

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
SERVICE DE BIOCHIMIE

**ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA FONCTION DE ZAC1, UN
FACTEUR DE TRANSCRIPTION
SUPPRESSEUR DE TUMEURS**

**STUDY OF THE EXPRESSION AND THE FUNCTION OF ZAC1, A
TRANSCRIPTION FACTOR AND TUMOR SUPPRESSOR**

Barbara WARZEE

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES**

ANNEE ACADEMIQUE 2010-2011

Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Fabrice Bureau et Pierre Lekeux, pour m'avoir accueillie au sein de leurs services de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège et permis d'y réaliser une thèse de doctorat.

Je remercie tout particulièrement mon promoteur, le Professeur Fabrice Bureau pour son inspiration permanente et ses conseils judicieux. Merci pour le juste équilibre que tu arrives à trouver entre l'encadrement indispensable à notre apprentissage et l'autonomie qui nous est nécessaire pour la prise de notre envol. Merci d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour mener ma thèse à terme dans les meilleures conditions possibles. Je sortirai enrichie d'avoir travaillé dans ton laboratoire en perpétuelle évolution où règnent la bonne humeur et la confiance.

Un grand merci au Docteur Christophe Desmet, d'avoir été là dans les dernières étapes et de m'avoir appris comment rédiger un article scientifique. J'espère que tu iras loin dans ta carrière FNRS car la recherche a besoin de personnes passionnées, dynamiques et débordantes d'idées comme toi.

Je tiens à remercier le Professeur Laurent Journot de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier de m'avoir donné les souris Zac1 KO, sans lesquelles je n'aurais pu effectuer cette étude. J'en profite pour remercier le Docteur Dimitri Pirotin, le Professeur Pierre-Vincent Drion, Luc Duwez et Fabrice Olivier pour la gestion de l'élevage des souris Zac1 KO.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Professeur Didier Hober de l'Université de Lille pour m'avoir accueillie en stage dans son laboratoire de Virologie et mis à disposition sa banque de virus. Je remercie beaucoup Delphine Caloone pour m'avoir initiée aux techniques de virologie.

Je remercie mon Comité de thèse, à savoir le Docteur Alain Chariot et le Professeur Jean-Marie Godeau, pour leur accompagnement. Merci au Professeur Jacques Piette, au Docteur Jean-Christophe Marine et au Docteur Yvette Habraken pour leurs conseils sur les dommages à l'ADN. Je remercie le Professeur Daniel Desmecht et son assistant Mutin-Marie Garigliany pour m'avoir permis de cultiver le virus du Sendaï au sein du Département de Pathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège. Je remercie le Docteur Sandra Ormenese, Rafaat Stephan, et la plateforme GIGA Imagerie et cytométrie de flux, pour les

analyses FACS. Merci également au Docteur Didier Cataldo d'avoir pu utiliser son Quantity One Software pour effectuer mes analyses statistiques Western blot au sein de son laboratoire de Biologie des tumeurs et du développement. Je tiens à remercier le Professeur Tada Taniguchi et le Professeur Shizuo Akira pour m'avoir respectivement mis à disposition les souris IRF3 et IRF7 KO et les MEFs TLR3 KO.

Je remercie le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA) de m'avoir financée durant 4 ans et de m'avoir octroyée une bourse afin d'effectuer un stage à l'Université de Lille.

Je tiens à remercier tout particulièrement notre technicien, Cédric François, pour m'avoir aidée tout au long de ma thèse. Merci pour ton dynamisme, la qualité de ton travail et notamment pour m'avoir appris à préparer une cassette WB en moins d'une minute. Je remercie Ilham Sbai, Raja Fares, Martine Leblond et Dominique Beerens pour leur aide au niveau du secrétariat, des commandes et des relectures de manuscrits.

Merci au Professeur Pierre Lekeux d'avoir permis à son équipe d'allier travail et plaisir en nous invitant à un workshop à Calvi.

Je remercie toutes les personnes qui font ou ont fait partie de l'équipe de Physiologie que j'ai pu côtoyer, à savoir, Pierre, Fabrice, Fabrizio, Delphine, Dorothée, Gregory, Philippe, Laurence, Cédric, Christophe, Sabine, Hugues, Rodrigue, Denis, Audrey, Eve, Clémence, Dimitri, Tania, Ilham, Raja, Martine, Marie, Claire, Catherine, Stéphanie, Ann-Steph, Julien, Thomas, Agnieszka, et Morgane pour leur sympathie, leurs conseils et tout simplement pour leur présence. Je garderai d'excellents souvenirs des expressions décoiffantes de Claire, des histoires abracadabrantes d'Ann-Steph, de l'humour décapant de Pujol, des ragots de Cédric, du look irréprochable de Catherine, des aventures palpitantes de Marie et de l'ascenseur émotionnel de Christophe.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis qui m'ont soutenue durant ma thèse et, plus particulièrement, ma maman et Kikou. Merci maman de m'avoir toujours encouragée dans mes études et de m'avoir transmis le goût du travail. Merci Adri d'être présent dans tous mes projets passés, présents et à venir.

7-AAD: 7-amino-actinomycin D	MTT: 3-(4,5)-dimethylthiazazo(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazoliumromide
ALLN: N-acetylleucylleucylnorleucinal	Mx: Myxovirus
Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1	MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
BrdU: Bromodeoxyuridine	MYLK: Myosin light chain kinase
CARDs: Caspase recruitment domains	NF-κB: Nuclear Factor-kappa B
CBP: CREB binding protein	NK: Natural Killer
CDs : Cellules dendritiques	NOD-LRR: Nucleotide-oligomerization domain leucin-rich repeat
CMV: Cytomégalo virus	PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
CpG: Cytosine-phosphate-guanine	PACAP1-R: Récepteur de type I de PACAP
CREB: cAMP-response-element-binding protein	PAMPs: Pathogen associated molecular pattern
Ct: Cycle threshold	PBS: Phosphate-Buffered Saline
CVB4 E2: Coxsackievirus B4 E2	PCAF: Facteur associé à CBP/p300
DAI: DNA-dependent activator of IRFs	PCR: Polymerase Chaîne Reaction
DBD: domaine de liaison à l'ADN	PFU: Plaque-forming units
DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium	PKR: Protéine kinase R
DNMT: ADN méthyltransférase	PLAG: Pleiomorphic Adenoma Gene
eIF-2α: Eukaryotic Initiation Factor 2- α	PLAGL: Pleiomorphic Adenoma Gene Like
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	Poly(I:C): acide polyribonoinique polyribocytidylique
EMCV: Virus de l'Encéphalomyocardite	PPARγ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
ER: Récepteur à œstrogène	PRRs: Pattern recognition receptors
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain	RE: Réticulum endoplasmique
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	RIG-I: Retinoic-acid-inducible gene I
GAS: gamma-activated sequence	RLHs: RIG-I like helicases
HAT: Histone acétyl-transférase	RSV F: Respiratory Syncytial Virus Fusion
HSV-1: Herpès Virus Simplex de type 1	RT: Reverse Transcriptase
HYMAI: Hydatidiform Mole Associated and Imprinted	SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
IAD: IRF association domaine	SeV: virus Sendai
ISG: IFN stimulated genes	SH2: Src-homology domain
IFNAR: Interferon- α/β receptor	SPF: Specific Pathogen Free
IFNs: Interférons	STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
IκB: Inhibitor of NF- κ B	TBK: Tank-binding kinase
IKK: I κ B Kinase	TCID50: Tissue Culture Infected Dose at 50%
IL: Interleukine	TIR: Toll/IL-1R/R
IL-1R: Récepteur de l'Interleukine-1	TNDM: Transient Neonatal Diabetes Mellitus
IPS1: Interferon- β promoter stimulator 1	TNF-α: Tumor Necrosis Factor- α
IRF: Interferon Regulatory Factor	TLR: Toll-Like Receptor
ISG: Interferon-Stimulated Gene	TRAF: TNF Receptor Associated Factor
ISGF: Interferon-Stimulated Gene Factor	TRIF: TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta
ISRE: IFN Stimulated Response Element	TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
JAK: Janus Tyrosine Kinase	UTR: Untranslated region
JEV: Virus de l'Encéphalite Japonaise	VRS: Virus respiratoire syncytial
KO: Knock Out	VSV: Virus de la Stomatite Vésiculeuse
Lot1: Lost on transformation 1	WT: Wild-Type
LPG2: Laboratory of Genetics and Physiology 2	Zac1: Zinc finger protein regulator of apoptosis and cell cycle arrest 1
LPS: Lipopolysaccharides	
MDA5: Melanoma Differentiation-Associated Gene 5	
MDM2: Murine Double Minute 2	
MEFs: Fibroblastes Embryonnaires Murins	
MOI: Multiplicity of Infection	

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
SUMMARY	2
INTRODUCTION.....	3
1. ZAC1	3
1.1. Découverte du facteur de transcription Zac1	3
1.2. Structure protéique de Zac1	3
1.3. Variants de transcrits de Zac1	4
1.4. Localisation tissulaire de Zac1	6
1.5. Zac1, facteur de transcription et co-régulateur.....	7
1.6. Zac1, gène soumis à l’empreinte.....	11
1.7. Zac1 et le développement embryonnaire.....	12
1.9. Zac1, membre de la famille PLAG	15
1.10. Etude de Zac1 dans notre laboratoire.....	17
2. IMMUNITE INNEE ANTIVIRALE	18
2.1. Immunité innée et immunité adaptative	18
2.2. Immunité innée et récepteurs PRRs	19
2.3. Récepteurs Toll-like	19
2.3.1. Description générale.....	19
2.3.2. TLRs impliqués dans la réponse antivirale	23
TLR3	24
TLRs 7/8 et TLR 9	25
TLRs 2 et 4.....	27
2.4. Récepteurs PRRs cytosoliques	27
2.4.1. Description générale.....	27
2.4.2. RLHs	28
2.5. Les IFNs de type I.....	30
2.5.1. Description générale.....	30
2.5.2. Régulation des IFNs de type I.....	30
2.5.3. Voie de signalisation des IFNs de type I.....	34
2.5.4. Gènes régulés par les IFNs de type I.....	35
OBJECTIF DU TRAVAIL	37
MATERIEL ET METHODES	38
RESULTATS	46
1. DETECTION DE LA PROTEINE ZAC1 DANS LES ORGANES MURINS	46
2. VOIE DE DEGRADATION DE LA PROTEINE ZAC1	48
3. EXPRESSION DE LA PROTEINE ZAC1 SUITE A L’INDUCTION DE DOMMAGES A L’ADN.....	51
4. INDUCTION VIRALE DE ZAC1B A TRAVERS UN MECANISME DEPENDANT DU TLR3 ET D’IRF3	53
4.1. Expression de Zac1 suite aux traitements avec divers stimuli pro-inflammatoires ..	53
4.2. Régulation de l’expression de Zac1b après traitement au poly(I:C).....	53
4.3. Expression de Zac1b dans des cellules primaires adultes traitées au poly(I:C).....	55
4.4. Voies de signalisation empruntées par le poly(I:C) pour induire l’expression de Zac1b.....	56
4.5. Expression de Zac1b suite à une infection virale.....	59
4.6. Effets de l’expression de Zac1b sur la survie de cellules infectées à l’EMCV.....	61
4.7. Effets de l’expression de Zac1b sur la réplication virale dans des cellules infectées à l’EMCV	64

4.8. Effets de l'expression de Zac1b sur la production des IFNs de type I dans des cellules infectées à l'EMCV	64
4.9. Effets de l'inactivation de Zac1 dans des souris infectées à l'EMCV	65
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	68
BIBLIOGRAPHIE	74

RESUME

Zinc finger protein regulator of apoptosis and cell cycle arrest 1 (Zac1) est un facteur de transcription suppresseur de tumeurs capable, à travers des voies différentes et indépendantes, d'induire l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. Malgré ses implications potentielles dans le développement embryonnaire et certaines maladies telles que le cancer et le diabète néonatal, les mécanismes régulant son expression physiologique, ainsi que sa fonction biologique exacte restent méconnus. Les deux principaux objectifs de notre travail consistaient, d'une part, à définir la nature des stimuli capables de moduler l'expression endogène de la protéine Zac1 et, d'autre part, à étudier la fonction de Zac1. Nous avons tout d'abord montré que la protéine Zac1 n'était pas exprimée dans les organes murins où l'on détecte son ARN messager. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de mécanisme de dégradation de la protéine Zac1. Malgré ses similitudes de fonction avec le suppresseur de tumeurs p53, Zac1 n'était également pas exprimée après traitement avec des inducteurs de p53 tels que des inducteurs de dommages à l'ADN. Après avoir testé sans succès de nombreux stimuli pro-inflammatoires susceptibles d'induire l'expression de Zac1, nous avons finalement découvert que le variant de transcrite Zac1b était exprimé dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) traités à l'acide polyribonoinosinique polyribocytidylique [poly(I:C)], un double brin d'ARN synthétique. Cette régulation s'est avérée être dépendante de la voie du Toll-Like Receptor 3 (TLR3) et de l'Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3), et indépendante des interférons (IFNs) de type I. Le TLR3 et IRF3 étant des activateurs centraux de l'immunité antivirale, nous avons tenté de déterminer si Zac1 pourrait être impliqué dans la réponse antivirale. En rapport avec cette hypothèse, nous avons observé que Zac1b était exprimé dans des MEFs infectées avec le virus de l'Encéphalomyocardite (EMCV). Nous avons également constaté que les MEFs déficientes pour Zac1 étaient moins sensibles à la mort cellulaire induite par l'EMCV que les MEFs sauvages. Cependant, l'inactivation du gène Zac1 n'avait pas d'effet sur la survie des souris infectées à l'EMCV. En conclusion, ce travail décrit, pour la première fois, une régulation transcriptionnelle de Zac1b induite par des ARN double brin synthétiques et des virus à ARN, mais dont la signification fonctionnelle reste à découvrir. De plus, il montre que les stimuli capables d'induire p53 n'induisent pas l'expression de la protéine Zac1 suggérant que la protéine Zac1 est régulée différemment de p53.

SUMMARY

Zinc finger protein regulator of apoptosis and cell cycle arrest 1 (Zac1) is a transcription factor and tumor suppressor able to induce apoptosis or cell cycle arrest through different and independent pathways. In spite of the potential functions attributed to Zac1 in embryonic development as well as in certain disorders such as cancer and neonatal diabetes, little is known of its physiological regulation and biological function. The aims of this study were to identify stimuli that modulate the expression of Zac1, and to investigate the potential functional significance of this regulation. We initially showed that the Zac1 protein was not expressed in murine organs where Zac1 mRNA was detected. However, we could not determine mechanism which may lead to Zac1 protein degradation. In spite of its functional parallelism with the tumor suppressor p53, Zac1 protein expression was not also induced upon treatment with p53 inducers such as DNA damage inducers. After having tested unsuccessfully a lot of pro-inflammatory stimuli susceptible to induce Zac1 protein expression, we discovered that variant Zac1b was expressed in murine embryonic fibroblasts (MEFs) treated with polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)], a synthetic double-stranded RNA. This regulation occurred mainly through Toll-Like Receptor 3 (TLR3)- and Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3)- dependent and type I Interferon (IFN)-independent pathways. As TLR3 and IRF3 are central activators of antiviral immunity, we hypothesized that Zac1 may be implicated in antiviral responses. In line with this notion, we observed that Zac1b was expressed in MEFs infected with Encephalomyocarditis virus (EMCV). We also observed that Zac1-deficient MEFs were less sensitive to EMCV-induced cell death than wild-type MEFs. However, Zac1 gene inactivation had no effect on the survival of mice infected with EMCV. In conclusion, this study describes for the first time a transcriptional regulation of Zac1b, induced by synthetic dsRNA and RNA viruses, the functional significance of which remains to be further investigated. More, it allows to determine a lot of stimuli enable to induce Zac1 protein expression and shows that Zac1 may undergo a different regulation than p53.

INTRODUCTION

1. ZAC1

1.1. Découverte du facteur de transcription Zac1

En 1997, Spengler et ses collaborateurs ont découvert un nouveau facteur de transcription capable d'induire, par des voies différentes et indépendantes, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou l'apoptose. Suite à ces études, ce nouveau facteur de transcription a été baptisé murine Zinc finger protein regulator of apoptosis and cell cycle arrest 1 (mZac1) (Spengler *et al.*, 1997). Plus tard, son homologue humain, hZac1 a été mis en évidence (Varrault *et al.*, 1998).

Parallèlement, Zac1 a été découvert par deux autres équipes de chercheurs. En 1997, Abdollahi et ses collaborateurs ont observé la perte d'expression d'un gène dans des tumeurs ovariennes chez le rat, qu'ils ont appelé Lost on transformation 1 (Lot1). Lot1 s'est avéré être l'homologue de Zac1 chez le rat (Abdollahi *et al.*, 1997a ; Abdollahi *et al.*, 1997b). En 1998, Kas et son équipe ont découvert Zac1 chez l'humain, qu'ils ont nommé Pleiomorphic Adenoma Gene Like 1 (PLAGL1) de par son analogie de structure avec les deux autres membres de la famille PLAG, PLAG1 et PLAGL2 (Kas *et al.*, 1998).

1.2. Structure protéique de Zac1

Zac1 murin (mZac1) est une protéine de 693 acides aminés (Spengler *et al.*, 1997). Elle possède 7 doigts de zinc de type C2H2 (comme décrits dans la Figure 1) dans sa région N-terminale (acides aminés 1-208), flanqués d'une région de 65 acides aminés sans motifs connus (acides aminés 209-279). La partie centrale de mZac1 présente une répétition de 34 motifs PLE, PMQ, PML ou PLQ (acides aminés 280-382), suggérant une hélice poly-proline de type II pouvant être impliquée dans les interactions protéine-protéine. La partie C-terminale (acides aminés 383-693) se décompose en 5 parties : une première partie riche en acides aminés P, une deuxième riche en résidus P, Q et L, une troisième riche en tandems PE, une quatrième contenant presque exclusivement l'acide aminé E, et une cinquième contenant un site de phosphorylation pour la protéine kinase A. Les doigts de zinc interviennent dans la liaison à l'ADN, tandis que la partie riche en acides aminés P semble être indispensable à la fonction transactivatrice de mZac1 (Spengler *et al.*, 1997) (Figure 2).

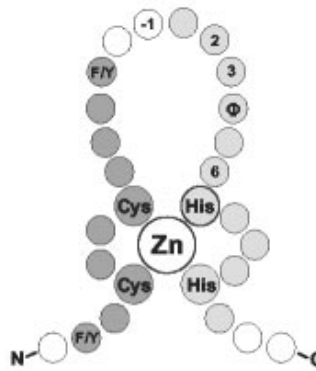


Figure 1. Schéma du doigt de zinc de type C2H2. Les acides aminés formant le feuillet- β et l'hélice- α sont représentés respectivement en gris foncé et gris clair. Les résidus conservés sont les 2 cystéines et les 2 histidines, stabilisés par un ion zinc, ainsi que la phénylalanine (F) ou la tyrosine (Y), et un acide aminé hydrophobique (ϕ). D'après Hoffmann *et al.*, 2003.

Zac1 humain (hZac1) est une protéine de 463 acides aminés qui présente une forte homologie avec mZac1 (74,6% de nucléotides et 68,5% d'acides aminés en commun). hZac1 se distingue de mZac1 par le fait qu'elle ne possède ni de partie centrale riche en motifs PLE, PMQ, PML et PLQ, ni les parties C-terminales riches en résidus P, Q et L, en tandems PE, ou en acide aminé E (Figure 2). hZac1 se réduit donc à 4 parties : les 7 doigts de zinc, le linker, la portion riche en acide aminé P, et la partie contenant le site de phosphorylation pour la protéine kinase A (possédant respectivement 84,2%, 54%, 58% et 63% d'acides aminés en commun avec mZac1). Les 11 acides aminés C-terminaux sont identiques entre hZac1 et mZac1 (Varrault *et al.*, 1998).

Lot1, l'homologue de Zac1 chez le rat, possède 583 acides aminés. Il présente une forte homologie avec mZac1 et hZac1. Lot1 se distingue de mZac1 par le fait qu'il ne possède pas de partie centrale riche en motifs PLE, PMQ, PML et PLQ (Abdollahi *et al.*, 1997a ; Varrault *et al.*, 1998) (Figure 2).

1.3. Variants de transcrits de Zac1

Deux variants de transcrits de Zac1 existent chez la souris : mZac1 (aussi nommé mZac1a) et mZac1b. Le gène mZac1 comprend 10 exons dont seulement les deux derniers sont codants et codent pour la protéine à 7 doigts de zinc de 693 acides aminés décrite dans le chapitre précédent (Abdollahi, 2007). La protéine mZac1b possède 11 acides aminés

supplémentaires (PQMQLQPLQLQ) dans la région C-terminale riche en résidus P, Q et L par rapport à la protéine mZac1 (Figure 2). Les 2 gènes possèdent la même région 5'UTR, suggérant qu'ils utilisent le même promoteur (Huang et Stallcup, 2000).

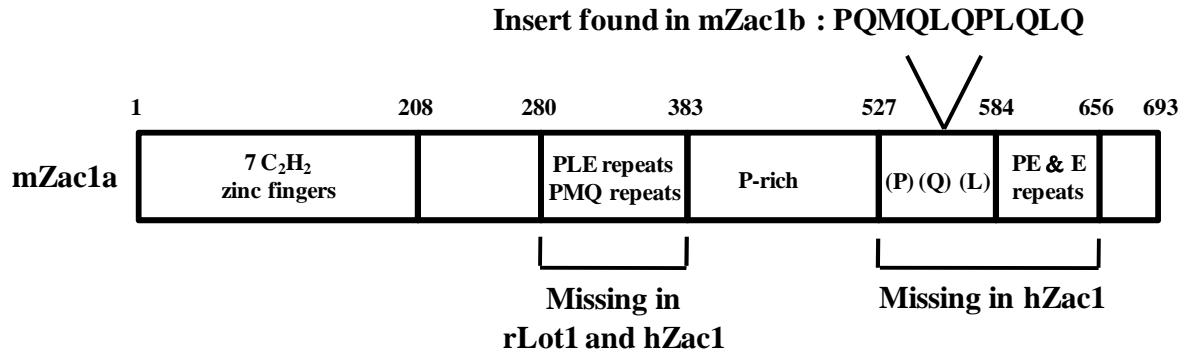


Figure 2. Domaines de la protéine mZac1. Onze acides aminés supplémentaires ont été trouvés sur la protéine mZac1b. Les régions manquantes de mZac1 chez ses homologues hZac1 et rLot1 sont soulignées. D'après Huang *et al.*, 2000.

Chez l'humain, les gènes hZac1, PLAGL1 et hLot1 partagent la même séquence codante et génèrent donc la même protéine à 7 doigts de zinc de 463 acides aminés décrite dans le chapitre précédent (Kamiya *et al.*, 2000). Cependant, hZac1, hLot1 et PLAGL1 montrent des régions 5'UTR différentes pouvant résulter d'un épissage alternatif (Kamiya *et al.*, 2000 ; Kas *et al.*, 1998 ; Varrault *et al.*, 1998).

Le gène hZac1 comprend 9 exons. L'exon 8 contient le codon d'initiation ATG et l'exon 9 contient le codon de terminaison TAA. L'épissage de l'exon 8 (premier exon codant) génère une nouvelle protéine, Zac Δ 2, auquel il manque les deux premiers doigts de zinc à l'extrémité N-terminale (Bilanges *et al.*, 1999 ; Bilanges *et al.*, 2001 ; Varrault *et al.*, 2001). Le promoteur putatif de hZac1 fait 876 paires de bases (pb) et comprend l'extrémité 5'UTR de l'exon 1 (Varrault *et al.*, 2001) (Figure 3).

Le gène PLAGL1 comprendrait 5 ou 6 exons. L'avant dernier exon contient le codon d'initiation ATG et la région codant pour les deux premiers doigts de zinc. Le dernier exon contient le codon de terminaison TAA ainsi qu'une région 3'UTR de 1223 pb précédant le signal de polyadénylation AATAAA. Tout comme hZac1, l'épissage de l'avant dernier exon génère une protéine à 5 doigts de zinc au lieu de 7, forme courte de PLAGL1 (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Kas *et al.*, 1998 ; Poulin et Labelle, 2005) (Figure 3).

Le gène hLot1 possède 6 exons. La protéine hLot1 est codée par les deux derniers exons 5 et 6. Le codon d'initiation ATG est localisé à 356 pb de l'extrémité 5' de l'exon 5. Le codon de terminaison TAA se trouve à 1238 pb de l'extrémité 5' de l'exon 6, suivi de 1200 pb comprenant la queue poly(A) (Abdollahi *et al.*, 2003). Le promoteur défini de hLot1 fait environ 1500 pb et comprend l'extrémité 5'UTR de l'exon 1 (Abdollahi *et al.*, 2003) (Figure 3).

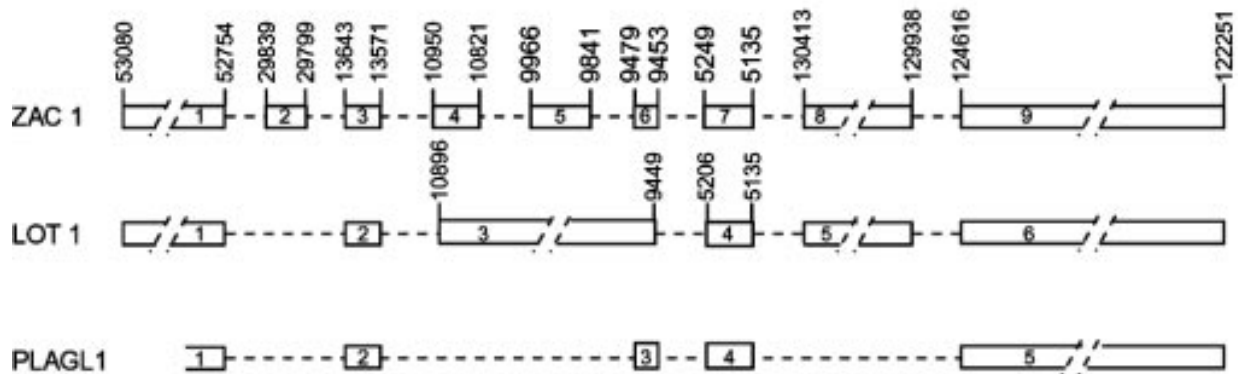


Figure 3. Représentation schématique des variants d'épissage humains hZac1, hLot1 et PLAGL1 (forme courte). Tous les exons de hZac1, hLot1 et PLAGL1 sont localisés et de taille définie. L'extrémité 5' de PLAGL1 n'a pas encore été identifiée. Le dernier exon des 3 variants possède des variations dans leurs séquences nucléotidiques. D'après Abdollahi *et al.*, 2003.

1.4. Localisation tissulaire de Zac1

L'ARN messager de mZac1 (mZac1a et mZac1b) se retrouve principalement dans l'hypophyse (Spengler *et al.*, 1997). Il est également retrouvé, à un moindre niveau, dans d'autres régions du cerveau (le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le tronc cérébral et le cervelet), ainsi que dans quelques organes, tels que l'estomac, les reins, les glandes surrénales, le cœur et les poumons (Spengler *et al.*, 1997).

Zac1 humain (hZac1/PLAGL1/hLot1) présente une distribution plus large que Zac1 murin. On retrouve en effet son ARN messager dans la presque totalité des organes fœtaux et adultes. Son plus haut niveau d'expression se retrouve dans l'hypophyse, les reins, les glandes surrénales et le placenta. On le retrouve aussi en grande quantité au niveau de l'utérus, des glandes mammaires, des ovaires, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des tissus lymphoïdes. Les muscles squelettiques, le foie, le cerveau et la moelle épinière expriment plus faiblement l'ARN messager de hZac1 (Kas *et al.*, 1998 ; Varrault *et al.*, 1998).

Le transcrite de Zac1 chez le rat (rLot1) est détecté à un niveau considérable dans les ovaires, le pancréas, les testicules et l'utérus et à un plus faible niveau dans le cerveau et les reins (Abdollahi *et al.*, 1997a).

La protéine Zac1 n'est pas nécessairement exprimée dans les organes ou tissus où l'on détecte son ARNm. Peu d'études ont mis en évidence l'expression endogène de la protéine Zac1. La protéine Zac1 a été détectée dans plusieurs régions du cerveau chez le rat. Elle est notamment exprimée *in vivo* durant le développement du cervelet chez de jeunes rats et dans des cellules granuleuses du cervelet *in vitro* jusqu'à leur différenciation (Ciani *et al.*, 2003). Il a été également décrit que la transcription du gène codant pour mZac1 s'effectue à proximité du nucléole et que son ARNm s'accumule au niveau de ce site de transcription. Le nucléole interagirait physiquement avec l'ARNm de mZac1 et empêcherait sa traduction en protéine. Le traitement de fibroblastes embryonnaires murins avec de l'actinomycine D provoque un désassemblage du nucléole, et par conséquent, induit une forte expression protéique de mZac1 (Royo *et al.*, 2009). Enfin, Zac1 est exprimée dans des cellules rénales humaines suite à un stress hypertonique (Lanaspa *et al.*, 2009).

1.5. Zac1, facteur de transcription et co-régulateur

Zac1 est décrit comme un facteur de transcription intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998). Ses 7 doigts de zinc de type C2H2 et sa région riche en proline en C-terminal font de Zac1 un facteur de transcription potentiel, capable de se lier à l'ADN et de montrer une activité transactivatrice (Spengler *et al.*, 1997).

Des recherches ont en effet montré que hZac1 est une protéine nucléaire, possédant une activité transactivatrice et étant capable de se fixer à l'ADN au niveau du motif G₄C₄, reconnu par les doigts de zinc 6 et 7 (Abdollahi *et al.*, 1999 ; Hoffmann *et al.*, 2003 ; Kas *et al.*, 1998 ; Varrault *et al.*, 1998). hZac1 possède également une activité répressive en se liant à un autre motif nucléotidique G₄N₆G₄, reconnu par les doigts de zinc 2, 3, 4, 6 et 7. La liaison de hZac1 à la répétition du motif (G₄N₆G₄)₂ provoque une dimérisation de hZac1 qui montre, dans ce cas-ci, une activité transactivatrice (Hoffmann *et al.*, 2003) (Figure 4).

