteins and apoptosis was determined as described in Fig. 2. Protein expression levels were analyzed by immunoblot.

FIG. 7 Lack of effect of HSV-2 R2 and the peptidomimetic inhibitor BILD1633 on the R1 antiapoptotic potential. (A) A549-tTA cells were infected for 24 h with increasing MOI of AdCR5-R2 and 50 PFU/cell of AdCMV-cTA and re-infected with

2.5 PFU/cell of AdTR5-R1 (+, black bars) or mock infected (-, grey bars) for 7 h. Cells were treated with CHX (15 μ g/ml) as control or CHX (15 μ g/ml) + TNF (2.5 ng/ml). Apoptosis was scored under microscopic observation 16 h later. Percentage of TNF-specific apoptosis was determined as in Fig. 2. Total protein extracts were analyzed by immunoblot with mAb 932 to detect HSV-2 R1 or pAb P9 to detect HSV-2 R2. (B) A549-tTA cells were either mock-infected or infected with 5 PFU/cell of Ad5TR5-R1 in the presence of increasing concentrations of BILD1633. CHX or CHX + TNF was added 7 h later as above and apoptosis was determined as in A. \square , mock infection; \blacksquare , Ad5TR5-R1 infection + BILD1633.

TABLE I
Solubility of R1 and mutant R1s

Protein	% Solubility ^a		
	HD	HD + NaCl	RIPA
R1	56	nd ^b	79
R1(Δ 2-249)	44	nd	95
R1(Δ 2-312)	nd	nd	75
R1(Δ 2-357)	3	47	13
R1(Δ 2-398)	0	0	nd
R1(Δ 2-496)	0	0	nd
R1(Δ 107-446)	0	nd	0
R1(Δ 378-445)	0	nd	nd
R1(1-446)-GFP	38	nd	nd
R1(1-496)	35	nd	nd
R1(1-834)-GFP	35	nd	nd
R1(1-983)	nd	nd	92
R1(1-1081)	nd	nd	68
R1(1-1113)	nd	nd	4
R1(1-1123)	nd	nd	21
R1-GFP	60	nd	nd
GFP-R1	72	nd	nd

^aValues are the means of at least two independent determinations

^bnd, not determined.