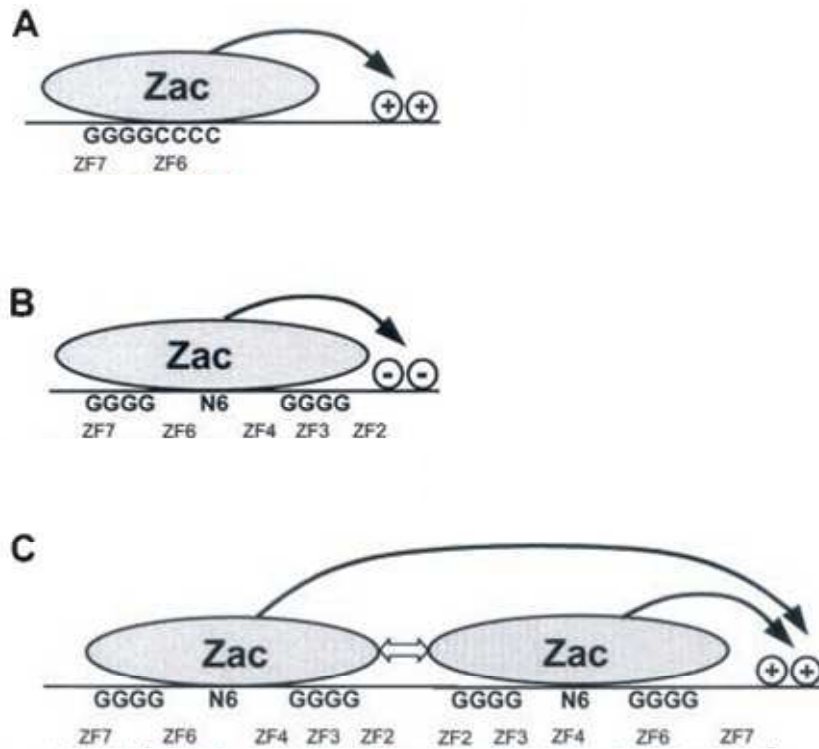


Figure 4. Domaines de liaison à l'ADN et transactivation de hZac1. (A) hZac1 se lie au motif G_4C_4 , ce qui lui confère une activité transactivatrice. Les doigts de zinc (ZF) 6 et 7 participent à la liaison à l'ADN. (B) La liaison de hZac1 au motif $G_4N_6G_4$ lui confère une activité de répresseur. (C) La liaison de hZac1 à des motifs répétés $(G_4N_6G_4)_2$ conduit à sa dimérisation et lui confère une activité transactivatrice. Les doigts de zinc (ZF) 2, 3, 4, 6 et 7 participent à la liaison à l'ADN. D'après Hoffmann *et al.*, 2003.

Bilanges et ses collaborateurs ont décrit un nouveau variant de transcrit de hZac1 auquel il manque deux doigts de zinc, Zac Δ 2 (Bilanges *et al.*, 2001). Zac Δ 2 montre également une capacité de fixation à l'ADN et une activité transactivatrice. Zac Δ 2 se lie au motif G_4C_4 avec une plus grande affinité que hZac1. Par contre, ne possédant pas les doigts de zinc 1 et 2 N-terminaux de hZac1, il ne sait pas se lier au motif $G_4N_6G_4$. Contrairement à l'apoptose qu'il induit très faiblement, Zac Δ 2 induit plus fortement l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 que hZac1 (Bilanges *et al.*, 2001). Ces observations laissent penser que l'activité biologique de hZac1 pourrait dépendre du site de fixation à l'ADN qu'il reconnaît. En se liant au motif G_4C_4 , tout comme Zac Δ 2, hZac1 pourrait induire préférentiellement l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Par contre, en se liant au motif $G_4N_6G_4$, il pourrait induire préférentiellement l'apoptose (Bilanges *et al.*, 2001 ; Hoffmann *et al.*, 2003) (Figure 5).

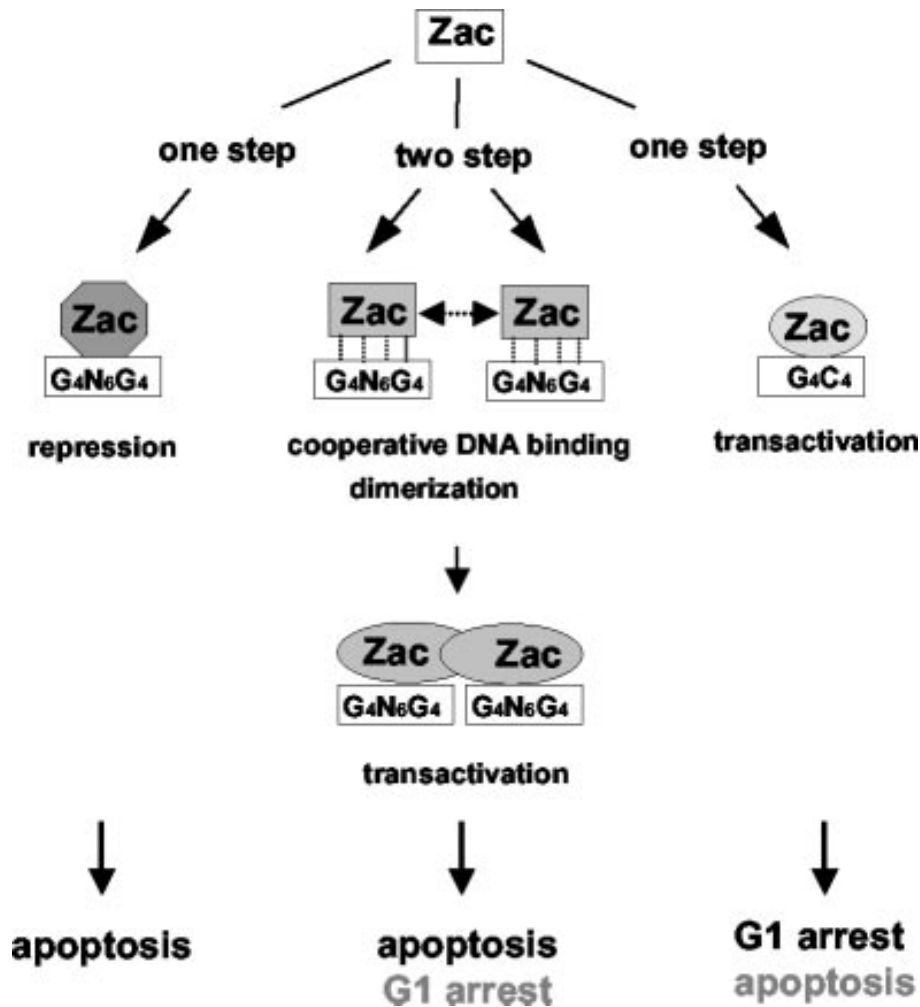


Figure 5. Activité biologique de hZac1 spécifique aux motifs de liaison à l'ADN reconnus. La liaison de hZac1 à la séquence palindromique G_4C_4 induirait préférentiellement l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, tout comme l'exemple de Zac $\Delta 2$. Par contre, la liaison de hZac1 au motif $G_4N_6G_4$ ou au motif répété $(G_4N_6G_4)_2$ conduirait plutôt à l'apoptose. D'après Hoffmann et al., 2003.

Les quelques gènes cibles de Zac1 mis en évidence sont impliqués soit dans le développement embryonnaire, soit dans le contrôle de la prolifération cellulaire tels que p21^{WAF1/CIP1} et Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) (Abdollahi et al., 1999 ; Barz et al., 2006 ; Huang et al., 2007 ; Yuasa et al., 2010).

En plus d'être un facteur de transcription, Zac1 pourrait intervenir dans la transcription de certains gènes en tant que co-régulateur (Huang et Stallcup, 2000).

Les récepteurs nucléaires sont des récepteurs qui jouent un rôle clé dans la croissance cellulaire, la différenciation, l'homéostasie et le développement. L'activité des récepteurs

nucléaires est régulée par des co-activateurs et répresseurs jouant un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes ciblés. Le variant murin mZac1b agit comme un co-régulateur de récepteurs nucléaires hormonaux, capable de se lier directement aux co-activateurs, p160 et CREB binding protein (CBP)/p300 (Huang et Stallcup, 2000).

En plus de recruter les facteurs initiant la transcription, le co-activateur CBP/p300 présente une activité d'histone acétyl-transférase (HAT) qui acétyle les résidus des acides aminés lysines des histones, permet la décompaction de la chromatine et de ce fait favorise la transcription des gènes. En se liant à CBP/p300, mZac1 régule l'activité HAT du co-activateur en augmentant son activité catalytique (Hoffmann *et al.*, 2006). Le suppresseur de tumeur p73 est capable de recruter hZac1 avec les co-activateurs p300 et le facteur associé à CBP/p300 (PCAF) au niveau du promoteur de p21^{Cip1}. hZac1 sert à stabiliser l'association entre p300 et PCAF et à augmenter l'activité catalytique de PCAF (Hoffmann et Spengler, 2008) (Figure 6).

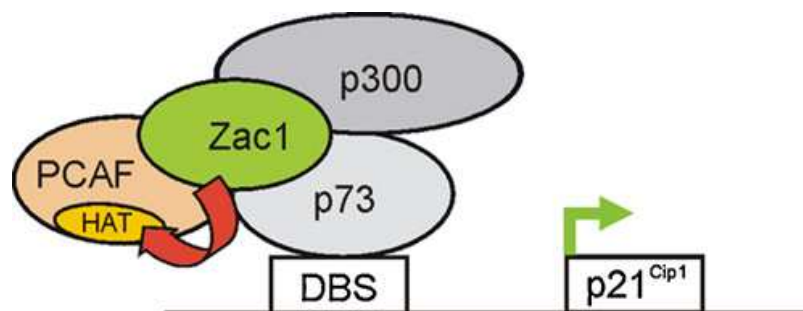


Figure 6. Contrôle de l'activité de PCAF par le co-activateur hZac1. Le suppresseur de tumeurs p73 recrute hZac1 ainsi que les co-activateurs p300 et PCAF au niveau du promoteur de p21^{Cip1} (DSB). hZac1 stabilise l'association entre p300 et PCAF et augmente l'activité catalytique HAT de PCAF. D'après Hoffmann et Spengler, 2008.

hZac1 a été défini comme un co-activateur de p53 (Huang *et al.*, 2001). Il peut se lier à p53 et augmenter son activité transcriptionnelle, notamment au niveau des promoteurs des gènes codant pour Apoptosis protease-activating factor-1 (Apaf-1) et p21^{WAF1/Cip1} (Huang *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2008 ; Rozenfeld-Granot *et al.*, 2002). hZac1 interagit également, dans les cellules Hela, avec la protéine E2 du papillomavirus, capable de réguler l'activité transcriptionnelle de p53 (Wu *et al.*, 2007).

Comme le montre la Figure 7, mZac1 et hZac1 ont le même domaine de liaison à l'ADN, qui correspond à leurs 7 doigts de zinc. Les domaines de transactivation et de liaison

aux co-activateurs de mZac1 correspondent respectivement, à la région riche en proline qui lui est spécifique et au début de son extrémité C-terminale. Par contre, les domaines de transactivation et de liaison aux co-activateurs de hZac1 sont localisés tous les deux en début d'extrémité C-terminale (Theodoropoulou *et al.*, 2010).

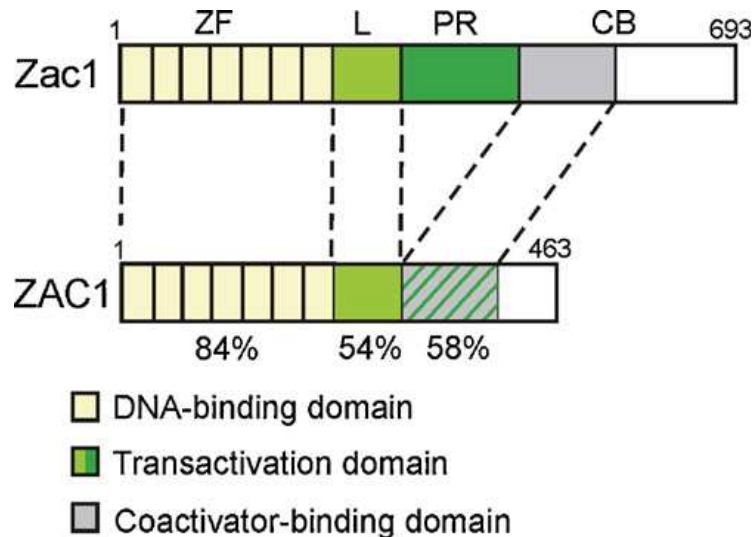


Figure 7. Schéma des protéines mZac1 et hZac1. Les domaines sont encadrés et les nombres représentent les acides aminés. L'homologie (en %) entre Zac1 humain et murin est indiquée. mZac1 et hZac1 contiennent toutes les deux 7 doigts de zinc (ZF) qui interviennent dans la liaison à l'ADN. Le linker (L) confère une activité transactivatrice avec la région riche en proline (PR) spécifique à la souris. La partie N-terminale de l'extrémité C-terminale contient le domaine de liaison des co-activateurs (CB) qui recrute les co-activateurs p300/CBP. Chez l'humain, le domaine CB est à la fois le domaine de liaison des co-activateurs et le domaine de transactivation. D'après Theodoropoulou *et al.* 2010.

1.6. Zac1, gène soumis à l'empreinte

Zac1 est un gène soumis à l'empreinte génomique, localisé dans la région chromosomique 6q24-25 chez l'humain et sur le chromosome 10A chez la souris. Seul son allèle paternel est exprimé. Son promoteur maternel est méthylé, ce qui empêche l'expression de Zac1 sur l'allèle correspondant (Kamiya *et al.*, 2000 ; Piras *et al.*, 2000).

Un gène soumis à l'empreinte est, dans les conditions normales, exprimé uniquement à partir de l'allèle paternel ou de l'allèle maternel (expression monoallélique du gène). L'empreinte parentale est due à des modifications épigénétiques de l'ADN. La principale modification épigénétique en rapport avec l'empreinte parentale est la méthylation de l'ADN

au niveau des résidus cytosines précédant un résidu guanine (îlots CpG). Cette méthylation est contrôlée par des ADN méthyltransférases (DNMT) qui catalysent le transfert d'un groupement méthyl (CH₃) sur les résidus cytosines de l'ADN, produisant de la 5-méthylcytosine (Figure 8). La méthylation de l'ADN aboutit à une compaction des nucléosomes, empêchant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes et aboutissant à une répression transcriptionnelle (Ohlsson *et al.*, 1998 ; Reik et Walter, 1998 ; Surani, 1998).

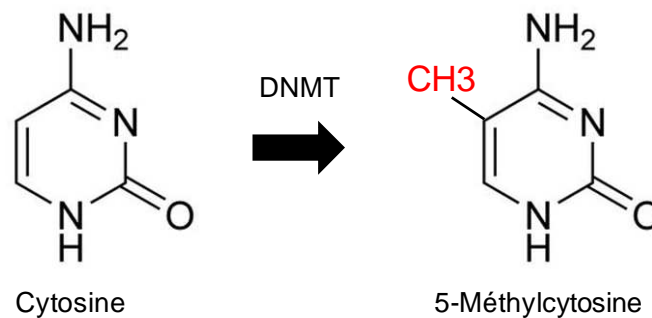


Figure 8. Méthylation de l'ADN contrôlée par les ADN méthyltransférases (DNMT). D'après Reik et Walter, 1998.

De nombreux gènes soumis à l'empreinte sont impliqués dans la croissance fœtale et le développement placentaire. Des anomalies de l'empreinte peuvent donner lieu à des syndromes génétiques bien caractérisés, des anomalies du développement et certains cancers. Par conséquent, Zac1 a été suspecté d'être impliqué dans le développement embryonnaire ainsi que dans certaines maladies telles que le cancer et le diabète néonatal (Abdollahi *et al.*, 1999 ; Kamikihara *et al.*, 2005 ; Temple et Shield, 2002).

1.7. Zac1 et le développement embryonnaire

Plusieurs études ont montré que Zac1 est fortement exprimé durant le développement embryonnaire et postnatal dans divers organes (dont principalement le cerveau), lui suggérant un rôle dans la neurogenèse, la chondrogenèse, la myogenèse et la rétino-genèse (Alam *et al.*, 2005 ; Ciani *et al.*, 2003 ; Contestabile *et al.*, 2005 ; Fila *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2007a ; Maebayashi *et al.*, 1999 ; Tsuda *et al.*, 2004 ; Valente et Auladell, 2001 ; Valente *et al.*, 2004 ; Valente *et al.*, 2005).

En 2006, Varrault et ses collaborateurs ont mis au point une souris déficiente pour Zac1. Ils ont ciblé la région codant pour les doigts de zinc N-terminaux en délétant le premier exon

codant ainsi que la portion 5' du second exon codant. Ils ont généré les 4 génotypes possibles ($Zac1^{+/+}$, $Zac1^{-/-}$, $Zac1^{+/-mat}$ et $Zac1^{+/-pat}$) par différents croisements. Comme attendu pour un gène maternellement réprimé, les souris hétérozygotes $Zac1^{+/-mat}$ ne présentent pas de phénotype. Par contre, les souris hétérozygotes $Zac1^{+/-pat}$ héritent d'un allèle maternel qui n'exprime pas *Zac1* et sont déficientes pour ce gène. Aucun transcrite de *Zac1* n'est détecté dans les différents organes de souris hétérozygotes $Zac1^{+/-pat}$. Les souris déficientes $Zac1^{-/-}$ et $Zac1^{+/-pat}$ possèdent donc le même phénotype. L'inactivation du gène *Zac1* chez la souris conduit à une restriction de leur croissance intra-utérine responsable d'une réduction de leur poids de 11% à 16,5 jours de gestation et de 23% à leur naissance. Le poids des différents organes reste proportionnel au poids total de l'embryon, excepté pour leur foie et leurs poumons qui sont de plus petites tailles. Les nouveaux nés déficients $Zac1^{-/-}$ et $Zac1^{+/-pat}$ ont également une peau ridée et une queue en tire-bouchon. Ils présentent des malformations osseuses au niveau des vertèbres caudales, des chevilles et des dernières phalanges. Les souris déficientes $Zac1^{-/-}$ et $Zac1^{+/-pat}$ présentent une létalité néonatale. Le croisement entre un mâle hétérozygote $Zac1^{+/-}$ avec une femelle sauvage $Zac1^{+/+}$ engendre une portée comprenant à la naissance 50% de souriceaux $Zac1^{+/+}$ et 50% de souriceaux $Zac1^{+/-pat}$ comme attendu selon les lois de Mendel. Par contre, 70% des souriceaux $Zac1^{+/-pat}$ meurent durant les 3 premiers jours de la vie suite certainement à une mauvaise formation des poumons. Les 30% restants atteignent l'âge adulte tout à fait normalement. Aucun caractère phénotypique n'a été mis en évidence chez les souris déficientes $Zac1^{+/-pat}$ et $Zac1^{-/-}$ adultes (Varrault *et al.*, 2006).

1.8. Zac1, gène candidat suppresseur de tumeurs

Les connaissances acquises ces dernières années dans le domaine de l'oncologie indiquent que le cancer résulte de l'altération des mécanismes de contrôle de la prolifération des cellules. Cette altération peut être d'origine exogène, comme dans le cas des cancers causés par des virus, mais elle résulte le plus souvent de la mutation ou de la modification de l'expression de certains gènes cellulaires dont les produits sont essentiels au contrôle de la prolifération. Parmi ces gènes, on distingue classiquement les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes). Les oncogènes codent des protéines qui activent la prolifération cellulaire. Leur activité est essentielle au cours du développement ou lors des processus normaux de régénération tissulaire, mais ils ne sont que peu ou pas actifs dans les cellules différenciées. La mutation de ces oncogènes peut entraîner leur activation permanente et inopportune. Les cellules renfermant ces gènes mutés ont alors une tendance plus forte à proliférer et, donc, à former des tumeurs. Les produits des gènes suppresseurs de tumeurs

contrebalancent les effets de l'activation des oncogènes de deux manières différentes : soit ils inhibent directement la prolifération cellulaire, soit ils éliminent les cellules qui prolifèrent de façon non contrôlée en induisant un programme génétique qui aboutit au " suicide " de la cellule (mort cellulaire programmée ou apoptose). Il apparaît maintenant que la cancérisation nécessite à la fois l'activation constitutive d'un oncogène et l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs (Vogelstein et Kinzler, 2004).

Un des exemples les plus connus de suppresseur de tumeurs est p53. p53 est capable d'inhiber la croissance de cellules tumorales *in vitro* (Baker *et al.*, 1990) et de diminuer leur tumorigénicité (Chen *et al.*, 1990). Le gène codant pour p53, Trp53 est muté dans la moitié des tumeurs humaines (Hollstein *et al.*, 1991 ; Nigro *et al.*, 1989) et dans les 50% restantes, des mutations affectent l'activité ou les niveaux d'expression de régulateurs de p53 (Levine, 1997). Enfin, la perte de p53 chez la souris prédispose grandement celle-ci à développer des tumeurs (Donehower *et al.*, 1992 ; Jacks *et al.*, 1994). Zac1 est souvent comparé à p53 du fait qu'il est le seul autre facteur de transcription capable d'induire par des voies différentes et indépendantes, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou l'apoptose (Spengler *et al.*, 1997). De plus, hZac1 pourrait être un gène cible de p53, vu qu'il possède des motifs de liaison pour p53 sur son promoteur (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2002).

Zac1 est un gène candidat suppresseur de tumeurs (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998). La perte d'expression de l'ARNm de Zac1 a été observée dans de nombreuses tumeurs telles que les tumeurs de l'ovaire (Abdollahi *et al.*, 1997a ; Abdollahi *et al.*, 1997b ; Cvetkovic *et al.*, 2004), du sein (Bilanges *et al.*, 1999), de l'hypophyse (Pagotto *et al.*, 1999), de la tête et du cou (Koy *et al.*, 2004), de la peau (Basyuk *et al.*, 2005), des chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques (Poulin et Labelle, 2005) et des carcinomes hépatocellulaires (Midorikawa *et al.*, 2006).

L'augmentation artificielle de l'expression de hZac1 dans des lignées cellulaires provenant de tumeurs du sein et de l'ovaire, inhibe la croissance cellulaire tumorale à travers l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998), selon une voie dépendante ou non de p53 (Kamikihara *et al.*, 2005).

Le gène codant pour hZac1 est localisé dans la région chromosomique 6q24-25 (Varrault *et al.*, 1998), une région impliquée dans le développement de nombreuses tumeurs solides (Fujii *et al.*, 1996 ; Taguchi *et al.*, 1993 ; Theile *et al.*, 1996 ; Thrash-Bingham *et al.*,

1995). Ce gène est soumis à l’empreinte génomique et l’inactivation de l’allèle paternel est donc suffisante pour réprimer la transcription de hZac1 (Kamiya *et al.*, 2000). Dans certaines tumeurs, l’inactivation du gène hZac1 est due à des délétions (Aguiari *et al.*, 1999 ; Cvetkovic *et al.*, 2004 ; Lemeta *et al.*, 2006). Cependant, des études ont montré une perte d’expression de hZac1 dans plusieurs cancers ne présentant pas de délétion dans la région 6q24-25 (Kamikihara *et al.*, 2005 ; Pagotto *et al.*, 2000). Zac1 peut en effet être aussi régulé épigénétiquement dans le cancer (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Bilanges *et al.*, 1999 ; Kamikihara *et al.*, 2005 ; Varrault *et al.*, 2001). La plupart des gènes soumis à l’empreinte génomique contiennent des îlots CpG différemment méthylés sur les deux allèles. L’allèle paternel du gène hZac1 peut subir une hyperméthylation des îlots CpG au niveau de son promoteur, qui empêche sa transcription (Abdollahi *et al.*, 2003 ; Kamikihara *et al.*, 2005). Le traitement de lignées cellulaires cancéreuses avec des agents déméthylants tels que le 2-deoxy-azacytidine conduit d’ailleurs à une réexpression de l’ARNm de hZac1 (Bilanges *et al.*, 1999 ; Kamikihara *et al.*, 2005).

1.9. Zac1, membre de la famille PLAG

Zac1 appartient à la famille Pleiomorphic Adenoma Gene (PLAG) de par sa forte analogie de structure avec les deux autres membres de cette famille, PLAG1 et PLAGL2. La famille PLAG constitue une nouvelle sous-famille de protéines à doigts de Zinc, capables de reconnaître l’ADN et de réguler la transcription. hZac1 possède des similarités de séquence avec PLAG1 et PLAGL2 surtout au niveau de ses doigts de Zinc à l’extrémité N-terminale. Quatre acides aminés (STSY) en début d’extrémité C-terminale restent également conservés chez les 3 membres (Kas *et al.*, 1998) (Figure 9).

A l’opposé de Zac1, PLAG1 et PLAGL2 sont des proto-oncogènes qui, en situation normale, ne sont exprimés que dans les tissus fœtaux. Le gène codant pour PLAG1 est localisé dans la région chromosomique 8q12, région cible d’un réarrangement chromosomique dans les adénomes pléiomorphiques des glandes salivaires (Kas *et al.*, 1998).

La différence fonctionnelle entre hZac1 et les deux autres membres de la famille PLAG est due à la spécificité de leur liaison à l’ADN. PLAG1 et PLAGL2 reconnaissent, comme hZac1, des motifs nucléotidiques riches en GC mais ceux-ci doivent impérativement être suivis d’un cluster G. Le facteur de transcription hZac1 cible donc des gènes différents que PLAG1 et PLAGL2 (Hensen *et al.*, 2002).

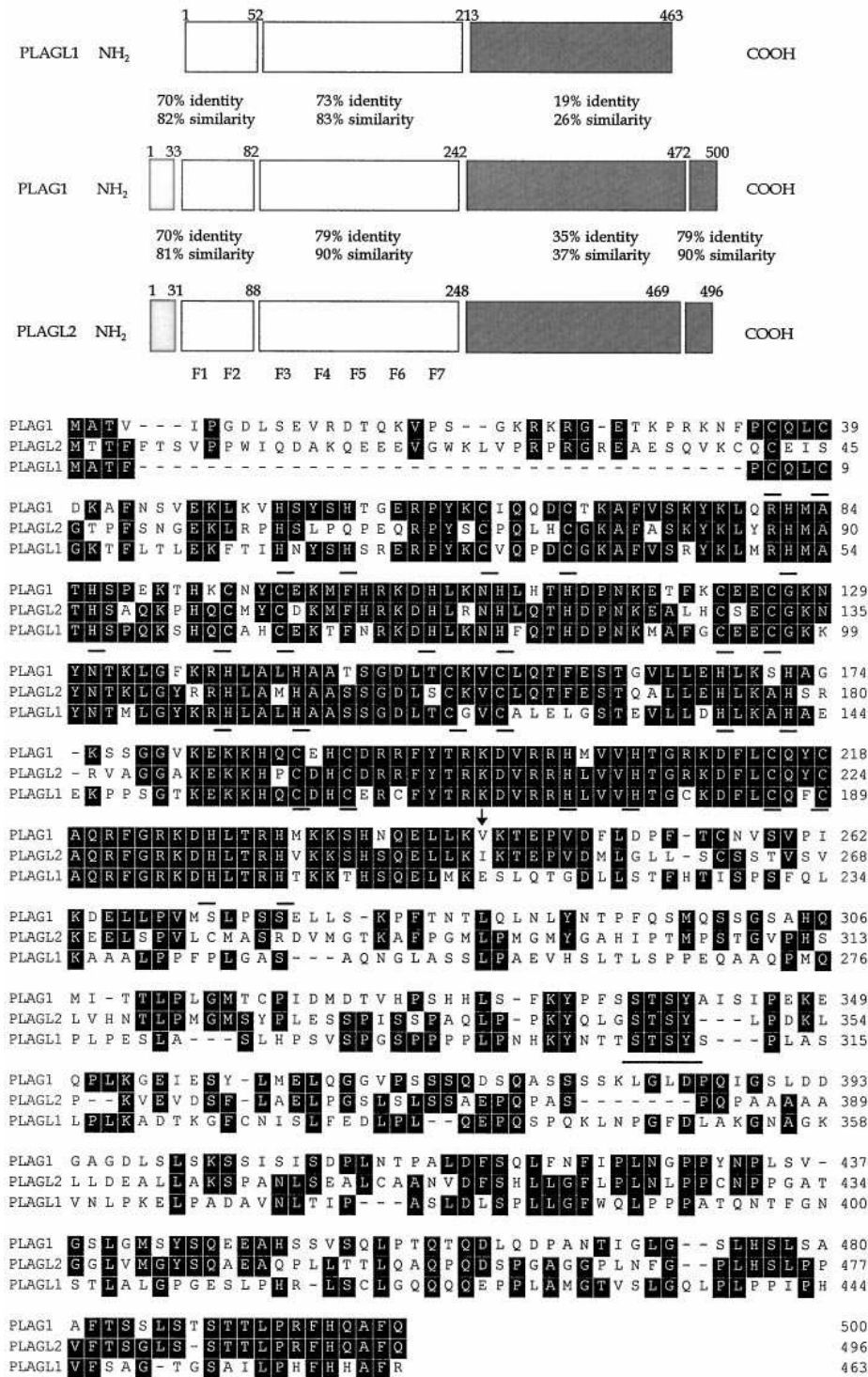


Figure 9. Comparaison des séquences protéiques de hZac1 (PLAGL1), PLAG1 et PLAGL2. Schéma des protéines de la famille PLAG et alignement des séquences en acides aminés de PLAG1, PLAGL2 et hZac1 (PLAGL1). Le pourcentage d'identité et de similarité des différents domaines sont mentionnés. Les résidus conservés sont surlignés. La flèche représente la limite entre les doigts de zinc et le domaine de transactivation. D'après Kas et al., 1998.

1.10. Etude de Zac1 dans notre laboratoire

Alors que la durée de vie des cellules dendritiques (CDs) immatures dans les tissus périphériques est longue, les CDs matures ayant migré dans les ganglions régionaux meurent par apoptose en moins de trois jours (Stoll *et al.*, 2002). Notre laboratoire, en collaboration avec celui du Dr Muriel Moser (Institut de Biologie et de Médecine Moléculaire, Université Libre de Bruxelles), a comparé le transcriptome des CDs matures à celui des CDs immatures par la technique de microarray. Les CDs que nous avons utilisées étaient des CDs immatures murines isolées de la rate. Nous avons pu les faire murer en les mettant en culture *in vitro* durant toute une nuit. Nous avons observé une forte modulation de l'expression de *Zac1*, un gène potentiellement impliqué dans l'apoptose. En effet, *Zac1* est surexprimé dans les CDs matures. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR quantitative. Bien qu'il semble que la durée de vie des CDs matures dans les organes lymphoïdes conditionne l'ampleur et l'orientation de la réponse immune, les mécanismes moléculaires régulant la survie des CDs sont peu connus. Ces résultats préliminaires suggèrent que l'augmentation de l'expression de *Zac1* lors de la maturation des CDs pourrait déclencher l'apoptose des CDs dans les organes lymphoïdes et participer ainsi à la régulation de la réponse immune. Pour répondre à ce projet, notre laboratoire (en association avec le Dr Stéphane Schurmans, FMV, ULG) a généré une souris dans laquelle *Zac1* peut être invalidé de manière conditionnelle. Notre objectif est d'invalider *Zac1* spécifiquement au niveau des cellules dendritiques à l'aide d'une *CD11c-Cre*. L'élaboration de cette souris transgénique étant actuellement terminée, nous pourrons l'utiliser afin d'étudier le rôle potentiel de *Zac1* dans l'apoptose des CDs matures.

2. IMMUNITE INNEE ANTIVIRALE

2.1. *Immunité innée et immunité adaptative*

Les défenses immunitaires de l'organisme sont devenues de plus en plus complexes au fur et à mesure de l'évolution des espèces afin de combattre des agents pathogènes évoluant également sans cesse. Le système immunitaire des vertébrés est constitué de deux bras : l'immunité innée et l'immunité adaptative (ou spécifique). La recherche en immunologie a été dominée ces dernières décennies par les travaux portant sur la compréhension des mécanismes de l'immunité adaptative, dont l'origine évolutive est plus récente. Le rôle des lymphocytes B et des lymphocytes T, et de leurs récepteurs des antigènes spécifiques a notamment été défini (Janeway, 2001). Au cours du développement des cellules, un mécanisme de recombinaison de gènes génère dans chaque lymphocyte un récepteur de l'antigène possédant un site de reconnaissance unique. L'infection induira ensuite une expansion clonale des lymphocytes dont les récepteurs reconnaissent un antigène exprimé par l'agent infectieux, permettant une réponse adaptée, ou spécifique, à ce germe (Imler et Hoffmann, 2001).

Jusqu'au milieu des années nonante, l'immunité adaptative était définie comme le seul élément essentiel dans la défense des vertébrés contre les micro-organismes infectieux. L'immunité innée était, en effet, considérée comme le mécanisme de défense des organismes moins évolués. Cependant, malgré sa très grande spécificité, le système adaptatif ne permet pas à lui seul de contrôler les infections. En effet, l'amplification clonale des lymphocytes naïfs et leur différenciation en cellules effectrices prennent plusieurs jours, alors que de nombreux agents infectieux ont des temps de génération qui peuvent n'être que de quelques dizaines de minutes (Imler et Hoffmann, 2001 ; Janeway, 2001 ; Janeway et Medzhitov, 2002).

Ces 20 dernières années, des études ont également mis en lumière les fonctions primordiales de la réponse immune innée dans ce domaine. L'immunité innée est la première réponse que l'organisme oppose à l'infection. Elle constitue une réaction rapide, non spécifique et indépendante d'une exposition préalable de l'organisme à l'agent pathogène (Imler et Hoffmann, 2001 ; Janeway, 2001 ; Janeway et Medzhitov, 2002).

2.2. Immunité innée et récepteurs PRRs

Dès 1989, Charles Janeway a postulé l'existence de récepteurs, les Pattern recognition receptors (PRRs) reconnaissant des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de micro-organismes, les Pathogen associated molecular pattern (PAMPs), et activant la réponse immune innée (Janeway, 1989). Ces PAMPs seraient caractérisés par les trois propriétés suivantes : (i) ils sont absents de la cellule hôte ; (ii) ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes, ce qui permet de reconnaître l'énorme diversité de microbes par un nombre restreint de récepteurs ; (iii) ils sont essentiels à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance. L'identité moléculaire des récepteurs PRRs restera inconnue jusque la découverte des récepteurs Toll-Like (TLRs) (Akira *et al.*, 2001 ; Janeway et Medzhitov, 2002).

2.3. Récepteurs Toll-like

2.3.1. Description générale

Les récepteurs Toll-like (TLRs) sont des récepteurs PRRs membranaires qui reconnaissent des PAMPs de divers agents pathogènes et jouent un rôle clé dans l'activation de la réponse immune innée et adaptative. Ils tiennent leur nom de leur analogie structurelle et fonctionnelle avec le récepteur Toll de la drosophile, découvert en 1996, capable d'induire une réponse immune antifongique (Lemaitre *et al.*, 1996).

Les récepteurs TLRs sont des protéines transmembranaires comprenant 3 domaines : un domaine extracellulaire riche en leucine, spécifique à chaque TLR et qui participe à la reconnaissance des PAMPs ; un domaine transmembranaire riche en cystéine ; et un domaine intracytoplasmique TIR (Toll/IL-1R/R) que l'on retrouve chez les membres de la famille du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R) et qui participe aux interactions protéine-protéine (Imler et Hoffmann, 2001) (Figure 11).

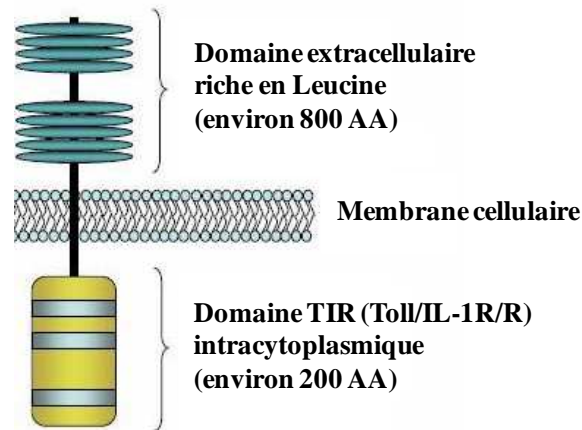


Figure 11. Structure protéique générale des TLRs. Les récepteurs TLRs sont des protéines transmembranaires constituées par un domaine extracellulaire riche en leucine d'environ 800 acides aminés (AA) qui est spécifique à chaque TLR, une partie transmembranaire riche en cystéine et un domaine intracytoplasmique, d'environ 200 AA, que l'on retrouve chez les membres de la famille du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R), nommé TIR (Toll/IL-1R/R). D'après Imler, 2004.

Treize TLRs ont été clonés chez les mammifères (10 chez l'humain et 13 chez la souris) et chaque récepteur semble impliqué dans la reconnaissance de PAMPs spécifiques, provenant de bactéries, virus, champignons ou protozoaires (Beutler, 2004 ; Medzhitov *et al.*, 1997). Ils sont exprimés dans beaucoup de types cellulaires dont principalement les cellules du système immunitaire inné et les cellules ayant un contact avec le milieu extérieur. Les TLRs 1 à 9 sont conservés chez l'homme et chez la souris. Le TLR10 est présent seulement chez l'humain et le TLR11 n'est fonctionnel que chez la souris. Les ligands PAMPs des TLRs 1 à 9 et 11 sont bien connus, contrairement aux ligands des TLRs 10, 12 et 13 qui doivent encore être définis. Certains TLRs peuvent former des hétérodimères entre eux, ce qui leur permet d'élargir le spectre de PAMPs reconnus (Beutler, 2004).

Dans le cadre de la reconnaissance de PAMPs d'origine bactérienne, l'hétérodimère TLR2/1 lie des lipopeptides triacylés alors que le dimère TLR2/6 lie des lipopeptides diacylés et des acides lipotéichoïques. L'homodimère TLR2 reconnaît le peptidoglycane, des lipopolysaccharides (LPS) atypiques, la moduline phenol soluble de *Staphylococcus epidermidis*, et des porines de *Neisseria*. De plus, les TLRs 4, 5 et 9 lient respectivement les

LPS, la flagelline et les motifs CpG de l'ADN bactérien. Le TLR11 détecte des protéines non définies d'*Escherichia coli* uropathogénique.

Le TLR3 lie spécifiquement les ARN double brin (ARNdb) viraux alors que les ARN simple brin (ARNsb) viraux sont reconnus par les TLRs 7/8. Le TLR9 détecte les motifs CpG non méthylés de l'ADN viral. Le TLR4 semblerait également détecter la protéine de fusion du Virus Syncytial Respiratoire (RSV F).

Finalement, l'hétérodimère TLR2/6 détecte le zymosan fongique et des glycolipides (GIPLs) de *Trypanosoma cruzi*, et le TLR11 lie une protéine de *Toxoplasma gondii* (West et al., 2006) (Figure 12).

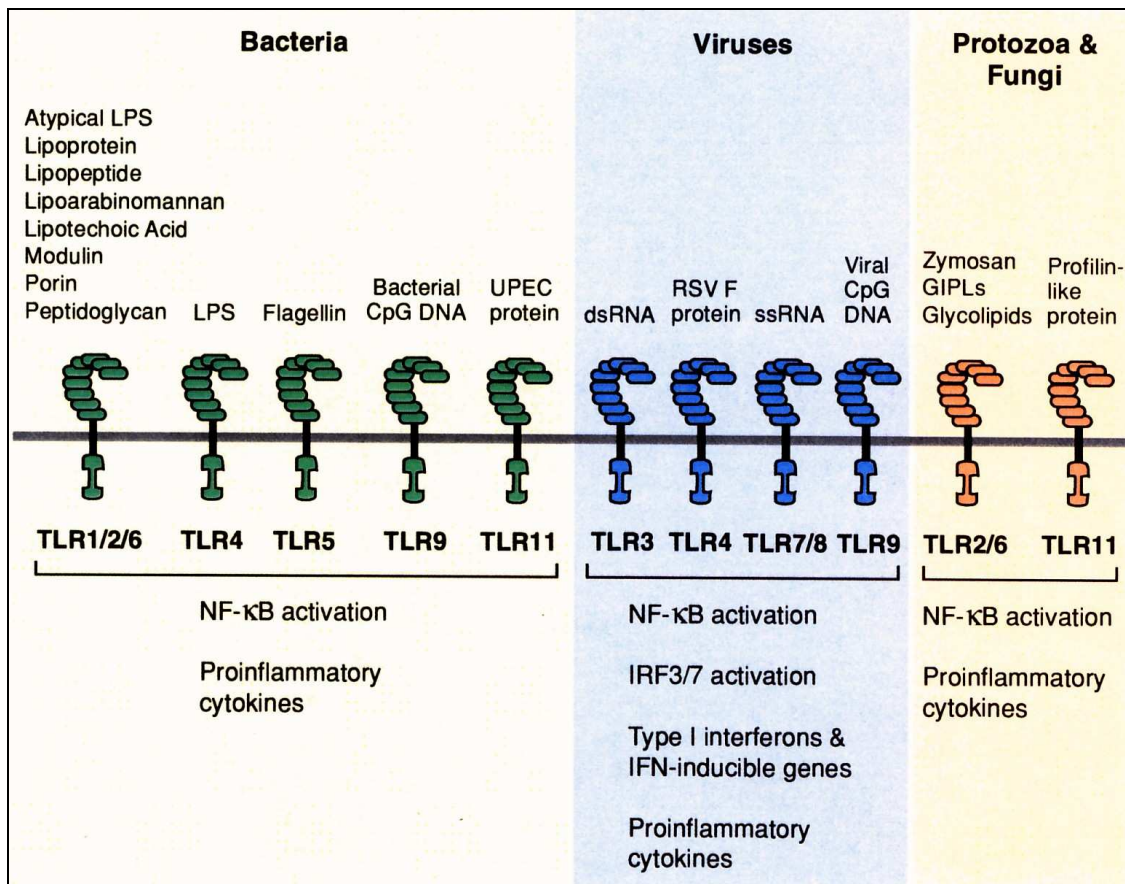


Figure 12. Les récepteurs Toll-like (TLR) et leurs ligands spécifiques chez les mammifères. D'après West et al., 2006.

Le domaine intracytoplasmique TIR des TLRs leur permet de se lier à des protéines adaptatrices possédant également un domaine TIR. De par cette propriété, les TLRs sont capables d'activer des voies de signalisation complexes qui conduisent à une réponse

immunitaire incluant la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 p40 et la production des interférons (IFNs) de type I.

Tous les TLRs, excepté le TLR3, utilisent la protéine adaptatrice Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) pour activer le Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) et des Interferon Regulatory Factors (IRFs). Cette voie dépendante de MyD88 conduit principalement à la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et donc à l'induction d'une réponse inflammatoire.

Les TLRs 3 et 4, qui reconnaissent respectivement les ARN double brin viraux et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négatives, ont la particularité de pouvoir emprunter une voie MyD88-indépendante en utilisant la protéine adaptatrice TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta (TRIF) (Fitzgerald *et al.*, 2003 ; Hoebe *et al.*, 2003 ; Oshiumi *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2002 ; Yamamoto *et al.*, 2003). Cette voie active les IRFs -3 et -7 et NF- κ B, et conduit principalement à la production d'IFNs de type I (Doyle *et al.*, 2002 ; Honda *et al.*, 2005 ; Kawai *et al.*, 2001 ; Kawai et Akira, 2010) (Figure 13).

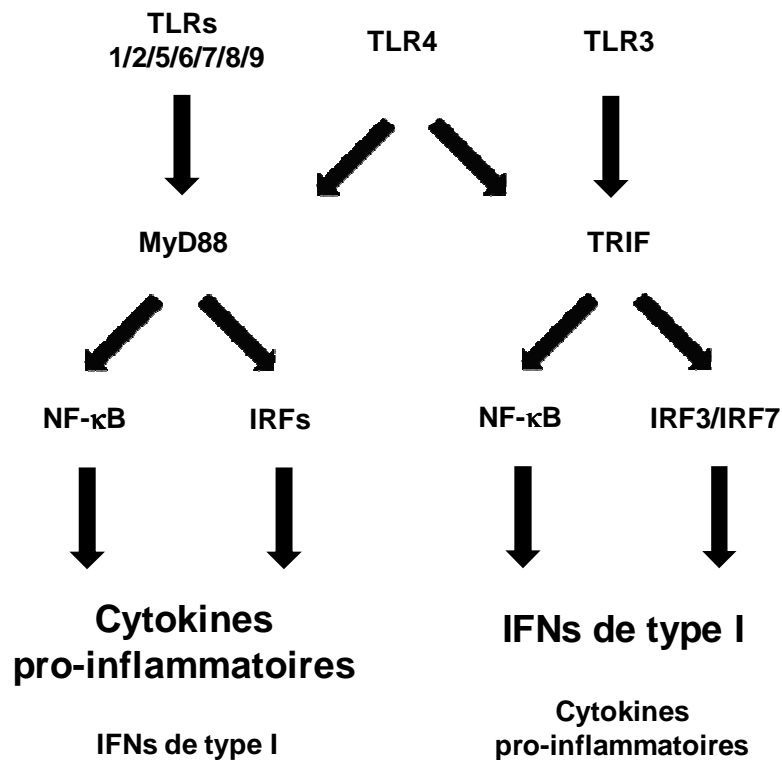


Figure 13. Représentation schématique et simplifiée des voies de signalisations activées par les récepteurs TLRs. D'après Latz et Fitzgerald, 2008.

2.3.2. TLRs impliqués dans la réponse antivirale

Un virus est une entité biologique qui nécessite une cellule hôte pour se multiplier. Il est composé d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique (soit d'ADN, soit d'ARN, simple ou double brin) entourées d'une coque de protéines, appelée la capside, et, parfois, d'une enveloppe. Les virus peuvent pénétrer dans la cellule par différents mécanismes. Les virus non enveloppés entrent dans la cellule par translocation en se liant à la membrane cellulaire et en y générant un pore. Tous les virus peuvent pénétrer dans la cellule lors de l'endocytose. Les virus sont capturés dans les vésicules endocytiques lors de la phagocytose ou pinocytose et entrent ensuite dans le cytoplasme par fusion ou destruction de la membrane endosomale. Certains virus enveloppés fusionnent également leur enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire et relarguent leur particule virale dans le cytoplasme (Hogle, 2002 ; Perry *et al.*, 2005) (Figure 14).

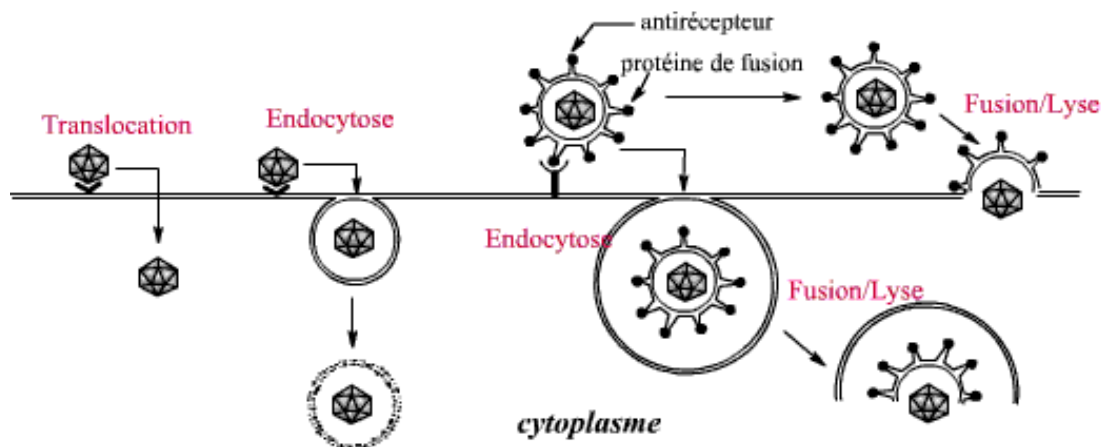


Figure 14. Description des différents mécanismes de pénétration d'un virus dans la cellule hôte. D'après Perry *et al.*, 2005.

Contrairement aux autres TLRs exprimés à la surface des cellules, les TLRs 3, 7/8 et 9, spécialisés dans la réponse antivirale, sont localisés stratégiquement dans les endosomes/lysosomes des cellules hôtes (Galiana-Arnoux et Imler, 2006 ; Kawai et Akira, 2010) (Figure 15).

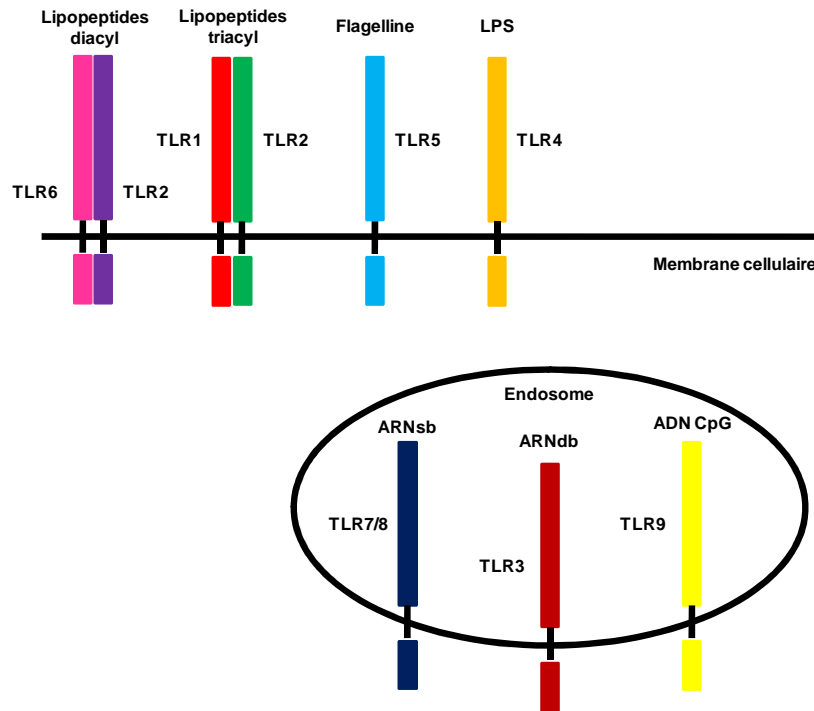


Figure 15. Représentation schématique de la localisation cellulaire des TLRs. Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent des composés microbiens protéiques ou lipidiques exogènes. Les TLRs 3, 7, 8 et 9, reconnaissent des acides nucléiques exogènes et sont localisés dans les endosomes/lysosomes des cellules hôtes. D'après Takeda *et al.*, 2005.

TLR3

Le TLR3 a été découvert à la base comme récepteur reconnaissant l'acide polyribonucloéique polyribocytidylique [poly(I:C)], un double brin d'ARN synthétique capable de mimer un ARN viral (Alexopoulou *et al.*, 2001). Par la suite, il a été montré que le TLR3 reconnaissait des ARN double brin (ARNdb) viraux correspondant à des intermédiaires de réplication des virus à ARN, dont par exemple, le virus de l'Encéphalomyocardite (EMCV) et le virus respiratoire syncytial (VRS) (Kawai et Akira, 2010).

L'initiation de la réponse antivirale débute lorsque l'ARNdb viral se lie à la surface extérieure du domaine extracellulaire du TLR3. La protéine adaptatrice TRIF, contenant un domaine TIR, s'associe alors avec le domaine TIR du récepteur TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Kawai et Akira, 2010).

D'une part, TRIF recrute les kinases IKKi/IKKε et Tank-binding kinase 1 (TBK1) qui phosphorylent et activent le facteur de transcription IRF3. Du à son changement conformationnel, IRF3 phosphorylé forme des dimères (homodimères ou hétérodimères avec IRF7) et interagit avec les co-activateurs CBP/P300 pour former un holocomplexe dans le noyau. Ce complexe se lie aux promoteurs des IFNs de type I afin d'induire leur expression (Honda et Taniguchi, 2006 ; Kawai et Akira, 2010 ; Weaver *et al.*, 1998 ; Yoneyama *et al.*, 1998).

D'autre part, TRIF conduit à l'activation du complexe de la kinase IκB (IKK) qui phosphoryle IκB et permet à NF-κB de migrer vers le noyau et d'induire l'expression de cytokines inflammatoires et des IFNs de type I (Kawai et Akira, 2010 ; Takeda, 2005) (Figure 16)

TLRs 7/8 et TLR 9

Les motifs CpG sont sous-représentés dans l'ADN des mammifères et sont dans la plupart des cas méthylés. Au contraire, les motifs CpG sont fréquemment rencontrés chez l'ADN de virus ou de bactéries et ne sont pas méthylés. Le TLR9 reconnaît spécifiquement des ADN viraux ou bactériens contenant des motifs CpG non méthylés (Kawai et Akira, 2010 ; Wagner, 2004). Les TLRs 7 et 8 sont initialement connus pour être activés par les imidazoquinolines qui sont des agents pharmacologiques antiviraux utilisés notamment pour soigner les infections aux Herpès. Ils reconnaissent également les ARN simple brin (ARNsb) des virus à ARN comme par exemple le virus de l'Influenza ou le Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV) (Akira, 2003).

Lors de la reconnaissance de leurs ligands spécifiques, les TLRs 7, 8 et 9 recrutent la protéine adaptatrice MyD88 qui possède un domaine TIR et s'associe avec le domaine TIR des TLRs 7, 8 ou 9. MyD88 induit plusieurs voies de signalisation différentes. D'une part, elle conduit à l'activation de NF-κB qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, le recrutement de MyD88 par les TLRs 7, 8 ou 9 engendre la phosphorylation et l'activation d'IRF7 qui participent à la production d'IFNs de type I (Diebold *et al.*, 2004 ; Kawai et Akira, 2010 ; Takeda, 2005) (Figure 16).

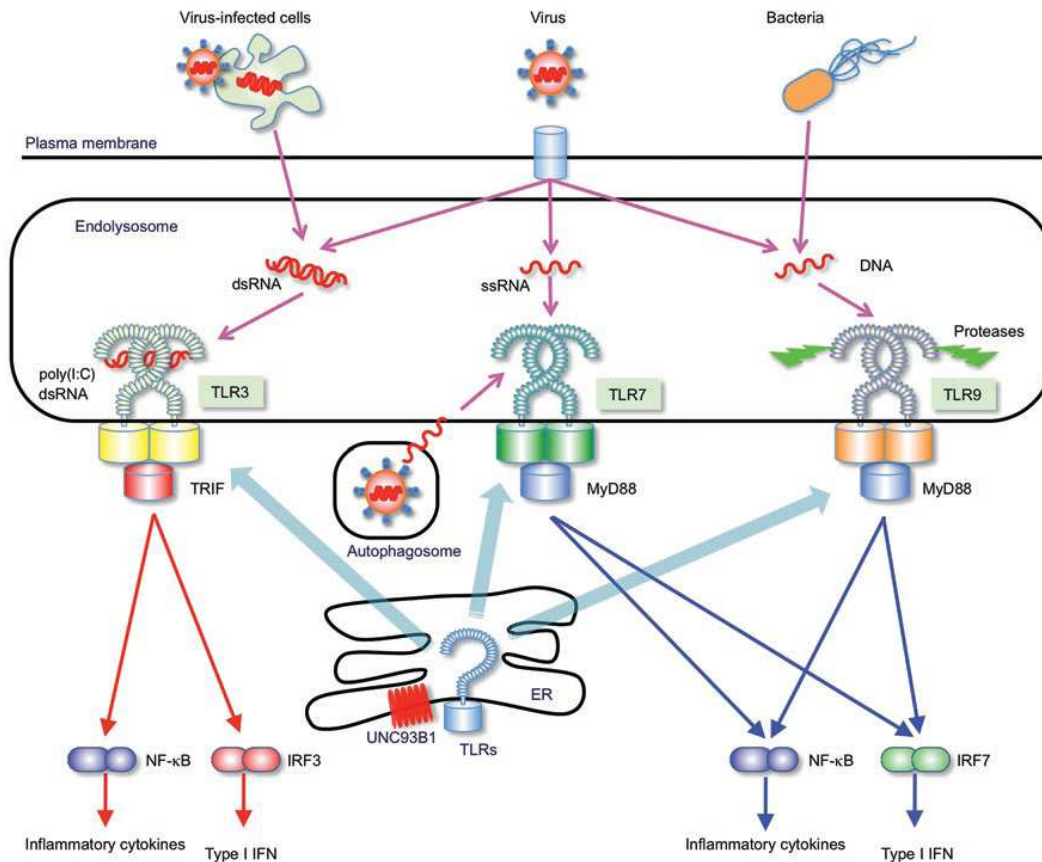


Figure 16. Reconnaissance de PAMPs par les TLRs intracellulaires. Le TLR3 reconnaît des ARN double brin (dsRNA) provenant de virus ou de cellules infectées par un virus. Le dsRNA se lie au domaine extracellulaire du TLR3 qui active une voie dépendante de TRIF qui, à son tour, induit l'expression des IFNs de type I et de cytokines inflammatoires. Le TLR7 reconnaît des ARN simple brin viraux (ssRNA) et active NF- κ B et IRF7 via une voie dépendante de MyD88, qui induisent, respectivement, la production de cytokines inflammatoires et des IFNs de type I. De plus, l'autophagie est impliquée dans la délivrance des ssRNA au niveau des vésicules exprimant le TLR7. Le TLR9 reconnaît l'ADN viral ou bactérien. Le clivage protéolytique du TLR9 est nécessaire pour activer sa voie de signalisation. Le TLR9 recrute MyD88 afin d'activer NF- κ B et IRF7. Les TLRs 3, 7 et 9 sont principalement localisés dans le réticulum endoplasmique (RE) et sont ensuite transportés vers les endo/lysosomes où ils se lient à leurs ligands. La protéine membranaire UNC93B1 interagit avec les TLRs dans le RE et est essentielle à leur transport. D'après Kawai et Akira, 2010.

TLRs 2 et 4

Les TLRs 2 et 4 sont capables de détecter des PAMPs de différents pathogènes. Ils peuvent être notamment impliqués dans la réponse antivirale en reconnaissant des protéines virales impliquées dans l'assemblage de la capsid ou dans l'interaction avec les cellules hôtes. Le TLR2 induirait l'expression de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'Herpès Virus Simplex de type 1 (HSV-1) et au cytomégalovirus (CMV). Cependant, TLR2 est incapable d'induire la production d'IFNs de type I (Compton *et al.*, 2003). Par contre, le TLR4 serait capable d'induire l'expression des IFNs de type I mais les molécules virales reconnues par le TLR4 n'ont pas encore été clairement définies (Jiang *et al.*, 2005).