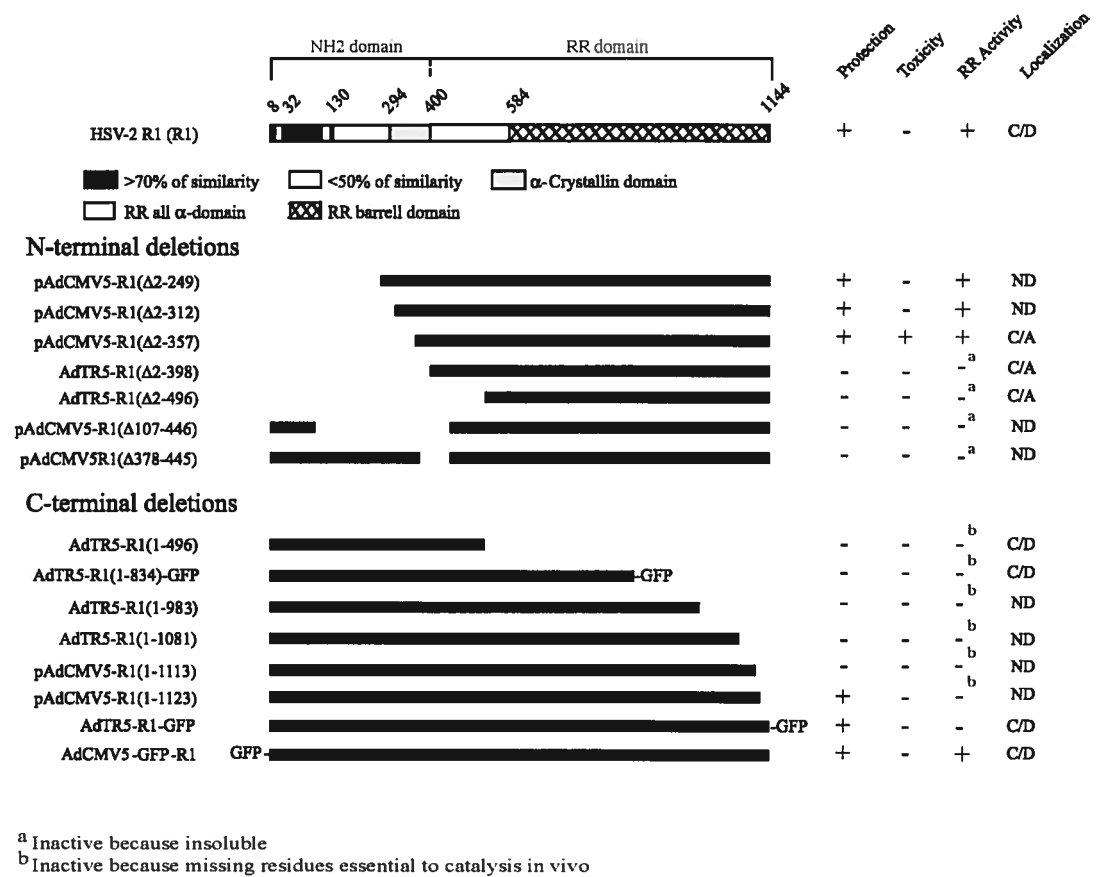


Fig.1

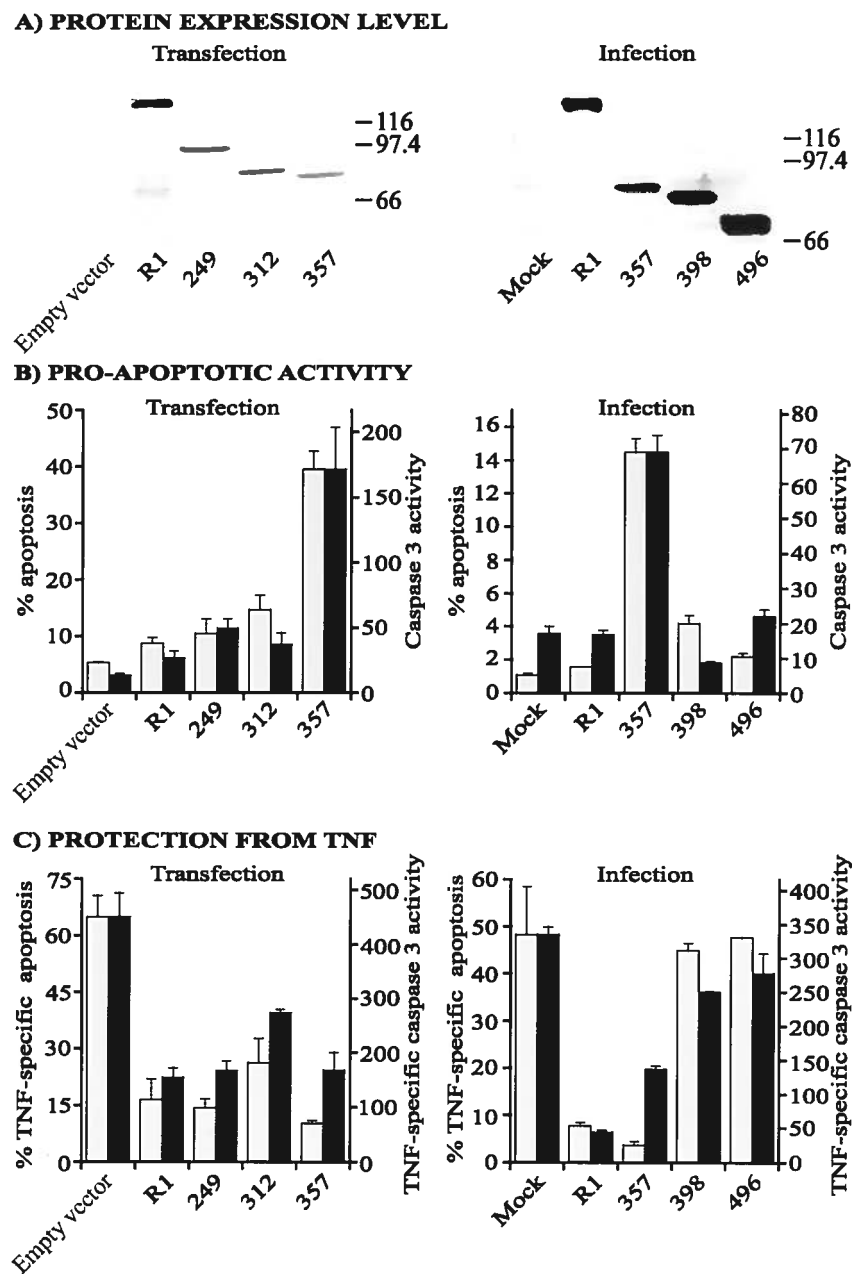


Fig.2

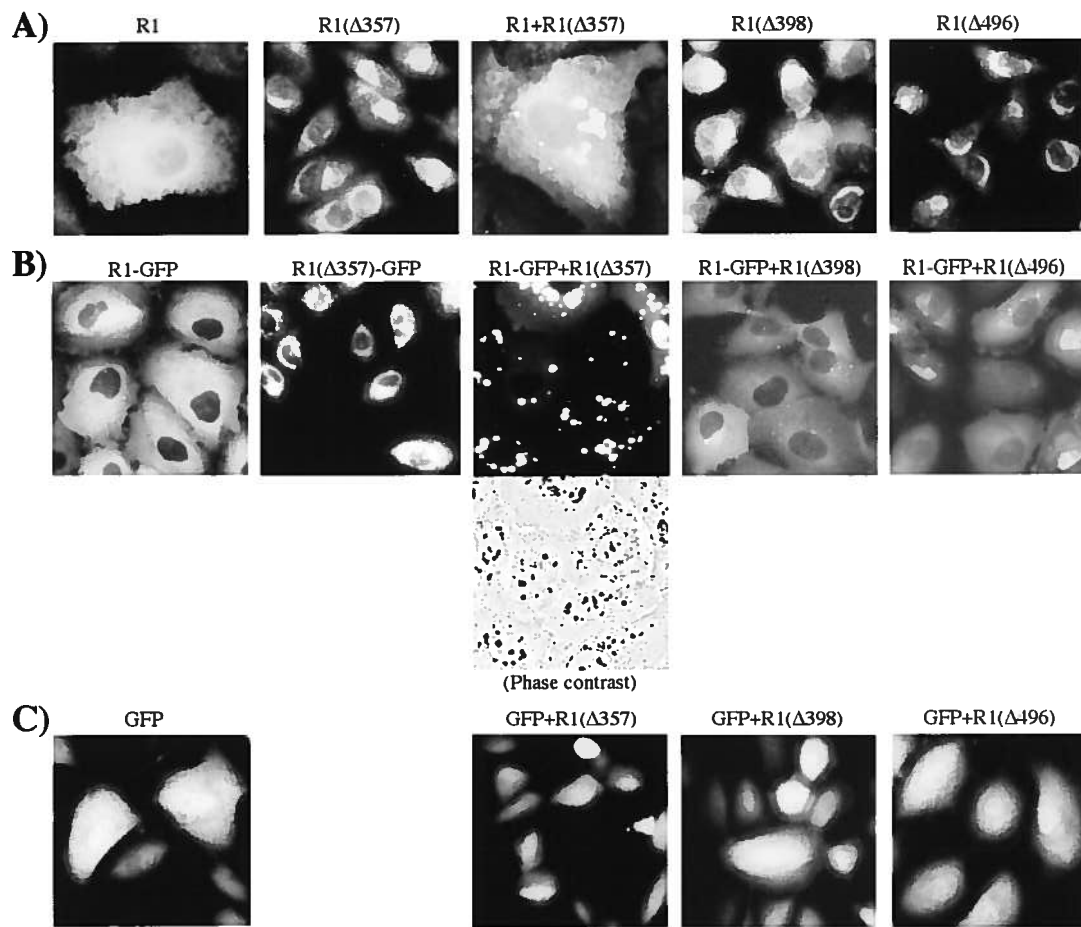


Fig.3

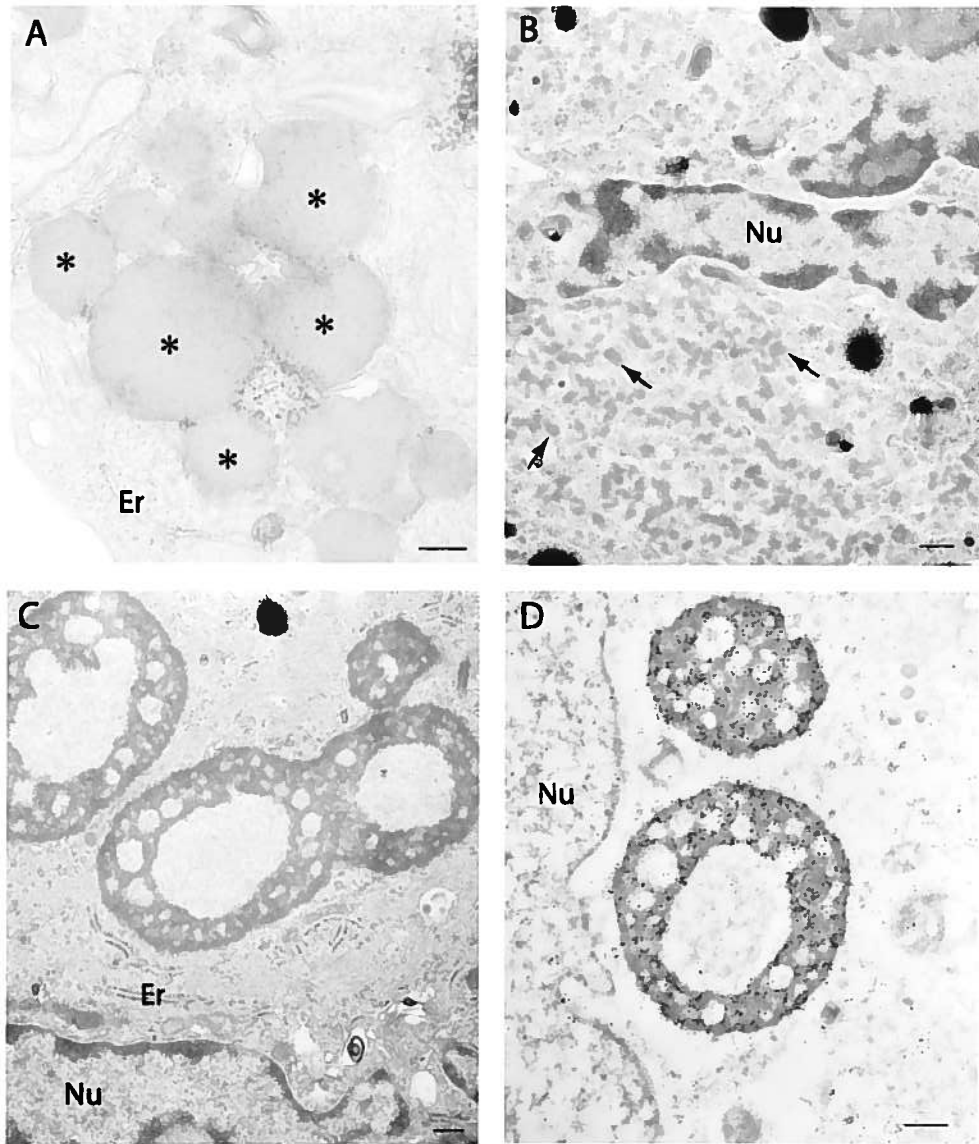


Fig.4

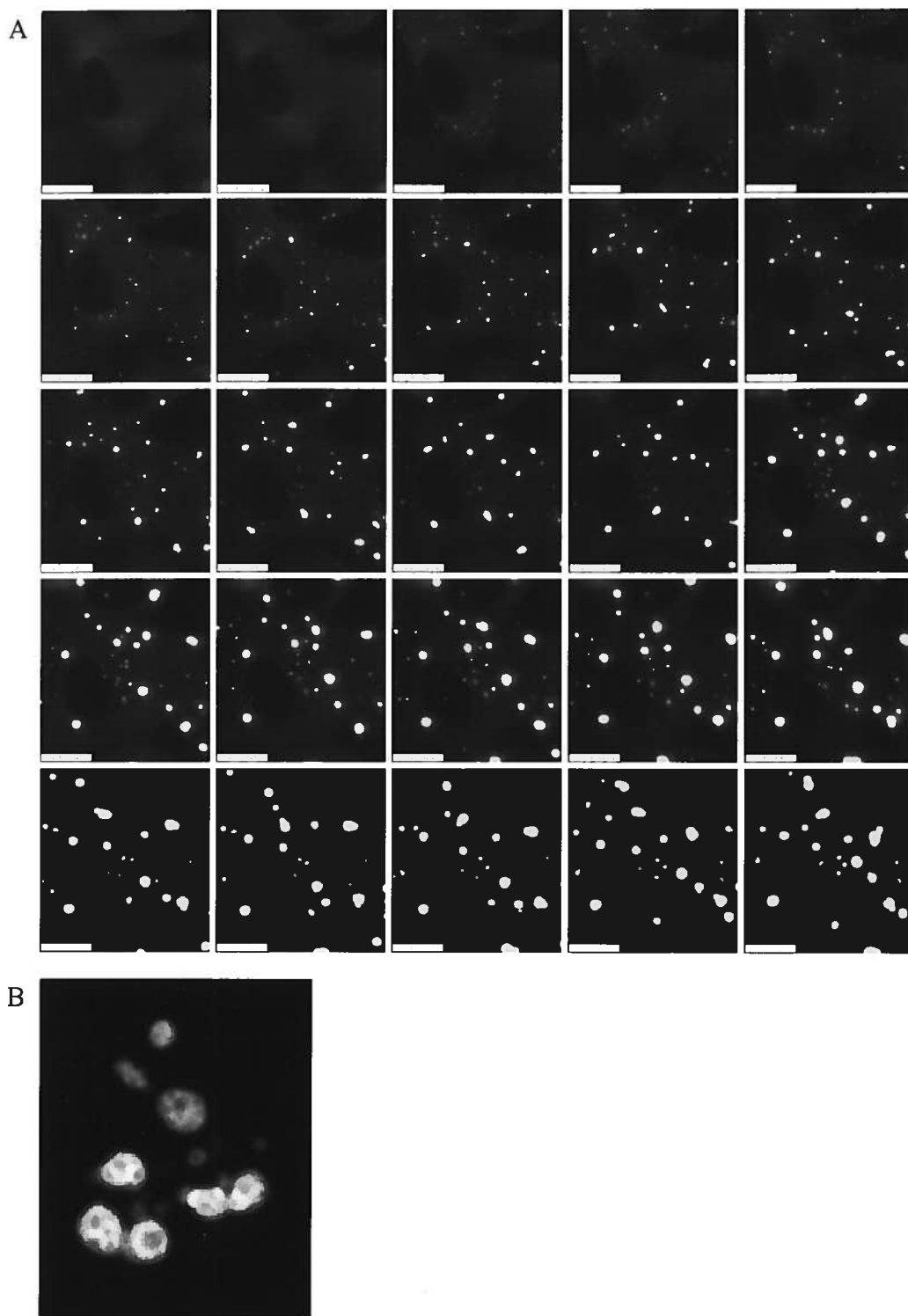


Fig.5

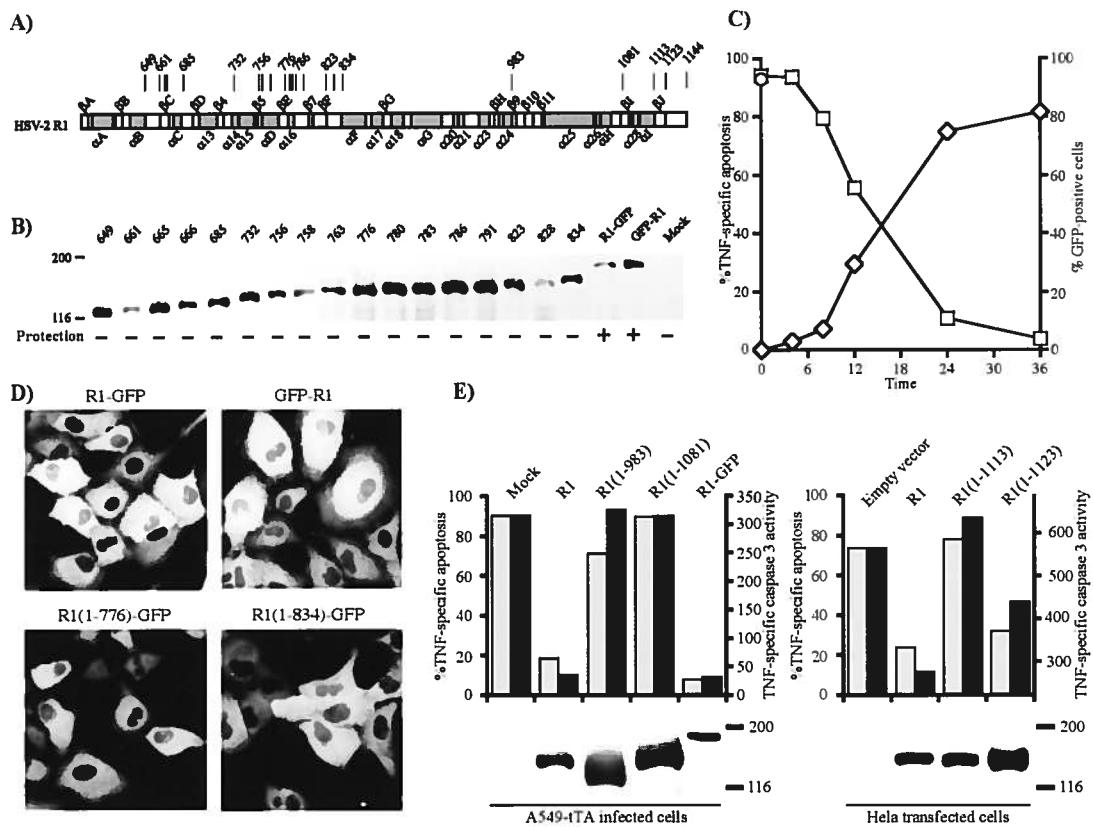


Fig. 6

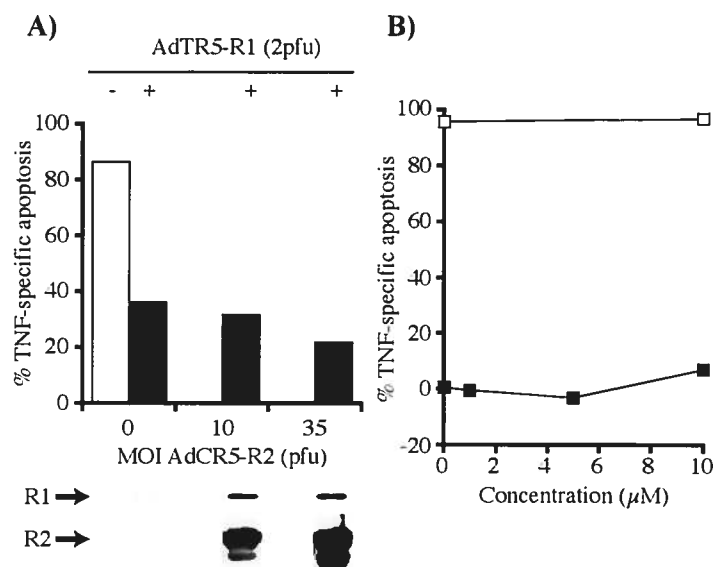


Fig. 7

2.4 : Résultats supplémentaires

Mécanisme Moléculaire du Potentiel Anti-apoptotique de la Sous-unité R1 de la RR du Virus de l'Herpès Simplex

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Chabaud Stéphane^a et Yves Langelier^{a,b}

^a Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre Dame, Montréal, QC, Canada, H2L 4M1

^b Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H2L 4M1

Introduction.

Bien que le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 ait été démontré dans plusieurs types de cellules, son mécanisme reste inconnu. Les principales informations dont nous disposons sont que HSV R1 supprime l'activation de la procaspase-8 induite par la stimulation des récepteurs de mort cellulaire. L'induction via les mitochondries entraîne une activation de la procaspase-8 par la caspase-3 qui ne peut être empêchée par HSV R1, les données faisant même alors apparaître une potentialisation de l'activation de la procaspase-8 [14]. HSV R1 doit donc agir au niveau de l'activation de la procaspase-8 par la voie des récepteurs ou en amont. Le fait que HSV R1 bloque l'apoptose dans des cellules traitées ou non à la cycloheximide permet de conclure qu'aucune synthèse protéique n'est nécessaire pour la protection à partir du traitement avec l'inducteur d'apoptose : le mécanisme ne ferait donc pas appel à des contrôles de la transcription ou de la traduction subséquent à l'activation des récepteurs. Il se peut néanmoins que HSV R1 intervienne entre le moment où elle est synthétisée et l'induction pour activer ou stabiliser des facteurs de transcription ou des protéines qui activeraient une réponse protectrice.

Nous présentons ici une série d'expériences visant à mieux comprendre le mécanisme moléculaire par lequel HSV R1 protège les cellules de l'apoptose. Plusieurs mécanismes ont été présentés pour diverses protéines agissant comme inhibiteurs de l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Des protéines

bloquent le transport des récepteurs à la membrane [306], d'autres empêchent leur diffusion latérale pour éviter la formation de multimères [282]. Certains entrent en compétition avec l'adaptateur pour se fixer au récepteur [128] ou avec la procaspase pour se fixer à l'adaptateur au sein du complexe de signalisation de mort cellulaire (complexe-II [133] ou DISC, *death-inducing signaling complex* [rev. 144]). D'autres enfin se fixe à la caspase activée pour inhiber son activité protéasique [rev. 119]. Nous savons par des travaux antérieurs que HSV R1 agit au niveau ou en amont de l'activation de la procaspase-8 et qu'elle est inefficace une fois la caspase-8 activée [14]. Rien ne peut toutefois nous empêcher d'imaginer qu'elle pourrait avoir une action sur les voies modulées par ASK-1 ou Akt/PKB.

Nous avons trouvé que HSV R1 ne modifie les niveaux d'expression d'aucune des protéines du DISC/Complexe-II étudiées. Les niveaux d'activation de NF- κ B restent identiques en présence de HSV R1 indiquant qu'il y a bien expression des récepteurs à la membrane. Enfin, les résultats obtenus pour l'activation des voies ASK-1 et Akt/PKB semblent indiquer une absence d'effet de HSV R1 à ce niveau. Le rôle de HSV R1 dans une éventuelle séquestration de la procaspase-8 est actuellement sous investigation.

Matériels et méthodes.

Lignées de cellules

Des cellules HeLa et A549-tTA déjà décrites ont été utilisées [13]. Les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal TSA (Tet System Approved, Clontech). Pour maintenir l'expression du tTA à haut niveau, les cellules A549-tTA sont entretenues avec 30 mg/ml de Phléomycine (Sigma) jusqu'à un passage avant leur utilisation.

Virus et infection

Les virus AdTR5-R1 et AdCMV5-R1 déjà décrits ont été utilisés pour exprimer HSV R1 dans les A549-tTA et les HeLa respectivement [13]. Les cellules (3×10^5 A549-tTA ou HeLa dans un puits de 35 mm (plaques de 6 puits Corning)) sont étalées une journée avant l'infection. Les deux virus ont été utilisés avec une multiplicité

d'infection (MOI) de 25 pfu par cellule pour permettre une protection de plus de 90% des cellules après 8 heures d'infection. Le protocole d'infection a déjà été décrit [13].

Mesure des niveaux d'apoptose

Les niveaux d'apoptose ont été mesurés par des comptes cellulaires réalisés dans dix champs sélectionnés aléatoirement. Les cellules présentant les caractéristiques de cellules en apoptose ont comptés comme cellules apoptotiques, les autres cellules comme cellules non-apoptotiques. Des travaux menés précédemment [14, 15, 17] ont montrés que pour les types de cellules que nous utilisons le résultat de ces comptes corrèle très fortement avec l'activité enzymatique de la caspase-3 et le clivage de PARP, deux marqueurs reconnus de l'apoptose ainsi qu'avec des essais de viabilité utilisant le colorant WST-1. Pour induire l'apoptose, les cellules sont traitées 8 heures post-infection (à moins de précisions contraires) avec 15 mg/ml de CHX (contrôle) ou 15 mg/ml de CHX + 2,5 ng/ml de TNF- α .

Préparation des extraits cellulaires

Au temps indiqué, 250 ml d'une solution de 0,5% sodium dodécyl-sulfate (SDS) dans de l'eau Ultrapure est ajoutée aux cellules A549-tTA et le lysat est stocké à -80°C. Les échantillons sont soniqués brièvement avant leur analyse pour briser les molécules d'ADN.

Analyse par Western Blot

10 mg d'extraits subissent une Electrophorèse sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivis d'un Western Blot (kit Biorad). Les membranes sont révélées avec le kit SuperSignal (Pierce). Les anticorps utilisés sont le mAb 932 pour HSV-2 R1 et des anticorps commerciaux (Santa Cruz) pour Fas, FADD, Caspase-8, NF- κ B-p65, NF- κ B-p65 phosphorylé, Akt, Akt phosphorylé et ASK-1.

Résultats et discussion

Les niveaux d'expression des composants du DISC ne sont pas altérés par HSV R1

Des cellules A549-tTA ont été infectées ou non par un adénovirus permettant l'expression de HSV-2 R1 (Ad5TR5-R1 à 25pfu pour 7 heures). Les niveaux des différentes protéines testées ont été déterminés par SDS-PAGE et Western Blot.

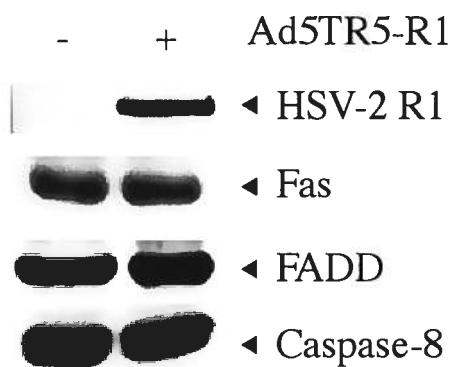


Fig.1 : Les niveaux d'expression des composants du DISC ne sont pas modifiés par HSV R1: Les extraits de cellules infectées par l'Ad5TR5-R1 avec une MOI de 25 pfu par cellule (+) ou non (-) sont recueillis à 7 h après infection pour analyse par Western blot. Les conditions sont précisées dans le Matériel et méthodes du chapitre 2.4.

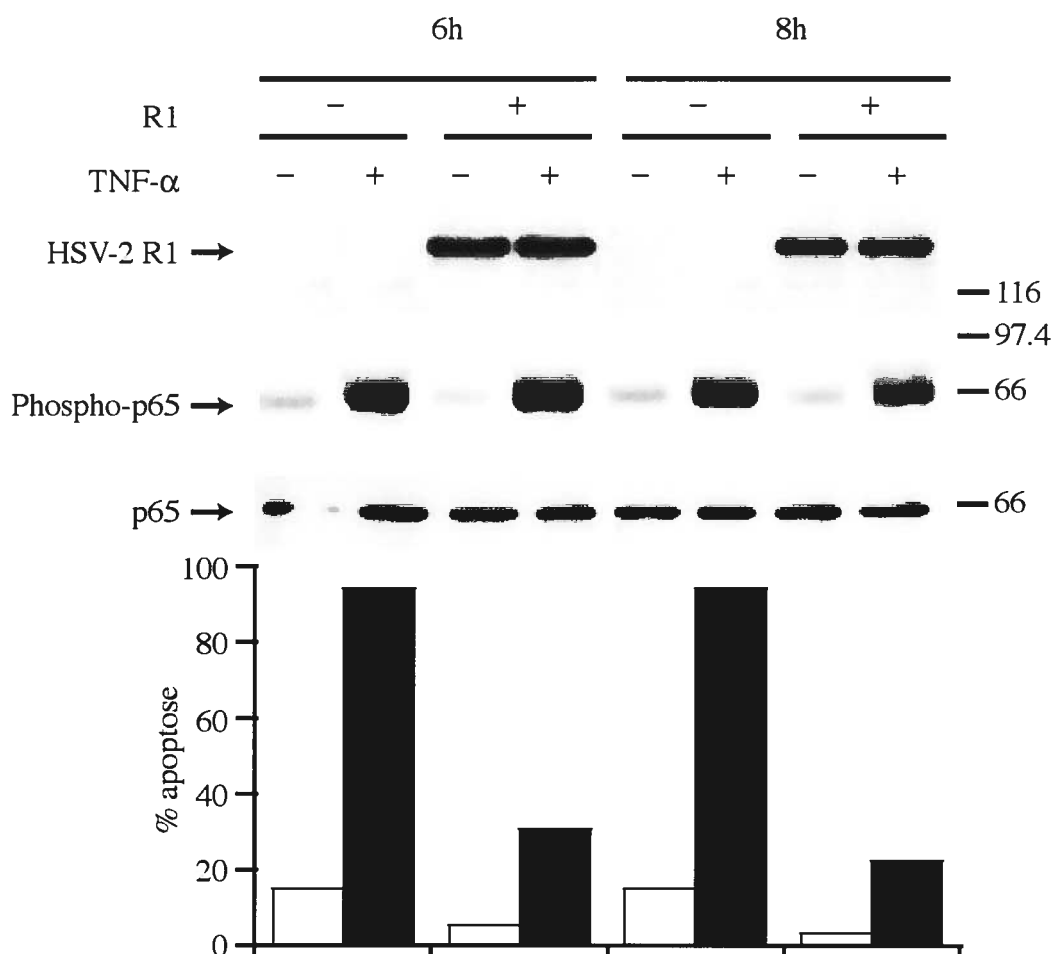


Fig.2 : HSV R1 ne modifie pas le niveau d'activation de NF- κ B. Des cellules HeLa sont infectées en duplicata pour le temps indiqué en haut du graphique avec une MOI de 25 pfu/cellule du virus Ad5CMV5-R1. Les cellules sont alors traitées avec de la cycloheximide (CHX, 15 μ g/ml) ou de la CHX (15 μ g/ml) + TNF- α (2,5 ng/ml). Après 15 minutes, la moitié des boîtes de Petri sont lavées deux fois au PBS et les cellules lysées avec une solution de 0,5% de SDS. L'autre moitié des boîtes de Petri sont incubés 16 h et les niveau d'apoptose sont déterminés par observation au microscope (barres grises pour CHX, noires pour CHX+TNF). Les extraits cellulaires sont brièvement soniqués et dosés pour analyse par Western blot utilisant les conditions décrites dans le Matériel et méthodes du chapitre 2.4.

Les niveaux d'expression du récepteur Fas, de FADD et de la procaspase-8 dans les cellules A549-tTA infectées ou non restent identiques (Fig.1). Ceci indique que HSV R1 n'agit ni sur la synthèse ni sur la stabilité de ces protéines. Toutefois cela ne nous renseigne pas sur la formation du DISC.

Les niveaux d'activation de NF- κ B ne sont pas modifiés

Des cellules A549-tTA ont été infectées comme précédemment et les niveaux de p65 totaux ou phosphorylés ont été déterminés par SDS-PAGE et Western Blot après exposition 10 minutes à une dose de TNF- α suffisante pour tuer plus de 95% des cellules en 16 heures (Fig.2).

Le niveau d'expression de NF- κ B n'est pas modifié par l'expression de HSV R1 (Fig.2). La protéine est bien activée par un traitement au TNF- α et de façon similaire en présence ou en absence de HSV R1 (Fig.2) ce qui exclut que NF- κ B soit impliqué dans le mécanisme de protection. Cela indique aussi que les récepteurs sont bien exportés à la membrane plasmique et qu'ils forment des complexes fonctionnels.