2.4. Récepteurs PRRs cytosoliques

2.4.1. Description générale

Des récepteurs PRRs cytosoliques participent également à la reconnaissance des PAMPs et à l'induction de la réponse immunitaire : les Nucleotide-oligomerization domain leucin-rich repeat (NOD-LRR) et les Retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases (RLHs). La famille des NOD-LRR comprend plus de 20 membres qui reconnaissent divers PAMPs bactériens et déclenchent la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine IL-1 β . Ils permettent ainsi de contenir l'infection en induisant la mort des cellules infectées (Franchi *et al.*, 2009 ; Kawai et Akira, 2010). Les récepteurs RLHs ciblent les ARNdb et les ARNsb triphosphate viraux, et induisent l'expression des IFNs de type I. Ils sont présents dans la majorité des cellules de l'organisme. Parmi les RLHs, on retrouve Retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I), Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 (MDA5) et Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LPG2) (Kawai et Akira, 2008 ; Yoneyama et Fujita, 2009). La mise en évidence d'autres protéines cytoplasmique telles que DNA-dependent activator of IRFs (DAI), qui est capable de se lier à de l'ADNdb viral ou bactérien et d'activer IRF3, suggère l'existence également d'autres récepteurs cytoplasmiques détectant l'ADN de PAMPs au niveau du cytosol (Hornung et Latz, 2010 ; Rathinam *et al.*, 2010 ; Takaoka *et al.*, 2007).

2.4.2. RLHs

Les RLHs RIG-I et MDA5 comprennent des domaines de recrutement pour caspase, Caspase recruitment domains (CARDs) en N-terminal et un domaine hélicase DexD/H box en C-terminal. Ils interfèrent avec les ARNdb et les ARNsb triphosphate viraux grâce à leur domaine hélicase. Leurs domaines CARDs interviennent dans l'initiation de la réponse immune (Yoneyama *et al.*, 2005). Ils s'associent avec la protéine adaptatrice membranaire mitochondriale Interferon- β promoter stimulator 1 (IPS1) qui contient également un domaine CARD (Kawai *et al.*, 2005). IPS1 interagit avec l'ubiquitine ligase E3 TNF Receptor Associated Factor 3 (TRAF3) et active le complexe IKKi/IKK ϵ et TBK1 qui phosphorylent et activent IRF3 et IRF7, régulateurs clés de l'expression des IFNs de type I. IPS1 induit également l'activation de NF- κ B via Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) et une voie dépendante des caspases 8 et 10 (Takeuchi et Akira, 2007) (Figure 17).

Les RLHs semblent essentiels pour induire une réponse antivirale après infection avec de nombreux virus à ARN tels que le Virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV), le VSV, le virus de l'Influenza, le Reovirus, le virus de Sendai (SeV) ou l'EMCV (Saito et Gale, 2008). Tout comme le TLR3, les RLHs sont aussi activés après traitement au poly(I:C) (Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2006 ; Yoneyama *et al.*, 2004). Cependant, RIG-I et MDA5 ne reconnaissent pas tout à fait les mêmes ligands et de ce fait, cibleraient des virus à ARN différents. RIG-I reconnaît des ARNdb de petites tailles issus de la réplication virale de virus à ARN tels que le VSV, le SeV, le JEV et le virus de l'hépatite C. Certains virus, dont le virus de l'Influenza, phosphorylent leur ARNsb à son extrémité 5'. RIG-I est également capable de détecter ces ARNsb triphosphate. MDA5 se lie préférentiellement à des ARNdb de grandes tailles comme les intermédiaires de réplication de l'EMCV, du virus de la Dengue et du virus de West Nile (Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2005 ; Kato *et al.*, 2006 ; Saito et Gale, 2008). Cependant, la spécificité de réponse des RLHs face à différents types de virus semblerait être plus complexe. Une récente étude a démontré que l'inactivation de MDA5 chez des souris infectées au SeV augmenterait significativement la mort des souris infectées et la réplication virale. MDA5 serait donc indispensable à la survie de l'organisme après infection avec un Paramyxoviridae, normalement défini comme activant le récepteur RIG-I (Gitlin *et al.*, 2010).

Le troisième RLH, LPG2 ne possède pas de domaines de recrutement CARDs. Il servirait de régulateur positif ou négatif à la voie des RLHs en formant des hétérodimères avec RIG-I ou MDA5 (Saito et Gale, 2008).

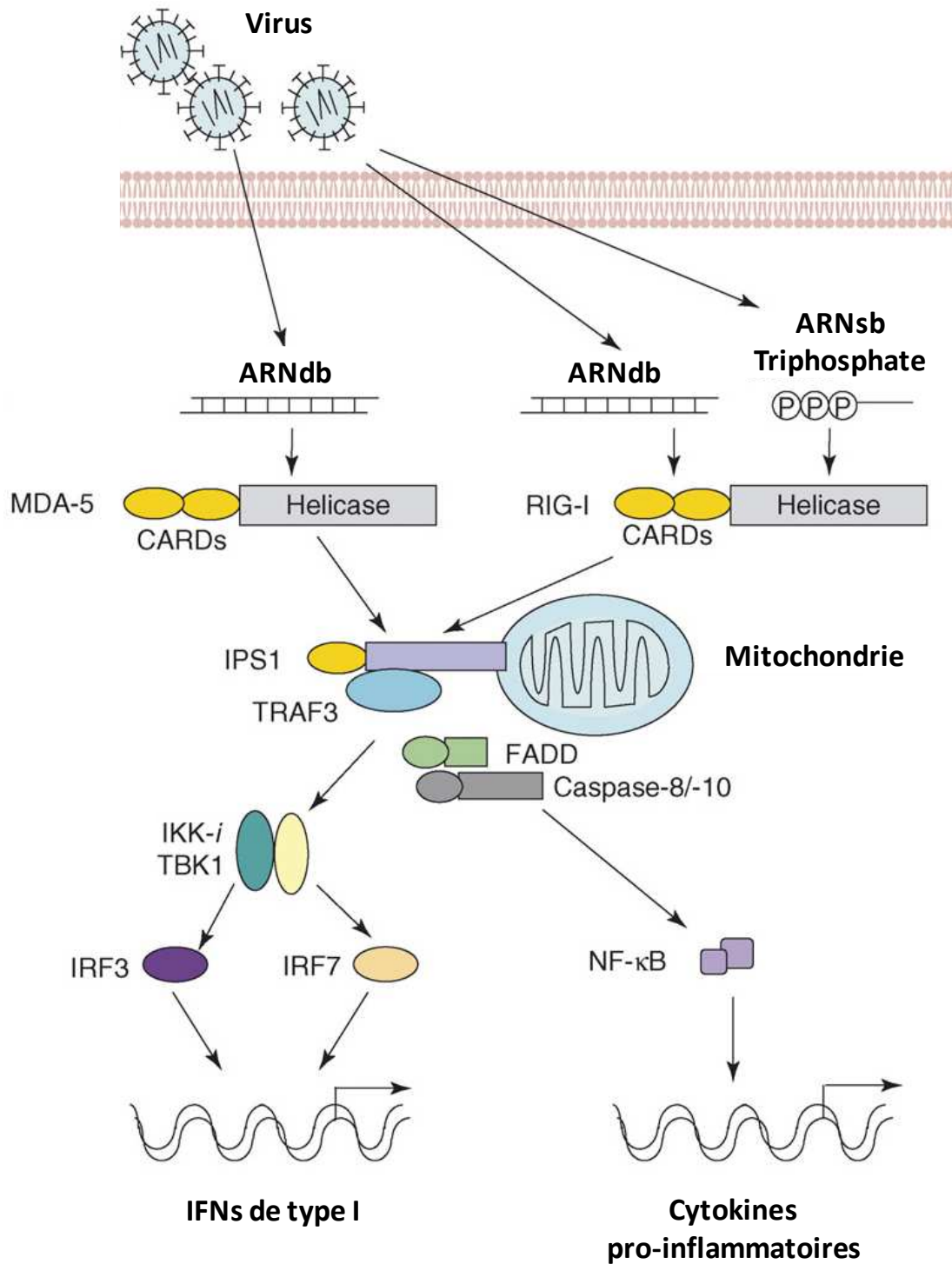


Figure 17. Représentation schématique de la voie de RIG-1 et MDA5. D'après Takeuchi et Akira, 2007.

2.5. Les IFNs de type I

2.5.1. Description générale

Les IFNs sont divisés en trois types distincts : types I, II et III (Pestka *et al.*, 2004). Les IFNs de type I se composent de plusieurs gènes incluant principalement les IFN- α , IFN- β (Taniguchi *et al.*, 1980), et d'autres tels que l'IFN- ω , l'IFN- ϵ et l'IFN- κ (Pestka *et al.*, 2004). Chez l'humain et la souris, il existe respectivement 13 et 14 gènes de la sous-famille de l'IFN- α . Par contre, on ne retrouve qu'un seul gène pour l'IFN- β (Weissmann et Weber, 1986). Les IFNs de type II font référence à l'IFN- γ . L'expression du gène de l'IFN- γ est typiquement induit dans les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T et les cellules Natural killer (NK) (Farrar et Schreiber, 1993). D'autres membres des IFNs tels que les IFN- λ_1 , - λ_2 , - λ_3 ont été identifiés et classés dans la famille des IFNs de type III (Honda *et al.*, 2006 ; Pestka *et al.*, 2004).

Les IFNs de type I sont les cytokines majeures de la réponse antivirale. Ils tiennent d'ailleurs leur appellation du fait qu'ils interfèrent avec la réplication du virus chez l'hôte. Les IFNs de type I représentent l'évènement majeur de défense de l'organisme contre les infections virales en agissant directement et très rapidement sur la cellule infectée. Par contre, l'activation du système immunitaire par l'IFN de type II (IFN- γ) constitue un évènement plus tardif, lors de la réponse immune adaptative, qui renforcera l'action rapide des IFNs de type I (Honda *et al.*, 2006 ; Stetson et Medzhitov, 2006 ; Vilcek, 2006).

2.5.2. Régulation des IFNs de type I

Les IFNs de type I sont produits par tous les types cellulaires en réponse à une infection virale. Ils sont principalement régulés au niveau transcriptionnel par les Interferons regulatory factors (IRFs) qui forment une famille de 9 membres (Figure 18). Les IRFs possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) en N-terminal, qui se lie aux motifs nucléotidiques GAAANN et AANNNGAA. Chaque IRF est pourvu d'un domaine qui lui est spécifique en C-terminal, IRF association domaine (IAD), qui lui confère son activité transactivatrice, sa spécificité cellulaire et sa capacité d'interagir avec d'autres membres de la famille IRFs ou d'autres facteurs (Hiscott, 2007).

IRF	Expression	Target gene	Main immune function of target gene	Phenotype of gene-knockout mice
IRF1	Constitutive, and inducible by IFN γ	NOS2, GBP1 and gp91 ^{PHOX}	Promote antibacterial and antiviral innate immunity	Susceptibility to infection with the intracellular bacteria <i>M. bovis</i> and <i>B. abortus</i> ; reduced resistance to infection with the virus EMCV
		IL12	Promotes T _H 1-cell responses	Defective T _H 1-cell responses; susceptibility to infection with the parasite <i>L. major</i> and the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i>
		IL15	Controls haematopoietic-cell development	Defective NK-cell, NKT-cell and IEL development
		TAP1 and LMP2	Provide MHC class I molecules with short peptides	Reduced CD8 ⁺ T-cell numbers
		CDKN1A	Controls the cell-cycle and apoptosis	Reduced DNA-damage-induced cell-cycle arrest
		Caspase-1	Controls apoptosis and processes IL-1 β	Reduced DNA-damage-induced apoptosis of mitogen-activated mature T cells
IRF2	Constitutive	IFN-inducible genes (such as OAS, PKR and IRF7)*	Attenuate type I IFN responses	Severe skin inflammation mediated by CD8 ⁺ T cells; defective CD4 ⁺ DC development
		IL12	Promotes T _H 1-cell responses	Susceptibility to infection with the parasite <i>L. major</i>
IRF3	Constitutive	IFNB, IFNA4, IFIT1, CXCL9, CXCL10 and CCL5	Promote antibacterial and antiviral innate immunity	Reduced resistance to infection with the virus EMCV; increased ability to clear infection with the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i> ; resistance to LPS-induced endotoxic shock
IRF4	Constitutive, and inducible by TLR ligation	IL4 and GATA3	Controls T-cell function	Defective T _H 2-cell differentiation
		IGK and CD23	Control B-cell development and function	Defective mature B-cell function; defective immunoglobulin production
		ND	Controls DC development	Defective CD4 ⁺ DC development
IRF5	Constitutive, and inducible by type I IFNs and by TLR ligation	IL6, IL12, TNF, NFKBIZ and CXCL2	Promote inflammation	Resistance to LPS- or CpG-containing-DNA-induced shock
IRF6	ND	ND	ND	ND
IRF7	Constitutive, and inducible by type I IFNs	IFNB and IFNA	Promote antiviral innate immunity	Susceptibility to infection with the viruses EMCV, VSV and HSV; reduced efficiency of CD8 ⁺ T-cell cross-priming
IRF8	Constitutive, and inducible by IFN γ	IL12 and IL18	Promote T _H 1-cell responses	Defective T _H 1-cell differentiation; susceptibility to infection with the intracellular bacterium <i>L. monocytogenes</i> and the parasites <i>L. major</i> and <i>T. gondii</i>
		ND	Controls haematopoietic-cell development	Development of chronic-myeloid-leukaemia-like disease; defective plasmacytoid-DC and CD8 ⁺ DC development
IRF9	Constitutive	IFN-inducible genes (such as OAS, PKR and IRF7)	Mediate type I IFN responses	Susceptibility to infection with the viruses EMCV, VSV and HSV

Figure 18. Membres IRFs et leurs rôles dans la réponse immune. (*) Gènes IFN-inductibles régulés négativement par IRF2. D'après Honda et Akira, 2006.

Les IRFs 3 et 7 sont les IRFs principaux impliqués dans la voie des PRRs et l'expression des IFNs de type I lors d'une infection virale (Honda et Taniguchi, 2006 ; Kawai et Akira, 2010). IRF3 est exprimé constitutivement et est localisé dans le cytoplasme sous forme inactive. Lors d'une infection virale, le TLR3, RIG-1 et MDA5 reconnaissent les ARN bicaténaires viraux et activent des voies de signalisation conduisant à l'activation d'IRF3 (Doyle *et al.*, 2002 ; Takeuchi et Akira, 2007). IRF3 est activé par phosphorylation au niveau de résidus sérine en C-terminal et est alors transloqué dans le noyau. Du au changement conformationnel, la forme phosphorylée d'IRF3 peut former des dimères (homodimères ou hétérodimères avec IRF7) et interagir avec les co-activateurs CBP/P300 pour former un holocomplexe dans le noyau. Ce complexe est capable de se lier aux promoteurs des IFNs de type I (Honda et Taniguchi, 2006 ; Weaver *et al.*, 1998 ; Yoneyama *et al.*, 1998).

IRF7 est également activé par les voies des TLRs 7/8 et 9 (Takeuchi et Akira, 2007). De façon similaire à IRF3, IRF7 est localisé dans le cytosol sous forme inactive et est activé lors d'une infection virale par phosphorylation au niveau de résidus sérine en C-terminal. IRF7 phosphorylé peut former des homodimères ou des hétérodimères avec IRF3 et migrer dans le noyau afin de réguler l'expression des IFNs de type I (Sato *et al.*, 1998).

Contrairement à IRF3 qui est exprimé constitutivement, IRF7 est faiblement exprimé dans la plupart des cellules et son expression est fortement induite par les IFNs de type I. En effet, l'induction de l'expression des IFNs de type I en réponse à l'induction virale est biphasique. Dans la première phase, IRF3 est activé lors d'une infection virale et conduit à l'expression de l'IFN- β et de l'IFN- $\alpha 4$. A ce niveau, IRF7 est faiblement exprimé mais la production d'IFNs de type I va induire fortement son expression. Dans la seconde phase, IRF3 et IRF7 vont ensemble induire l'expression de l'IFN- β et des IFNs- $\alpha 1, 2, 4$ et 5. Il s'agit d'une boucle rétroactive positive (Sato *et al.*, 2000) (Figure 19).

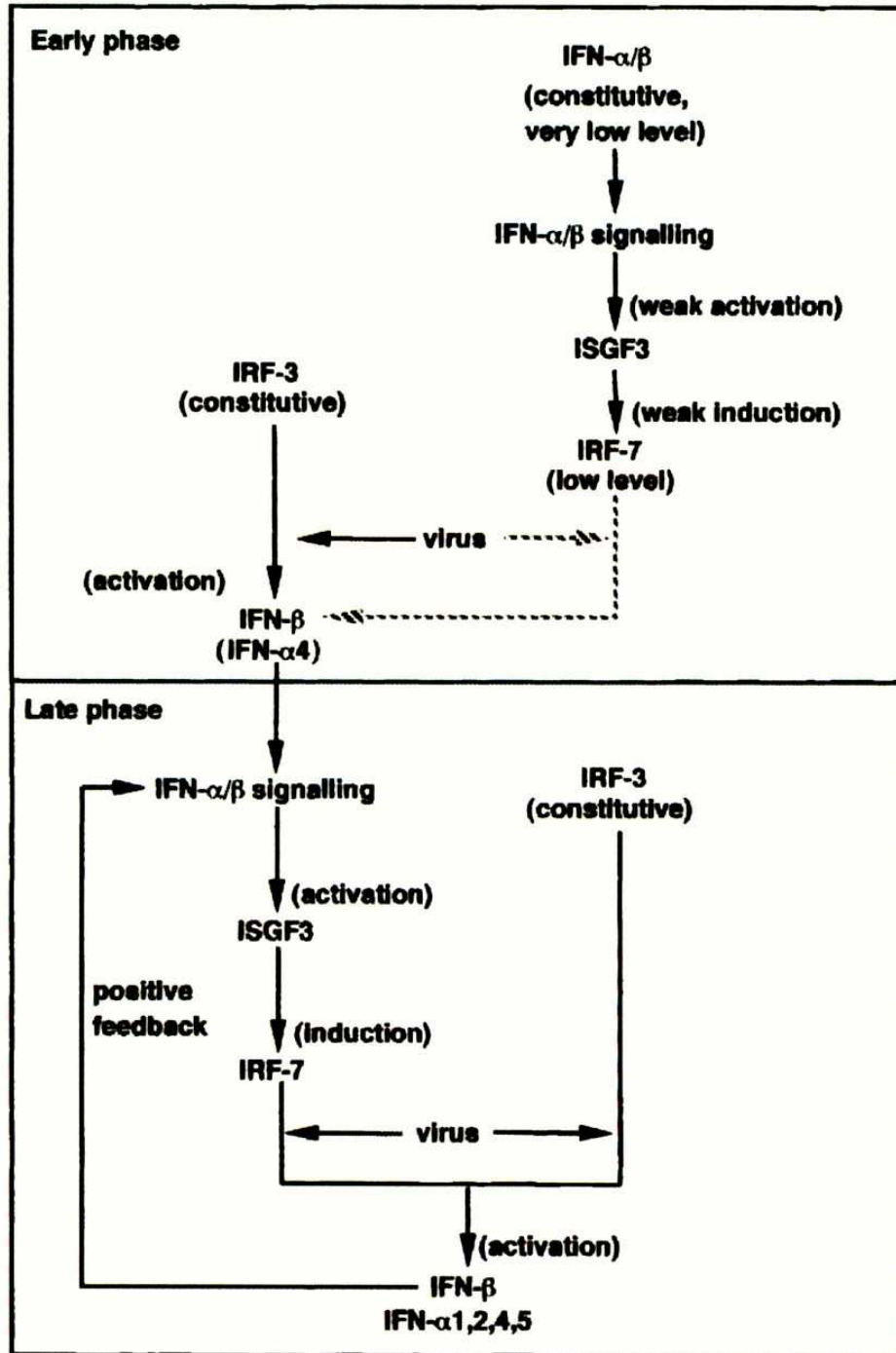


Figure 19. Représentation schématique du mécanisme biphasique impliquant IRF3 et IRF7 dans l'induction des IFNs de type I. D'après Sato et al., 2000.

2.5.3. Voie de signalisation des IFNs de type I

Les IFNs de type I (IFNs- α et - β), par leurs actions autocrine et paracrine, préparent les cellules à une éventuelle infection en y induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lutte antivirale (Doyle *et al.*, 2002 ; Honda *et al.*, 2005 ; Kawai *et al.*, 2001). Les IFNs de type I (IFNs- α ou - β) se lient à leur récepteur spécifique à la surface cellulaire, Interferon- α/β receptor (IFNAR) composé de 2 sous-unités (IFNAR1 et IFNAR2) (Uze *et al.*, 2007). La fixation de ces cytokines à leur récepteur permet l'activation de tyrosines kinases de la famille Janus Tyrosine Kinase (JAK), JAK1 et Tyk2. Les JAKs activées phosphorylent le récepteur au niveau de résidus tyrosine, permettant le recrutement des facteurs Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-1 et -2 via leur domaine de signalisation SH2. JAK1 et Tyk2 phosphorylent STAT1 et STAT2 qui peuvent ainsi former des hétérodimères. Ces derniers s'associent au facteur de transcription IRF9 (ISGF3 γ ou p48) pour former un complexe transcriptionnellement actif appelé Interferon-Stimulated Gene Factor 3 (ISGF3) qui migre vers le noyau et permet l'induction de nombreux gènes en se fixant à leurs régions promotrices possédant l'élément enhancer appelé IFN stimulated response element (ISRE).

L'IFN de type II (IFN- γ) active les kinases JAK1 et JAK2 qui phosphorylent son récepteur et permettent le recrutement, l'activation et l'homodimérisation de STAT1. Les homodimères STAT1 migrent ensuite vers le noyau et se fixent à des séquences promotrices de type gamma-activated sequence (GAS). Sous l'effet des IFNs- α et - β , des homodimères ou des hétérodimères STAT1/STAT1, STAT1/STAT3, STAT3/STAT3 peuvent aussi se former et se fixer sur les séquences promotrices (GAS) pour transactiver les gènes normalement induits par l'IFN- γ .

Les IFNs- λ induisent une signalisation similaire aux IFN de type I, mais se fixent à des récepteurs différents des IFNs de types I et II. Ils activent des kinases qui permettent la phosphorylation de STAT1 et STAT2 et la formation du complexe ISGF3 (Gongora et Mechti, 1999 ; Uze *et al.*, 2007) (Figure 20).

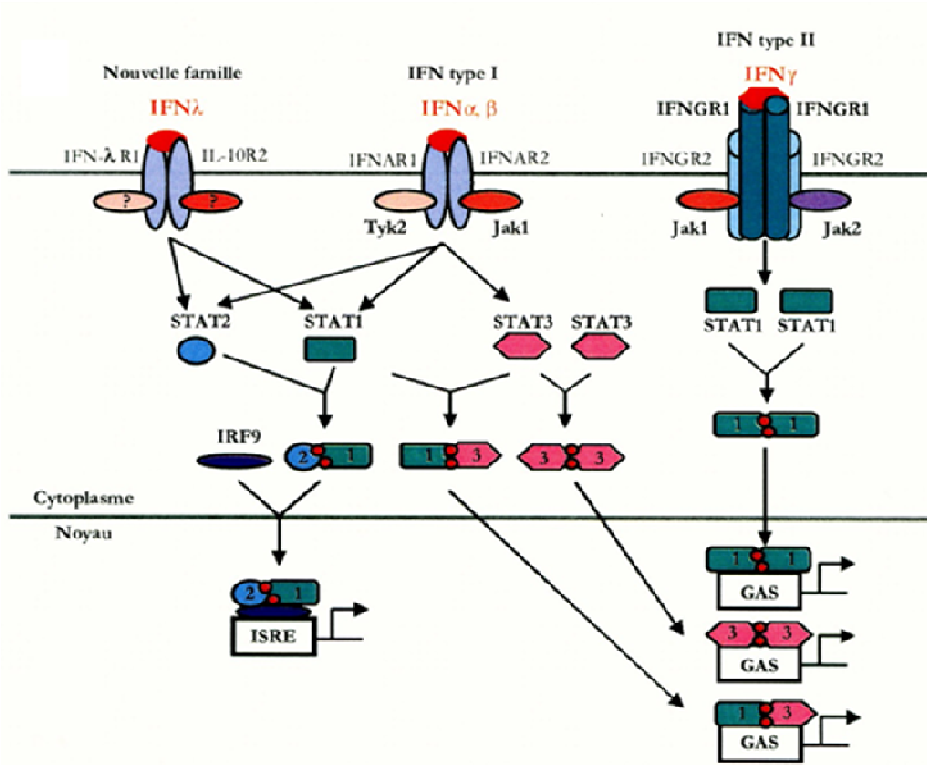


Figure 20. Représentation schématique de la voie de signalisation des IFNs. D'après Gongora et Mechti, 1999.

2.5.4. Gènes régulés par les IFNs de type I

Les IFNs de type I, par fixation à leur récepteur spécifique, sont responsables de l'induction de plusieurs centaines de gènes, les IFN stimulated genes (ISG) (Figure 21). Les protéines antivirales majeures les plus connues dans le système IFN sont la protéine kinase R (PKR), les 2-5A synthétase/RNase L et les protéines Mx (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003 ; Garcia *et al.*, 2007 ; Haller *et al.*, 2007a).

Function	Example	Function	Example
Apoptosis	TRAIL, Fas, XAF-1, caspase-4, caspase-8, RIFs, PKR, IRF-1, PML, RNase L, galectin-9, OAS-1	Antigen processing/presentation/immunomodulation	MHC I and II, β -microglobulin, LMP-2, TLR-3, SP100B, C1 inhibitor, Complement components
Antiviral	PKR, GBP-2, Mx proteins, RANTES, 2'5'A oligoadenylate synthetase, cig-5	Cell cycle/DNA scaffold	v-myc, I β -16, MAP3K8, myc promoter binding gene, Histone H1 family, NBS-1/p95
Host defense	PKR, ISGF3- γ , IRF 1-9, MyD88, Staf50, CD47 antigen, MX proteins, IL-15, IL-6, IL-1 β , ISG-15	Transcription factors	STAT1, STAT2, ISGF3- γ , IRF1-7

Figure 21. Exemples d'ISGs classés en fonction de leurs fonctions. D'après Chawla-Sarkar *et al.*, 2003.

La protéine kinase R (PKR) est une kinase sérine-thréonine cytoplasmique induite par les IFNs de type I. Elle possède 2 domaines conservés de liaison aux ARNdb viraux dans sa région N-terminale. PKR est activée par phosphorylation suite à sa liaison à l'ARNdb (Perry *et al.*, 2005). Une fois activée, la kinase induit, à son tour, l'activation de la production d'IFNs de type I et de NF- κ B, renforçant ainsi la réponse antivirale (Clemens, 1997). PKR activé participe également à la phosphorylation de la kinase Eukaryotic Initiation Factor 2- α (eIF-2 α) qui conduit à l'inhibition de la traduction des ARNm et de la réplication virale (Garcia *et al.*, 2007 ; Perry *et al.*, 2005 ; Saunders et Barber, 2003).

La voie de la 2-5A synthétase/RNase L est une voie multienzymatique qui conduit à la dégradation de l'ARN en réponse aux IFNs de type I. Elle met en jeu l'action synergique de deux enzymes IFN-inductibles : la 2-5A synthétase (OAS) et la RNase L. Après son activation par des ARNdb viraux, la 2-5A synthétase polymérise l'ATP en oligoadénylates par des liaisons 2'-5' (2-5A). Les molécules de 2-5A vont se lier avec une très haute affinité à une endoribonucléase latente, la RNase L, et l'activer. La RNase L, ainsi activée, va catalyser le clivage d'ARN viraux (Barber, 2001 ; Haller *et al.*, 2007a ; Malathi *et al.*, 2007).

Les protéines Mx sont des GTPases induites par les IFNs de type I. Elles tiennent leur nom de leur capacité à inhiber le développement du Myxovirus (Mx) de l'influenza. Leur fonctionnement exact n'est pas encore bien compris, mais certaines se trouvent dans le noyau et pourraient y bloquer la transcription, tandis que d'autres, dans le cytoplasme, ont d'autres effets sur la prolifération virale comme de perturber l'assemblage des particules virales. Les protéines Mx les plus connues sont Mx1 et Mx2 murines, et MxA et MxB humaines. Chaque membre de la famille semble posséder sa propre spécificité. Par exemple, la protéine Mx1 est nécessaire et suffisante pour protéger contre le virus de l'Influenza, alors que la protéine MxA ne protégera que partiellement les cellules infectées par ce virus (Haller *et al.*, 2007a ; Haller *et al.*, 2007b ; Pavlovic *et al.*, 1992).

La réponse des IFNs de type I aux infections virales déclenche des mécanismes apoptotiques dans la cellule infectée. Des études ont notamment montré que l'expression du gène suppresseur de tumeurs p53 est induite après traitement aux IFNs de type I. La stimulation aux IFNs- α et - β n'active pas p53 mais prépare une éventuelle réponse de p53 face à des signaux de stress, telle qu'une infection virale. En effet, lorsque p53 est activé dans des cellules infectées par un virus, il induit l'apoptose de la cellule, limitant la réplication et la dissémination virale (Porta *et al.*, 2005 ; Takaoka *et al.*, 2003).

OBJECTIF DU TRAVAIL

Zac1 est un facteur de transcription suppresseur de tumeurs capable, à travers des voies différentes et indépendantes, d'induire l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. Malgré ses implications potentielles dans le développement embryonnaire et certaines maladies telles que le cancer et le diabète néonatal, les mécanismes régulant son expression physiologique, ainsi que sa fonction biologique exacte restent méconnus.

La majorité des études dévolues à Zac1 concernent des types cellulaires ayant perdu l'expression de ce facteur de transcription (cellules provenant essentiellement de tumeurs de l'ovaire, du sein et de l'hypophyse), et visent à démontrer que l'expression forcée de Zac1 dans ces lignées peut provoquer l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Il n'existe pas de modèle cellulaire établi pour l'étude de l'expression endogène de Zac1.

De plus, contrairement à l'ARN messager de Zac1 mis en évidence dans de nombreux organes, la protéine endogène Zac1 n'a été qu'une seule fois détectée *in vivo*. En effet, il a été montré que la protéine Zac1 était exprimée dans plusieurs régions du cerveau chez le rat (Ciani *et al.*, 2003).

Les deux objectifs de notre travail étaient, d'une part, de définir la nature des stimuli capables de moduler l'expression endogène de la protéine Zac1 et, d'autre part, d'étudier la fonction de Zac1 à la lumière des résultats obtenus dans la première partie de la thèse.

MATERIEL ET METHODES

Souris

Les souris déficientes pour *Zac1* (Varrault *et al.*, 2006) nous ont été données par le Professeur L. Journot (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France). Ces souris sont de fond génétique C57Bl/6. Les souris C57Bl/6 sauvages et déficientes pour *Zac1* ont été élevées et hébergées dans des cages à couvercle filtrant sur un portoir ventilé à l'animalerie conventionnelle de l'Université de Liège. Les souris *Zac1*^{+/-pat} hétérozygotes ont été générées en croisant des mâles *Zac1*^{+/-} hétérozygotes avec des femelles C57Bl/6 sauvages. Les souris ont été génotypées par PCR à l'aide des primers suivants : primer forward 5-aagtctcacgcggaagaaaa-3, primer reverse spécifique à l'allèle sauvage 5-gttggggagcttctctgg-3, primer reverse spécifique à l'allèle muté 5-gggaggattgggaagacaat-3. Les souris ont été utilisées entre l'âge de 8 à 10 semaines. Tous les protocoles et procédures expérimentaux ont été approuvés par la Commission d'Ethique de l'Université de Liège.

Fibroblastes embryonnaires murins

Les MEFs WT, *Zac1*^{-/-}, *IRF3*^{-/-} et *IRF7*^{-/-} ont été isolées à partir d'embryons murins âgés entre 12 et 13 jours. Le cœur et la tête des embryons ont été enlevés et le reste du corps haché dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline, GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse). Les fibroblastes ont été dissociés par ajout de trypsine/EDTA (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse) durant 20 minutes à 37°C et agités toutes les 2 minutes. Après, les cellules ont été reprises dans une seringue montée d'une aiguille de 18G et mises en culture dans une boîte T25 avec du Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse) complété avec 10% de FBS, de la L-Glutamine 2 mM, 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, 10 µg/ml de gentamycine (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse) et 10 µg/ml de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Les cellules ont été incubées à 37° C dans 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé après 24 heures et les cellules passées après 48 heures. Les cellules ont été utilisées entre le troisième et le cinquième passage.

Les souris *IRF3*⁻ et *IRF7*⁻ déficientes (Sato *et al.*, 2000) ont été fournies par RIKEN BioResource Center (Ibaraki, Japon), et ont été élevées et maintenues à l'animalerie SPF

(Specific Pathogen Free) du GIGA-Research. Les MEFs TLR3^{-/-} et TLR3^{+/+} nous ont été données par le Professeur S. Akira (Université d'Osaka, Osaka, Japon).

Réactifs

Les ligands des récepteurs Toll-like (TLRs) suivants ont été utilisés : les CpG, la flagelline, le Pam₃CSK₄, le poly(I:C), le R848 (tous achetés chez Invivogen, San Diego, CA, USA), et des lipopolysaccharides (LPS, *Escherichia coli* 055:B5) (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α a été fourni par PeproTech EC (Londres, Grande-Bretagne), l'interleukine IL-1 β par Biosource (Camarillo, CA, USA), l'interféron IFN- α par Hycult biotechnology b.v. (Uden, Pays-Bas). La chloroquine, l'IFN- β , l'actinomycine D, la doxorubicine, l'E64 [trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butane], l'H₂O₂, la lactacystine, le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) et le nutline-3a ont été commandés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La calpeptine et l'ALLN (N-acetylleucylleucylnorleucinal) proviennent de chez Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Irradiation des cellules

Les cellules ont été irradiées avec des irradiations gamma de 10 Gy (Caesium-137) à partir d'un irradiateur Gammacell-40 (MDS Nordion, Ottawa, ON, Canada) ou des irradiations UV (50 J/m²).

Macrophages péritonéaux murins

Des souris C57Bl/6 âgées entre 7 et 10 semaines ont été traitées, par injection intrapéritonéale, à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille stérile de 27G, avec 200 μ g de poly(I:C) (Invivogen, San Diego, CA, USA) solubilisé dans du PBS à 1 μ g/ μ l. Les souris contrôles ont reçu 200 μ l de PBS (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse) par injection intrapéritonéale à la place du poly(I:C). Après 6 heures de traitement, les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale et les cellules de la cavité péritonéale ont été récoltées par lavages péritonéaux avec du PBS/EDTA (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse). Les comptages cellulaires au microscope ont montré qu'approximativement 85% des cellules isolées étaient des macrophages.

Virus

Les virus de l'Encéphalomyocardite (EMCV, chimpanzé, Floride, 1944), de l'Herpès Virus Simplex-1 (HSV-1) et du Coxsackievirus B4 E2 (CVB4 E2) nous ont été fournis par le Professeur D. Hober (Université de Lille, Lille, France) et proviennent à la base de l'American Type Culture Collection (VR-129B, VR-260, ATCC, VA, Manassas, USA). Le virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV, Indiana) nous a été donné par le Professeur P. Lebon (Université de Paris, Paris, France). Ces virus ont été propagés dans des cellules Vero (ATCC, Manassas, VA, USA). Lorsque plus de 90% des cellules infectées montraient des signes de cytopathie, les cultures ont été congelées à -80°C et décongelées et le milieu de culture a ensuite été clarifié par centrifugation à 1400 rpm durant 10 minutes. Les titres viraux présents dans le milieu de culture ont été mesurés par dilutions sériées dans les cellules Vero en plaques 96 puits afin de déterminer la dose infectieuse en TCID₅₀ (tissue culture infected dose at 50%) en utilisant la méthode de calcul de Reed-Muench. Les stocks de virus ont été aliquotés et congelés à -80°C dans du milieu DMEM (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse).

Le virus Sendai (SeV, extrait de poumon d'un nouveau né mort d'une congestion pulmonaire, Japon, 1952) (VR-105, ATCC, Manassas, VA, USA) a été propagé, durant 48 heures, dans des œufs de poules embryonnés SPF (Lohmann, Cuxhaven, GmbH) âgés de 11 jours incubés dans une couveuse à 37°C. Les fluides allantoïdiens ont été récupérés à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille de 25G et clarifiés par centrifugation à 1400 rpm durant 10 minutes. Les titres viraux ont été mesurés par dilutions sériées dans des cellules LLC-MK2 en plaques 96 puits (ATCC, Manassas, VA, USA) afin de déterminer le nombre de pfu (plaque-forming units)/ml. Les stocks viraux ont été aliquotés et congelés à -80°C. Ce protocole a été approuvé par la Commission d'Ethique de l'Université de Liège.

Transfections et plasmides

Les gènes codant pour les protéines mZac1b et mZac1a ont été chacun clonés dans un vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules 293 (ATCC, Manassas, VA, USA) ou les MEFs ont été transfectées toute une nuit par lipofection, avec 3 µg de plasmide pour 6 µl de Transfectine (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Concernant les transfections au poly(I:C), les cellules ont été transfectées durant 6 heures avec 3 µg de poly(I:C) pour 6 µl de Transfectine (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Immunoblot

Les cellules traitées dans des plaques 6 puits, ont été décollées et récupérées dans leur surnageant. Elles ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 1400 rpm. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 100 µl de tampon RIPA [1X PBS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 µM sodium orthovanadate, 5 µg/ml aprotinine, 5 µg/ml leupeptine (Sigma, St Louis, Missouri, USA), 40 µg/ml complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)].

Les organes récupérés ont été lavés dans 3 ml de PBS contenant 1 mM de PMSF, 100 µM de sodium orthovanadate, 5 µg/ml d'aprotinine, 5 µg/ml de leupeptine (Sigma, St Louis, Missouri, USA), et 40 µg/ml de complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) et ensuite broyés à l'aide d'un piston dans 1 ml de tampon RIPA.

Les lysats ont ensuite été incubés sur glace durant 20 à 30 minutes et vortexés 2 à 3 fois durant cette période. Ensuite, ils ont été centrifugés à vitesse maximale durant 5 minutes à 4° C. Les surnageants ont été récupérés et stockés à -80° C.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay, Hercules, CA, USA).

Les extraits protéiques totaux ont été utilisés. Un volume de tampon de chargement (0,125 M Tris pH 6,8, 5% SDS, 20% glycérol, 10% β-mercaptoéthanol, 8% v/v bleu de bromophénol 0,25%) a été ajouté au marqueur de poids moléculaire (« Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers », Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne). Le gel était constitué d'un gel de concentration à 4,5% (4,5% acrylamide, 0,12% bis N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M Tris pH 6,8, 0,2% dodecylsulfate de sodium (SDS), H₂O, 6,25 mM EDTA pH 7,0, 0,2% TEMED, 0,12% d'ammonium persulfate) et d'un gel de séparation à 10% (10% acrylamide, 0,25% bis N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 375 mM Tris pH 8,8, 0,2% SDS, H₂O, 10% glycérol, 6 mM EDTA pH 7,0, 0,1% TEMED, 8,3% APS). La migration a été réalisée sous un courant de 20 mA par gel présent dans un tampon TGS (Tris 50 mM, 0,384 M glycine, 3,5 mM SDS, 2 mM EDTA).

Le gel a été pré-équilibré pendant 30 minutes dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 0,192 M Glycine, 20% méthanol). Le transfert des protéines a ensuite été réalisé sur une membrane en difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) préalablement délipidée au méthanol, réhydratée dans de l'eau et équilibrée dans le tampon de transfert. Le transfert a été réalisé sous un courant de 200 mA durant 2 heures.

Après l'étape de transfert, la membrane a été incubée dans 25 ml de tampon de blocage [1X TBS (2,42 g base Tris, 8 g NaCl à pH 7,6 pour un litre), 0,1% Tween-20, 3,5% de lait en poudre] pendant une heure à température ambiante. La membrane a été lavée trois fois pendant 10 minutes dans 15 ml de TBS-Tween. L'anticorps primaire anti-mZac1 [polyclonal, lapin (IgG)], l'anticorps primaire anti-p53 [polyclonal, lapin (IgG)] ont été fournis par Santa-Cruz (CA, USA), et l'anticorps primaire anti- β -actine [monoclonal, souris (IgM)] par Calbiochem (San Diego, CA, USA). Ils ont été respectivement dilués au 1:200, 1:1000 et 1:4000 et incubés avec la membrane dans 4 ml de TBS-Tween durant toute la nuit à 4°C. La membrane a été à nouveau lavée trois fois pendant 10 minutes dans 15 ml de TBS-Tween. La protéine A (Roche Diagnostics GmbH, Bâle, Suisse) ou l'anticorps secondaire anti-souris conjugués à la HRP (DAKO A/S, Golstrup, Danemark) ont été respectivement dilués à 1:5000 et 1:1000 et incubés avec la membrane dans 20 ml de tampon de blocage (19 ml TBS-Tween + 1 ml de solution bloquante de lait) pendant 45 minutes sous agitation. La membrane a été à nouveau lavée trois fois comme précédemment.

La membrane a été incubée sous agitation dans 10 ml de réactif chemiluminescent ECL (Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) pendant une minute à température ambiante puis a été révélée.

L'intensité des signaux a été estimée par densitométrie à l'aide du Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). L'expression de la β -actine a servi de contrôle interne pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux cellules non traitées dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard.

Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel

Après traitement des cellules, les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole préconisé par le fabricant.

Préalablement à l'extraction d'ARN, les organes récupérés ont été incubés une nuit à 4°C dans du RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) et ensuite broyés dans le tampon de lyse du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole préconisé par le fabricant.

L'ARN a ensuite été dosé par mesure de l'absorbance à 260 nm. La synthèse d'ADN complémentaire a été effectuée à partir d'1 µg d'ARN total grâce au kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) en suivant le protocole de base fourni par le fabricant.

Les primers utilisés dans les RT-PCR quantitatives ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique) et conçus à l'aide du logiciel primer express (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). La séquence des primers était la suivante : Zac1b-F 5-tgagtgtgtgaatctggg-3 et Zac1b-R 5-ttatctaaatgcgtgatgaaa-3; GAPDH-F 5-caacagggtggtggacctcat-3 et GAPDH-R 5-tgggatagggcctctcttct-3. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant (1) jusqu'à 8,5 µl d'H₂O ; (2) 12,5 µl de mix SybrGreen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ; (3) 1 µl des primers forward et reverse adéquats de 3 µM ; (4) 2 µl d'ADN complémentaire. Les PCRs et la quantification de la fluorescence en temps réel ont été réalisées dans un IQTM5 Optical System Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Après un cycle initial de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes, 40 cycles d'amplification ont été initiés consistant en une dénaturation de 20 secondes à 95°C suivie d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 10 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 12 secondes. La comparaison des Ct (Cycle threshold) a été utilisée pour quantifier de façon relative l'expression des gènes, en se rapportant au gène invariant GAPDH.

ELISA

Les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ont été réalisés à l'aide de kits commerciaux permettant le dosage de l'IFN- α et de l'IFN- β dans les surnageants cellulaires et les sérums (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA).

Test MTT

La viabilité des cellules a été déterminée par 3-(4,5)-diméthylthiazol(-z-y1)-3,5-diphényltétrazoliumromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Après retrait du milieu de culture, les cellules ont été lavées 3 fois avec du DMEM sans rouge de phénol (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse). Après lavage, elles ont été incubées dans une solution de MTT [0,5 mg/ml dans du DMEM sans rouge de phénol (GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Ecosse)] à 37°C durant 3 heures. Ensuite, les cellules ont été lysées en rajoutant de l'isopropanol acide (0,04 M d'HCl dans de l'isopropanol absolu) pour dissoudre les cristaux de formazan. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm (avec une référence de 630 nm).

Test de prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été mesurée à l'aide d'un test d'incorporation au bromodeoxyuridine (BrdU) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Brièvement, 10 µM de BrdU ont été rajoutés durant les 3 dernières heures de culture dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et traitées à la DNase afin d'exposer le BrdU incorporé dans les cellules. Ensuite, les cellules ont été resuspendues avec un anticorps anti-BrdU FITC. L'ADN total a été coloré avec une solution de 7-amino-actinomycine D (7-AAD). L'incorporation du BrdU a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'un FACScanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Test d'apoptose

L'apoptose a été mesurée à l'aide d'un test au Terminal deoxynucleotidyl transférase d'UTP nick end labeling (TUNEL) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées au TUNEL. Les analyses ont été réalisées par cytométrie en flux à l'aide d'un FACScanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Mesure des titres viraux

Des souris C57Bl/6 âgées entre 7 et 12 semaines ont été infectées, par injection intrapéritonéale, à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille stérile de 27G, avec 100 pfu d'EMCV. Après 2 jours d'infection, les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale. Les

cœurs ont été récupérés et broyés dans 3 ml de PBS. Les broyats de cœurs ont ensuite été congelés à -80°C, décongelés et clarifiés par centrifugation à 1400 rpm durant 10 minutes.

Les titres viraux présents dans les surnageants cellulaires ou les broyats de cœurs ont été mesurés par dilutions sériées dans des cellules Vero (ATCC, Manassas, VA, USA) en plaques 96 puits afin de déterminer la dose infectieuse en TCID₅₀ (tissue culture infected dose at 50%) en utilisant la méthode de calcul de Reed-Muench.

Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm leur déviation standard (DS). Les différences statistiques ont été déterminées à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Fisher's PLSD (Protected Least Significant Difference). Un test de Wilcoxon a été utilisé pour évaluer la différence de survie entre les souris sauvages et déficientes pour *Zac1* après infection à l'EMCV. Les différences ont été considérées comme significatives lorsqu'elles possédaient une valeur P inférieure à 0,05. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

RESULTATS

1. DETECTION DE LA PROTEINE ZAC1 DANS LES ORGANES MURINS

L'ARN messager de Zac1 murin a été mis en évidence principalement dans l'hypophyse mais aussi dans d'autres régions du cerveau et dans quelques organes, tels que l'estomac, les reins, les glandes surrénales, le cœur et les poumons (Spengler *et al.*, 1997). Par contre, la protéine Zac1 n'a jamais été détectée *in vivo* chez la souris. Notre première démarche a été de déterminer par Western blot si la protéine Zac1 était présente dans les différents organes murins.

Les 2 variants de transcrits de Zac1, Zac1a et Zac1b, ont une taille respective d'environ 76 et 79 kDa. Cependant, il a été rapporté que ces protéines, de par leurs nombreuses répétitions en acide glutamique (E), migraient beaucoup plus lentement sur gel Western blot et apparaissaient à des tailles supérieures à 100 kDa (Huang et Stallcup, 2000 ; Varrault *et al.*, 1998). N'ayant à cette étape ni de contrôle positif, ni de contrôle négatif, et ne connaissant donc pas exactement la taille des signaux attendus en Western blot, nous avons cloné Zac1a et Zac1b et transfecté des cellules 293 avec les vecteurs d'expression codant pour les 2 variants de transcrit de Zac1. Les blots ont montré que Zac1a et Zac1b apparaissaient respectivement à un poids moléculaire d'environ 105 kDa et 125 kDa (Figure 1A).

Comme le montre la Figure 1B, nous n'avons détecté la protéine Zac1 dans aucun des organes testés à savoir le cœur, le foie, la rate, les reins, les glandes surrénales, les poumons, le thymus, l'estomac, le cerveau, les testicules, l'utérus et les ovaires. Par contre, l'ARNm de Zac1 a été localisé par RT-PCR quantitative dans tous les organes testés (résultats non montrés).

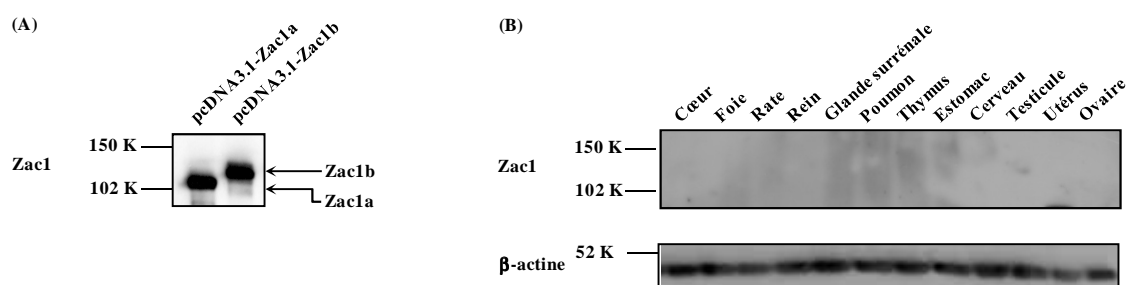


Figure 1. Détection de la protéine Zac1 dans les organes murins. (A) Des cellules 293 ont été transfectées durant 16 heures avec les vecteurs d'expression codant pour Zac1a et Zac1b. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. (B) Les organes (cœur, foie, rate, reins, glandes surrénales, poumons, thymus, estomac, cerveau, testicules, utérus et ovaires) ont été prélevés sur 4 souris C57Bl/6 sauvages âgées de 12 semaines (2 mâles et 2 femelles) préalablement sacrifiées par dislocation cervicale. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β -actine nous a servi de contrôle interne.

2. VOIE DE DEGRADATION DE LA PROTEINE ZAC1

Dans des conditions de croissance cellulaire optimales, la protéine p53 possède un temps de demi-vie très court et est par conséquent exprimée à un taux très faible dans les différents tissus. La protéine Murine Double Minute 2 (MDM2) joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression de p53, d'une part en bloquant son activité transcriptionnelle et d'autre part, en induisant la poly-ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome 26S (Chene, 2003 ; Haupt *et al.*, 1997 ; Kubbutat *et al.*, 1997). Lorsque les cellules sont soumises à un stress (dommages à l'ADN, signaux hyperprolifératifs, ...), p53 et MDM2 subissent des modifications post-traductionnelles, qui par divers mécanismes, empêchent leur interaction et donc la dégradation de p53. La forme stabilisée de p53 peut, dès lors, induire soit l'arrêt du cycle cellulaire au point de transition G1/S, soit la mort cellulaire par apoptose (Chene, 2003 ; Ling *et al.*, 2002).

Comme les résultats précédents nous l'ont montré, la protéine Zac1 n'est pas détectée dans les organes où l'on localise son ARNm. Tout comme la protéine p53, Zac1 pourrait posséder un temps de demi-vie très court et de ce fait, être exprimée très faiblement dans les différents tissus. Nous nous sommes donc intéressés aux potentielles voies de dégradation de la protéine Zac1. Nous avons choisi d'utiliser comme modèle cellulaire des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) car il a été rapporté que ces cellules exprimaient l'ARNm de Zac1 à l'état basal (El Kharroubi *et al.*, 2001).

Il existe différents processus de dégradation des protéines néoformées, tels que la voie du protéasome, la voie du lysosome, ou encore la voie des calpaïnes (Adams, 2003). Des MEFs ont été traitées avec un inhibiteur commun de ces 3 voies de dégradation [ALLN (N-acetylleucylleucylnorleucinal)], deux inhibiteurs de la voie du protéasome (le MG132 et la lactacystine), deux inhibiteurs de la voie du lysosome (la chloroquine et l'E64) et un inhibiteur spécifique des calpaïnes (la calpeptine). L'accumulation de la protéine Zac1b a été observée dans les MEFs traitées avec des inhibiteurs de la voie du protéasome, à savoir l'ALLN, le MG132 et la lactacystine (Figure 2A).

Afin d'être certains que l'accumulation de Zac1b observée après inhibition de la voie du protéasome résultait bien d'une régulation post-traductionnelle, nous avons effectué des RT-PCRs quantitatives pour Zac1b à partir d'extraits d'ARN de MEFs traitées au MG132. Etonnamment, le traitement au MG132 induisait également une augmentation de la quantité

d'ARNm codant pour Zac1b, indiquant donc une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Figure 2B).

Le MG132, en inhibant la voie du protéasome, empêche la dégradation de nombreux facteurs pro-apoptotiques tels que p53 et induit la mort cellulaire (MacLaren *et al.*, 2001 ; Shinohara *et al.*, 1996). Nous nous sommes donc demandés si lors du traitement au MG132, Zac1b ne serait pas régulé transcriptionnellement par un ou plusieurs facteurs pro-apoptotiques stabilisés. Dans ce cas, Zac1b pourrait participer à la mort cellulaire induite par le MG132. Des tests de survie ont été effectués sur des MEFs Zac1^{+/+} et Zac1^{-/-} traitées au MG132. L'inactivation de Zac1 n'avait pas d'impact significatif sur la survie des cellules traitées au MG132 (Figure 2C).

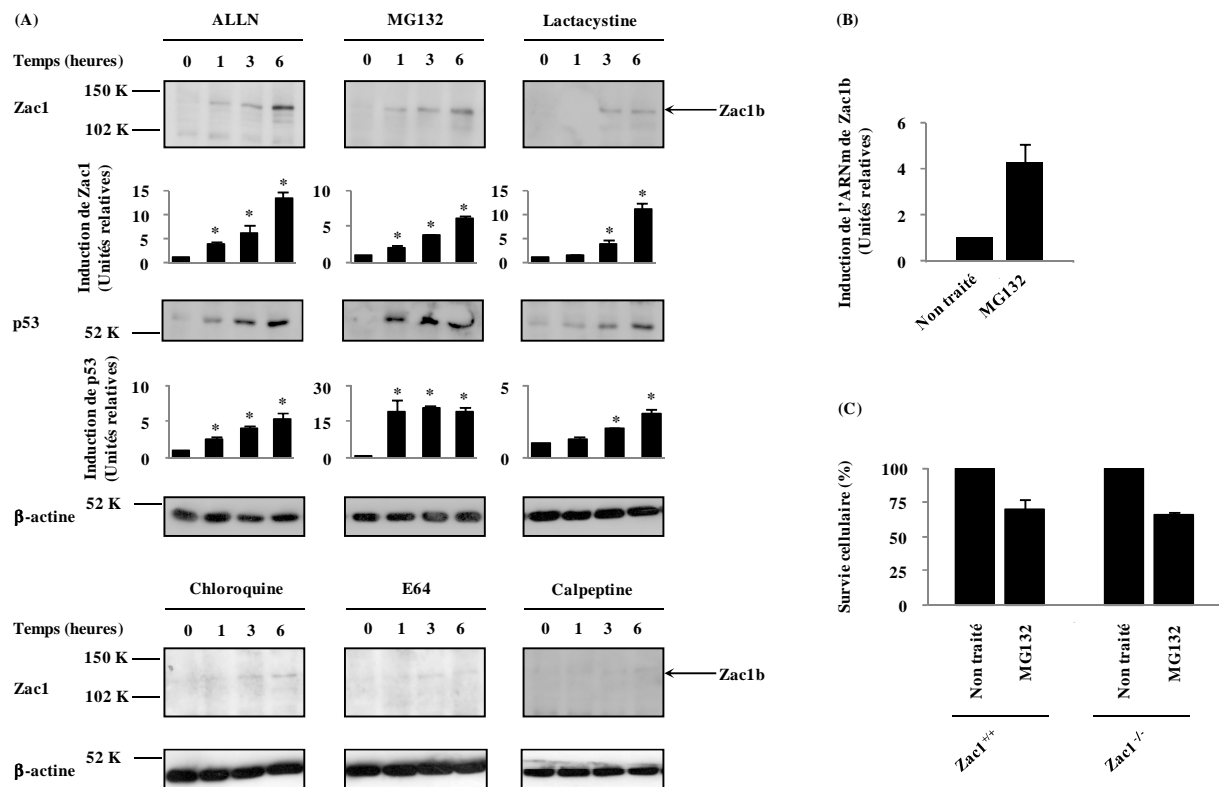


Figure 2. Voie de dégradation de la protéine Zac1. (A) Des MEFs ont été traitées durant 1, 3 et 6 heures à l'ALLN (100 μM), au MG132 (50 μM), à la lactacystine (50 μM), à la chloroquine (100 μM), à l'E64 (200 μM) ou à la calpeptine (100 μM). Des MEFs non traitées ont été utilisées comme contrôle. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1 et de p53. La β-actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. (B) Des MEFs WT ont été traitées durant 6 heures au MG132 (50 μM). L'expression de l'ARNm de Zac1b a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux MEFs non traitées dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne ± leur déviation standard. L'expression de GAPDH a servi de contrôle interne pour la normalisation. (C) Des MEFs $Zac1^{+/+}$ et $Zac1^{-/-}$ ont été traitées durant 6 heures au MG132 (50 μM). La viabilité des cellules a été déterminée par test MTT. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± leur déviation standard. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

3. EXPRESSION DE LA PROTEINE ZAC1 SUITE A L'INDUCTION DE DOMMAGES A L'ADN

Zac1 présentant des analogies fonctionnelles avec la protéine p53 (Spengler *et al.*, 1997) et cette dernière étant fortement exprimée suite aux traitements avec des agents induisant des dommages à l'ADN tels que l'H₂O₂, les irradiations- γ , la doxorubicine, les nutlines ou les irradiations UV (Van Dyke, 2007), nous avons testé les effets de ces agents sur l'expression de Zac1 dans des MEFs.

Etonnamment, l'H₂O₂, les irradiations- γ , la doxorubicine, le nutline-3a, et les irradiations UV n'induisaient pas l'expression de la protéine Zac1 dans les MEFs, alors que comme attendu, ils induisaient l'accumulation de la protéine p53 (Figure 3). L'expression de l'ARNm de Zac1 n'était également pas induite après traitement avec ces inducteurs de dommages à l'ADN (résultats non montrés).

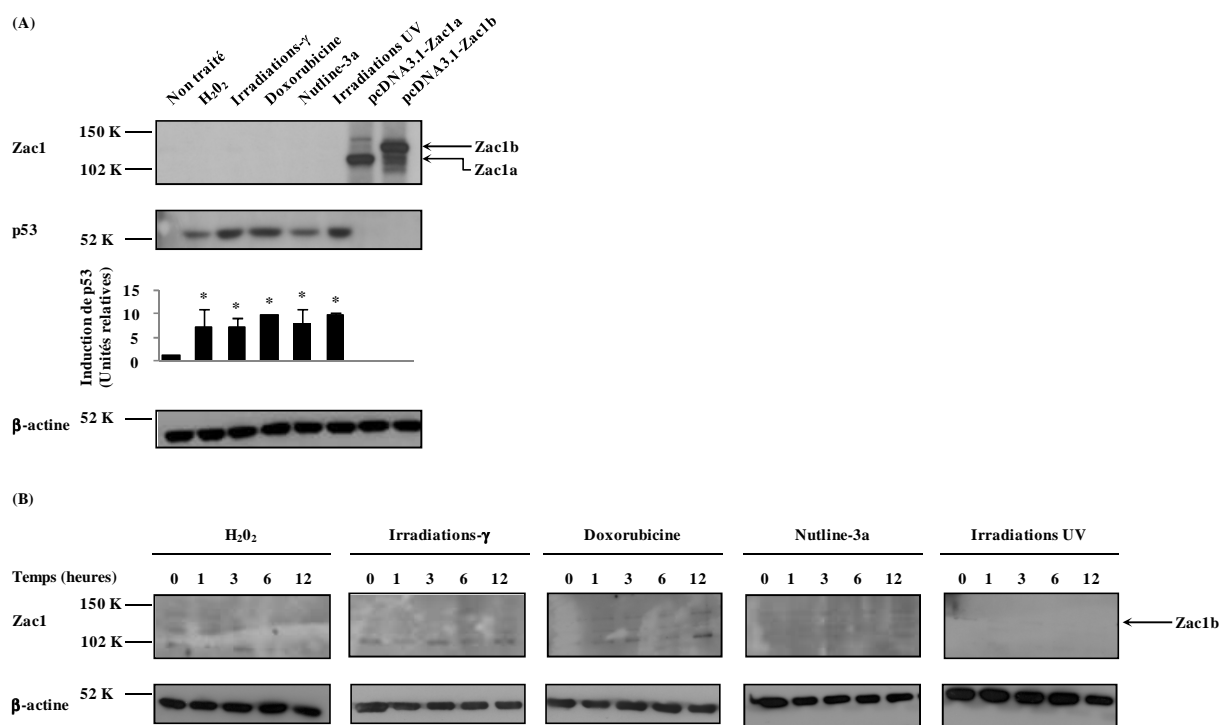


Figure 3. Expression de la protéine Zac1 suite à l'induction de dommages à l'ADN. (A-B) Des MEFs WT ont été traitées durant 6 heures (A) ou durant 1, 3, 6, et 12 heures (B) à l'H₂O₂ (200 μM), aux irradiations-γ(10 Gy), à la doxorubicine (0,2 μg/ml), au nutline-3a (5 μM) ou aux irradiations UV (50 J/m²). Des MEFs non traitées ont été utilisées comme contrôle. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1 et p53. La β-actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4. INDUCTION VIRALE DE ZAC1B A TRAVERS UN MECANISME DEPENDANT DU TLR3 ET D'IRF3

4.1. Expression de *Zac1* suite aux traitements avec divers stimuli pro-inflammatoires

Nous avons déterminé si certains stimuli pro-inflammatoires, pouvant agir comme de puissants inducteurs de l'apoptose (Grunnet *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2007b ; Rath et Aggarwal, 1999 ; Salaun *et al.*, 2006 ; Taura *et al.*, 2010), étaient capables de réguler l'expression de *Zac1*. Des MEFs ont été stimulées avec différents ligands de TLRs [Pam3CSK4 (TLR1/2), poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), flagelline (TLR5), R848 (TLR7/8), CpG (TLR9)] et des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β). Comme le montre la Figure 4, le poly(I:C), ligand spécifique au TLR3, induisait l'expression de la protéine *Zac1*. Nous avons également étudié l'expression de l'ARNm de *Zac1* après traitement avec les divers stimuli pro-inflammatoires. Tout comme observé pour la protéine *Zac1*, les stimuli pro-inflammatoires testés, excepté le poly(I:C), n'induisaient pas l'expression de l'ARNm de *Zac1* (résultats non montrés).