Si les récepteurs sont bien présents à la membrane et peuvent permettre la signalisation via la voie NF- κ B, cela n'implique pas pour autant que le complexe pro-apoptotique se forme [133]. Des co-immunoprécipitations n'ont pas permis de détecter une interaction de HSV R1 avec la procaspase-8 (Sasseville, AMJ, données non publiées). Si le récepteur est présent et fonctionnel à la membrane pour signaler une réponse anti-apoptotique, il peut néanmoins en être autrement de la formation du complexe pro-apoptotique. FADD ou la procaspase-8 peuvent être séquestrés dans des complexes ou piégés dans des compartiments sub-cellulaires. Cependant HSV R1 ne peut empêcher l'activité de la caspase-8 lorsqu'elle est activée par la caspase-3 au cours de l'induction de la voie mitochondriale. Aussi il faut supposer que HSV R1 agit, directement ou indirectement, au voisinage de la membrane plasmique voir des radeaux lipidiques portant les récepteurs de mort cellulaire pour empêcher spécifiquement dans ces régions l'activation de la procaspase-8. Comme HSV R1 est diffuse dans le cytoplasme, ceci renforce l'idée d'une action indirecte de HSV R1. De plus celle-ci est capable de protéger les cellules même lorsqu'elle est exprimée à de très faibles niveaux [14], ce qui est compatible avec une association transitoire à un complexe en formation dont elle se détacherait pour par exemple aider à former

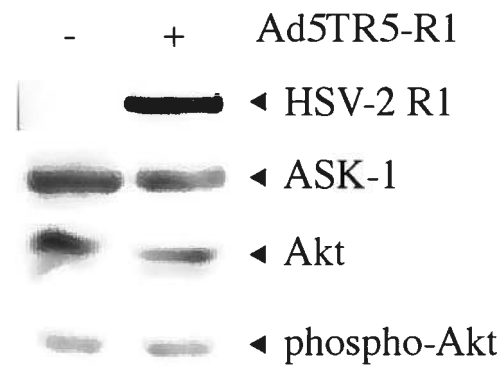


Fig.3 : Les niveaux d'expression des kinases ASK-1 et Akt ne sont pas modifiés par HSV R1 ni le niveau d'activation de Akt : Les extraits de cellules infectées par l'Ad5TR5-R1 avec une MOI de 25 pfu/cellule (+) ou non (-) sont recueillis à 7 h après infection pour analyse par Western blot. Les conditions sont précisées dans le Matériel et méthodes du chapitre 2.4.

d'autres complexes ou bien à une action plus indirecte (stabilisation de protéines qui seraient libérées suite à la formation du DISC par exemple).

HSV R1 ne modifie pas les niveaux d'expressions d'ASK-1 ni d'activation de AKT/PKB

L'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort cellulaire peut également emprunter la voie ASK-1 dans les types cellulaires que nous avons utilisés (cellules A549 et HeLa). De même il est connu que l'activation de Akt/PKB est susceptible de moduler négativement les voies apoptotiques, Il nous a donc semblé légitime de rechercher si l'expression de ASK-1 et/ou la phosphorylation de Akt/PKB pouvaient être modifiée par HSV R1.

Dans les même condition expérimentale que pour la figure 1, aucune différence dans les niveaux d'expression de ASK-1 n'a pu être décelé dans les extraits de cellules exprimant HSV R1 (Fig.3). De même pour les niveaux d'activation de Akt/PKB Cela ne veut toutefois pas dire que HSV R1 ne pourrait pas contribuer à moduler l'activité de ces kinases lors de l'engagement des récepteurs par leurs ligands.

Remerciements : Nous tenons à remercier le docteur B. Massie pour les virus AdTR5-R1 et AdCMV5-R1 ainsi que les cellules A549-tTA ainsi que le docteur L. Thelander pour l'anticorps monoclonal 932.

Chapitre III : Discussion générale

Le but de cette thèse était d'étudier de nouvelles activités associées à la sous-unité R1 de la RR des virus herpès : l'activité anti-apoptotique, découverte avant le début de mon stage, et l'activité de chaperon moléculaire, qui fut trouvée pendant mes travaux. (i) J'ai voulu définir le spectre d'action du potentiel anti-apoptotique, les régions importantes pour celui-ci et définir si possible son mécanisme. (ii) Les travaux sur l'activité de chaperon moléculaire visèrent surtout à caractériser les diverses propriétés communes aux sHsp et à HSV R1. Mes travaux ont permis de mieux caractériser le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 en précisant les régions impliquées et le spectre d'action du potentiel anti-apoptotique. Des études préliminaires sont en cours pour cerner le mécanisme anti-apoptotique plus précisément. D'autres études devraient permettre de définir l'importance de l'activité de chaperon moléculaire en culture cellulaire et *in vivo*.

3.1 Caractérisation de l'activité anti-apoptotique de HSV R1

3.1.1 Spectre d'action du potentiel anti-apoptotique de HSV R1.

Les premières évidences d'un potentiel anti-apoptotique pour HSV-2 R1 provenaient d'expériences utilisant des vecteurs adénoviraux dans une lignée exprimant un trans-activateur (tTA) (Art.1, Fig.1). Aussi, nous avons, en premier lieu, démontré que ni le tTA (Art.1, Fig.s2 et s3) ni aucune protéine adénovirale n'étaient impliqués (Art.1, Fig.s3). Par la suite, la spécificité de HSV-2 R1 pour la voie des récepteurs de mort cellulaire fut mise en évidence par des expériences montrant que l'apoptose induite dans des cellules A549-tTA par des traitements agissant via la voie mitochondriale (ménadione, staurosporine, étoposide et sur-expression de Bax) n'étaient pas bloquée par HSV R1 (Art.1, Fig.2A). Par contre, si HSV R1 bloque l'activation de la procaspase-8 et donc subséquemment de la procaspase-3 lors de la stimulation des récepteurs de mort cellulaire, l'activation de la procaspase-8 par la caspase-3 activée via la voie mitochondriale ne peut être prévenue par R1 (Art.1, Fig.2B). L'apoptose via la voie extrinsèque est caractérisée dans les cellules de type-I par l'activation de la procaspase-8. Nous avons montré que R1, exprimé dans notre système adénoviral,

était capable de prévenir l'activation de celle-ci (Art.1, Fig.3) mais sans inhiber l'activité de la caspase-8 *in vitro*. Pris ensemble, ces résultats démontrent que HSV R1 a un potentiel anti-apoptotique dirigé contre l'activation de la voie des récepteurs de mort cellulaire et qu'elle agit au niveau ou en amont de l'activation de la procaspase-8.

Des travaux ont été publiés indiquant que HSV R1, mais pas un mutant délété d'une partie de son domaine amino-terminal ($\Delta 86-106$), était capable de protéger des cellules HEK 293 (293) de l'apoptose induite par la staurosporine (STS) ou le choc osmotique (D-mannitol) [273], deux inducteurs de la voie mitochondriale. Les résultats présentés dans cette étude s'appuient sur des tests courants pour mesurer les niveaux d'apoptose (TUNEL, fragmentation de l'ADN, clivage de la procaspase-3 et de poly (ADP-Ribose) polymérase (PARP)). Cette étude semble donc contredire le fait que le potentiel anti-apoptotique de R1 serait spécifique de la voie des récepteurs de mort cellulaire. Des différences de séquences entre leur protéine et la notre sont, *a priori*, exclues puisque la souche virale d'où origine le gène HSV R1 est la même pour les deux groupes (souche 333) [307]. Nous avons donc voulu vérifier si les différences entre les résultats des 2 études pouvaient être liés à l'utilisation de lignées cellulaires différentes. Des cellules HeLa et A549-tTA, exprimant transitoirement HSV R1 ainsi que des cellules A549-tTA exprimant de manière stable et inducible HSV R1-GFP ont été utilisées. Aucune des cellules exprimant HSV R1 n'a cependant montré de capacité à se protéger de la mort cellulaire induite par la STS plus grande que la lignée parentale. Il en est de même pour les expériences que nous avons menées avec des cellules HEK 293 exprimant transitoirement ou de manière stable HSV R1 (données non présentées). Cette même étude montre que des cellules PC-12 sont protégées par l'expression de R1 contre l'apoptose induite par une carence en facteur de croissance neuronaux (NGF, *nerve growth factor*). Dans cette étude, le mutant R1($\Delta 86-106$) démontre également une absence de protection [273]

Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer la différence de résultats obtenus par notre laboratoire et par le groupe d'Aurelian. En premier lieu, les différences que nous observons au niveau des cellules 293 stimulées par la STS peuvent être liées à l'utilisation de lignées dérivées de HEK 293 différentes. En effet,

le groupe d'Aurelian utilise des cellules 293 transfectées pour exprimer de façon stable HSV R1. Ces cellules ont été sélectionnées pour la résistance au G418 sur plusieurs passages et il est possible que le clone JHLa1 [258] qui exprime la R1 soit également résistant à l'activation de la procaspase-3, la lignée parentale et le clone exprimant le mutant restant sensibles à l'activation de la procaspase-3. Il se peut aussi que l'expression constitutive de HSV R1 ait forcé la lignée à s'adapter à cette situation. On sait que la surexpression de protéines anti-apoptotiques peut parfois se révéler pro-apoptotique [317, 318]. Aussi, les cellules ont, peut être, rééquilibré les niveaux d'expression d'autres protéines impliquées dans la mécanique apoptotique. Une autre explication qui permet de mieux concilier nos résultats avec ceux d'Aurelian, notamment ceux obtenus avec les cellules PC-12, est le fait que les voies apoptotiques utilisées d'une lignée de cellules à l'autre ne sont pas identiques et dans la même lignée, l'utilisation d'inducteurs différents peut conduire à des réponses différentes. La meilleure illustration de ce fait est la division des cellules en 2 classes par rapport à leur réponse à la stimulation des récepteurs de mort cellulaire [159].

3.1.2 Potentiel anti-apoptotique de HSV R1 au cours d'une infection virale

Nous avons montré que HSV-1 et -2 étaient capables de bloquer l'apoptose induite par le TNF avec une cinétique qui corrèle avec l'expression de HSV R1 au cours de l'infection (Art.1, Fig.4). De plus, un mutant viral délété du gène de R1 (ICP6 Δ) perd la moitié de sa capacité à protéger indiquant l'implication de R1 mais également la présence d'autres protéines protectrices (Art.1, Fig.5). Cette diminution de protection corrèle avec une diminution de la capacité à prévenir l'activation de la procaspase-8 pour ICP6 Δ (Art.1, Fig.6). Ces résultats permettent d'envisager que HSV R1 soit impliquée dans la protection contre les cytokines des cellules infectées par les HSV mais que d'autres protéines virales sont également susceptibles de jouer un rôle.

3.1.2 Domaines impliqués dans le potentiel anti-apoptotique de HSV R1

L'existence d'un domaine NH₂ unique pour la R1 des HSV et le fait que la délétion de celui-ci jusqu'au 357^{ème} acide aminé produisait une protéine fortement cytotoxique, nous a conduit à formuler l'hypothèse que le domaine NH₂ était impliqué dans le potentiel anti-apoptotique de R1. L'expression de 3 protéines contenant la séquence amino-terminale jusqu'aux positions 398, 445 et 496 n'a toutefois pas démontré de capacité à protéger les cellules du TNF (Art.1, Fig.7). Si le domaine N-terminal joue un rôle, les deux domaines, ou des parties des deux domaines, seraient impliqués dans la protection. Aussi, afin de délimiter les régions importantes, un vaste programme de délétion a été entrepris (Art.3, Fig.1). L'analyse des résultats nous indique que les 357 premiers acides aminés de HSV R1 ne sont pas nécessaires pour maintenir la fonction anti-apoptotique de R1 (Art.3, Fig.2C). Les résultats de délétions plus longues au N-terminus ne nous ont pas permis de conclure que la perte d'activité biologique était liée à la perte de séquences importantes en raison de la formation d'agrégats insolubles par ces protéines mutantes (Art.3, Table I). L'absence de protection contre le TNF- α des protéines où le domaine α -cristallin est délété permet d'exclure que la protection conférée par R1(Δ 2-357) soit une réaction non spécifique de la cellule à une agrégation protéique. De plus, un caractère toxique n'a pu être démontré que pour R1(Δ 2-357). La région 300-400 semble être impliquée dans le repliement de la protéine comme l'indique l'insolubilité des protéines présentant des délétions à ce niveau (Art.3, Table I). Nous avons également démontré que la majeure partie du domaine RR est requise pour la protection contre le TNF- α (Art.3, Fig.6). En effet, seuls les 21 derniers acides aminés peuvent être tronqués sans effet pour la protection (mais pas sur la solubilité de la protéine qui est diminuée (Art.3, Table I)). L'association de HSV R2 avec R1 n'entraîne pas de diminution de la protection conférée par R1, ce qui permet d'exclure la surface de contact de R2 sur R1 (Art.3, Fig.7A). Nous avons également testé un peptido-mimétique correspondant à l'extrémité C-terminal de R2 [9, 12] qui lie R1 dans un sillon formé par α I, α 13 et divers autres éléments de structure déjà décrits [219]. Ce peptide, bien qu'actif pour inhiber l'activité RR de HSV R1 (réduction de 100 fois du titre de la progénie d'un

virus HSV poussant sur une monocouche de cellules confluentes en présence du peptide, résultats non montrés), n'a pas eu d'effet sur le potentiel protecteur de R1 (Art.3, Fig.7B) indiquant que ces régions ne sont pas impliquées dans la protection. Il est à noter que les régions de HSV R1 situées sur la face opposée à celle où se lie la R2 présentent des homologies avec des séquences des homologues de R1 chez les virus herpès de classe β dont on sait que la fonction n'est pas la réduction des ribonucléotides.

Des publications récentes [273, 274] rapportent que HSV-2 R1 bloque l'apoptose induite par la STS dans des cellules 293 ou par la carence en NGF dans des cellules PC-12 mais pas un mutant HSV-2 R1(Δ 86-106). De plus si HSV-2 est capable de protéger des neurones hippocampaux contre l'apoptose induite par l'infection virale elle-même, un mutant de HSV-2 où R1 est délétée de la région 107-446 (ICP10 Δ PK, exprimé à un très faible niveau par rapport à la protéine sauvage) est au contraire pro-apoptotique. A l'inverse, un mutant délété du domaine RR a le même phénotype que le virus sauvage [273]. HSV-1 ou ses mutants ICP6 Δ et *hrR3*, où R1 est respectivement délétée totalement ou partiellement (domaine RR seulement), présentent également une toxicité [274]. En conclusion, les auteurs présument que le présumé domaine PK, spécifique à HSV-2 R1 selon le groupe d'Aurelian, est indispensable à la protection et qu'il agit via l'activation par phosphorylation des voies de signalisation MAPK. Les régions importantes pour la protection se situent donc d'après ces études dans la région 86-447 de la R1 de HSV-2 exclusivement.

Nous ne reviendrons pas sur les études de plusieurs groupes qui ont démontrés que HSV-2 R1 n'avait pas d'activité PK [266, 267] par contre nous avons démontré que HSV-2 R1(Δ 107-446) était une protéine totalement insoluble que ce soit dans des cellules HeLa ou 293, dans des tampons Hepes 50mM, DTT 2mM ou RIPA, utilisé couramment par le groupe d' Aurelian (Art.3, Table I et données non publiées). Ceci pourrait expliquer encore mieux que la diminution du niveau d'expression de la protéine la perte d'activité biologique constatée. Il n'en reste pas moins que les résultats obtenus avec le mutant R1(Δ 86-106) sont en contradiction avec notre présente étude qui a montré que les 357 premiers acides aminés de HSV-2 R1 n'étaient pas nécessaires pour protéger de l'apoptose induite par le TNF. Le fait que

ICP10 Δ RR ait un potentiel anti-apoptotique (i.e. le domaine amino-terminal seul) semble venir lui aussi contredire nos résultats qui démontrent que l'intégrité du domaine réductase est essentielle pour la protection. De plus nous avons clairement démontré que le domaine amino-terminal seul et ceci jusqu'au 496^{ème} acide aminé était incapable de protéger de l'activation du TNFR.

Une explication de la différence de nos résultats concernant les régions impliquées dans le potentiel protecteur de R1 est que les domaines intervenants dans la protection contre l'apoptose induite par ce genre de stimuli dans les cellules choisies par le groupe d'Aurelian soit différents de ceux qui sont impliqués dans la protection contre l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire dans les cellules que nous avons utilisé. En effet, des études [274] ont montré que les mutants de la souche KOS de HSV-1, ICP6 Δ et *hrR3* (fusion avec *lacZ* après le domaine N-terminal de HSV-1 R1), qui lors de nos essais se comportait comme ICP6 Δ , ainsi que HSV-1 (souche F) induisait l'apoptose dans environ la moitié des cellules dans des cultures de neurones hippocampaux mais pas HSV-2. L'apoptose ainsi induite pouvant être réduite par l'expression de HSV-2 R1. Le domaine RR étant fortement homologue entre les R1 des deux types de HSV alors que le domaine amino-terminal est relativement divergeant, un potentiel anti-apoptotique dirigé contre ce type d'apoptose pour HSV-2 mais pas HSV-1 est possible. Les auteurs présupposent l'existence d'une activité PK et indiquent que la protection serait conférée dans ce système par la régulation positive de la protéine anti-apoptotique Bag-1 (*Bcl-2-associated athanogene-1*), un facteur qui agit avec ou indépendamment de Bcl-2 [319] notamment en association avec Hsp-70 [320]. Dans ce modèle, l'apoptose est induite par l'activation de JNK. HSV-2 active aussi JNK (Fig.10A) et c-Jun (Fig.10C) mais plus faiblement que HSV-1. On se rappellera que l'activation transitoire de JNK est protectrice contrairement à son activation soutenue. Toutefois dans un autre modèle cellulaire le groupe de Conner a démontré que HSV-1 était capable de protéger les cellules via l'activation de la voie p38/MAPK [321, 322], alors que le groupe de Jerome a montré que dans les cellules Jurkat (type II), HSV-1 mais pas HSV-2 avait un potentiel protecteur contre l'apoptose induite par l'activation de Fas [197]. Il est donc possible que les apparentes contradictions entre

ces différents travaux trouvent leur source dans l'utilisation de types cellulaires et de stimuli différents. Des études sont en cours dans notre laboratoire pour essayer de le déterminer.