4.2. Régulation de l'expression de *Zac1b* après traitement au poly(I:C)

Afin de déterminer quel variant de transcrite de *Zac1* était induit par le poly(I:C), nous avons transfecté des MEFs avec des vecteurs d'expression codant pour *Zac1a* ou *Zac1b*. La comparaison avec les 2 variants de *Zac1* exprimés de manière exogène indiquait que le poly(I:C) induisait majoritairement l'isoforme *Zac1b* dans les MEFs. Certains blots montraient que la protéine *Zac1a* serait aussi faiblement induite après traitement au poly(I:C). Cependant, le variant de transcrite *Zac1a* ne possédant pas de région distincte à *Zac1b*, il nous était difficile d'étudier la régulation de son ARNm par RT-PCR quantitative. Nous nous sommes donc principalement focalisés sur les mécanismes de régulation de l'expression de *Zac1b* après traitement au poly(I:C). L'anticorps anti-*Zac1* reconnaissait également un signal non spécifique d'approximativement 140 kDa que nous suspectons d'être l'enzyme Myosin light chain kinase (MYLK) de par son poids moléculaire et sa séquence d'homologie avec l'immunogène utilisé pour la production d'anticorps anti-*Zac1* (Figure 5A).

Le poly(I:C) induisait également une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour *Zac1b*. Afin de savoir s'il s'agissait d'une augmentation transcriptionnelle ou d'une stabilisation de son ARNm, nous avons co-traité nos cellules au poly(I:C) et à l'actinomycine

D. L'actinomycine D est un agent intercalant de l'ADN. En se fixant spécifiquement à l'ADN, elle inhibe fortement la synthèse d'ARNm par la polymérase. En sa présence, la quantité d'ARNm codant pour mZac1 restait inchangée après stimulation au poly(I:C). Il s'agissait donc d'une régulation transcriptionnelle de Zac1b (Figure 5B).

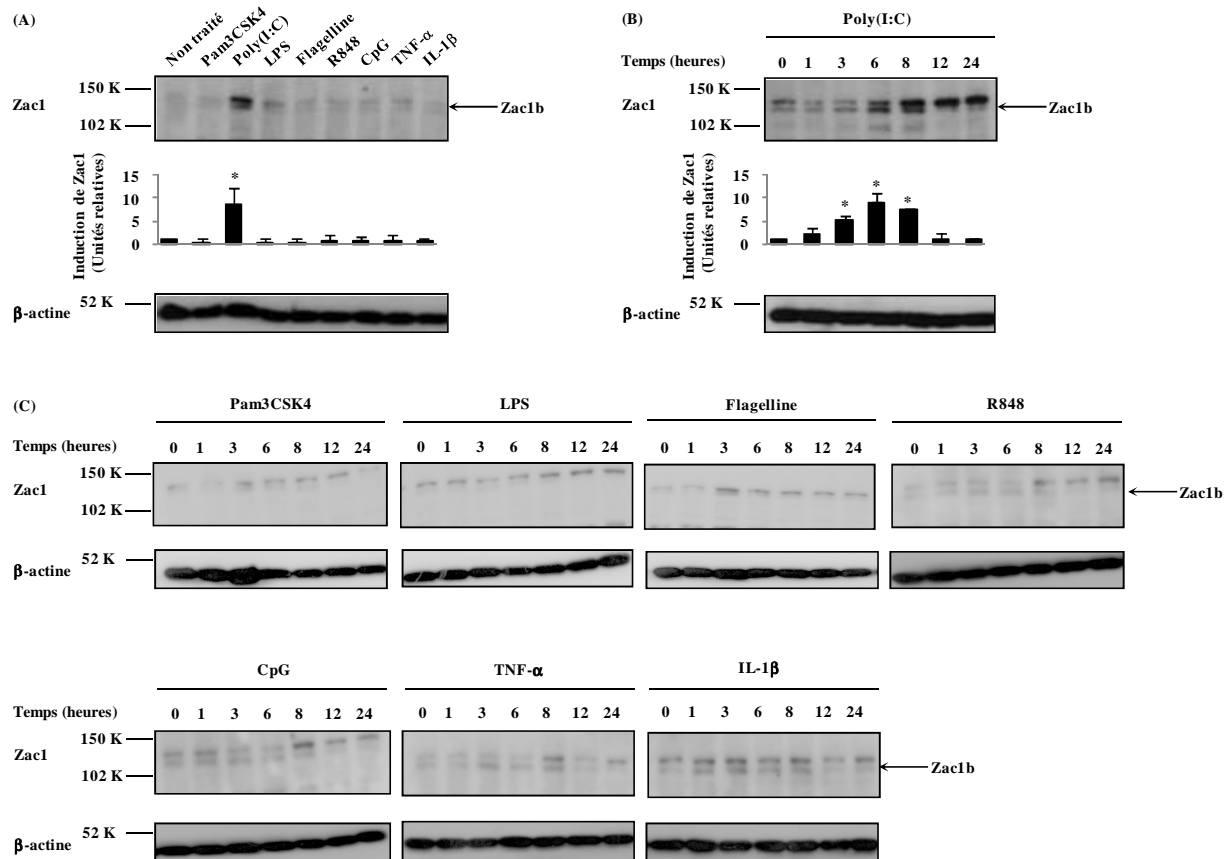


Figure 4. Expression de Zac1 suite aux traitements avec divers stimuli pro-inflammatoires. (A-B-C) Des MEFs ont été traitées durant 6 heures (A) ou durant 1, 3, 6, 8, 12 et 24 heures (B-C) avec du Pam3CSK4 (1 μ g/ml, ligand des TLRs1/2), du poly(I:C) (20 μ g/ml, ligand du TLR3), des LPS (10 μ g/ml, ligand du TLR4), de la flagelline (10 μ g/ml, ligand du TLR5), du R848 (5 μ g/ml, ligand des TLRs7/8), des CpG (5 μ M, ligand du TLR9), du TNF- α (20 ng/ml) ou de l'IL-1 β (10 ng/ml). Des MEFs non traitées ont été utilisées comme contrôle. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β -actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

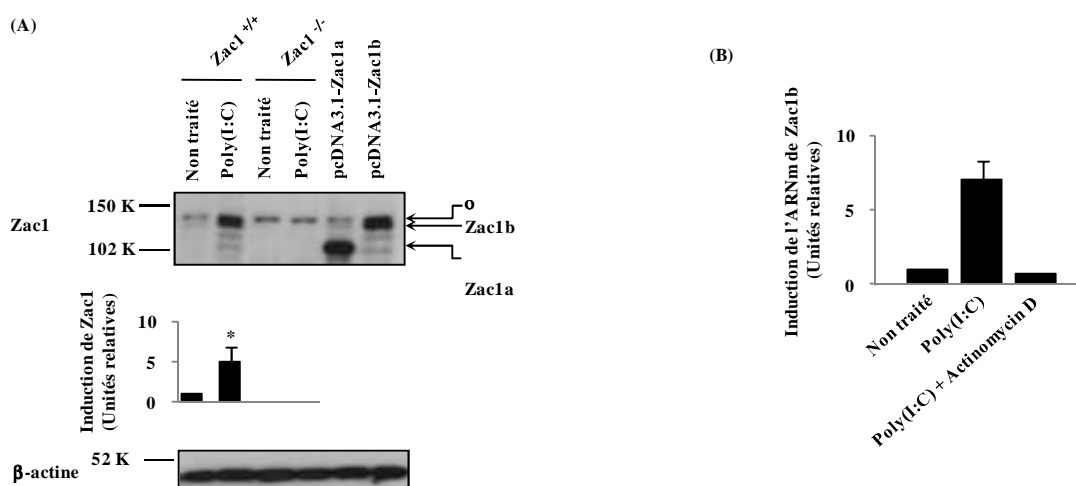


Figure 5. Régulation de l'expression de *Zac1b* après traitement au poly(I:C). (A) Des MEFs WT ont été transfectées durant 16 heures avec les vecteurs d'expression codant pour *Zac1a* et *Zac1b*. Pour comparaison, des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été traitées durant 6 heures au poly(I:C) (20 μ g/ml). Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de *Zac1*. La β -actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. (°) Signal non spécifique à *Zac1*. (B) Des MEFs WT ont été traitées durant 6 heures au poly(I:C) (20 μ g/ml), avec ou sans de l'actinomycine D (1 μ g/ml). L'expression de l'ARNm de *Zac1b* a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux MEFs non traitées dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. L'expression de *GAPDH* a servi de contrôle interne pour la normalisation. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.3. Expression de *Zac1b* dans des cellules primaires adultes traitées au poly(I:C)

Nous avons ensuite déterminé si le poly(I:C) induisait aussi l'expression de *Zac1b* dans des cellules primaires adultes. Nous avons montré que des souris traitées par injection intrapéritonéale avec du poly(I:C) exprimaient *Zac1b* au niveau de leurs macrophages péritonéaux (Figure 6).

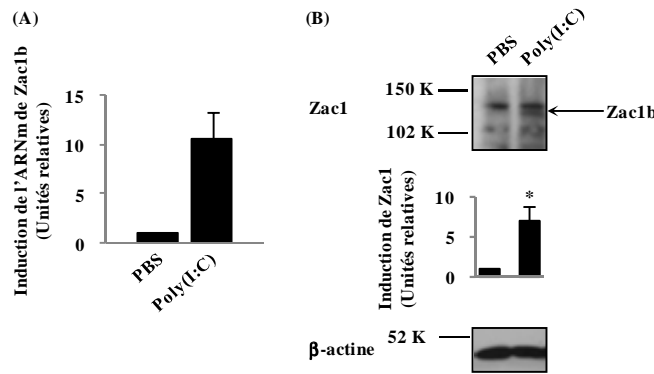


Figure 6. Expression de *Zac1b* dans des cellules primaires adultes traitées au poly(I:C). Trois souris C57Bl/6 sauvages ont été traitées par injection intrapéritonéale au poly(I:C) (200 μ g). Trois souris C57Bl/6 sauvages traitées au PBS ont été utilisées comme contrôle. Après 6 heures de traitement, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les macrophages péritonéaux ont été récupérés par un lavage du péritoine. (A) L'expression de l'ARNm de *Zac1b* a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux macrophages péritonéaux des souris traitées au PBS dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. L'expression de *GAPDH* a servi de contrôle interne pour la normalisation. (B) Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de *Zac1*. La β -actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.4. Voies de signalisation empruntées par le poly(I:C) pour induire l'expression de *Zac1b*

Le poly(I:C) est un double brin d'ARN synthétique qui active spécifiquement le TLR3 lorsqu'il est déposé dans le milieu extracellulaire (Alexopoulou *et al.*, 2001) et les RLHs lorsqu'il est transfecté dans la cellule (Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2006 ; Yoneyama *et al.*, 2004). Afin d'examiner la voie empruntée par le poly(I:C) pour induire *Zac1b*, nous avons traité des MEFs TLR3^{+/+} et TLR3^{-/-} avec du poly(I:C), soit déposé dans le milieu de culture, soit transfecté dans les cellules. *Zac1b* était exprimé dans les MEFs TLR3^{+/+} que le poly(I:C) ait été déposé ou transfecté. Cependant, l'induction de *Zac1b* par le poly(I:C) transfecté était beaucoup plus faible que lorsqu'il était déposé dans le milieu. *Zac1b* était exprimé dans les MEFs TLR3^{-/-} transfectées au poly(I:C) mais pas dans les MEFs TLR3^{-/-} sur lesquelles le poly(I:C) avait été déposé (Figure 7). Ces résultats indiquent que l'expression de *Zac1b* par le

poly(I:C) serait dépendante du TLR3 mais que les RLHs pourraient également contribuer à cette induction.

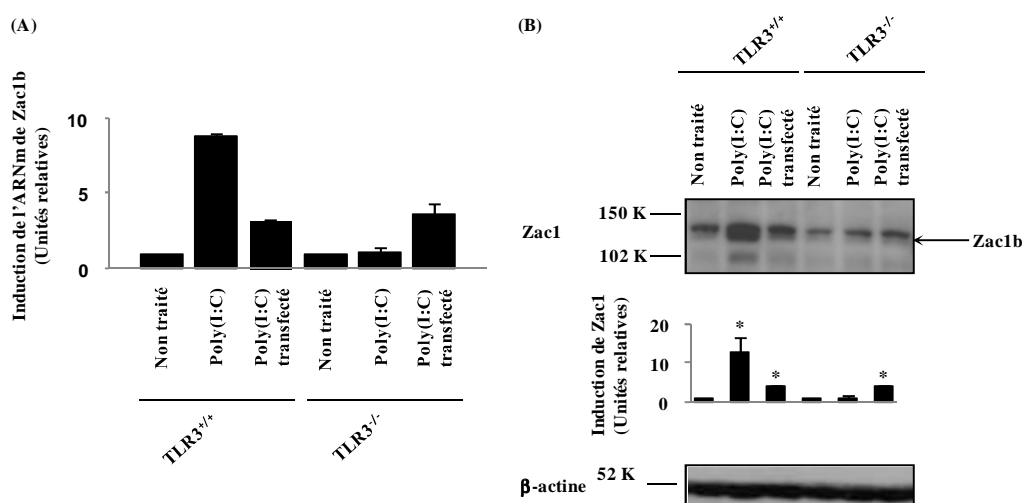


Figure 7. Rôles du TLR3 et des RLHs dans l'induction de Zac1b par le poly(I:C). Des MEFs TLR3^{+/+} et TLR3^{-/-} ont été traitées au poly(I:C) (20 µg/ml) ou transfectées au poly(I:C) durant 6 heures. (A) L'expression de l'ARNm de Zac1b a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux MEFs non traitées dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne ± leur déviation standard. L'expression de GAPDH a servi de contrôle interne pour la normalisation. (B) Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β-actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

Nous avons ensuite étudié la contribution d'IRF3, d'IRF7 et des IFNs de type I dans l'expression de Zac1b par le poly(I:C). Tout comme les MEFs WT, les MEFs IRF7^{-/-} exprimaient la protéine Zac1b après stimulation au poly(I:C). Par contre, l'expression de Zac1b était fortement diminuée dans les MEFs IRF3^{-/-} traitées au poly(I:C) (Figure 8A-B). Le traitement de MEFs WT aux IFNs de type I (IFN-α et IFN-β) n'induisait pas l'expression de Zac1b (Figure 8C-D). L'expression de Zac1b serait donc dépendante d'IRF3, indépendante d'IRF7 et indépendante des IFNs de type I. Inversement, nous avons aussi testé l'effet de Zac1b, induit par le poly(I:C), sur la production des IFNs de type I en comparant la production de l'IFN-α et de l'IFN-β par des MEFs Zac1^{+/+} et Zac1^{-/-} traitées au poly(I:C). Comme le montre la Figure 8E-F, Zac1b n'influçait pas la production des IFNs de type I induits par le poly(I:C).

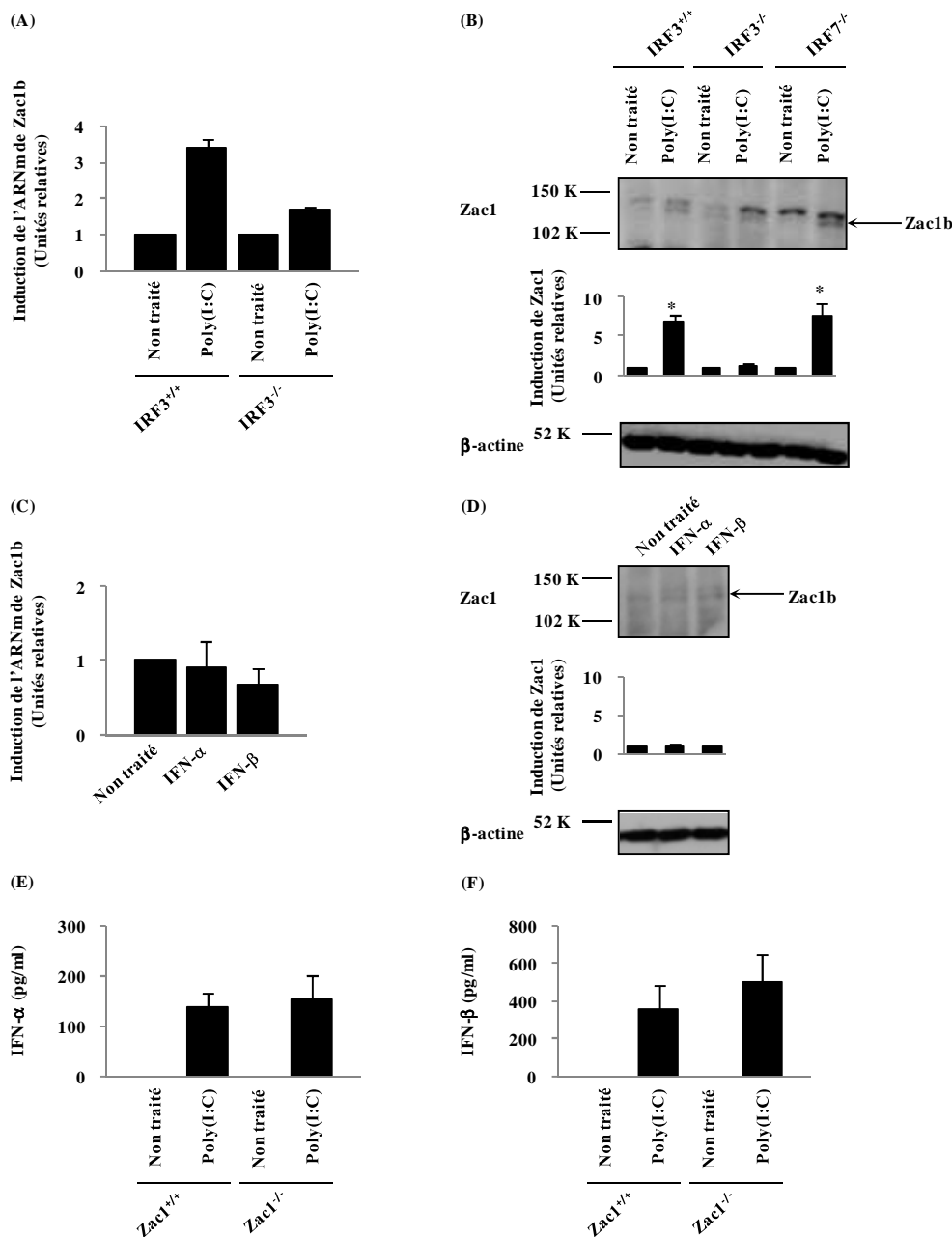


Figure 8. Rôles d'IRF3, d'IRF7 et des IFNs de type I dans l'induction de Zac1b par le poly(I:C). Des MEFs WT, IRF3^{-/-} et IRF7^{-/-} ont été traitées durant 6 heures au poly(I:C) (20 µg/ml). Des MEFs WT ont été traitées durant 6 heures à l'IFN-α et à l'IFN-β (100 U/ml). (A-C) L'expression de l'ARNm de Zac1b a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant aux MEFs non traitées dont la valeur a été fixée à 1 et sont représentés sous la forme de moyenne ± leur déviation standard. L'expression de GAPDH a servi de contrôle interne pour la normalisation. (B-D) Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β-actine

nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. (E-F) Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été traitées durant 24 heures au poly(I:C) (20 µg/ml). Les concentrations (E) en IFN- α et (F) en IFN- β dans les surnageants cellulaires ont été mesurées par test ELISA. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.5. Expression de *Zac1b* suite à une infection virale

Les résultats précédents ont montré que l'expression de *Zac1b* après traitement au poly(I:C) était régulée par le TLR3, potentiellement par les RLHs et par IRF3, qui sont des activateurs centraux de l'immunité antivirale. Ces observations nous laissèrent penser que *Zac1b* pourrait être impliqué dans la réponse antivirale. Nous avons tout d'abord observé si une infection virale était capable d'induire l'expression de *Zac1b*.

Il existe différentes familles de virus, classées selon la nature de leur acide nucléique (soit ADN, soit ARN, simple ou double brin), et possédant des méthodes de réplication qui leur sont propres. Etant donné que le TLR3 et les RLHs reconnaissent spécifiquement les intermédiaires de réplication à ARNdb des virus à ARN (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2006 ; Yoneyama *et al.*, 2004), nous avons infecté des MEFs avec 4 virus à ARN tels que le virus de l'Encéphalomyocardite (EMCV, Picornaviridae), le virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV, Rhabdoviridae), le virus de Sendai (SeV, Paramyxoviridae) et le Coxsackievirus CVB4 E2 (CVB4 E2, Picornaviridae). Des MEFs ont également été infectées avec un virus à ADN, à savoir l'Herpes Virus Simplex-1 (HSV-1, Herpesviridae). La protéine *Zac1b* était exprimée uniquement dans les MEFs infectées à l'EMCV (Figure 9A). Nous avons parallèlement étudié l'expression de l'ARNm de *Zac1* dans les MEFs après infection à l'EMCV, au VSV, au SeV, au CVB4E2 et à l'HSV-1. Tout comme observé pour la protéine *Zac1*, seule l'infection à l'EMCV induisait l'expression de l'ARNm de *Zac1* (résultats non montrés). Des MEFs *TLR3*^{-/-} ont également été infectées à l'EMCV et n'exprimaient pas la protéine *Zac1b*, indiquant que l'induction de *Zac1b* après infection à l'EMCV était dépendante de la voie du TLR3 (Figure 9B).

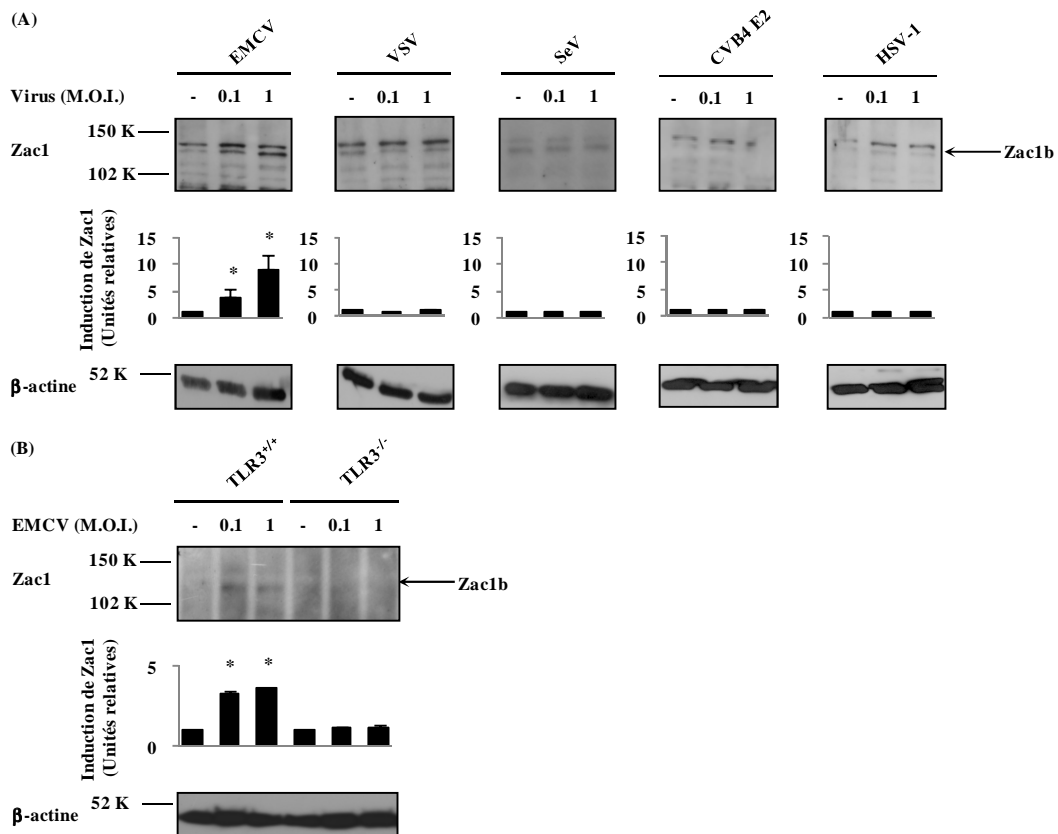


Figure 9. Expression de Zac1b suite à une infection virale. (A) Des MEFs WT ont été infectées durant 6 heures à l'EMCV, au VSV, au SeV, au CVB4 E2 ou à l'HSV-1 [0,1 ou 1 Multiplicity Of Infection (M.O.I.)]. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β -actine nous a servi de contrôle interne. (B) Des MEFs TLR3^{+/+} et TLR3^{-/-} ont été infectées à l'EMCV durant 6 heures. Les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour l'expression de Zac1. La β -actine nous a servi de contrôle interne. (*) Significativement différent du contrôle non traité. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.6. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la survie de cellules infectées à l'EMCV

Zac1 ayant été décrit comme un facteur pro-apoptotique, (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998), nous avons déterminé si l'expression de *Zac1b* pouvait avoir un impact sur la survie des cellules infectées à l'EMCV. Les tests de survie ont montré que les MEFs *Zac1*^{-/-} étaient faiblement mais significativement moins sensibles à la mort induite par l'EMCV que les MEFs *Zac1*^{+/+} (Figure 10A). Cependant, cette augmentation de la survie des MEFs *Zac1*^{-/-} ne correspondait ni à une augmentation de leur prolifération cellulaire, ni à une diminution de leur taux d'apoptose (Figure 10B-C).

Des tests de survie ont été également effectués sur des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} infectées avec d'autres virus (VSV, SeV, HSV-1 ou CVB4 E2) ou traitées avec des inducteurs de dommages à l'ADN (H₂O₂ ou doxorubicine). Pour toutes ces conditions, des taux de survie similaires ont été observés entre les MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-}, indiquant que l'augmentation du taux de survie des MEFs *Zac1*^{-/-} après infection à l'EMCV serait spécifique à la surexpression de *Zac1b* (Figure 11).

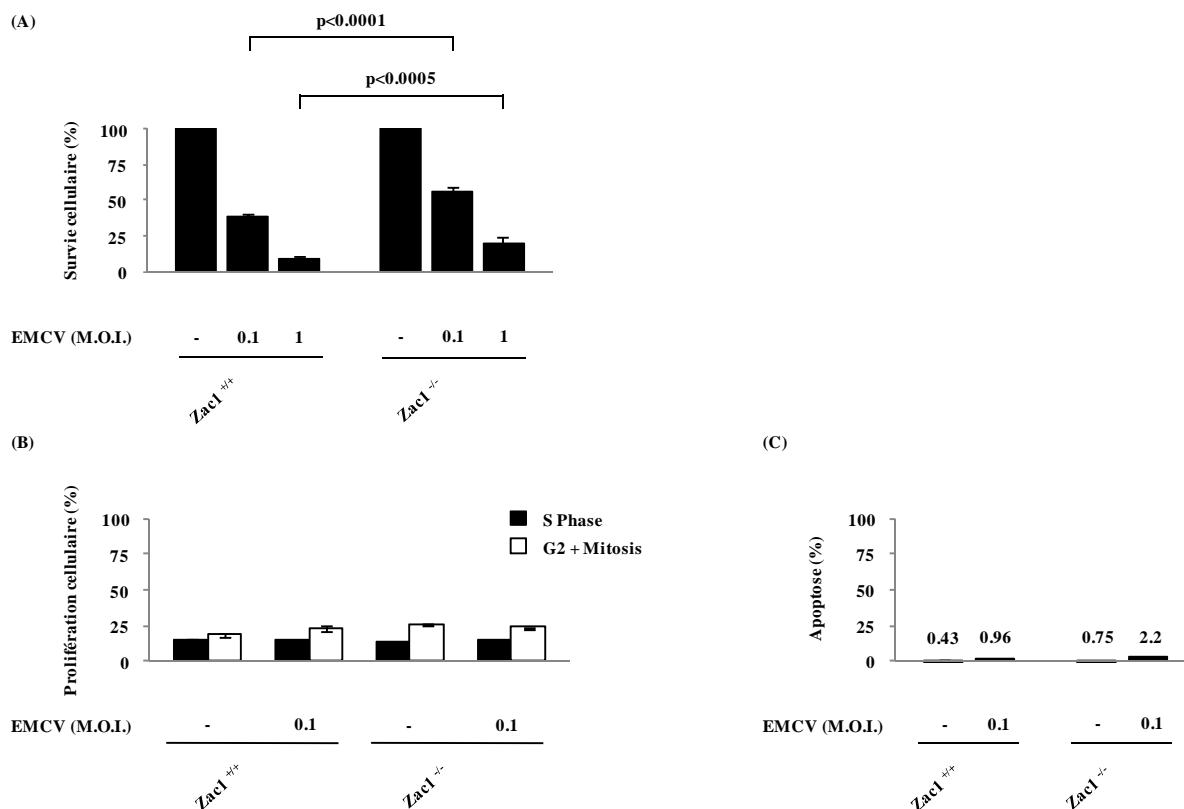


Figure 10. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la survie de cellules infectées à l'EMCV. (A) Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été infectées à l'EMCV durant 12 heures. La viabilité des cellules a été déterminée par test MTT. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. (B-C) Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été infectées durant 6 heures à l'EMCV (0,1 M.O.I.). (B) La prolifération cellulaire a été déterminée par un test d'incorporation au BrdU combiné à une coloration de l'ADN total avec une solution de 7-AAD. Cette double coloration a permis, d'une part, de mettre en évidence les cellules synthétisant activement de l'ADN (incorporation du BrdU) et, d'autre part, de distinguer les cellules en phase de réplication S et en phase G2 + Mitose (coloration au 7AAD). (C) L'apoptose a été déterminée par un test TUNEL. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

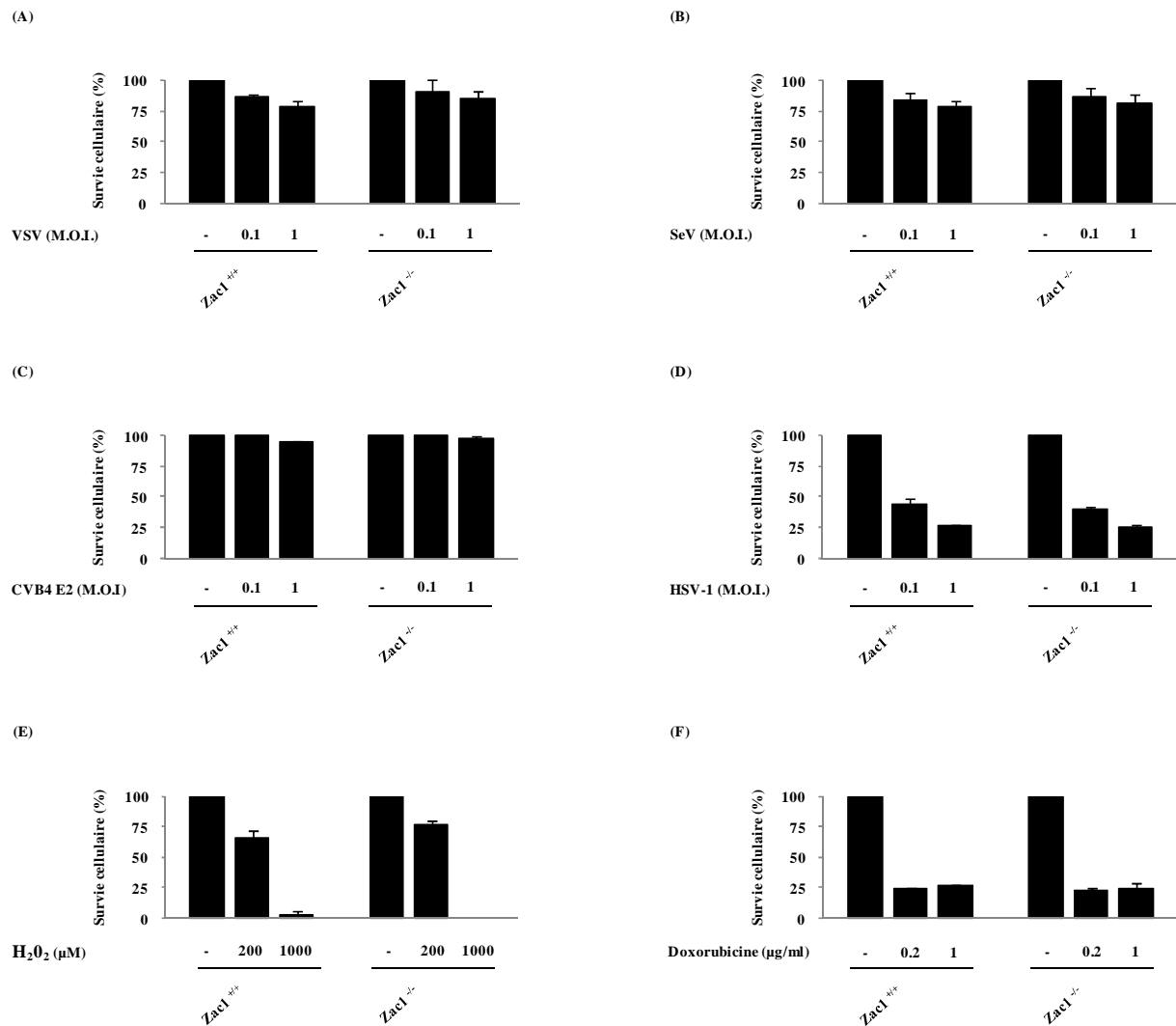


Figure 11. Effets de l'inactivation de *Zac1b* sur la survie de cellules infectées au VSV, au SeV, au CVB4 E2 ou à l'HSV-1 ou traitées à l'H₂O₂ ou à la doxorubicine. Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été infectées durant 24 heures (A) au VSV, (B) au SeV, ou (C) au CVB4 E2 (0,1 ou 1 M.O.I.), ou (D) infectées durant 12 heures à l'HSV-1 (0,1 ou 1 M.O.I.), ou traitées durant 24 heures (E) à l'H₂O₂ (200 ou 1000 μM) ou (F) à la doxorubicine (0,2 ou 1 μg/ml). La viabilité des cellules a été déterminée par test MTT. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± leur déviation standard. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.7. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la réplication virale dans des cellules infectées à l'EMCV

Nous nous sommes demandés si l'expression de *Zac1b* pouvait avoir un impact sur la réplication virale dans les cellules infectées à l'EMCV. Nous avons par conséquent mesuré les titres viraux dans les surnageants de MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} infectées 24 heures à l'EMCV (0,1 et 1 M.O.I.). La progénie virale était similaire dans les MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} (Figure 12).

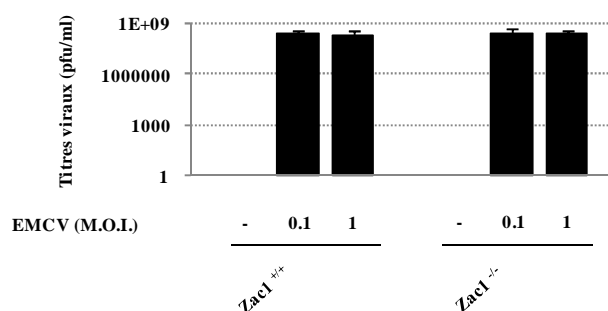


Figure 12. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la réplication virale dans des cellules infectées à l'EMCV. Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été infectées durant 24 heures à l'EMCV (0,1 et 1 M.O.I.). Les titres viraux ont été déterminés par test de dilutions sériées. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. Cette expérience a été répétée plus de 3 fois.

4.8. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la production des IFNs de type I dans des cellules infectées à l'EMCV

Nous avons aussi testé l'effet de *Zac1b* induit par l'EMCV sur la production des IFNs de type I, en comparant la production de l'IFN- α et de l'IFN- β dans des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} infectées à l'EMCV. Comme le montre la Figure 13, *Zac1b* n'influçait pas la production des IFNs de type I induits par l'EMCV.

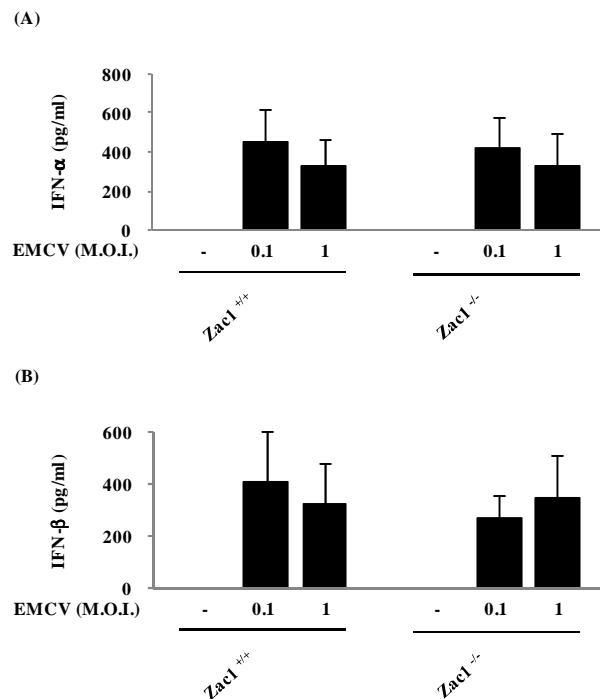


Figure 13. Effets de l'expression de *Zac1b* sur la production des IFNs de type I dans des cellules infectées à l'EMCV. (A-B) Des MEFs *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{-/-} ont été infectées durant 24 heures à l'EMCV (0,1 et 1 M.O.I.). Les concentrations (A) en IFN-α et (B) en IFN-β dans les surnageants cellulaires ont été mesurés par test ELISA. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm leur déviation standard. Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

4.9. Effets de l'inactivation de *Zac1* dans des souris infectées à l'EMCV

Zac1 étant un gène soumis à l'empreinte génomique, les souris hétérozygotes *Zac1*^{+/-pat} héritent d'un allèle maternel qui n'exprime pas *Zac1* et sont donc déficientes pour ce gène (Varrault *et al.*, 2006). En accord avec ces données (Varrault *et al.*, 2006), nous avons aussi observé que l'ARNm de *Zac1* n'était pas exprimé dans les organes de souris *Zac1*^{+/-pat} tels que le foie ou les poumons (Figure 14). Dans le cadre de cette étude, les individus hétérozygotes *Zac1*^{+/-pat} ont donc été considérés comme des mutants complets.

Afin d'observer les effets de l'inactivation du gène *Zac1* sur la survie des souris, nous avons infecté des souris *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{+/-pat} à l'EMCV. Comme le montre la Figure 15A-C, les souris *Zac1*^{+/-pat} ne montraient pas de différence significative au niveau de leur taux de survie suite à une infection à l'EMCV. De plus, la production des IFNs de type I et la quantité

de titres viraux mesurés au niveau du cœur étaient similaires chez les souris $Zac1^{+/+}$ et $Zac1^{+/-pat}$ infectées à l'EMCV (Figure 15D-F).

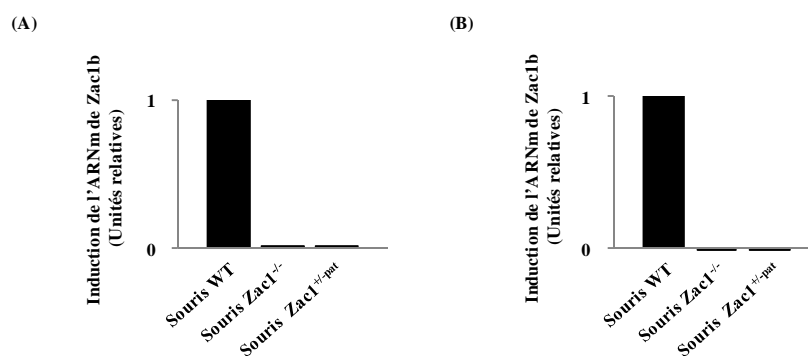


Figure 14. Détection de l'ARNm de $Zac1b$ dans les organes de souris $Zac1^{+/-pat}$. (A) Le foie et (B) les poumons ont été prélevés sur des souris C57Bl/6 $Zac1^{+/+}$, $Zac1^{-/-}$ ou $Zac1^{+/-pat}$, préalablement sacrifiées par dislocation cervicale. L'expression de l'ARNm de $Zac1b$ a été estimée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en unités relatives se rapportant à la quantité d'ARNm $Zac1b$ présent dans l'organe de la souris sauvage dont la valeur a été fixée à 1. L'expression de $GAPDH$ a servi de contrôle interne pour la normalisation.

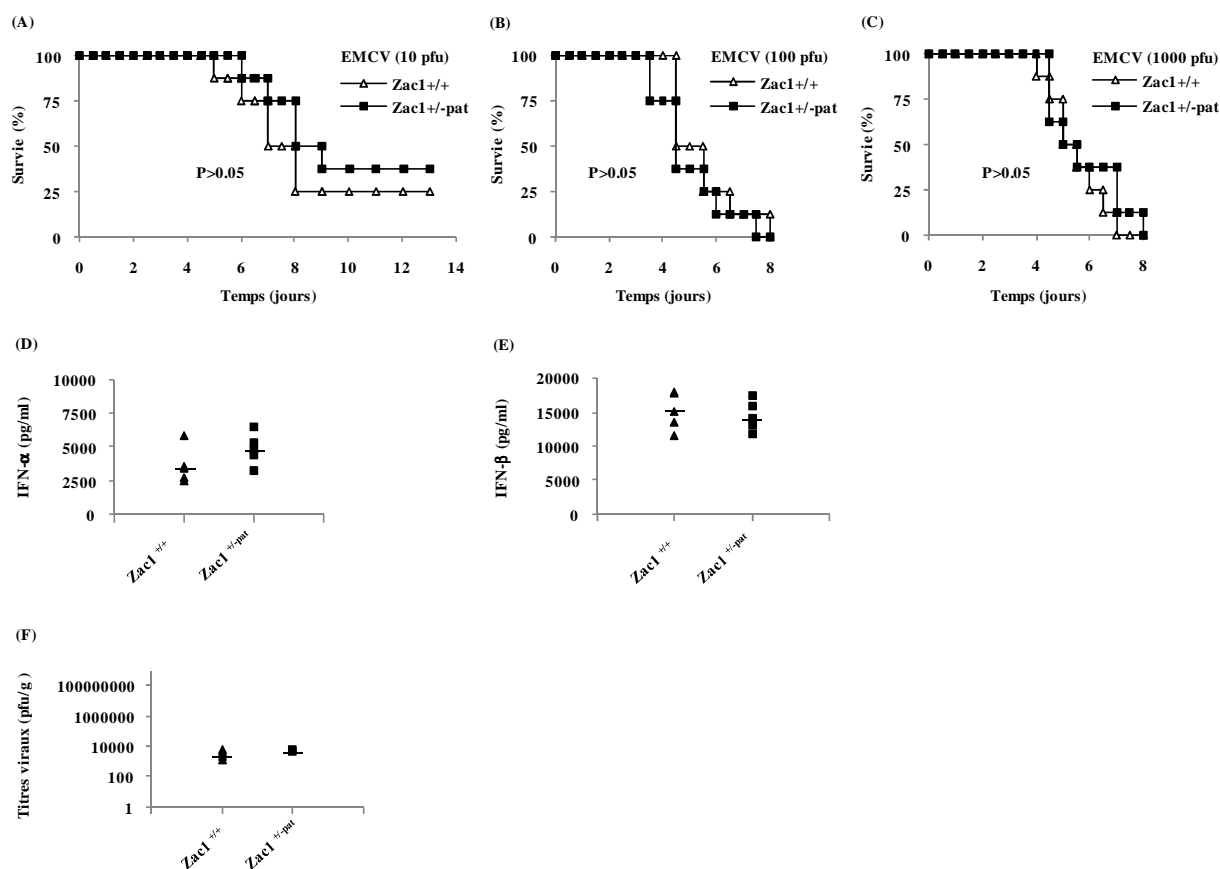


Figure 15. (A-B-C) Des souris *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{+/-pat} ont été infectées par injection intrapéritonéale avec (A) 10, (B) 100 ou (C) 1000 plaque-forming units (pfu) d'EMCV et ont été suivies toutes les 12 heures afin de déterminer leur taux de survie (n=8/groupe). Un test général de Wilcoxon a été utilisé pour évaluer la différence de survie entre les souris *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{+/-pat}. De comparables résultats ont été obtenus dans 2 expériences indépendantes. (D-E) Des souris *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{+/-pat} ont été infectées par injection intrapéritonéale avec 10⁷ pfu d'EMCV (n=6/groupe). Les sérums ont été récoltés après 6 heures d'infection sur les souris préalablement sacrifiées par dislocation cervicale. Les concentrations (D) en IFN- α et (E) en IFN- β dans les sérums ont été mesurés par test ELISA. (F) Des souris *Zac1*^{+/+} et *Zac1*^{+/-pat} ont été infectées par injection intrapéritonéale avec 100 pfu d'EMCV (n=4/groupe). Après 2 jours d'infection, les titres viraux en EMCV présents dans le cœur des souris infectées ont été déterminés par test de dilutions sériées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Malgré les diverses fonctions potentielles attribuées à Zac1, les mécanismes régulant son expression physiologique, ainsi que sa fonction biologique exacte restent méconnus. La protéine Zac1 est rarement exprimée dans les tissus ou cellules où l'on retrouve son ARN messager. De plus, aucun modèle cellulaire dans lequel la protéine Zac1 est exprimée de manière endogène n'avait été établi et correctement caractérisé avant que ne débute la présente étude.

N'ayant au départ aucun contrôle, positif ou négatif, pour nous aider à identifier la protéine Zac1, nous avons cloné les 2 variants de transcrits de Zac1 murin, Zac1a et Zac1b, dans des vecteurs d'expression que nous avons utilisés pour transfecter des cellules 293. En Western blot, les signaux respectifs à Zac1a et Zac1b apparaissaient à un poids moléculaire d'environ 105 kDa et 125 kDa, alors que leurs tailles attendues étaient d'environ 76 kDa et 79 kDa. Les protéines Zac1a et Zac1b migreraient plus lentement que prévu sur gel Western blot car elles possèdent de nombreuses répétitions en acide glutamique (E) (Huang et Stallcup, 2000 ; Varrault *et al.*, 1998). Nous avons également cloné Zac1 humain mais nous n'avons pas trouvé d'anticorps capable de le détecter. Nous avons donc décidé de débiter notre étude chez la souris. La protéine murine Zac1 n'ayant jamais été mise en évidence *in vivo*, nous l'avons recherchée, dans un premier temps, dans une série d'organes murins sans succès.

Dans des conditions de croissance cellulaire optimales, la protéine p53 possède un temps de demi-vie très court et est par conséquent exprimée à un taux très faible dans les différents tissus. MDM2 joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression de p53, d'une part en bloquant son activité transcriptionnelle et d'autre part, en induisant sa poly-ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S (Chene, 2003 ; Haupt *et al.*, 1997 ; Kubbutat *et al.*, 1997). Lorsque les cellules sont soumises à un stress (dommages à l'ADN, signaux hyperprolifératifs, ...), p53 et MDM2 subissent des modifications post-traductionnelles, qui par divers mécanismes, empêchent leur interaction et donc la dégradation de p53. La forme stabilisée de p53 peut, dès lors, induire soit l'arrêt du cycle cellulaire au point de transition G1/S, soit la mort cellulaire par apoptose (Chene, 2003 ; Ling *et al.*, 2002). Par analogie à p53, Zac1 pourrait posséder un temps de demi-vie très court et de ce fait, être indétectable dans les organes où l'on localise son ARNm. Nous nous sommes alors intéressés aux potentielles voies de dégradation de la protéine Zac1. Nous avons choisi d'utiliser comme

modèle cellulaire des MEFs car il a été décrit que ces cellules exprimaient l'ARNm de *Zac1* à l'état basal (El Kharroubi *et al.*, 2001). La protéine *Zac1b* s'accumulait dans des MEFs traitées avec des inhibiteurs de la voie du protéasome, suggérant que tout comme *p53*, *Zac1b* serait dégradée par la voie du protéasome. Cependant, cette accumulation de *Zac1b* résultait non pas d'un mécanisme post-translationnel mais plutôt d'un mécanisme transcriptionnel ou post-transcriptionnel. L'inhibition de la voie du protéasome empêche la dégradation de nombreux facteurs pro-apoptotiques tels que *p53* et induit la mort cellulaire (MacLaren *et al.*, 2001 ; Shinohara *et al.*, 1996). *Zac1b* pourrait donc être régulé transcriptionnellement par un ou plusieurs facteurs pro-apoptotiques stabilisés. Cependant son inactivation n'avait pas d'impact significatif sur l'apoptose induite par le MG132. L'inhibition de la voie du protéasome induit l'accumulation de nombreuses protéines (Adams, 2003). Il serait intéressant d'observer si certains mécanismes physiologiques faisant suite à une accumulation importante de protéines dans la cellule, tels que le stress du réticulum endoplasmique (Xu *et al.*, 2005), seraient capables d'induire l'expression de *Zac1*.

Zac1 possède la particularité avec *p53*, de pouvoir induire par des voies différentes et indépendantes, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Spengler *et al.*, 1997). Cependant, cette fonction n'a jamais pu être démontrée en conditions physiologiques. *p53* est principalement exprimé suite à des dommages à l'ADN tels que ceux causés par l' H_2O_2 , les irradiations γ , la doxorubicine, les nutlines et les irradiations UV (Van Dyke, 2007). Nous avons testé l'effet de ces stimuli sur l'expression de *Zac1* dans des MEFs. Contrairement à *p53*, la protéine *Zac1* n'était exprimée dans aucune des conditions testées. Malgré leurs similitudes de fonction, ces résultats indiquent que *Zac1* serait donc régulé différemment de *p53*.

Certains stimuli pro-inflammatoires peuvent agir comme de puissants inducteurs de l'apoptose (Ma *et al.*, 2007b ; Rath et Aggarwal, 1999 ; Salaun *et al.*, 2006 ; Taura *et al.*, 2010). Nous nous sommes demandés si le $TNF-\alpha$, l' $IL-1\beta$, et les ligands de TLRs, de puissants stimuli pro-inflammatoires, pouvaient réguler l'expression de *Zac1*. Les cytokines pro-inflammatoires n'ont pas eu d'effet sur l'induction de *Zac1*. Parmi les ligands de TLRs testés, le poly(I:C), ligand spécifique au TLR3, était capable d'induire l'expression de *Zac1* dans les MEFs. Il existe deux variants murins de *Zac1*, *Zac1a* et *Zac1b*, issus de l'épissage alternatif (Huang et Stallcup, 2000). Le traitement au poly(I:C) induisait majoritairement l'expression de l'isoforme *Zac1b* et ce, en le régulant au niveau transcriptionnel. La protéine

Zac1a semblait également être faiblement induite après traitement au poly(I:C). Cependant, le variant de transcrite Zac1a ne possédant pas de région distincte à Zac1b, il nous était difficile d'étudier la régulation de son ARNm par RT-PCR quantitative. C'est pourquoi nous avons décidé de nous focaliser principalement sur les mécanismes de régulation de l'expression de Zac1b après traitement au poly(I:C).

Les MEFs sont des cellules embryonnaires, ce qui pouvait limiter l'interprétation des résultats obtenus dans ces cellules. Nous nous sommes par conséquent intéressés à l'expression de Zac1b dans des cellules primaires adultes. Le traitement de souris au poly(I:C) par injection intrapéritonéale induisait l'expression de Zac1b au niveau de leurs macrophages péritonéaux. Nous avons donc, pour la première fois, mis en évidence la protéine Zac1b murine *in vivo*.

Nous nous sommes ensuite penchés sur les mécanismes régulant l'expression de Zac1b après traitement au poly(I:C). Le poly(I:C) est un double brin d'ARN synthétique qui active le TLR3 lorsqu'il est reconnu dans les vésicules endosomales et les récepteurs cytosoliques RLHs lorsqu'il est détecté dans le cytoplasme (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2006 ; Yoneyama *et al.*, 2004). Le poly(I:C) induisait l'expression de Zac1b selon une voie dépendante du TLR3. Cependant, les RLHs pourraient, de manière plus faible, également contribuer à cette induction. La reconnaissance du poly(I:C) par le TLR3 ou les RLHs conduit à l'activation d'IRF3 et d'IRF7 et à la production d'IFNs de type I (O'Neill *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2004 ; Yoneyama *et al.*, 1998). Nous avons montré que l'expression de Zac1b après traitement au poly(I:C) était dépendante d'IRF3, indépendante d'IRF7 et indépendante des IFNs de type I. Inversement, l'expression de Zac1b n'influçait pas la production des IFNs de type I induits par le poly(I:C). Ces observations nous laissent penser qu'IRF3, en tant que facteur de transcription, pourrait directement réguler l'expression de Zac1b au niveau transcriptionnel. Le logiciel Genomatix a défini 3 promoteurs putatifs de Zac1, localisés respectivement à cheval sur la région en amont du start de transcription et de l'exon 1, dans l'intron 3, et à cheval sur l'intron 4 et l'exon 5. Chacun des 3 promoteurs putatifs contiendrait un site potentiel de fixation IRF (scores respectifs de 0.81, 0.69 et 0.86). En perspective, il serait intéressant d'étudier la fixation éventuelle d'IRF3 au promoteur de Zac1.

Le TLR3 et les RLHs sont des activateurs centraux de l'immunité antivirale et sont activés par des intermédiaires de réplication à ARNdb des virus à ARN (Alexopoulou *et al.*,

2001 ; Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2006 ; Yoneyama *et al.*, 2004). Nous avons donc testé si une réelle infection virale pouvait réguler l'expression de Zac1b. Des MEFs ont été infectées avec différents virus à ARN tels que l'EMCV (Picornaviridae), le VSV (Rhabdoviridae), le SeV (Paramyxoviridae) et le CVB4 E2 (Picornaviridae) mais aussi avec le virus à ADN, HSV-1 (Herpesviridae). Seule l'infection par l'EMCV induisait l'expression de la protéine Zac1b. Nous nous sommes alors interrogés sur la spécificité d'induction de Zac1b par l'EMCV, en comparaison aux autres virus testés. Bien que des études aient montré que le TLR3 pouvait être impliqué dans la réponse au HSV-1 (Zhang *et al.*, 2007), ce virus à ADN n'est pas spécifique à la voie du TLR3 et des RLHs. Le CVB4 E2 est un virus humain et se réplique très peu dans les MEFs (résultats non montrés). Il n'est donc pas étonnant que ces 2 virus n'induisent pas l'expression de Zac1b. Il a été décrit que le VSV et le SeV seraient reconnus préférentiellement par le RLH RIG-I alors que l'EMCV, en tant que Picornaviridae, activerait plus spécifiquement le RLH MDA5 (Gitlin *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2005 ; Kato *et al.*, 2006 ; Saito et Gale, 2008). L'induction de Zac1b par l'EMCV pourrait être dépendante de MDA5, ce qui expliquerait pourquoi cette protéine n'est pas exprimée après infection au VSV et au SeV. Cependant, nous avons observé que l'induction de Zac1b après infection à l'EMCV était principalement dépendante du TLR3, rendant cette hypothèse peu probable. Les virus ont développé de nombreuses stratégies pour bloquer l'une ou l'autre des étapes de l'action des IFNs de type I. Les principaux mécanismes utilisés sont l'inhibition de la production des IFNs de type I et de leur voie de signalisation, ainsi que l'inhibition des voies antivirales qu'ils activent (Barber, 2001). Le VSV et le SeV bloquent la production des IFNs de type I dans les MEFs, selon un mécanisme non défini (Kato *et al.*, 2006). Comme d'autres virus, le VSV et le SeV pourraient empêcher la production en IFNs de type I en inhibant l'activité d'IRF3 (Basler *et al.*, 2003 ; Cardenas *et al.*, 2006), ce qui expliquerait pourquoi ils seraient incapables d'induire l'expression de Zac1b. L'EMCV, au contraire, induit une forte activité d'IRF3 (Kato *et al.*, 2006) et vraisemblablement selon cette voie, l'expression de Zac1b.

Enfin, nous avons tenté de définir la fonction potentielle de Zac1b au cours d'une infection par l'EMCV. Zac1 étant décrit comme un facteur pro-apoptotique (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998), nous avons investigué si l'expression de Zac1b après infection à l'EMCV pouvait avoir un impact sur la survie des cellules infectées. Les MEFs Zac1^{-/-} étaient faiblement mais significativement moins sensibles que les MEFs Zac1^{+/+} à la mort cellulaire induite par l'EMCV. Cependant, nous n'avons pas pu trouver d'explication à cette

observation. L'augmentation de la survie des MEFs $Zac1^{-/-}$ ne correspondait ni à une augmentation de leur prolifération cellulaire, ni à une diminution de leur taux d'apoptose. De plus, $Zac1$ n'affectait pas la réplication virale et la production en IFNs de type I après infection à l'EMCV. Les MEFs $Zac1^{-/-}$ infectées avec d'autres virus (VSV, SeV, CVB4 E2 et HSV-1) et traitées avec des inducteurs de dommages à l'ADN (H_2O_2 et doxorubicine) ne présentaient pas un taux de survie plus élevé par rapport aux MEFs $Zac1^{+/+}$. La différence de survie observée entre les MEFs $Zac1^{+/+}$ et $Zac1^{-/-}$ était donc bien spécifique à l'infection à l'EMCV et non due, de manière générale, à une résistance accrue des MEFs $Zac1^{-/-}$ à la mort cellulaire. En perspective, nous effectuerons un microarray afin de comparer le transcriptome de MEFs $Zac1^{+/+}$ et de MEFs $Zac1^{-/-}$ infectées à l'EMCV. Connaître les gènes régulés par $Zac1$ pourrait nous aider à caractériser l'impact de son expression lors d'une infection virale.

Le virus de l'EMCV infecte préférentiellement *in vivo* les cardiomyocytes et entraîne leur nécrose. Les lésions du myocarde finissent par causer la mort de l'animal infecté (Kato *et al.*, 2006). Cependant, la mort des cellules infectées, induite notamment par p53, est connue également pour limiter la réplication et la dissémination virale, rendant l'hôte plus résistant à l'infection (Porta *et al.*, 2005 ; Takaoka *et al.*, 2003). Nous nous sommes demandés quel effet l'inactivation du gène $Zac1$ pourrait avoir sur la survie de souris infectées à l'EMCV. $Zac1$ étant un gène soumis à l'empreinte génomique, les souris hétérozygotes $Zac1^{+/-pat}$ héritent d'un allèle maternel qui n'exprime pas $Zac1$ et sont donc déficientes pour ce gène (Varrault *et al.*, 2006).