3.1.3 Mécanisme d'action de HSV R1 pour protéger les cellules de l'apoptose

Nous avons établi que les niveaux du récepteur Fas, de l'adaptateur FADD et de la procaspase-8 n'étaient pas changés lorsque HSV R1 est exprimée dans les cellules (Chap.2.4 Fig.1). Ceci indique que HSV R1 n'a pas d'effet sur la synthèse ou la stabilité de ces protéines. L'activation de NF- κ B identique en présence comme en absence de HSV R1 indique que la formation de complexes de signalisation fonctionnels à la membrane n'est pas dérangée. Les récepteurs de mort cellulaire migrent donc bien jusqu'à la membrane plasmique (Chap.2.4 Fig.2). Les niveaux de ASK-1 et d'Akt activé par phosphorylation, deux autres modulateurs des voies apoptotiques (Fig.3 et 4) ne sont pas non plus modifiés (Chap.2.4 Fig.3).

Des études de co-immunoprécipitations n'ont pas permis de détecter une association directe entre procaspase-8 et HSV R1 (données non présentées de A.M.J. Sasseville).

3.1.5 L'énigme de HSV R1(Δ 2-357)

Une question passionnante qui reste à résoudre est le caractère à la fois pro- et anti-apoptotique de HSV R1(Δ 2-357). Comment une protéine peut être à la fois toxique et protectrice. Plusieurs cas existent de protéine anti-apoptotique qui peuvent devenir pro-apoptotique selon les conditions comme, par exemple, la surexpression de Bcl-2 [317, 318, 323], la protéine FLIP_L [rev. 146, 156], le facteur NF- κ B [324] ou la kinase JNK [170, 325]. On sait que la procaspase-8 est activée en premier dans les cellules qui expriment HSV R1(Δ 2-357) (Art.3), or l'activation de cette même procaspase-8 est empêchée lors d'un traitement au TNF- α dans des cellules exprimant cette protéine (évidemment pas les mêmes puisque les premières sont mortes). Ce résultat n'est pas en soi contradictoire si l'activation de la procaspase-8 par HSV R1(Δ 2-357) implique une voie distincte de celle de l'activation de la procaspase-8 par les récepteurs de mort cellulaire. Toutefois si c'est la voie

extrinsèque qui est activée (formation du complexe-II pro-apoptotique précédemment décrit) il se pourrait qu'il y ait un facteur seuil en deçà duquel la protéine serait anti-apoptotique et pro-apoptotique au-delà. Comme la protéine se présente sous deux formes, soluble et insoluble, la première question qui vient à l'esprit est évidemment de savoir si les deux formes de la protéine tronquée jouent des rôles différents ou non (et de savoir si la forme insoluble joue un rôle ou non). Dans les premières heures qui suivent l'expression de HSV R1(Δ 2-357), la protéine est relativement diffuse mais peu concentrée dans le cytoplasme des cellules, puis au fur et à mesure que la protéine s'accumule, elle s'agrège et cette agrégation semble corrélée avec l'apparition de la cytotoxicité. Toutefois, on ne peut prétendre que les deux événements sont liés car la concentration de protéine soluble augmente également (même si elle diminue d'un point de vue relatif). Si la responsabilité des agrégats de protéines dans la toxicité observée dans de nombreuses pathologies a été soutenue par plusieurs études, de plus en plus, la littérature indique que cette toxicité serait reliée à la forme soluble ou oligomérique de ces protéines [326, 327]. Toutefois, les agrégats formés dans les cellules des tissus de patients ou dans les modèles cellulaires (Alzheimer (AD), Huntington (HD), Creutzfeld-Jacob (CJD), ...) sont différents de ce que l'on observe avec HSV R1(Δ 2-357). Des études menées en tentant de solubiliser *in vivo* (dans des cellules en culture) la R1(Δ 2-357) avec du chlorure de lithium pourraient être engagées. Si ce dernier produit n'induit pas de toxicité propre, il pourrait permettre de solubiliser HSV R1(Δ 2-357) (dont la solubilité est proportionnelle *in vitro* à la quantité de NaCl dans le tampon d'extraction (Art.3, table I et données non montrées)) et la variation de la toxicité pourrait alors nous indiquer quelle est la forme toxique.

Des études sur cette protéine sont évidemment indispensables pour comprendre cette dualité qui peut être riche d'enseignements pour la compréhension de l'apoptose en général mais également pour comprendre le mécanisme d'action de HSV R1.

3.2 Caractérisation de l'activité de chaperon moléculaire de HSV R1

3.2.1 HSV R1 a des caractéristiques similaires aux sHsp

Le groupe d'Aurelian a rapporté une identité de séquence de 30% entre H11 (ou HSP22 ou HspB8) et HSV-2 R1 (sans la présenter). Ce groupe avance, en outre, que la protéine H11 est une PK [16] qui présente un certain nombre de caractéristiques biochimiques communes avec l'activité PK présumée de R1 (dépendance au Mn^{2+} , Ser/Thr kinase,...). Alors que les auteurs affirment qu'aucune séquence homologue n'a pu être trouvée dans SwisProt avec BLASTX, lorsque, au laboratoire, nous avons cherché avec le même logiciel quelles étaient les protéines les plus voisines de H11, nous nous sommes aperçus que les protéines contenant un domaine α -cristallin y étaient très nombreuses. Il fut rapidement confirmé par un autre groupe que HspB8 était une petite protéine de choc thermique possédant une activité de chaperon moléculaire [328, 329]. Des évidences très nettes démontrent également que HspB8 n'est pas une PK, n'en possédant ni les caractéristiques génétiques, ni les caractères biochimiques [329]. Les différences de résultats entre ces groupes et celui d'Aurelian peuvent être provenir de la méthode utilisée pour déterminer la présence d'une activité PK qui est la même que celle utilisée pour soutenir l'existence d'une activité kinase pour HSV-2 R1 [16].

Lorsque nous avons essayé d'aligner HSV-2 R1 avec H11, aucune identité ne pu être détectée avec les méthodes classiques d'alignement de séquences protéiques (BLASTp). C'est en cherchant des homologies possibles entre HSV-2 R1 et la région d'homologie entre plusieurs sHsp (domaine α -cristallin) que fut trouvée, au voisinage de la position 357 (\approx 300-400), une séquence homologue avec HSV R1 (Art.2, Fig.1A). Cette homologie est cependant moindre que celles proposée par le premier groupe. Toutefois, elle a permis d'orienter nos travaux et diverses expériences ont été menées dans notre laboratoire et dans celui de Jacques Landry à Québec, pour vérifier si HSV R1 pouvait présenter des caractéristiques communes avec les sHsp. Parmi les caractéristiques les plus remarquables des sHsp, on trouve la capacité à former des

multimères. Des échantillons de HSV R1 purifiée forment des complexes suggérant la formation d'hexamères (Art.2, Fig.2). Récemment il a été démontré que la R1 des mammifères, chez laquelle le domaine α -cristallin fait place aux éléments de régulation allostériques, était capable de former de telles structures mais uniquement en présence de ribonucléotides [230]. Des études comparatives avec Hsp27, le prototype des sHsp, ont démontré très clairement que, *in vitro* (test de dénaturation de la citrate synthase à 43°C), HSV R1 possède une activité de chaperon moléculaire similaire à Hsp27 (Art.2, Fig.3A et B). La sous-unité R1 murine, qui n'a pas de domaine α -cristallin, est quant à elle dépourvue d'activité de chaperon moléculaire et ce même dans des conditions favorisant sa multimérisation (Art.2, Fig.3C et D).

3.2.2 Le domaine « α -cristallin » de HSV R1 en est-il un ?

Le domaine α -cristallin de HSV-2 R1, s'il s'agit bien d'un domaine de ce type, présente des séquences similaires notables avec les sHsp (par exemple les résidus L325, R 354, G380 ou L382) mais montre aussi des différences sur un certain nombre d'autres séquences (LDV en début de domaine et DXHG au centre par exemple) (Art.2). Les divergences observées pourraient être liées à la nécessité du domaine α -cristallin viral de s'adapter au domaine RR situé en aval impliquant la coopération des deux domaines comme cela a déjà été montré pour d'autres sHsp [330]. Il est à noter que les domaines α -cristallin présentent fréquemment des divergences de séquences entre eux tout en ayant des structures tridimensionnelles similaires [293, 294]. Par exemple, la co-chaperonne de Hsp90, p23, a ainsi une structure-3D similaire à un domaine α -cristallin tout en ayant une séquence très éloignée [330]. En absence d'études de structure par cristallisation de HSV R1, il est très difficile de confirmer ou d'infirmer que le domaine découvert est bien un domaine α -cristallin. Toutefois, même s'il s'avérait que l'homologie détectée entre HSV R1 et les sHsp ne permette pas de décrire un domaine α -cristallin, la fonction de chaperon moléculaire a été démontrée sans ambiguïté. Néanmoins, établir que le domaine α -cristallin de HSV R1 en est bien un permettrait de faciliter l'étude de la fonction de chaperon

moléculaire grâce à des mutations plus subtiles que l'on pourrait envisager en fonction de la littérature.

3.2.3 Relation entre l'activité de chaperon moléculaire de HSV R1 et son potentiel anti-apoptotique.

Il est connu que Hsp27 protège les cellules où elle est exprimée de divers stimuli pro-apoptotique dont le TNF- α , bien que la relation entre le domaine α -cristallin et la protection contre l'apoptose n'ait pas été établie [rev. 331]. Pour faire le lien entre la présence du domaine α -cristallin et le potentiel anti-apoptotique de HSV R1, nous avons comparé les capacités de protection contre le TNF- α de la sous-unité R1 herpétique à celle de son homologue humain (Hu R1) dépourvu de domaine α -cristallin. Si HSV R1 protège les cellules du TNF- α très efficacement, son homologue humain en est incapable lorsqu'il est exprimé à des niveaux comparables ou supérieurs (Art.2, Fig.4). Toutefois comme nous l'avons démontré (Art.1, Fig.7) l'expression du domaine α -cristallin de HSV R1 seul est incapable de protéger les cellules de l'apoptose. La coopération des deux domaines de la protéine semble nécessaire pour l'expression du potentiel anti-apoptotique de HSV R1. Bien que séduisante a priori la relation entre potentiel anti-apoptotique et activité de chaperon moléculaire de HSV R1 n'est pas assurée : les différences entre HSV R1 et Hu R1 vont bien au-delà du seul domaine α -cristallin et relier directement les deux activités parce que Hu R1 ne comprend pas de domaine α -cristallin et ne protège pas à la différence de HSV R1 serait sûrement trop hâtif. En particulier, le lien entre domaine α -cristallin et contrôle de l'apoptose n'a pu être établi notamment en raison de la très grande difficulté d'approche de ce domaine par la technique que nous avons choisi au départ (délétion importante). Toutefois, la plupart des groupes travaillant sur le sujet se heurtent, même en effectuant des altérations mineures de ce domaine, à des problème de solubilité et de perte d'activité biologique.

L'accent a été mis récemment sur le remodelage du cytosquelette au cours de l'apoptose aussi bien dans l'initiation du phénomène que dans son exécution et évidemment dans ses conséquences. De plus il a été démontré que les sHsp étaient

capables de s'associer aux filaments d'actine, sans que cela ne soit relié au déclenchement de l'apoptose. Toutefois des cellules où la fonction du protéasome avait été inhibée, et donc plus sensible à l'apoptose, voient leurs sHsp se relocaliser vers le cytosquelette [332]. De façon intéressante, il est à noter qu'un virus mutant déficient pour HSV R1 présente des modifications au niveau de la formation de syncytium [333] ce qui corrèle avec des observations que nous avons réalisées au laboratoire. Elles montraient que ICP6 Δ formait des grands syncytia dans 50% des plages de lyse du virus alors que lorsqu'il était complété par l'expression de HSV R1-GFP (dans des lignées stables inductibles) il y avait réversion vers le type sauvage (pas de syncytium ou syncytia de quelques cellules seulement). Ces travaux préliminaires doivent néanmoins être confirmés mais pourraient être très importants notamment soit pour relier le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 avec son activité de chaperon moléculaire (via la formation de complexes aiguillés vers les récepteurs par le cytosquelette par exemple), soit pour définir une éventuelle nouvelle fonction pour HSV R1.

UL-14, une autre protéine des HSV, présente des fonctions anti-apoptotique et de chaperon moléculaire [196, 299]. Toutefois cette protéine semble plutôt agir sur des stimuli différents de ceux dont protège HSV R1 et présente une homologie avec Hsp70.

3.2.4 Importance du domaine α -cristallin pour le bon repliement de HSV R1

L'observation très importante et très surprenante du caractère ambivalent de R1(Δ 2-357), une protéine peu soluble, à la fois pro- et anti-apoptotique (Art.3, Fig.2B et C) nous a conduit à investiguer la nature des agrégats formés par les protéines délétées de tout ou partie de leur domaine α -cristallin. En utilisant différentes techniques (microscopie optique, à fluorescence, électronique, migration sur gradient de glycérol, dosage d'activité RR, étude de solubilité en présence de sels ou de détergents, etc..) nous avons pu définir clairement deux types d'agrégats : ceux qui sont formés par la R1(Δ 2-357) et ceux qui le sont par les protéines où la partie carboxy-terminale ou la totalité du domaine α -cristallin est délété (Art.3, Fig.3, Fig.4,

Table I et données non montrées). Là où ces derniers forment des agrégats insolubles de protéines mal repliées sans aucune fonction biologique détectable, les agrégats de R1(Δ 2-357) semblent correspondre à des multimères de protéines correctement repliées et dotées d'une activité biologique mais présentant des surfaces de contact exposées de façon aberrante. Cette hypothèse est appuyée par divers résultats caractérisant cette protéine tronquée et, montrant qu'à la différence des protéines présentant de plus larges délétions, elle est biologiquement active : (i) la fraction soluble de HSV R1(Δ 2-357) possède une activité RR complète ; (ii) HSV R1(Δ 2-357) est capable de protéger les cellules de l'apoptose induite par le TNF- α ; (iii) elle possède aussi la capacité d'induire l'apoptose ; (iv) elle se solubilise lors d'une extraction en présence de 1M de NaCl et présente alors le même profil de sédimentation sur gradient de glycérol que HSV R1 ; enfin, (v) elle forme des structures très particulières en présence de HSV R1. Le domaine α -cristallin semble donc être impliqué dans le repliement et la solubilité de HSV R1. Comment le domaine α -cristallin peut-il avoir ces effets ? Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ce rôle. Une fonction de chaperon intramoléculaire, une fonction de recrutement des chaperons cellulaires ou encore une fonction structurale passive du domaine α -cristallin qui permettrait une organisation correcte du reste de la protéine. Rien ne nous permet, avec les résultats que nous avons obtenus, de trancher entre ces différentes possibilités.

3.3 Rôle de HSV R1 dans l'infection

La compréhension des diverses fonctions de HSV R1 et de leurs mécanismes est indispensable pour déterminer son importance dans la pathogenèse virale. De même qu'il est nécessaire d'étudier ces fonctions dans le cadre de l'infection virale qui est très différente évidemment des essais menés *in vitro* ou en culture cellulaire au laboratoire, néanmoins tout à fait indispensable dans un premier temps.

3.3.1 Potentiel anti-apoptotique

De nombreuses protéines virales sont capables de moduler l'apoptose. Aussi, nous aimerions établir l'importance du potentiel anti-apoptotique de HSV R1 au cours d'une infection herpétique. Un certain nombre de redondance semble exister. Si on prend par exemple le cas de la protection contre l'apoptose induite par le ligand de Fas : vhs[14], gJ [197], gD [200] et R1 [14] protègent les cellules. Ont-elles un rôle à des moments différents au cours de l'infection ou dans des types de cellules différents ? Ont-elles réellement cette fonction dans les cellules infectées ou bien est ce un rôle accessoire intervenant uniquement lorsque d'autres protéines sont absentes ? On peut aussi envisager un système très redondant permettant de contrôler très efficacement le déclenchement de l'apoptose.

3.3.1.1 Importance du TNF- α dans le contrôle de l'infection

La plupart des expériences de protection que nous avons menées au laboratoire utilisaient comme inducteur d'apoptose le TNF- α . L'inhibition de la signalisation du TNF- α a déjà été décrite pour de nombreux virus et montre que le TNF- α est une cible de choix pour ceux-ci [334]. HSV R1 bloque très efficacement l'apoptose induite par la voie des récepteurs dans les cellules épithéliales. Pour évaluer son importance dans la protection globale conférée aux cellules infectées, il est donc légitime de s'interroger sur la contribution du TNF- α dans le contrôle de l'infection virale. Est-il important au cours du cycle lytique dans les cellules épithéliales de la périphérie, au cours de la réactivation du virus ou des deux ?

Des études ont montré que le TNF- α jouait un rôle important aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Par exemple des souris déficientes pour l'expression du TNF- α sont plus sensibles que des souris sauvages à l'infection herpétique. La mortalité de souris infectées passant de 3 à 17% en cas d'interruption génique du TNF- α [191]. La même étude montre que les niveaux de réactivation du virus sont également augmentés (de 16 à 48%) chez les souris n'exprimant pas de TNF- α . Des études très récentes, menées par un groupe indépendant, ont confirmé ces résultats et l'importance du

TNF- α dans le contrôle de l'infection herpétique et de la réactivation du virus [335]. De même il a été démontré que l'expression du TNF- α était élevée dans les sites de latence [336-338] et permettait de contrôler la réactivation du virus en ayant une action très précoce [336, 339]. De plus les sites de latence sont enrichis en cellules sécrétrices de TNF- α ce qui suggère également un rôle important pour le TNF- α dans le contrôle des différentes étapes de l'infection virale [338, 340-342]. Ces données indiquent que le TNF- α , sans être un élément unique dans le système de défense de l'hôte, est un composant majeur de la réponse à l'infection herpétique.

3.3.1.2 Rôle et importance de la fonction de R1 par rapport aux autres protéines

Au cours de la réactivation du virus dans les neurones : HSV R1 est exprimée comme une protéine très précoce au cours de la réactivation du virus [70, 71] et ceci dans un contexte où les cellules dans lesquelles le virus se réactive sont dans un environnement riche en cytokines. Il apparaît dès lors évident qu'exprimer une protéine anti-apoptotique à ce moment du cycle du virus lui confère un avantage sélectif notable. HSV R1 est déjà une protéine essentielle à la réactivation du virus par son activité RR. Mais cette fonction nécessite également la présence de HSV R2. HSV R1 exprimée avant même que son activité enzymatique soit fonctionnelle, pourrait préserver les cellules soit jusqu'à ce qu'une (ou des) autre(s) protéine(s) protectrice(s) soi(en)t exprimée(s) soit jusqu'à la fin de la réactivation en collaboration ou pas avec d'autres protéines. Il est à noter que le potentiel anti-apoptotique d'aucune protéine virale n'a été établi dans les neurones, exception faite pour l'action de HSV-2 R1 dans les cultures primaires de neurones hippocampaux [273, 274]. Une protection contre l'apoptose a cependant été démontrée pour les LATs [195]. Ces derniers sont, peut être, suffisamment efficaces pour protéger les cellules où le virus se réactive jusqu'à la synthèse de protéines virales protectrices. HSV R1, une protéine IE, est susceptible d'assurer très tôt un rôle dans la modulation de l'apoptose. En effet, les protéines décrites pour protéger HSV de l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire sont gJ et gD deux

glycoprotéines exprimées plus tardivement que R1 lors de la réactivation (le potentiel de vhs, exprimée également tardivement, n'a pas été aussi bien caractérisée). gD agit via l'activation de NF- κ B, le mécanisme de gJ est pour l'instant inconnu. Actuellement, au cours de la phase précoce de la réactivation, seule HSV R1 est susceptible de posséder un potentiel anti-apoptotique dirigé contre le TNF- α . Un autre groupe a montré que, dans les cellules neuronales PC-12, HSV R1 protégeait également de l'apoptose induite par la carence en facteur de croissance (NGF) ou de l'apoptose induite par le virus lui-même dans des cultures primaires de neurones hippocampaux [273, 274]. Même si une partie des résultats de cet article sont discutables, ils nous encouragent à croire que HSV R1 conserverait son potentiel anti-apoptotique, prouvé dans les cellules épithéliales, dans des cellules neuronales similaires à celles où le virus établit la latence et donc où il se réactive. Ces divers arguments, sans constituer une démonstration, rendent probable un rôle important pour HSV R1 au cours de la réactivation du virus pour protéger les cellules au moins le temps que les virions soient prêts à migrer vers les tissus épithéliaux. Nos essais avec HSV R2 montrent que l'expression de cette protéine en très grand excès par rapport à HSV R1 (30 fois ou plus) n'est pas capable de diminuer le potentiel anti-apoptotique de cette dernière (Art.3). Or, au cours de l'infection virale, le ratio R1/R2 est beaucoup plus équilibré [256]. Le potentiel de HSV R1 pourrait donc continuer à se maintenir même lorsque HSV R2 est exprimée dans les cellules infectées.

Au cours du cycle lytique dans les tissus épithéliaux : Le cycle lytique ayant lieu dans des cellules similaires à celles où nous avons effectué nos expériences (A549, HeLa, MDA-MB231) il est probable que HSV R1 conserve sa fonction dans les cellules qui lui servent de cibles *in vivo*. Dans ces cellules en culture, la presque totalité de celles qui expriment HSV R1 sont protégées ce qui en fait une protéine très efficace. Nos expériences montrent que pour être pleinement efficace, HSV R1 doit être accumulée à une concentration de 0.06% des protéines cellulaires totales (Art.1). Une quantité très faible de HSV R1 est donc nécessaire pour protéger les cellules. Cette quantité est accumulée très tôt dans la cellule infectée (3 heures post-infection). Toutefois de nombreuses protéines pourraient être efficaces pour protéger les cellules au cours du cycle lytique et l'importance de HSV R1 semble, à priori, moins grande. En effet, la

glycoprotéine gD fait partie de l'enveloppe du virus et peut donc agir très rapidement. Un certain laps de temps semble néanmoins nécessaire entre l'entrée du virus et l'apparition de la fonction protectrice [200]. gD est indispensable à l'entrée du virus dans les cellules. Elle se lie à des récepteurs dont 3 ont été identifiés : HveA, B et C [343-346]. Le premier est de la famille des TNFR et permet une signalisation en augmentant le niveau d'activation des facteurs NF- κ B et peut être AP-1 (via JNK et p38MAPK) [347, 348]. Une irradiation aux UV des particules virales n'empêche pas cette phase de signalisation de se produire. De plus celle-ci ayant lieu dès l'entrée du virus, cela confirme que le responsable est une ou des protéines contenues dans la particule virale. A ce stade, d'autres protéines, comme par exemple gB ou vhs, pourraient intervenir. Les HSV mutants pour vhs perdent 30% de leur capacité à protéger les cellules de l'apoptose induite par le TNF- α . Il est à noter que, même si HSV R1 est présente dans le tégument du virion, elle n'est pas suffisamment concentrée une fois libérée dans le cytoplasme de l'hôte pour pouvoir avoir une action immédiate de protection contre l'apoptose induite par le TNF- α puisque nos essais n'indiquent pas de protection immédiatement après l'infection (ce qui est vrai aussi pour les glycoprotéines). Toutefois il se peut aussi que le mécanisme de protection de R1, comme celui des glycoprotéines, nécessite un certain laps de temps avant d'être opérant (intervalle de temps qui serait, alors, plus long dans le cas de HSV R1 que dans celui des glycoprotéines). Une deuxième phase de modulation de la réponse cellulaire, UV sensible donc provoquée par des protéines néo-synthétisées et présentant une cinétique IE, est ensuite enclenchée. Elle induit l'activation d'AP-1 via JNK [322, 348] mais également celle de NF- κ B. La délétion des protéines IE ICP4 et ICP27 entraîne la perte de l'activation de NF- κ B dans cette phase [349]. Toutefois HSV R1 et d'autres facteurs pourraient prendre le relais ou agir également au cours de cette première phase.

Il est évident toutefois que seuls des tests menés *in vivo* avec un virus HSV mutant codant pour une HSV R1 pleinement fonctionnelle pour son activité RR mais déficiente pour son potentiel anti-apoptotique (mutant anti- δ RR⁺) nous permettrait de répondre de façon claire à ces questions. Néanmoins les études préalables que nous avons menées permettent d'espérer des résultats intéressants et ainsi d'ouvrir la voie à

des études plus coûteuses chez l'animal. Ces études pourraient être complétées par des études complémentations chez des animaux transgéniques exprimant HSV R1-GFP, une protéine fusion possédant un potentiel anti-apoptotique intacte mais ayant perdu son activité enzymatique [15].

3.3.2 Activité de chaperon moléculaire

Les résultats obtenus au cours de la cartographie du potentiel anti-apoptotique de HSV R1 indique une contribution importante du domaine α -cristallin pour le bon repliement de la protéine. Néanmoins l'activité de chaperon moléculaire pourrait avoir un rôle en soi dans l'infection herpétique sans être reliée à la fonction anti-apoptotique de HSV R1 ou à son repliement. Deux cas semblent être particulièrement intéressant pour expliquer l'émergence d'une activité de chaperon moléculaire viral chez les HSV : la capacité du virus à se réactiver et se répliquer au cours des épisodes de fièvres et l'abondance de protéines virales néo-synthétisées au cours du cycle productif du virus.

3.3.2.1 Importance au cours de fièvres

Les HSV peuvent se réactiver suite à des chocs thermiques, de même que les encéphalites provoquées par les HSV induisent des épisodes fiévreux. Aussi le virus peut-il trouver avantage à protéger les cellules où il se réplique notamment pour protéger ses propres protéines mais également celles qui dans la machinerie de son hôte lui sont nécessaires. Le mutant ICP6 Δ de la souche KOS, chez qui le gène de HSV R1 a été délété, présente une croissance plus faible que celle de la souche parentale à 39.5°C [251]. La sous-unité R1 humaine est peu stable à la chaleur [242] : il se peut donc que cette effet soit du au fait que la RR cellulaire ne peut pas fournir tous les dXTP nécessaires à la synthèse de l'ADN viral. Il se peut aussi que ce soit du à l'augmentation de la formation d'agrégats de protéines virales dénaturées par la chaleur et qui aurait été autrement protégées par HSV R1. Des études préliminaires de complémentation avec le mutant ICP6 Δ de la souche KOS se répliquant dans des

cellules exprimant de façon stable et inductible HSV R1-GFP, une protéine sans activité RR, ne nous ont pas permis de trancher. Il semblait y avoir une augmentation du titre viral produit en présence de HSV R1-GFP mais on ne retrouvait pas le titre viral obtenu avec la souche parentale.

3.3.2.2 Importance pour la synthèse de protéines virales

Même à 37°C, dans des cellules en croissance exponentielle, donc exprimant leur RR, ICP6Δ montre une croissance plus faible que KOS [251] ce qui indique que ce virus présente un défaut autre que la simple perte de l'activité RR. Il n'est pas impossible que HSV R1 intervienne comme chaperon moléculaire pour aider au bon repliement de protéines virales produites à haut niveau au cours de la phase productive du virus. En effet les niveaux d'expression des chaperons cellulaires sont adaptés par la cellule à sa propre production de protéines. Bien évidemment favoriser l'expression correcte de protéines virales n'est aucunement nécessaire à la cellule hôte mais par contre tout a fait indispensable pour le virus. Hors une augmentation de la synthèse protéique va se traduire par une diminution du contrôle de qualité, à quantité égales de chaperons moléculaires [rev. 350]. Il est donc intéressant pour les virus d'exprimer des protéines ayant une activité de chaperon moléculaire pour suppléer la machinerie cellulaire [rev. 351]. Pour vérifier ce point il pourrait être intéressant de déterminer les niveaux de solubilité des protéines totales dans le cas d'une infection herpétique avec HSV-1 KOS ou ICP6Δ. Une augmentation du ratio d'insolubilité globale des protéines indiquant alors un défaut dans le contrôle du bon repliement de celles ci. Les résultats pourraient alors être comparés à ceux obtenus en complétant ICP6Δ avec la R1-GFP dans nos lignées stables inductibles.

3.4 Investigations pour définir le rôle du potentiel anti-apoptotique de HSV R1 dans la pathogenèse virale

L'objectif majeur des recherches entreprises sur la sous-unité R1 de la RR des HSV reste de définir le rôle que celle-ci joue dans la pathogenèse virale par son activité

enzymatique, son potentiel anti-apoptotique et son activité de chaperon moléculaire (et éventuellement par d'autres fonctions encore inconnues). Par rapport aux travaux présentés dans cet ouvrage nous nous attacherons surtout à donner des pistes pour investiguer le rôle de sa fonction anti-apoptotique.

3.4.1 Construction d'un mutant anti- RR^+

Nous avons entamé une série d'expérience visant à évaluer si HCMV R1 possède un potentiel anti-apoptotique comparable à celui de HSV R1. En effet il a déjà été démontré que cette protéine module l'apoptose au cours de l'infection [238]. Les résultats obtenus ne nous permettent pas pour l'instant de répondre à cette question. Deux autres constructions permettant l'expression de protéines homologues de HSV R1 chez les virus herpès de classe β : EHV-4 R1 et HHV-7 R1 sont également à l'étude de même que celles de BHV-2 R1 et VZV R1 deux homologues de HSV R1 dans des virus appartenant à la classe α . A partir des résultats de protection obtenus pour ces différentes protéines, il sera possible par comparaison de séquence d'établir des séquences (nucléiques ou protéiques) consensus voir des motifs 3D consensus. La mutation de ces consensus dans HSV R1 devrait permettre d'isoler des mutants ayant perdu leur fonction anti-apoptotique mais conservé leur activité RR. Comme approche alternative, il resterait possible de muter au hasard la séquence de HSV-2 R1 entre 357 et 1123 (positions les plus extrêmes définies pour conserver le potentiel anti-apoptotique) et de réaliser, grâce à notre système adénoviral d'expression inductible de protéines fusionnées à la GFP, un criblage rapide des mutants pour éliminer ceux qui sont toxiques ou agrégés. Toutefois cette approche serait probablement plus longue et fastidieuse. De plus, les résultats obtenus par le groupe du docteur Brune ainsi que l'existence des homologues de HSV R1 sans fonction RR chez les virus herpès de classe β nous permettent d'envisager que la première approche sera fructueuse.

3.4.2 Étude *in vitro* et *in vivo*

Une fois ce mutant obtenu, on pourra tester son effet dans différentes lignées de cellules ainsi que dans des cultures primaires de cellules cibles des HSV. Si les résultats confirment le potentiel anti-apoptotique de HSV R1, on pourra alors réaliser des expériences sur des modèles animaux. L'étude *in vivo* devrait nous permettre de définir le rôle et l'importance du potentiel anti-apoptotique de HSV R1 aussi bien au niveau de la primo-infection que de la réactivation et des infections récurrentes. Les résultats obtenus avec notre virus mutant pourront être validés par des études de complémentation menées sur des animaux transgéniques exprimant HSV R1-GFP dans les tissus cibles au cours de l'infection (R1-GFP est une protéine anti-apoptotique sans activité RR).

3.4.3 Potentiel de HSV R1 dans les neurones

Nous avons entrepris nos études sur des cellules épithéliales (HeLa, A549, MDA-MB231) même si la littérature scientifique actuellement disponible nous permet de penser que le rôle de HSV R1 pourrait être plus important pour la pathogenèse virale au niveau de la réactivation du virus dans les neurones plutôt que lors de l'infection des cellules épithéliales au cours de la primo-infection ou lors des récurrences. Deux raisons principales nous ont conduit à privilégier cette approche plutôt qu'une étude sur des lignées de cellules neuronales. Premièrement, les cellules de types épithéliales que nous avons utilisées sont des cellules répondant très efficacement à l'activation des récepteurs de mort cellulaire, ce qui n'est pas le cas de la plupart des lignées neuronales [352-357]. Il était donc plus aisé, dans un premier temps, d'utiliser des cellules épithéliales pour caractériser le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 et des mutants construits pour délimiter les régions impliquées. De plus les résultats obtenus dans les cellules épithéliales peuvent s'avérer utiles pour la compréhension de la pathogenèse virale dans ces cellules même s'il est probable que le potentiel de R1 y soit redondant avec celui d'autres protéines virales. La deuxième raison, d'ordre plus technique, est que nous voulions utiliser un modèle cellulaire où il nous serait

possible de moduler l'expression de HSV R1. Cet objectif requiert la sélection de lignées de cellules exprimant un transgène, dans notre cas le tTA ou rtTA. Ces lignées de cellules avaient déjà été établies avant mon arrivée au laboratoire et sont bien caractérisées. Toutefois, nous envisageons de vérifier si le potentiel anti-apoptotique de HSV R1, prouvé pour les cellules épithéliales, est conservé dans les cellules neuronales.

Plusieurs lignées répondent à la stimulation par le TNF, notamment les cellules humaines SK-N-MC différenciées qui semblent être des cellules de type II [352], et les cellules de rats PC-12 [354-357], pour lesquels certaines données suggèrent qu'elles seraient des cellules de type I [356] ou II [355]. Les cellules murines N1E-115 répondent également au TNF mais peu de données sont disponibles [353]. Au laboratoire, nous pensons utiliser les lignées PC-12 car elles ont été utilisées par d'autres groupes travaillant à caractériser le potentiel anti-apoptotique de HSV R1 [273], il nous faudra évidemment préciser le type de ces cellules et il pourrait également être intéressant de tester des lignées de cellules de type II.

3.5 Investigations pour définir le mécanisme

3.5.1 Partenaires cellulaires de HSV R1

L'observation que HSV R1-GFP conservait son activité anti-apoptotique nous permettra d'utiliser cette protéine pour des essais de co-immunoprécipitations en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP de façon à conserver le maximum d'interactions possibles entre R1 et ses partenaires. Le précipité pourra être résolu soit par SDS-PAGE classique suivi de Western blot avec des anticorps appropriés pour cribler les diverses protéines connues susceptibles d'être impliquées, soit par gel 2D et analyse par spectrométrie de masse. Il serait alors très intéressant de regarder ce qu'il advient lorsque HSV R1(Δ 2-357) est exprimée. L'étude de la composition des structures bien particulières formées par la co-expression de HSV R1 et HSV R1(Δ 2-357) pourrait se révéler très enrichissante pour la compréhension du mécanisme d'action de HSV R1 et des voies apoptotiques en général. Des agents de liaisons

croisées (*cross-link*) pourraient être utilisés également pour circonvenir la possibilité d'une association faible ou transitoire de certaines protéines avec HSV R1.

3.5.2 Caractérisation génétique

L'utilisation de lignées de cellules sur- ou sous- exprimant les protéines potentiellement impliquées dans les voies apoptotiques que nous avons décrites seraient également un apport non négligeable, de même que l'utilisation de protéines de signalisation constitutionnellement actives pour situer HSV R1 dans la cascade réactionnelle.

3.6 Etude de l'activité de chaperon moléculaire *in vivo*

Il aurait été intéressant de caractériser *in vivo* l'activité de chaperon moléculaire de HSV R1. Une étude *in vivo* nous aurait effectivement permis de voir non plus si R1 avait la potentialité d'être une chaperonne mais si elle l'était vraiment et éventuellement de mieux la caractériser dans un environnement cellulaire, l'utilisation de protéine purifiée posant toujours le problème de savoir si l'interaction avec d'autres facteurs ne serait pas capable d'inhiber une fonction particulière ou au contraire de la renforcer. Malheureusement, les cellules eucaryotes disposent d'un réseau de protéines de choc thermique aux fonctions parfois redondantes et l'interruption génique de l'une d'elles n'induit pas forcément d'effets. De même que la surexpression d'une sHsp ne permet pas de déterminer quelle est sa fonction réelle dans la cellule.

Un modèle a toutefois été développé par le groupe de Vierling pour étudier l'activité de chaperon moléculaire de protéines chez un mutant de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC6803 déléte du gène de Hsp16.6, sa seule sHsp : ces études permettent entre autres de définir la thermotolérance de la souche transformée mais également de savoir par exemple quelles protéines peuvent interagir avec la sHsp [22] Malgré les défauts que peut présenter un tel modèle, comme le fait d'être dans un

contexte procaryote, il permet quand même de tester des protéines mutantes ou des homologues en s'affranchissant des étapes de purification.

3.7 Conclusion de l'ouvrage

La caractérisation des fonctions anti-apoptotique et de chaperon moléculaire de HSV R1 permet non seulement de mieux comprendre les mécanismes employés par les virus pour se protéger de notre système de défense et pour se répliquer à des niveaux suffisants à leur maintien dans l'hôte et à leur propagation mais également pour la compréhension de mécanismes cellulaires vitaux comme l'apoptose, le contrôle qualité des protéines, leur agrégation, leur dégradation, etc...

Le développement de nombreux cancers est du au déséquilibre des constituants des voies apoptotiques afin de permettre une prolifération incontrôlée des cellules altérées. L'étude des voies apoptotiques, de leur modulation en particulier, est donc cruciale pour définir, dans de nombreux cas, des thérapies appropriées. De plus, l'utilisation de vecteurs viraux en thérapie génique et de nombreux virus oncolytiques en thérapie anti-cancéreuse ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement de tumeurs jusque là réfractaires aux traitements conventionnels mais il est indispensable d'être certain que l'on contrôle réellement les divers aspects de l'infection et qu'en voulant soigner dans l'immédiat on ne provoque pas à plus long terme des conséquences peu souhaitables comme cela a pu être le cas avec certaines campagnes de vaccination (polémique sur le déclenchement potentiel de la sclérose en plaques par la vaccination contre l'Hépatite B) ou pour l'utilisation de certains agents en chimiothérapie.

L'étude des propriétés de chaperon moléculaire de HSV R1 est également un point intéressant. Bien que les maladies neurodégénératives restent un domaine très complexe où peu de choses sont connues, il semble que le vieillissement s'accompagne d'une perte de la capacité de nos cellules de contrôler de façon adéquate le bon repliement de protéines et de diriger vers les voies de dégradation celles qui sont manifestement dangereuses. Notamment, on remarque une diminution de la

synthèse des chaperons moléculaires. On comprend qu'une protéine qui suppléerait les carences de nos cellules pourrait constituer un traitement. Il faut bien sûr pouvoir choisir des protéines qui vont accomplir leur rôle de façon efficace et si possible en interférant le moins possible avec les autres mécanismes cellulaires. D'où l'importance de délimiter précisément les régions impliquées dans chacune des activités et de mettre au point des mutants où les activités seraient séparées.

L'étude des diverses propriétés de HSV R1 ouvre des perspectives dans de nombreux champs d'étude que la seule analyse de sa séquence nucléotidique ou protéique ne pouvait laisser soupçonner. Cela devrait nous permettre de réfléchir à l'ampleur de la tâche qui reste à accomplir pour comprendre le fonctionnement d'une cellule humaine, son intégration dans l'organisme et ses interactions avec son environnement.

Références bibliographiques

- 1 Malkin, J.E., Morand, P., Malvy, D., Ly, T.D., Chanzy, B., de Labareyre, C., El Hasnaoui, A., Hercberg, S. Seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 infection in the general French population. *Sex Transm Infect* 2002;78(3):201-3.
- 2 Howard, M., Sellors, J.W., Jang, D., Robinson, N.J., Fearon, M., Kaczorowski, J., Chernesky, M. Regional distribution of antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 in men and women in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):84-9.
- 3 Koelle, D.M., Wald, A. Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. *J Antimicrob Chemother* 2000;45 Suppl T3:1-8.
- 4 Mitchell, B.M., Bloom, D.C., Cohrs, R.J., Gilden, D.H., Kennedy, P.G. Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia. *J Neurovirol* 2003;9(2):194-204.
- 5 Jones, C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res* 1998;51:81-133.
- 6 Villarreal, E.C. Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. *Prog Drug Res* 2003;60:263-307.
- 7 Nutter, L.M., Grill, S.P., Cheng, Y.C. Can ribonucleotide reductase be considered as an effective target for developing antiherpes simplex virus type II (HSV-2) compounds? *Biochem Pharmacol* 1985;34(6):777-80.
- 8 Spector, T., Averett, D.R., Nelson, D.J., Lambe, C.U., Morrison, R.W., Jr., St Clair, M.H., Furman, P.A. Potentiation of antiherpetic activity of acyclovir by ribonucleotide reductase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(12):4254-7.
- 9 Cohen, E.A., Gaudreau, P., Brazeau, P., Langelier, Y. Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by a nonapeptide derived from the carboxy terminus of subunit 2. *Nature* 1986;321(6068):441-3.
- 10 Dutia, B.M., Frame, M.C., Subak-Sharpe, J.H., Clark, W.N., Marsden, H.S. Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by synthetic peptides. *Nature* 1986;321(6068):439-41.

11 Cohen, E.A., Gaudreau, P., Brazeau, P., Langelier, Y. Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *J Virol* 1986;60(3):1130-3.

12 Liuzzi, M., Deziel, R., Moss, N., Beaulieu, P., Bonneau, A.M., Bousquet, C., Chafouleas, J.G., Garneau, M., Jaramillo, J., Krogsrud, R.L., et al. A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity in vivo. *Nature* 1994;372(6507):695-8.

13 Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F., Langelier, Y. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* 1998;72(3):2289-96.

14 Langelier, Y., Bergeron, S., Chabaud, S., Lippens, J., Guilbault, C., Sasseville, A.M., Denis, S., Mosser, D.D., Massie, B. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 11):2779-89.

15 Chabaud, S., Elahi, S.M., Sasseville, A.M.J., Guilbault, C., S., C., Caron, A., Nanci, A., Massie, B., Langelier, Y. The Ribonucleotide Reductase Domain of the R1 Subunit of Herpes Simplex Virus type-2 Ribonucleotide Reductase Is Essential for R1 Antiapoptotic Function. *J Virol* 2004; soumis.

16 Smith, C.C., Yu, Y.X., Kulka, M., Aurelian, L. A novel human gene similar to the protein kinase (PK) coding domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) codes for a serine-threonine PK and is expressed in melanoma cells. *J Biol Chem* 2000;275(33):25690-9.

17 Chabaud, S., Lambert, H., Sasseville, A.M., Lavoie, H., Guilbault, C., Massie, B., Landry, J., Langelier, Y. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett* 2003;545(2-3):213-8.

18 Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., Davison, A.J. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):865-70.

19 Minson, A.C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Mc Geoch, D.J., Pellet, P.E., Roizman, B., Studdert, D.M.J. Family Herpesviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, S.M. L, et al., editors. Virus Taxonomy, Seventh Report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press; 2000. p. 203-225.

20 Frederick, D.M., Bland, D., Gollin, Y. Fatal disseminated herpes simplex virus infection in a previously healthy pregnant woman. A case report. *J Reprod Med* 2002;47(7):591-6.

21 Arvin, A.M. Varicella-Zoster Virus. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;9(3):361-81.

22 Theil, D., Paripovic, I., Derfuss, T., Herberger, S., Strupp, M., Arbusow, V., Brandt, T. Dually infected (HSV-1/VZV) single neurons in human trigeminal ganglia. *Ann Neurol* 2003;54(5):678-82.

23 Whitley, R.J., Gnann, J.W., Jr. Herpes zoster in patients with human immunodeficiency virus infection--an ever-expanding spectrum of disease. *Clin Infect Dis* 1995;21(4):989-90.

24 Cunningham, A.L., Dworkin, R.H. The management of post-herpetic neuralgia. *Bmj* 2000;321(7264):778-9.

25 Nelson, C.T., Demmler, G.J. Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin Perinatol* 1997;24(1):151-60.

26 Braun, D.K., Dominguez, G., Pellett, P.E. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):521-67.

27 Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P., Menotti, L. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999;5(3):353-66.

28 Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234(4776):596-601.

29 Fantry, L.E., Cleghorn, F.R. HHV-6 infection in patients with HIV-1 infection and disease. *AIDS Read* 1999;9(3):198-203, 221.

30 Kuppers, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003;3(10):801-12.

31 Moss, D.J., Burrows, S.R., Castelino, D.J., Kane, R.G., Pope, J.H., Rickinson, A.B., Alpers, M.P., Heywood, P.F. A comparison of Epstein-Barr virus-specific T-cell immunity in malaria-endemic and -nonendemic regions of Papua New Guinea. *Int J Cancer* 1983;31(6):727-32.

32 Spano, J.P., Busson, P., Atlan, D., Bourhis, J., Pignon, J.P., Esteban, C., Armand, J.P. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* 2003;39(15):2121-35.

33 Leao, J.C., Caterino-De-Araujo, A., Porter, S.R., Scully, C. Human herpesvirus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2002;57(4):175-86.

34 Wald, A., Koutsky, L., Ashley, R.L., Corey, L. Genital herpes in a primary care clinic. Demographic and sexual correlates of herpes simplex type 2 infections. *Sex Transm Dis* 1997;24(3):149-55.

35 Fleming, D.T., McQuillan, G.M., Johnson, R.E., Nahmias, A.J., Aral, S.O., Lee, F.K., St Louis, M.E. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med* 1997;337(16):1105-11.

36 Cowan, F.M., French, R.S., Mayaud, P., Gopal, R., Robinson, N.J., de Oliveira, S.A., Faillace, T., Uuskula, A., Nygard-Kibur, M., Ramalingam, S., Sridharan, G., El Aouad, R., Alami, K., Rbai, M., Sunil-Chandra, N.P., Brown, D.W. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. *Sex Transm Infect* 2003;79(4):286-90.

37 Johnson, R.E., Nahmias, A.J., Magder, L.S., Lee, F.K., Brooks, C.A., Snowden, C.B. A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. *N Engl J Med* 1989;321(1):7-12.

38 Roberts, C.M., Pfister, J.R., Spear, S.J. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* 2003;30(10):797-800.

39 Mertz, G.J., Rosenthal, S.L., Stanberry, L.R. Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? *Sex Transm Dis* 2003;30(10):801-2.

40 Buxbaum, S., Geers, M., Gross, G., Schofer, H., Rabenau, H.F., Doerr, H.W. Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003;192(3):177-81.

41 Genève, U.d. Herpès. In: Genève Ud, editor. www.unige.ch/sciences/biologie/public/pif/chapitre/Herpes.pdf. Genève: Université de Genève. p. 78-88.

42 Lewis, M.L., Culbertson, W.W., Post, J.D., Miller, D., Kokame, G.T., Dix, R.D. Herpes simplex virus type 1. A cause of the acute retinal necrosis syndrome. *Ophthalmology* 1989;96(6):875-8.

43 Corey, L., Spear, P.G. Infections with herpes simplex viruses (2). *N Engl J Med* 1986;314(12):749-57.

44 Whitley, R.J. Herpes simplex viruses. In: B. N. Fields DMK, and P. M. Howley, editor. *Fields virology*, 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1995. p. 2297-2342.

45 Whitley, R.J. Epidemiology of herpes simplex virus. In: Roizman B, editor. *The herpesviruses*. New York: Plenum press; 1985. p. 1-44.

46 Schomogyi, M., Wald, A., Corey, L. Herpes simplex virus-2 infection. An emerging disease? *Infect Dis Clin North Am* 1998;12(1):47-61.

47 Scott, L.L., Sanchez, P.J., Jackson, G.L., Zeray, F., Wendel, G.D., Jr. Acyclovir suppression to prevent cesarean delivery after first-episode genital herpes. *Obstet Gynecol* 1996;87(1):69-73.

48 Sheffield, J.S., Hollier, L.M., Hill, J.B., Stuart, G.S., Wendel, G.D. Acyclovir prophylaxis to prevent herpes simplex virus recurrence at delivery: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2003;102(6):1396-403.

49 Dickerson, M.C., Johnston, J., Delea, T.E., White, A., Andrews, E. The causal role for genital ulcer disease as a risk factor for transmission of human immunodeficiency virus. An application of the Bradford Hill criteria. *Sex Transm Dis* 1996;23(5):429-40.

- 50 Schacker, T. The role of HSV in the transmission and progression of HIV. *Herpes* 2001;8(2):46-9.
- 51 Roizman, B. Herpesvirus and their replication. In: Fields BN, editor. *Fundamental virology*. 3rd ed. New York: Lippincott Raven press; 1996.
- 52 Roizman, B., Furlong, D. The replication of herpesviruses. In: Fraenkel-Comat H, Wagner, R.R., editor. *Comprehensive virology*. New York: Plenum Press; 1974. p. 229-403.
- 53 Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., Steven, A.C. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 2003;302(5649):1396-8.
- 54 Becker, Y., Dym, H., Sarov, I. Herpes simplex virus DNA. *Virology* 1968;36(2):184-92.
- 55 Kieff, E.D., Bachenheimer, S.L., Roizman, B. Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol* 1971;8(2):125-32.
- 56 Plummer, G., Goodheart, C.R., Henson, D., Bowling, C.P. A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology* 1969;39(1):134-7.
- 57 Furlong, D., Swift, H., Roizman, B. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol* 1972;10(5):1071-4.
- 58 Bearer, E.L., Breakefield, X.O., Schuback, D., Reese, T.S., LaVail, J.H. Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):8146-50.
- 59 Poffenberger, K.L., Roizman, B. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* 1985;53(2):587-95.
- 60 Su, Y.H., Moxley, M.J., Ng, A.K., Lin, J., Jordan, R., Fraser, N.W., Block, T.M. Stability and circularization of herpes simplex virus type 1 genomes in quiescently infected PC12 cultures. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 12):2943-50.

- 61 Deshmane, S.L., Fraser, N.W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 1989;63(2):943-7.
- 62 Jackson, S.A., DeLuca, N.A. Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7871-6.
- 63 Burton, E.A., Hong, C.S., Glorioso, J.C. The stable 2.0-kilobase intron of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript does not function as an antisense repressor of ICP0 in nonneuronal cells. *J Virol* 2003;77(6):3516-30.
- 64 Fawl, R.L., Roizman, B. Induction of reactivation of herpes simplex virus in murine sensory ganglia in vivo by cadmium. *J Virol* 1993;67(12):7025-31.
- 65 Sawtell, N.M., Thompson, R.L. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* 1992;66(4):2150-6.
- 66 Shimeld, C., Whiteland, J.L., Williams, N.A., Easty, D.L., Hill, T.J. 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* 1996;77 (Pt 10):2583-90.
- 67 Pazin, G.J., Ho, M., Jannetta, P.J. Reactivation of herpes simplex virus after decompression of the trigeminal nerve root. *J Infect Dis* 1978;138(3):405-9.
- 68 Perna, J.J., Mannix, M.L., Rooney, J.F., Notkins, A.L., Straus, S.E. Reactivation of latent herpes simplex virus infection by ultraviolet light: a human model. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):473-8.
- 69 Mikloska, Z., Sanna, P.P., Cunningham, A.L. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells in vitro. *J Virol* 1999;73(7):5934-44.
- 70 Tal-Singer, R., Lasner, T.M., Podrzucki, W., Skokotas, A., Leary, J.J., Berger, S.L., Fraser, N.W. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J Virol* 1997;71(7):5268-76.

71 Nichol, P.F., Chang, J.Y., Johnson, E.M., Jr., Olivo, P.D. Herpes simplex virus gene expression in neurons: viral DNA synthesis is a critical regulatory event in the branch point between the lytic and latent pathways. *J Virol* 1996;70(8):5476-86.

72 Honess, R.W., Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(4):1276-80.

73 Roizman, B., Kozak, M., Honess, R.W., Hayward, G. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: evidence for multilevel regulation of herpes simplex 1 RNA and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1975;39 Pt 2:687-701.

74 Honess, R.W., Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 1974;14(1):8-19.

75 Roizman, B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11307-12.

76 Mackem, S., Roizman, B. Structural features of the herpes simplex virus alpha gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer alpha regulation on chimeric thymidine kinase genes. *J Virol* 1982;44(3):939-49.

77 Mackem, S., Roizman, B. Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: the alpha 27 gene promoter-thymidine kinase chimera is positively regulated in converted L cells. *J Virol* 1982;43(3):1015-23.

78 Mackem, S., Roizman, B. Differentiation between alpha promoter and regulator regions of herpes simplex virus 1: the functional domains and sequence of a movable alpha regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(16):4917-21.

79 Cai, W., Schaffer, P.A. Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *J Virol* 1992;66(5):2904-15.

80 Allen, K.E., Everett, R.D. Mutations which alter the DNA binding properties of the herpes simplex virus type 1 transactivating protein Vmw175 also affect its ability to support virus replication. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 11):2913-22.

81 Sandri-Goldin, R.M. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev* 1998;12(6):868-79.

82 Jugovic, P., Hill, A.M., Tomazin, R., Ploegh, H., Johnson, D.C. Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *J Virol* 1998;72(6):5076-84.

83 Bruni, R., Roizman, B. Herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP22 interacts with a new cell cycle-regulated factor and accumulates in a cell cycle-dependent fashion in infected cells. *J Virol* 1998;72(11):8525-31.

84 Costanzo, F., Campadelli-Fiume, G., Foa-Tomasi, L., Cassai, E. Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol* 1977;21(3):996-1001.

85 Igarashi, K., Fawl, R., Roller, R.J., Roizman, B. Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J Virol* 1993;67(4):2123-32.

86 Roizman, B., Aurelian, L., Roane, P.R., Jr. The Multiplication of Herpes Simplex Virus. I. The Programming of Viral DNA Duplication in Hep-2 Cells. *Virology* 1963;21:482-98.

87 Roizman, B., Borman, G.S., Rousta, M.K. Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *Nature* 1965;206(991):1374-5.

88 Roizman, B., Roane, P.R., Jr. The Multiplication of Herpes Simplex Virus. Ii. The Relation between Protein Synthesis and the Duplication of Viral DNA in Infected Hep-2 Cells. *Virology* 1964;22:262-9.

89 Ebert, S.N., Subramanian, D., Shtrom, S.S., Chung, I.K., Parris, D.S., Muller, M.T. Association between the p170 form of human topoisomerase II and progeny viral DNA in cells infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1994;68(2):1010-20.

90 Vlazny, D.A., Kwong, A., Frenkel, N. Site-specific cleavage/packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full-length viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(5):1423-7.

- 91 Darlington, R.W., Moss, L.H., 3rd. Herpesvirus envelopment. *J Virol* 1968;2(1):48-55.
- 92 Roizman, B., Betteson, W. Herpesvirus and their replication. In: Fields BN, editor. *Virology*. New York: Raven Press; 1985. p. 497-526.
- 93 Johnson, D.C., Spear, P.G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* 1982;43(3):1102-12.
- 94 Stackpole, C.W. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol* 1969;4(1):75-93.
- 95 van Genderen, I.L., Brandimarti, R., Torrisi, M.R., Campadelli, G., van Meer, G. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 1994;200(2):831-6.
- 96 Elion, G.B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med* 1982;73(1A):7-13.
- 97 Elion, G.B. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol* 1993;Suppl 1:2-6.
- 98 Elion, G.B. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* 1983;12 Suppl B:9-17.
- 99 Tyring, S.K., Baker, D., Snowden, W. Valacyclovir for herpes simplex virus infection: long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 1:S40-6.
- 100 Corey, L., Wald, A., Patel, R., Sacks, S.L., Tyring, S.K., Warren, T., Douglas, J.M., Jr., Paavonen, J., Morrow, R.A., Beutner, K.R., Stratchounsky, L.S., Mertz, G., Keene, O.N., Watson, H.A., Tait, D., Vargas-Cortes, M. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* 2004;350(1):11-20.
- 101 Sheffield, J.S., Fish, D.N., Hollier, L.M., Cadematori, S., Nobles, B.J., Wendel, G.D., Jr. Acyclovir concentrations in human breast milk after valaciclovir administration. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(1):100-2.

102 Spruance, S.L., Stewart, J.C., Freeman, D.J., Brightman, V.J., Cox, J.L., Wenerstrom, G., McKeough, M.B., Rowe, N.H. Early application of topical 15% idoxuridine in dimethyl sulfoxide shortens the course of herpes simplex labialis: a multicenter placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 1990;161(2):191-7.

103 Abghari, S.Z., Stulting, R.D., Zhu, Z., Schinazi, R.F., Kaufman, H.E. Effect of genetically determined host factors on the efficacy of vidarabine, acyclovir and 5-trifluorothymidine in herpes simplex virus type 1 infection. *Ophthalmic Res* 1994;26(2):95-104.

104 Dwyer, D.E., Cunningham, A.L. 10: Herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Med J Aust* 2002;177(5):267-73.

105 Shi, Y.F., Szalay, M.G., Paskar, L., Sahai, B.M., Boyer, M., Singh, B., Green, D.R. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 1990;144(9):3326-33.

106 Hetts, S.W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 1998;279(4):300-7.

107 Raff, M.C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356(6368):397-400.

108 Savill, J., Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407(6805):784-8.

109 Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.

110 Raff, M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998;396(6707):119-22.

111 Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.

112 Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 1994;78(2):343-52.

113 Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry,

N.A., Becker, J.W. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 1996;3(7):619-25.

114 Kroemer, G., Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6(5):513-9.

115 Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H.L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclouhier, H., Reed, J.C., Kroemer, G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000;19(3):329-36.

116 Adams, J.M., Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322-6.

117 Xiang, J., Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(25):14559-63.

118 Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410(6828):549-54.

119 Deveraux, Q.L., Reed, J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(3):239-52.

120 Liston, P., Fong, W.G., Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003;22(53):8568-80.

121 Zhang, H.G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H.C., Mountz, J.D. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 2004;23(11):2009-15.

122 Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-8.

123 Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;17:331-67.

124 Thorburn, A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004;16(2):139-44.

- 125 Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., Bron, C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* 2003;18(5):655-64.
- 126 Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., Lenardo, M.J. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000;288(5475):2354-7.
- 127 Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288(5475):2351-4.
- 128 Tschopp, J., Martinon, F., Hofmann, K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol* 1999;9(10):R381-4.
- 129 Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385(6618):729-33.
- 130 Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45-65.
- 131 Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(1):53-66.
- 132 Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):745-56.
- 133 Micheau, O., Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114(2):181-90.
- 134 Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., Wajant, H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 13):2757-70.
- 135 Varfolomeev, E.E., Ashkenazi, A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 2004;116(4):491-7.

136 Irawaty, W., Kay, T.W., Thomas, H.E. Transmembrane TNF and IFN γ induce caspase-independent death of primary mouse pancreatic beta cells. *Autoimmunity* 2002;35(6):369-75.

137 Chen, G.G., Chu, Y.S., Chak, E.C., Leung, B.C., Poon, W.S. Induction of apoptosis in glioma cells by molecules released from activated macrophages. *J Neurooncol* 2002;57(3):179-86.

138 Fulda, S., Debatin, K.M. IFN γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 2002;21(15):2295-308.

139 Suk, K., Kim, Y.H., Chang, I., Kim, J.Y., Choi, Y.H., Lee, K.Y., Lee, M.S. IFN α sensitizes ME-180 human cervical cancer cells to TNF α -induced apoptosis by inhibiting cytoprotective NF- κ B activation. *FEBS Lett* 2001;495(1-2):66-70.

140 Suk, K., Chang, I., Kim, Y.H., Kim, S., Kim, J.Y., Kim, H., Lee, M.S. Interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. IFN γ inhibits cytoprotective NF- κ B through STAT1/IRF-1 pathways. *J Biol Chem* 2001;276(16):13153-9.

141 Suk, K., Kim, S., Kim, Y.H., Kim, K.A., Chang, I., Yagita, H., Shong, M., Lee, M.S. IFN- γ /TNF- α synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol* 2001;166(7):4481-9.

142 Aggarwal, B.B. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i6-16.

143 Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(3-4):193-209.

144 Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001;21(24):8247-54.

145 Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(3):1541-8.

146 Tschopp, J., Irmeler, M., Thome, M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998;10(5):552-8.

147 Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M., Lin, A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001;414(6861):313-7.

148 Tang, F., Tang, G., Xiang, J., Dai, Q., Rosner, M.R., Lin, A. The absence of NF-kappaB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22(24):8571-9.

149 Ponton, A., Clement, M.V., Stamenkovic, I. The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function. *J Biol Chem* 1996;271(15):8991-5.

150 Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997;385(6616):540-4.

151 Russo, M.P., Bennett, B.L., Manning, A.M., Brenner, D.A., Jobin, C. Differential requirement for NF-kappaB-inducing kinase in the induction of NF-kappaB by IL-1beta, TNF-alpha, and Fas. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(1):C347-57.

152 Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S., Nicholson, D.W. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 1998;5(4):271-88.

153 Li, Z., Zhang, J., Chen, D., Shu, H.B. Casper/c-FLIP is physically and functionally associated with NF-kappaB1 p105. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(4):980-5.

154 Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001;21(16):5299-305.

155 Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., Wajant, H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2001;21(12):3964-73.

156 Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., Grutter, M.G. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2002;277(47):45162-71.

157 Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., Yang, X. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 2002;21(14):3704-14.

158 Kataoka, T., Tschopp, J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):2627-36.

159 Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17(6):1675-87.

160 Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81(4):505-12.

161 Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81(4):495-504.

162 Walczak, H., Sprick, M.R. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci* 2001;26(7):452-3.

163 Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6(11):1028-42.

164 Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D. Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol Cell* 1998;1(2):319-25.

165 Chen, M., Orozco, A., Spencer, D.M., Wang, J. Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* 2002;277(52):50761-7.

- 166 Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., Salvesen, G.S. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003;11(2):529-41.
- 167 Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., Grutter, M.G. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003;11(2):543-9.
- 168 Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., Peter, M.E. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;22(1):207-20.
- 169 Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z.G. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(19):2514-26.
- 170 Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell* 2003;115(1):61-70.
- 171 Duan, H., Dixit, V.M. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 1997;385(6611):86-9.
- 172 Charette, S.J., Lambert, H., Landry, J. A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2001;276(39):36071-4.
- 173 Guicciardi, M.E., Gores, G.J. AIP1: a new player in TNF signaling. *J Clin Invest* 2003;111(12):1813-5.
- 174 Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Ichijo, H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 2003;28(1):23-9.
- 175 Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):361-70.
- 176 Yang, X., Stennicke, H.R., Wang, B., Green, D.R., Janicke, R.U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G.S., Froelich, C.J. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 1998;273(51):34278-83.
- 177 Kogel, D., Schomburg, R., Schurmann, T., Reimertz, C., Konig, H.G., Poppe, M., Eckert, A., Muller, W.E., Prehn, J.H. The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Neurochem* 2003;87(1):248-56.

178 Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R., Wek, R.C. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 2004;24(3):1365-77.

179 Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7198-209.

180 Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Zingler, K., Young, J.A. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 1996;87(5):845-55.

181 Dockrell, D.H. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect* 2001;42(4):227-34.

182 Everett, H., McFadden, G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. *Virology* 2001;288(1):1-7.

183 Beidler, D.R., Tewari, M., Friesen, P.D., Poirier, G., Dixit, V.M. The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1995;270(28):16526-8.

184 Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995;269(5232):1885-8.

185 Tewari, M., Dixit, V.M. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 1995;270(7):3255-60.

186 Komiyama, T., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Salvesen, G. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem* 1994;269(30):19331-7.

187 Chiou, S.K., Tseng, C.C., Rao, L., White, E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 1994;68(10):6553-66.

188 Perez, D., White, E. E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol* 1998;141(5):1255-66.

189 Teodoro, J.G., Branton, P.E. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* 1997;71(5):3620-7.

190 Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63(6):1129-36.

191 Minami, M., Kita, M., Yan, X.Q., Yamamoto, T., Iida, T., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Imanishi, J. Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(6):671-6.

192 Jerome, K.R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A.E., Lee, H., Corey, L. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* 1999;73(11):8950-7.

193 Aubert, M., Blaho, J.A. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol* 1999;73(4):2803-13.

194 Aubert, M., O'Toole, J., Blaho, J.A. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1999;73(12):10359-70.

195 Perng, G.C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hofman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 2000;287(5457):1500-3.

196 Yamauchi, Y., Daikoku, T., Goshima, F., Nishiyama, Y. Herpes simplex virus UL14 protein blocks apoptosis. *Microbiol Immunol* 2003;47(9):685-9.

197 Jerome, K.R., Chen, Z., Lang, R., Torres, M.R., Hofmeister, J., Smith, S., Fox, R., Froelich, C.J., Corey, L. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol* 2001;167(7):3928-35.

198 Benetti, L., Munger, J., Roizman, B. The herpes simplex virus 1 US3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol* 2003;77(11):6567-73.

199 Cartier, A., Broberg, E., Komai, T., Henriksson, M., Masucci, M.G. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ* 2003;10(12):1320-8.

200 Medici, M.A., Sciortino, M.T., Perri, D., Amici, C., Avitabile, E., Ciotti, M., Balestrieri, E., De Smaele, E., Franzoso, G., Mastino, A. Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 2003;278(38):36059-67.

201 Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000;2(8):476-83.

202 Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2(8):469-75.

203 Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., Kroemer, G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3(9):839-43.

204 Goodkin, M.L., Ting, A.T., Blaho, J.A. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 2003;77(13):7261-80.

205 LaFon, S.W., Nelson, D.J., Berens, R.L., Marr, J.J. Purine and pyrimidine salvage pathways in *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1982;31(2):231-8.

206 Mendz, G.L., Jimenez, B.M., Hazell, S.L., Gero, A.M., O'Sullivan, W.J. Salvage synthesis of purine nucleotides by *Helicobacter pylori*. *J Appl Bacteriol* 1994;77(6):674-81.

207 Mendz, G.L., Jimenez, B.M., Hazell, S.L., Gero, A.M., O'Sullivan, W.J. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides by *Helicobacter pylori*. *J Appl Bacteriol* 1994;77(1):1-8.

208 Harder, J., Follmann, H., Hantke, K. Deoxyribonucleotide synthesis in an *Escherichia coli* mutant (H 1491) which lacks ribonucleotide reductase subunit B2. *Z Naturforsch [C]* 1989;44(7-8):715-8.

209 Thelander, L., Reichard, P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* 1979;48:133-58.

210 Reichard, P. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 1993;260(5115):1773-7.

211 Stubbe, J. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J Biol Chem* 1990;265(10):5329-32.

212 Gripenburg, U., Blasczyk, K., Kappl, R., Huttermann, J., Auling, G. A divalent metal site in the small subunit of the manganese-dependent ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes*. *Biochemistry* 1998;37(22):7992-6.

213 Fieschi, F., Torrents, E., Touloukhonova, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karlsson, M., Sjoberg, B.M. The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J Biol Chem* 1998;273(8):4329-37.

214 Logan, D.T., Su, X.D., Aberg, A., Regnstrom, K., Hajdu, J., Eklund, H., Nordlund, P. Crystal structure of reduced protein R2 of ribonucleotide reductase: the structural basis for oxygen activation at a dinuclear iron site. *Structure* 1996;4(9):1053-64.

215 Uhlin, U., Eklund, H. The ten-stranded beta/alpha barrel in ribonucleotide reductase protein R1. *J Mol Biol* 1996;262(3):358-69.

216 Nordlund, P., Eklund, H. Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* 1993;232(1):123-64.

217 Nordlund, P., Sjoberg, B.M., Eklund, H. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 1990;345(6276):593-8.

218 Ekberg, M., Sahlin, M., Eriksson, M., Sjoberg, B.M. Two conserved tyrosine residues in protein R1 participate in an intermolecular electron transfer in ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 1996;271(34):20655-9.

219 Uhlin, U., Eklund, H. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 1994;370(6490):533-9.

220 Reichard, P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 1988;57:349-74.

221 Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnstrom, K., Sjoberg, B.M., Eklund, H. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* 1997;5(8):1077-92.

222 Chabes, A., Thelander, L. Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* 2000;275(23):17747-53.

223 Eriksson, S., Graslund, A., Skog, S., Thelander, L., Tribukait, B. Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. *J Biol Chem* 1984;259(19):11695-700.

224 Bjorklund, S., Skog, S., Tribukait, B., Thelander, L. S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* 1990;29(23):5452-8.

225 Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L., Tribukait, B. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* 1985;260(16):9114-6.

226 Mann, G.J., Musgrove, E.A., Fox, R.M., Thelander, L. Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. *Cancer Res* 1988;48(18):5151-6.

227 Guittet, O., Hakansson, P., Voevodskaya, N., Fridd, S., Graslund, A., Arakawa, H., Nakamura, Y., Thelander, L. Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *J Biol Chem* 2001;276(44):40647-51.

228 Yamaguchi, T., Matsuda, K., Sagiya, Y., Iwadate, M., Fujino, M.A., Nakamura, Y., Arakawa, H. p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 2001;61(22):8256-62.

229 Cooperman, B.S., Kashlan, O.B. A comprehensive model for the allosteric regulation of Class Ia ribonucleotide reductases. *Adv Enzyme Regul* 2003;43:167-82.

230 Kashlan, O.B., Scott, C.P., Lear, J.D., Cooperman, B.S. A comprehensive model for the allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase. Functional consequences of ATP- and dATP-induced oligomerization of the large subunit. *Biochemistry* 2002;41(2):462-74.

231 Kashlan, O.B., Cooperman, B.S. Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry* 2003;42(6):1696-706.

232 Willoughby, K., Bennett, M., Williams, R.A., McCracken, C., Gaskell, R.M. Sequences of the ribonucleotide reductase-encoding genes of felid herpesvirus 1 and molecular phylogenetic analysis. *Virus Genes* 1997;15(3):203-18.

233 Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169: *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;154:125-69.

234 Gompels, U.A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B.J., Martin, M.E., Efstathiou, S., Craxton, M., Macaulay, H.A. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995;209(1):29-51.

235 Nicholas, J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J Virol* 1996;70(9):5975-89.

236 Megaw, A.G., Rapaport, D., Avidor, B., Frenkel, N., Davison, A.J. The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* 1998;244(1):119-32.

237 Sun, Y., Conner, J. The U28 ORF of human herpesvirus-7 does not encode a functional ribonucleotide reductase R1 subunit. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 10):2713-8.

238 Brune, W., Menard, C., Heesemann, J., Koszinowski, U.H. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 2001;291(5502):303-5.

239 Lembo, D., Donalisio, M., Hofer, A., Cornaglia, M., Brune, W., Koszinowski, U., Thelander, L., Landolfo, S. The Ribonucleotide Reductase R1 Homolog of Murine Cytomegalovirus Is Not a Functional Enzyme Subunit but Is Required for Pathogenesis. *J Virol* 2004;78(8):4278-4288.

240 Lembo, D., Gribaudo, G., Hofer, A., Riera, L., Cornaglia, M., Mondo, A., Angeretti, A., Gariglio, M., Thelander, L., Landolfo, S. Expression of an altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of murine cytomegalovirus in quiescent fibroblasts. *J Virol* 2000;74(24):11557-65.

241 Patrone, M., Percivalle, E., Secchi, M., Fiorina, L., Pedrali-Noy, G., Zoppe, M., Baldanti, F., Hahn, G., Koszinowski, U.H., Milanesi, G., Gallina, A. The human cytomegalovirus UL45 gene product is a late, virion-associated protein and influences virus growth at low multiplicities of infection. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 12):3359-70.

242 Cohen, E.A., Charron, J., Perret, J., Langelier, Y. 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* 1985;66 (Pt 4):733-45.

243 Sun, Y., Conner, J. Characterization of heterosubunit complexes formed by the R1 and R2 subunits of herpes simplex virus 1 and equine herpes virus 4 ribonucleotide reductase. *Biochem J* 2000;347 Pt 1:97-104.

244 Cohen, G.H. Ribonucleotide reductase activity of synchronized KB cells infected with herpes simplex virus. *J Virol* 1972;9(3):408-18.

245 Langelier, Y., Dechamps, M., Buttin, G. Analysis of dCMP deaminase and CDP reductase levels in hamster cells infected by herpes simplex virus. *J Virol* 1978;26(3):547-53.

246 Huszar, D., Bacchetti, S. Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. *J Virol* 1981;37(2):580-8.

247 Darling, A.J., McKay, E.M., Ingemarson, R., Preston, V.G. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase activity from the large and small subunits. *Virus Genes* 1989;2(2):187-94.

- 248 Dutia, B.M., Preston, V.G., Polfreiman, J.U., Subak-Sharpe, J.H. [Characteristics and physical mapping of the gene of the herpes simplex virus that controls ribonucleotide reductase activity]. *Vopr Virusol* 1984;29(6):730-6.
- 249 Yamada, Y., Kimura, H., Morishima, T., Daikoku, T., Maeno, K., Nishiyama, Y. The pathogenicity of ribonucleotide reductase-null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Infect Dis* 1991;164(6):1091-7.
- 250 Goldstein, D.J., Weller, S.K. 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* 1988;62(1):196-205.
- 251 Goldstein, D.J., Weller, S.K. 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* 1988;166(1):41-51.
- 252 Nikas, I., McLauchlan, J., Davison, A.J., Taylor, W.R., Clements, J.B. Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins* 1986;1(4):376-84.
- 253 Conner, J., Macfarlane, J., Lankinen, H., Marsden, H. The unique N terminus of the herpes simplex virus type 1 large subunit is not required for ribonucleotide reductase activity. *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 1):103-12.
- 254 Conner, J., Cross, A., Murray, J., Marsden, H. Identification of structural domains within the large subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *J Gen Virol* 1994;75 (Pt 12):3327-35.
- 255 Bolger, G., Liuzzi, M., Krogsrud, R., Scouten, E., McCollum, R., Welchner, E., Kempner, E. Radiation inactivation of ribonucleotide reductase, an enzyme with a stable free radical. *Biophys J* 2000;79(4):2155-61.
- 256 Conner, J., Murray, J., Cross, A., Clements, J.B., Marsden, H.S. Intracellular localisation of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase subunits during infection of cultured cells. *Virology* 1995;213(2):615-23.
- 257 Hunter, J.C., Smith, C.C., Bose, D., Kulka, M., Broderick, R., Aurelian, L. Intracellular internalization and signaling pathways triggered by the large subunit of HSV-2 ribonucleotide reductase (ICP10). *Virology* 1995;210(2):345-60.

258 Smith, C.C., Luo, J.H., Hunter, J.C., Ordonez, J.V., Aurelian, L. The transmembrane domain of the large subunit of HSV-2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for protein kinase activity and transformation-related signaling pathways that result in ras activation. *Virology* 1994;200(2):598-612.

259 Aurelian, L., Smith, C.C., Klacsman, K.T., Gupta, P.K., Frost, J.K. Expression and cellular compartmentalization of a herpes simplex virus type 2 protein (ICP 10) in productively infected and cervical tumor cells. *Cancer Invest* 1983;1(4):301-13.

260 Smith, C.C., Aurelian, L. The large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is associated with the virion tegument and has PK activity. *Virology* 1997;234(2):235-42.

261 Desai, P., Ramakrishnan, R., Lin, Z.W., Osak, B., Glorioso, J.C., Levine, M. The RR1 gene of herpes simplex virus type 1 is uniquely trans activated by ICP0 during infection. *J Virol* 1993;67(10):6125-35.

262 Simard, C., Langlois, I., Styger, D., Vogt, B., Vlcek, C., Chalifour, A., Trudel, M., Schwyzer, M. Sequence analysis of the UL39, UL38, and UL37 homologues of bovine herpesvirus 1 and expression studies of UL40 and UL39, the subunits of ribonucleotide reductase. *Virology* 1995;212(2):734-40.

263 Yoon, S.S., Nakamura, H., Carroll, N.M., Bode, B.P., Chiocca, E.A., Tanabe, K.K. An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *Faseb J* 2000;14(2):301-11.

264 Spear, M.A., Sun, F., Eling, D.J., Gilpin, E., Kipps, T.J., Chiocca, E.A., Bouvet, M. Cytotoxicity, apoptosis, and viral replication in tumor cells treated with oncolytic ribonucleotide reductase-defective herpes simplex type 1 virus (hrR3) combined with ionizing radiation. *Cancer Gene Ther* 2000;7(7):1051-9.

265 Chung, T.D., Wymer, J.P., Smith, C.C., Kulka, M., Aurelian, L. Protein kinase activity associated with the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). *J Virol* 1989;63(8):3389-98.

266 Langelier, Y., Champoux, L., Hamel, M., Guilbault, C., Lamarche, N., Gaudreau, P., Massie, B. 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* 1998;273(3):1435-43.

267 Conner, J. 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* 1999;80 (Pt 6):1471-6.

268 Ali, M.A., McWeeney, D., Milosavljevic, A., Jurka, J., Jariwalla, R.J. Enhanced malignant transformation induced by expression of a distinct protein domain of ribonucleotide reductase large subunit from herpes simplex virus type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(18):8257-61.

269 Smith, C.C., Kulka, M., Wymer, J.P., Chung, T.D., Aurelian, L. Expression of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for virus growth and neoplastic transformation. *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 6):1417-28.

270 Smith, C.C., Luo, J.H., Aurelian, L. The protein kinase activity of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) fused to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor is ligand-inducible. *Virology* 1996;217(2):425-34.

271 Smith, C.C., Nelson, J., Aurelian, L., Gober, M., Goswami, B.B. 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* 2000;74(22):10417-29.

272 Perkins, D., Yu, Y., Bambrick, L.L., Yarowsky, P.J., Aurelian, L. Expression of herpes simplex virus type 2 protein ICP10 PK rescues neurons from apoptosis due to serum deprivation or genetic defects. *Exp Neurol* 2002;174(1):118-22.

273 Perkins, D., Pereira, E.F., Gober, M., Yarowsky, P.J., Aurelian, L. 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* 2002;76(3):1435-49.

274 Perkins, D., Pereira, E.F., Aurelian, L. 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* 2003;77(2):1292-305.

275 Perkins, D., Gyure, K.A., Pereira, E.F., Aurelian, L. Herpes simplex virus type 1-induced encephalitis has an apoptotic component associated with activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Neurovirol* 2003;9(1):101-11.

276 Bergeron, S. La sous unité R1 de la ribonucléotide réductase codée par le virus de l'herpès simplex de type 2 possède une fonction antiapoptotique. Montréal: Université de Montréal; 1998.

277 Fink, A.L. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 1999;79(2):425-49.

278 Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., King, J. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* 1991;253(5015):54-8.

279 Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M., Horwich, A.L. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* 1996;84(3):481-90.

280 Csermely, P. A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture. *News Physiol Sci* 2001;16:123-6.

281 Mounier, N., Arrigo, A.P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 2002;7(2):167-76.

282 Varadhachary, A.S., Edidin, M., Hanlon, A.M., Peter, M.E., Krammer, P.H., Salgame, P. Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J Immunol* 2001;166(11):6564-9.

283 de Jong, W.W., Leunissen, J.A., Voorter, C.E. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol* 1993;10(1):103-26.

284 Mornon, J.P., Halaby, D., Malfois, M., Durand, P., Callebaut, I., Tardieu, A. alpha-Crystallin C-terminal domain: on the track of an Ig fold. *Int J Biol Macromol* 1998;22(3-4):219-27.

285 Scharf, K.D., Siddique, M., Vierling, E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins

containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* 2001;6(3):225-37.

286 Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W., Weleber, R.G. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet* 1998;7(3):471-4.

287 Kumar, L.V., Ramakrishna, T., Rao, C.M. Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins. *J Biol Chem* 1999;274(34):24137-41.

288 Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Tsuzuki, M., Kishikawa, M., Shimada, A., Hosokawa, M., Kato, K. Hsp27 suppresses the formation of inclusion bodies induced by expression of R120G alpha B-crystallin, a cause of desmin-related myopathy. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(6):1217-23.

289 Ehrnsperger, M., Gaestel, M., Buchner, J. Structure & fonction of small heat shock proteins. In: Fink AL, Goto Y, editors. *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*. New York: Dekker; 1998. p. 533-575.

290 Kim, R., Lai, L., Lee, H.H., Cheong, G.W., Kim, K.K., Wu, Z., Yokota, H., Marqusee, S., Kim, S.H. On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8151-5.

291 Laufen, T., Zuber, U., Buchberger, A., Bukau, B. DnaJ proteins. In: Fink AL, Goto Y, editors. *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*. New York: Dekker; 1998. p. 241-274.

292 Crack, J.A., Mansour, M., Sun, Y., MacRae, T.H. Functional analysis of a small heat shock/alpha-crystallin protein from *Artemia franciscana*. Oligomerization and thermotolerance. *Eur J Biochem* 2002;269(3):933-42.

293 Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 1998;394(6693):595-9.

294 van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., Vierling, E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* 2001;8(12):1025-30.

295 Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* 2000;19(16):4310-22.

296 Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsiichlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39858-66.

297 Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31585-92.

298 Huang, L., Mivechi, N.F., Moskophidis, D. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol Cell Biol* 2001;21(24):8575-91.

299 Yamauchi, Y., Wada, K., Goshima, F., Daikoku, T., Ohtsuka, K., Nishiyama, Y. Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 12):2517-27.

300 Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2727-33.

301 Arrigo, A.P., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Virot, S., Javouhey, E., Mounier, N., Diaz-Latoud, C. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Prog Mol Subcell Biol* 2002;28:185-204.

302 Arrigo, A.P., Paul, C., Ducasse, C., Sauvageot, O., Kretz-Remy, C. Small stress proteins: modulation of intracellular redox state and protection against oxidative stress. *Prog Mol Subcell Biol* 2002;28:171-84.

303 Garrido, C., Bruey, J.M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Solary, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* 1999;13(14):2061-70.

304 Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D., Kharbanda, S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 2000;19(16):1975-81.

305 Andley, U.P., Song, Z., Wawrousek, E.F., Bassnett, S. The molecular chaperone alphaA-crystallin enhances lens epithelial cell growth and resistance to UVA stress. *J Biol Chem* 1998;273(47):31252-61.

306 Gober, M.D., Smith, C.C., Ueda, K., Toretsky, J.A., Aurelian, L. Forced expression of the H11 heat shock protein can be regulated by DNA methylation and trigger apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 2003;278(39):37600-9.

307 Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation *J Biol Chem*. 2000 Apr 7;275(14):10519-26.

308 Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*. 2002 Feb;9(2):401-10.

309 Gabai VL, Yaglom JA, Volloch V, Meriin AB, Force T, Koutroumanis M, Massie B, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6826-36.

310 Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(19):7146-59.

311 Charette, S.J., Landry, J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926:126-31.

312 Charette, S.J., Lavoie, J.N., Lambert, H., Landry, J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 2000;20(20):7602-12.

313 Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. Hsp60 accelerates the maturation of pro-

caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2049-56.

314 Sakahira H, Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3364-70.

315 Neznanov, N., Chumakov, K.P., Ullrich, A., Agol, V.I., Gudkov, A.V. Unstable receptors disappear from cell surface during poliovirus infection. *Med Sci Monit* 2002;8(10):BR391-6.

316 Hayashi, Y., Iwasaka, T., Smith, C.C., Aurelian, L., Lewis, G.K., Ts'o, P.O. Multistep transformation by defined fragments of herpes simplex virus type 2 DNA: oncogenic region and its gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(24):8493-7.

317 Wang, N.S., Unkila, M.T., Reineks, E.Z., Distelhorst, C.W. Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death. *J Biol Chem* 2001;276(47):44117-28.

318 Subramanian, T., Chinnadurai, G. Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK. *J Cell Biochem* 2003;89(6):1102-14.

319 Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., Reed, J.C. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80(2):279-84.

320 Townsend, P.A., Cutress, R.I., Sharp, A., Brimmell, M., Packham, G. BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim Biophys Acta* 2003;1603(2):83-98.

321 Zachos, G., Koffa, M., Preston, C.M., Clements, J.B., Conner, J. 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* 2001;75(6):2710-28.

322 Zachos, G., Clements, B., Conner, J. Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J Biol Chem* 1999;274(8):5097-103.

323 Uhlmann, E.J., Subramanian, T., Vater, C.A., Lutz, R., Chinnadurai, G. A potent cell death activity associated with transient high level expression of BCL-2. *J Biol Chem* 1998;273(28):17926-32.

324 Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M.S., Cano, L.L., Duke, R.C., Scheinman, R.I. NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ* 1999;6(6):570-82.

325 Reuther-Madrid, J.Y., Kashatus, D., Chen, S., Li, X., Westwick, J., Davis, R.J., Earp, H.S., Wang, C.Y., Baldwin Jr, A.S., Jr. The p65/RelA subunit of NF-kappaB suppresses the sustained, antiapoptotic activity of Jun kinase induced by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 2002;22(23):8175-83.

326 El-Agnaf, O.M., Mahil, D.S., Patel, B.P., Austen, B.M. Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273(3):1003-7.

327 Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300(5618):486-9.

328 Kappe, G., Verschuure, P., Philipsen, R.L., Staalduinen, A.A., Van de Boogaart, P., Boelens, W.C., De Jong, W.W. Characterization of two novel human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim Biophys Acta* 2001;1520(1):1-6.

329 Sun, X., Fontaine, J.M., Rest, J.S., Shelden, E.A., Welsh, M.J., Benndorf, R. Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins. *J Biol Chem* 2004;279(4):2394-402.

330 Garcia-Ranea, J.A., Mirey, G., Camonis, J., Valencia, A. p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett* 2002;529(2-3):162-7.

331 Arrigo, A.P. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris)* 2000;48(3):280-8.

332 Verschuure, P., Croes, Y., van den, I.P.R., Quinlan, R.A., de Jong, W.W., Boelens, W.C. Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(2):117-28.

333 Bond, V.C., Person, S., Warner, S.C. The isolation and characterization of mutants of herpes simplex virus type 1 that induce cell fusion. *J Gen Virol* 1982;61 (Pt 2):245-54.

334 Krajcsi, P., Wold, W.S. Inhibition of tumor necrosis factor and interferon triggered responses by DNA viruses. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9(3):351-8.

335 Minagawa, H., Hashimoto, K., Yanagi, Y. Absence of tumour necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex virus-1 infections. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 2):343-7.

336 Shimeld, C., Whiteland, J.L., Williams, N.A., Easty, D.L., Hill, T.J. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 12):3317-25.

337 Shimeld, C., Easty, D.L., Hill, T.J. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in the mouse trigeminal ganglion: an in vivo study of virus antigen and cytokines. *J Virol* 1999;73(3):1767-73.

338 Theil, D., Derfuss, T., Paripovic, I., Herberger, S., Meinl, E., Schueler, O., Strupp, M., Arbusow, V., Brandt, T. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 2003;163(6):2179-84.

339 Feduchi, E., Alonso, M.A., Carrasco, L. Human gamma interferon and tumor necrosis factor exert a synergistic blockade on the replication of herpes simplex virus. *J Virol* 1989;63(3):1354-9.

340 Chen, S.H., Garber, D.A., Schaffer, P.A., Knipe, D.M., Coen, D.M. Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation. *Virology* 2000;278(1):207-16.

341 Halford, W.P., Gebhardt, B.M., Carr, D.J. Persistent cytokine expression in trigeminal ganglion latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Immunol* 1996;157(8):3542-9.

- 342 Kodukula, P., Liu, T., Rooijen, N.V., Jager, M.J., Hendricks, R.L. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* 1999;162(5):2895-905.
- 343 Krummenacher, C., Rux, A.H., Whitbeck, J.C., Ponce-de-Leon, M., Lou, H., Baribaud, I., Hou, W., Zou, C., Geraghty, R.J., Spear, P.G., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. *J Virol* 1999;73(10):8127-37.
- 344 Cocchi, F., Lopez, M., Menotti, L., Aoubala, M., Dubreuil, P., Campadelli-Fiume, G. The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15700-5.
- 345 Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., Campadelli-Fiume, G. The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J Virol* 1998;72(12):9992-10002.
- 346 Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., Spear, P.G. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 1996;87(3):427-36.
- 347 Marsters, S.A., Ayres, T.M., Skubatch, M., Gray, C.L., Rothe, M., Ashkenazi, A. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1997;272(22):14029-32.
- 348 McLean, T.I., Bachenheimer, S.L. Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. *J Virol* 1999;73(10):8415-26.
- 349 Patel, A., Hanson, J., McLean, T.I., Olgiate, J., Hilton, M., Miller, W.E., Bachenheimer, S.L. Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology* 1998;247(2):212-22.

350 Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H., Buchner, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* 1991;9(9):825-9.

351 Sullivan, C.S., Pipas, J.M. The virus-chaperone connection. *Virology* 2001;287(1):1-8.

352 Talley AK, Dewhurst S, Perry SW, Dollard SC, Gummuluru S, Fine SM, New D, Epstein LG, Gendelman HE, Gelbard HA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2359-66.

353 Sipe KJ, Srisawasdi D, Dantzer R, Kelley KW, Weyhenmeyer JA. An endogenous 55 kDa TNF receptor mediates cell death in a neural cell line. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996 Jun;38(2):222-32.

354 Haviv R, Stein R. The intracellular domain of p55 tumor necrosis factor receptor induces apoptosis which requires different caspases in naive and neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res.* 1998 May 15;52(4):380-9.

355 Lindenboim L, Haviv R, Stein R. Bcl-xL inhibits different apoptotic pathways in rat PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1998 Aug 28;253(1):37-40.

356 Sarid R, Ben-Moshe T, Kazimirsky G, Weisberg S, Appel E, Kobiler D, Lustig S, Brodie C. vFLIP protects PC-12 cells from apoptosis induced by Sindbis virus: implications for the role of TNF-alpha. *Cell Death Differ.* 2001 Dec;8(12):1224-31.

357 Trincavelli ML, Falleni A, Chelli B, Tuscano D, Costa B, Gremigni V, Lucacchini A, Martini C. A(2A) adenosine receptor ligands and proinflammatory cytokines induce PC 12 cell death through apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2003 Nov 15;66(10):1953-62.