En accord avec ces données (Varrault *et al.*, 2006), nous avons aussi observé que l'ARNm de $Zac1$ n'était pas exprimé dans les organes de souris $Zac1^{+/-pat}$. Les souris $Zac1^{-/-}$ étant impossibles à générer en nombre suffisant, nous avons utilisé des souris $Zac1^{+/-pat}$ pour étudier l'inactivation du gène $Zac1$. Aucune différence significative entre les taux de survie, la production des IFNs de type I et la réplication virale n'a été observée chez les souris $Zac1^{+/+}$ et $Zac1^{+/-pat}$ après infection à l'EMCV. Malgré les effets observés *in vitro* de $Zac1$ sur la survie des cellules infectées à l'EMCV, son rôle *in vivo* suite à une infection virale reste indéterminé.

Nous avons réfléchi à plusieurs hypothèses capables d'expliquer pourquoi un effet de $Zac1$ dans la réponse antivirale s'observait uniquement *in vitro*. Premièrement, il se pourrait que le rôle de $Zac1$ après infection soit tellement faible qu'il ne permette pas d'influencer des mécanismes tels que la survie de l'hôte, la réplication virale ou la production en IFNs de type I. Deuxièmement, la différence biologique entre les cardiomyocytes chez la souris et les

MEFs en culture pourrait expliquer qu'aucun effet de *Zac1* n'ait été observé *in vivo*. Troisièmement, l'allèle maternel du gène *Zac1* pourrait être réactivé à un moment donné chez les souris *Zac1*^{+/-pat} selon un mécanisme non défini. Cependant, nous avons infecté à l'EMCV les quelques souris *Zac1*^{-/-} que nous avons réussi à générer. Le taux de survie de ces souris restait identique au taux de survie des souris *Zac1*^{+/+} (résultats non montrés). Quatrièmement, l'inactivation du gène *Zac1* chez la souris *Zac1* KO pourrait être compensée par l'activation d'autres gènes. En effet, étonnamment, les souriceaux *Zac1* KO survivants à la naissance, d'une part arrivent à l'âge adulte tout à fait normalement en rattrapant leur retard de croissance (Varrault *et al.*, 2006) et d'autre part, ne développent pas de tumeurs alors que *Zac1* est connu comme gène candidat suppresseur de tumeurs (Spengler *et al.*, 1997 ; Varrault *et al.*, 1998 ; Varrault *et al.*, 2006). Suite à cette quatrième hypothèse, nous avons élaboré une souris KO où l'inactivation du gène *Zac1* peut être induite à l'âge adulte. Ce système utilise une recombinase appelée Cre-ER. Cette recombinase résulte de la fusion de la recombinase originelle Cre au domaine de fixation du ligand du récepteur de l'œstrogène humain. La fixation du tamoxifène induit l'activation de la recombinase et l'excision d'un segment d'ADN situé entre deux séquences cibles loxP (Brocard *et al.*, 1997). Dans notre système, le principal exon codant du gène *Zac1* est encadré par deux sites loxP. L'activation « tamoxifène-dépendante » de la recombinase Cre-ER induit l'excision au niveau des séquences loxP de l'exon codant pour *Zac1* et l'inactivation irréversible de notre gène. L'utilisation de cette souris transgénique nous permettrait, d'une part de travailler préférentiellement sur des individus homozygotes et d'autre part, d'observer les effets de l'inactivation de *Zac1* sur un individu adulte.

En conclusion, ce travail a montré que les stimuli capables d'induire p53 n'induisent pas l'expression de la protéine *Zac1* suggérant que la protéine *Zac1* est régulée différemment de p53. La dernière partie de notre recherche a mis en évidence, pour la première fois, une condition physiologique dans laquelle la protéine *Zac1* est exprimée. En effet, le poly(I:C) induit l'expression de l'isoforme *Zac1b* à travers un mécanisme transcriptionnel dépendant du TLR3 et d'IRF3. *Zac1b* est également exprimé après infection au virus de l'EMCV selon une voie dépendante du TLR3. Malgré ses effets observés *in vitro* sur la survie des cellules infectées à l'EMCV, *Zac1b* ne semblerait pas avoir d'impact sur l'infection virale *in vivo*. Sa fonction biologique exacte reste encore à élucider.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDOLLAHI A., GODWIN A.K., MILLER P.D., GETTS L.A., SCHULTZ D.C., TAGUCHI T., TESTA J.R., HAMILTON T.C. Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res*, 1997a, **57**, 2029-2034.
- ABDOLLAHI A., ROBERTS D., GODWIN A.K., SCHULTZ D.C., SONODA G., TESTA J.R., HAMILTON T.C. Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene*, 1997b, **14**, 1973-1979.
- ABDOLLAHI A., BAO R., HAMILTON T.C. LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene*, 1999, **18**, 6477-6487.
- ABDOLLAHI A., GRUVER B.N., PATRIOTIS C., HAMILTON T.C. Identification of epidermal growth factor-responsive genes in normal rat ovarian surface epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **307**, 188-197.
- ABDOLLAHI A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J Cell Physiol*, 2007, **210**, 16-25.
- ADAMS J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*, 2003, **29 Suppl 1**, 3-9.
- AGUIARI G., MARTINELLO R., CASARO D., ROSSI S., PIVA R., MOLLICA G., CAVAZZINI P., DEL SENNO L. LOH of chromosome 6q compared with LOH of 17q and 18q in ovarian cancers: relationship to p53 expression and clinicopathological findings. *Int J Gynecol Cancer*, 1999, **9**, 147-155.
- AKIRA S., TAKEDA K., KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2001, **2**, 675-680.
- AKIRA S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2003, **15**, 5-11.
- ALAM S., ZINYK D., MA L., SCHUURMANS C. Members of the Plag gene family are expressed in complementary and overlapping regions in the developing murine nervous system. *Dev Dyn*, 2005, **234**, 772-782.
- ALEXOPOULOU L., HOLT A.C., MEDZHITOV R., FLAVELL R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, **413**, 732-738.
- ARIMA T., DREWELL R.A., ARNEY K.L., INOUE J., MAKITA Y., HATA A., OSHIMURA M., WAKE N., SURANI M.A. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet*, 2001, **10**, 1475-1483.
- BAKER S.J., MARKOWITZ S., FEARON E.R., WILLSON J.K., VOGELSTEIN B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 1990, **249**, 912-915.
- BARBER G.N. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001, **8**, 113-126.
- BARZ T., HOFFMANN A., PANHUYSSEN M., SPENGLER D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a Zac target gene mediating Zac antiproliferation. *Cancer Res*, 2006, **66**, 11975-11982.
- BASLER C.F., MIKULASOVA A., MARTINEZ-SOBRIDO L., PARAGAS J., MUHLBERGER E., BRAY M., KLENK H.D., PALESE P., GARCIA-SASTRE A. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, 2003, **77**, 7945-7956.
- BASYUK E., COULON V., LE DIGARCHER A., COISY-QUIVY M., MOLES J.P., GANDARILLAS A., JOURNOT L. The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas. *Mol Cancer Res*, 2005, **3**, 483-492.
- BEUTLER B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004, **430**, 257-263.
- BILANGES B., VARRAULT A., BASYUK E., RODRIGUEZ C., MAZUMDAR A., PANTALONI C., BOCKAERT J., THEILLET C., SPENGLER D., JOURNOT L. Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene*, 1999, **18**, 3979-3988.
- BILANGES B., VARRAULT A., MAZUMDAR A., PANTALONI C., HOFFMANN A., BOCKAERT J., SPENGLER D., JOURNOT L. Alternative splicing of the imprinted candidate tumor suppressor gene ZAC regulates its antiproliferative and DNA binding activities. *Oncogene*, 2001, **20**, 1246-1253.
- BROCARD J., WAROT X., WENDLING O., MESSADDEQ N., VONESCH J.L., CHAMBON P., METZGER D. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**, 14559-14563.
- CARDENAS W.B., LOO Y.M., GALE M., JR., HARTMAN A.L., KIMBERLIN C.R., MARTINEZ-SOBRIDO L., SAPHIRE E.O., BASLER C.F. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol*, 2006, **80**, 5168-5178.
- CHAWLA-SARKAR M., LINDNER D.J., LIU Y.F., WILLIAMS B.R., SEN G.C., SILVERMAN R.H., BORDEN E.C. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, 2003, **8**, 237-249.

- CHEN P.L., CHEN Y.M., BOOKSTEIN R., LEE W.H. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, 1990, **250**, 1576-1580.
- CHENE P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**, 102-109.
- CIANI E., HOFFMANN A., SCHMIDT P., JOURNOT L., SPENGLER D. Induction of the PAC1-R (PACAP-type I receptor) gene by p53 and Zac. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, **69**, 290-294.
- CIANI E., FRENQUELLI M., CONTESTABILE A. Developmental expression of the cell cycle and apoptosis controlling gene, *Lot1*, in the rat cerebellum and in cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, **142**, 193-202.
- CLEMENS M.J. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, **29**, 945-949.
- COMPTON T., KURT-JONES E.A., BOEHME K.W., BELKO J., LATZ E., GOLENBOCK D.T., FINBERG R.W. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*, 2003, **77**, 4588-4596.
- CONTESTABILE A., FILA T., BARTESAGHI R., CIANI E. Cyclic AMP-mediated regulation of transcription factor *Lot1* expression in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 2005, **280**, 33541-33551.
- CVETKOVIC D., PISARCIK D., LEE C., HAMILTON T.C., ABDOLLAHI A. Altered expression and loss of heterozygosity of the *LOT1* gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2004, **95**, 449-455.
- DIEBOLD S.S., KAISHO T., HEMMI H., AKIRA S., REIS E SOUSA C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004, **303**, 1529-1531.
- DONEHOWER L.A., HARVEY M., SLAGLE B.L., MCARTHUR M.J., MONTGOMERY C.A., JR., BUTEL J.S., BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 1992, **356**, 215-221.
- DOYLE S., VAIDYA S., O'CONNELL R., DADGOSTAR H., DEMPSEY P., WU T., RAO G., SUN R., HABERLAND M., MODLIN R., CHENG G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*, 2002, **17**, 251-263.
- EL KHARROUBI A., PIRAS G., STEWART C.L. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 8674-8680.
- FARRAR M.A., SCHREIBER R.D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 1993, **11**, 571-611.
- FILA T., TRAZZI S., CROCHEMORE C., BARTESAGHI R., CIANI E. *Lot1* Is a Key Element of the Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP)/Cyclic AMP Pathway That Negatively Regulates Neuronal Precursor Proliferation. *J Biol Chem*, 2009, **284**, 15325-15338.
- FILIPSSON K., SUNDLER F., AHREN B. PACAP is an islet neuropeptide which contributes to glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **256**, 664-667.
- FITZGERALD K.A., ROWE D.C., BARNES B.J., CAFFREY D.R., VISINTIN A., LATZ E., MONKS B., PITHA P.M., GOLENBOCK D.T. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, 2003, **198**, 1043-1055.
- FRANCHI L., EIGENBROD T., MUNOZ-PLANILLO R., NUNEZ G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*, 2009, **10**, 241-247.
- FUJII H., ZHOU W., GABRIELSON E. Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996, **16**, 35-39.
- GALIANA-ARNOUX D., IMLER J.L. Toll-like receptors and innate antiviral immunity. *Tissue Antigens*, 2006, **67**, 267-276.
- GARCIA M.A., MEURS E.F., ESTEBAN M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 2007, **89**, 799-811.
- GITLIN L., BARCHET W., GILFILLAN S., CELLA M., BEUTLER B., FLAVELL R.A., DIAMOND M.S., COLONNA M. Essential role of *mda-5* in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**, 8459-8464.
- GITLIN L., BENOIT L., SONG C., CELLA M., GILFILLAN S., HOLTZMAN M.J., COLONNA M. Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo. *PLoS Pathog*, 2010, **6**, e1000734.
- GONGORA C., MECHTI N. [Interferon signaling pathways]. *Bull Cancer*, 1999, **86**, 911-919.
- GRUNNET L.G., AIKIN R., TONNESEN M.F., PARASKEVAS S., BLAABJERG L., STORLING J., ROSENBERG L., BILLESTRUP N., MAYSINGER D., MANDRUP-POULSEN T. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes*, 2009, **58**, 1807-1815.
- HALLER O., KOCHS G., WEBER F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007a, **18**, 425-433.

- HALLER O., STAEHELI P., KOCHS G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 2007b, **89**, 812-818.
- HAUPT Y., MAYA R., KAZAZ A., OREN M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997, **387**, 296-299.
- HENSEN K., VAN VALCKENBORGH I.C., KAS K., VAN DE VEN W.J., VOZ M.L. The tumorigenic diversity of the three PLAG family members is associated with different DNA binding capacities. *Cancer Res*, 2002, **62**, 1510-1517.
- HISCOTT J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem*, 2007, **282**, 15325-15329.
- HOEBE K., DU X., GEORGEL P., JANSSEN E., TABETA K., KIM S.O., GOODE J., LIN P., MANN N., MUDD S., CROZAT K., SOVATH S., HAN J., BEUTLER B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 2003, **424**, 743-748.
- HOFFMANN A., CIANI E., BOECKARDT J., HOLSBOER F., JOURNOT L., SPENGLER D. Transcriptional activities of the zinc finger protein Zac are differentially controlled by DNA binding. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**, 988-1003.
- HOFFMANN A., BARZ T., SPENGLER D. Multitasking C2H2 zinc fingers link Zac DNA binding to coordinated regulation of p300-histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**, 5544-5557.
- HOFFMANN A., SPENGLER D. A new coactivator function for Zac1's C2H2 zinc finger DNA-binding domain in selectively controlling PCAF activity. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**, 6078-6093.
- HOGLE J.M. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **56**, 677-702.
- HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., HARRIS C.C. p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, **253**, 49-53.
- HONDA K., YANAI H., NEGISHI H., ASAGIRI M., SATO M., MIZUTANI T., SHIMADA N., OHBA Y., TAKAOKA A., YOSHIDA N., TANIGUCHI T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 2005, **434**, 772-777.
- HONDA K., TAKAOKA A., TANIGUCHI T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 2006, **25**, 349-360.
- HONDA K., TANIGUCHI T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**, 644-658.
- HORNUNG V., LATZ E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol*, 2010, **10**, 123-130.
- HUANG S.M., STALLCUP M.R. Mouse Zac1, a transcriptional coactivator and repressor for nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**, 1855-1867.
- HUANG S.M., SCHONTHAL A.H., STALLCUP M.R. Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene*, 2001, **20**, 2134-2143.
- HUANG S.M., HUANG S.P., WANG S.L., LIU P.Y. Importin alpha1 is involved in the nuclear localization of Zac1 and the induction of p21WAF1/CIP1 by Zac1. *Biochem J*, 2007, **402**, 359-366.
- IMLER J.L., HOFFMANN J.A. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*, 2001, **11**, 304-311.
- JACKS T., REMINGTON L., WILLIAMS B.O., SCHMITT E.M., HALACHMI S., BRONSON R.T., WEINBERG R.A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, 1994, **4**, 1-7.
- JANEWAY C.A., JR. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989, **54 Pt 1**, 1-13.
- JANEWAY C.A., JR. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*, 2001, **3**, 1167-1171.
- JANEWAY C.A., JR., MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20**, 197-216.
- JIANG Z., GEORGEL P., DU X., SHAMEL L., SOVATH S., MUDD S., HUBER M., KALIS C., KECK S., GALANOS C., FREUDENBERG M., BEUTLER B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*, 2005, **6**, 565-570.
- KAMIKIHARA T., ARIMA T., KATO K., MATSUDA T., KATO H., DOUCHI T., NAGATA Y., NAKAO M., WAKE N. Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer. *Int J Cancer*, 2005, **115**, 690-700.
- KAMIYA M., JUDSON H., OKAZAKI Y., KUSAKABE M., MURAMATSU M., TAKADA S., TAKAGI N., ARIMA T., WAKE N., KAMIMURA K., SATOMURA K., HERMANN R., BONTHRON D.T., HAYASHIZAKI Y. The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*, 2000, **9**, 453-460.
- KAS K., VOZ M.L., HENSEN K., MEYEN E., VAN DE VEN W.J. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 23026-23032.
- KATO H., SATO S., YONEYAMA M., YAMAMOTO M., UEMATSU S., MATSUI K., TSUJIMURA T., TAKEDA K., FUJITA T., TAKEUCHI O., AKIRA S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 2005, **23**, 19-28.

- KATO H., TAKEUCHI O., SATO S., YONEYAMA M., YAMAMOTO M., MATSUI K., UEMATSU S., JUNG A., KAWAI T., ISHII K.J., YAMAGUCHI O., OTSU K., TSUJIMURA T., KOH C.S., REIS E SOUSA C., MATSUURA Y., FUJITA T., AKIRA S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, **441**, 101-105.
- KAWAI T., TAKEUCHI O., FUJITA T., INOUE J., MUHLRADT P.F., SATO S., HOSHINO K., AKIRA S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, 2001, **167**, 5887-5894.
- KAWAI T., TAKAHASHI K., SATO S., COBAN C., KUMAR H., KATO H., ISHII K.J., TAKEUCHI O., AKIRA S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, 2005, **6**, 981-988.
- KAWAI T., AKIRA S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, **1143**, 1-20.
- KAWAI T., AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010, **11**, 373-384.
- KOY S., HAUSES M., APPELT H., FRIEDRICH K., SCHACKERT H.K., ECKELT U. Loss of expression of ZAC/LOT1 in squamous cell carcinomas of head and neck. *Head Neck*, 2004, **26**, 338-344.
- KUBBUTAT M.H., JONES S.N., VOUSDEN K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 1997, **387**, 299-303.
- LANASPA M.A., ANDRES-HERNANDO A., RIVARD C.J., DAI Y., LI N., BERL T. ZAC1 is up-regulated by hypertonicity and decreases sorbitol dehydrogenase expression allowing accumulation of sorbitol in kidney cells. *J Biol Chem*, 2009,
- LEMAITRE B., NICOLAS E., MICHAUT L., REICHHART J.M., HOFFMANN J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996, **86**, 973-983.
- LEMETA S., SALMENKIVI K., PYLKKANEN L., SAINIO M., SAARIKOSKI S.T., AROLA J., HEIKKILA P., HAGLUND C., HUSGAFVEL-PURSIAINEN K., BOHLING T. Frequent loss of heterozygosity at 6q in pheochromocytoma. *Hum Pathol*, 2006, **37**, 749-754.
- LEVINE A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, **88**, 323-331.
- LING F.H., LU V., SVEC F., FRECHET J.M. Effect of multivalency on the performance of enantioselective separation media for chiral HPLC prepared by linking multiple selectors to a porous polymer support via aliphatic dendrons. *J Org Chem*, 2002, **67**, 1993-2002.
- LIU P.Y., CHAN J.Y., LIN H.C., WANG S.L., LIU S.T., HO C.L., CHANG L.C., HUANG S.M. Modulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by Zac1 through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase I in HeLa Cells. *Mol Cancer Res*, 2008, **6**, 1204-1214.
- MA D., SHIELD J.P., DEAN W., LECLERC I., KNAUF C., BURCELIN R.R., RUTTER G.A., KELSEY G. Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. *J Clin Invest*, 2004, **114**, 339-348.
- MA L., HOCKING J.C., HEHR C.L., SCHUURMANS C., MCFARLANE S. Zac1 promotes a Muller glial cell fate and interferes with retinal ganglion cell differentiation in *Xenopus* retina. *Dev Dyn*, 2007a, **236**, 192-202.
- MA Y., HAYNES R.L., SIDMAN R.L., VARTANIAN T. TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle*, 2007b, **6**, 2859-2868.
- MACKAY D.J., TEMPLE I.K. Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010, **154C**, 335-342.
- MACLAREN A.P., CHAPMAN R.S., WYLLIE A.H., WATSON C.J. p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death Differ*, 2001, **8**, 210-218.
- MAEBAYASHI Y., SHIGEYOSHI Y., TAKUMI T., OKAMURA H. A putative transcription factor with seven zinc-finger motifs identified in the developing suprachiasmatic nucleus by the differential display PCR method. *J Neurosci*, 1999, **19**, 10176-10183.
- MALATHI K., DONG B., GALE M., JR., SILVERMAN R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*, 2007, **448**, 816-819.
- MEDZHITOV R., PRESTON-HURLBURT P., JANEWAY C.A., JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, **388**, 394-397.
- MIDORIKAWA Y., YAMAMOTO S., ISHIKAWA S., KAMIMURA N., IGARASHI H., SUGIMURA H., MAKUUCHI M., ABURATANI H. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*, 2006, **25**, 5581-5590.
- MIYATA A., ARIMURA A., DAHL R.R., MINAMINO N., UEHARA A., JIANG L., CULLER M.D., COY D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **164**, 567-574.

- NIGRO J.M., BAKER S.J., PREISINGER A.C., JESSUP J.M., HOSTETTER R., CLEARY K., BIGNER S.H., DAVIDSON N., BAYLIN S., DEVILEE P., ET AL. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 1989, **342**, 705-708.
- O'NEILL L.A., FITZGERALD K.A., BOWIE A.G. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*, 2003, **24**, 286-290.
- OHLSSON R., TYCKO B., SAPIENZA C. Monoallelic expression: 'there can only be one'. *Trends Genet*, 1998, **14**, 435-438.
- OSHIUMI H., MATSUMOTO M., FUNAMI K., AKAZAWA T., SEYA T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*, 2003, **4**, 161-167.
- PAGOTTO U., ARZBERGER T., CIANI E., LEZOUALCH F., PILON C., JOURNOT L., SPENGLER D., STALLA G.K. Inhibition of Zac1, a new gene differentially expressed in the anterior pituitary, increases cell proliferation. *Endocrinology*, 1999, **140**, 987-996.
- PAGOTTO U., ARZBERGER T., THEODOROPOULOU M., GRUBLER Y., PANTALONI C., SAEGER W., LOSA M., JOURNOT L., STALLA G.K., SPENGLER D. The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res*, 2000, **60**, 6794-6799.
- PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*, 1992, **66**, 2564-2569.
- PERRY A.K., CHEN G., ZHENG D., TANG H., CHENG G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res*, 2005, **15**, 407-422.
- PESTKA S., KRAUSE C.D., WALTER M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 2004, **202**, 8-32.
- PIRAS G., EL KHARROUBI A., KOZLOV S., ESCALANTE-ALCALDE D., HERNANDEZ L., COPELAND N.G., GILBERT D.J., JENKINS N.A., STEWART C.L. Zac1 (Lot1), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**, 3308-3315.
- PORTA C., HADJ-SLIMANE R., NEJMEDDINE M., PAMPIN M., TOVEY M.G., ESPERT L., ALVAREZ S., CHELBI-ALIX M.K. Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. *Oncogene*, 2005, **24**, 605-615.
- POULIN H., LABELLE Y. The PLAGL1 gene is down-regulated in human extraskeletal myxoid chondrosarcoma tumors. *Cancer Lett*, 2005, **227**, 185-191.
- RATH P.C., AGGARWAL B.B. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*, 1999, **19**, 350-364.
- RATHINAM V.A., JIANG Z., WAGGONER S.N., SHARMA S., COLE L.E., WAGGONER L., VANAJA S.K., MONKS B.G., GANESAN S., LATZ E., HORNUNG V., VOGEL S.N., SZOMOLANYI-TSUDA E., FITZGERALD K.A. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol*, 2010, **11**, 395-402.
- REIK W., WALTER J. Imprinting mechanisms in mammals. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, **8**, 154-164.
- RODRIGUEZ-HENCHE N., JAMEN F., LEROY C., BOCKAERT J., BRABET P. Transcription of the mouse PAC1 receptor gene: cell-specific expression and regulation by Zac1. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1576**, 157-162.
- ROYO F., PAZ N., ESPINOSA L., MCQUEEN P.G., VELLON L., PARADA L.A. Spatial link between nucleoli and expression of the Zac1 gene. *Chromosoma*, 2009, **118**, 711-722.
- ROZENFELD-GRANOT G., KRISHNAMURTHY J., KANNAN K., TOREN A., AMARIGLIO N., GIVOL D., RECHAVI G. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene*, 2002, **21**, 1469-1476.
- SAITO T., GALE M., JR. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J Exp Med*, 2008, **205**, 1523-1527.
- SALAUN B., COSTE I., RISSOAN M.C., LEBECQUE S.J., RENNO T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol*, 2006, **176**, 4894-4901.
- SATO M., HATA N., ASAGIRI M., NAKAYA T., TANIGUCHI T., TANAKA N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett*, 1998, **441**, 106-110.
- SATO M., SUEMORI H., HATA N., ASAGIRI M., OGASAWARA K., NAKAO K., NAKAYA T., KATSUKI M., NOGUCHI S., TANAKA N., TANIGUCHI T. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 2000, **13**, 539-548.
- SAUNDERS L.R., BARBER G.N. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J*, 2003, **17**, 961-983.
- SHINOHARA K., TOMIOKA M., NAKANO H., TONE S., ITO H., KAWASHIMA S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J*, 1996, **317 (Pt 2)**, 385-388.

- SPENGLER D., VILLALBA M., HOFFMANN A., PANTALONI C., HOUSSAMI S., BOCKAERT J., JOURNOT L. Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J*, 1997, **16**, 2814-2825.
- STETSON D.B., MEDZHITOV R. Type I interferons in host defense. *Immunity*, 2006, **25**, 373-381.
- STOLL S., DELON J., BROTZ T.M., GERMAIN R.N., Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Sciences*, 2002, **295**, 1873-1876.
- SURANI M.A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell*, 1998, **93**, 309-312.
- TAGUCHI T., JHANWAR S.C., SIEGFRIED J.M., KELLER S.M., TESTA J.R. Recurrent deletions of specific chromosomal sites in 1p, 3p, 6q, and 9p in human malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 1993, **53**, 4349-4355.
- TAKAOKA A., HAYAKAWA S., YANAI H., STOIBER D., NEGISHI H., KIKUCHI H., SASAKI S., IMAI K., SHIBUE T., HONDA K., TANIGUCHI T. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 2003, **424**, 516-523.
- TAKAOKA A., WANG Z., CHOI M.K., YANAI H., NEGISHI H., BAN T., LU Y., MIYAGISHI M., KODAMA T., HONDA K., OHBA Y., TANIGUCHI T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 2007, **448**, 501-505.
- TAKEDA K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, 2005, **11**, 51-55.
- TAKEUCHI O., AKIRA S. Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, **19**, 185-191.
- TANIGUCHI T., MANTEI N., SCHWARZSTEIN M., NAGATA S., MURAMATSU M., WEISSMANN C. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature*, 1980, **285**, 547-549.
- TAURA M., FUKUDA R., SUICO M.A., EGUMA A., KOGA T., SHUTO T., SATO T., MORINO-KOGA S., KAI H. TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci*, 2010,
- TEMPLE I.K., SHIELD J.P. Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *J Med Genet*, 2002, **39**, 872-875.
- THEILE M., SEITZ S., ARNOLD W., JANDRIG B., FREGE R., SCHLAG P.M., HAENSCH W., GUSKI H., WINZER K.J., BARRETT J.C., SCHERNECK S. A defined chromosome 6q fragment (at D6S310) harbors a putative tumor suppressor gene for breast cancer. *Oncogene*, 1996, **13**, 677-685.
- THEODOROPOULOU M., STALLA G.K., SPENGLER D. ZAC1 target genes and pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, **326**, 60-65.
- THRASH-BINGHAM C.A., SALAZAR H., FREED J.J., GREENBERG R.E., TARTOF K.D. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res*, 1995, **55**, 6189-6195.
- TSUDA T., MARKOVA D., WANG H., EVANGELISTI L., PAN T.C., CHU M.L. Zinc finger protein Zac1 is expressed in chondrogenic sites of the mouse. *Dev Dyn*, 2004, **229**, 340-348.
- UZE G., SCHREIBER G., PIEHLER J., PELLEGRINI S. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007, **316**, 71-95.
- VALENTE T., AULADELL C. Expression pattern of Zac1 mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development. *Mech Dev*, 2001, **108**, 207-211.
- VALENTE T., DOMINGUEZ M.I., BELLMANN A., JOURNOT L., FERRER I., AULADELL C. Zac1 is up-regulated in neural cells of the limbic system of mouse brain following seizures that provoke strong cell activation. *Neuroscience*, 2004, **128**, 323-336.
- VALENTE T., JUNYENT F., AULADELL C. Zac1 is expressed in progenitor/stem cells of the neuroectoderm and mesoderm during embryogenesis: differential phenotype of the Zac1-expressing cells during development. *Dev Dyn*, 2005, **233**, 667-679.
- VALLELEY E.M., CORDERY S.F., BONTHRON D.T. Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet*, 2007, **16**, 972-981.
- VALLELEY E.M., CORDERY S.F., CARR I.M., MACLENNAN K.A., BONTHRON D.T. Loss of expression of ZAC/PLAGL1 in diffuse large B-cell lymphoma is independent of promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, **49**, 480-486.
- VAN DYKE T. p53 and tumor suppression. *N Engl J Med*, 2007, **356**, 79-81.
- VARRAULT A., CIANI E., APIOU F., BILANGES B., HOFFMANN A., PANTALONI C., BOCKAERT J., SPENGLER D., JOURNOT L. hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**, 8835-8840.
- VARRAULT A., BILANGES B., MACKAY D.J., BASYUK E., AHR B., FERNANDEZ C., ROBINSON D.O., BOCKAERT J., JOURNOT L. Characterization of the methylation-sensitive promoter of the imprinted ZAC gene supports its role in transient neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 18653-18656.
- VILCEK J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity*, 2006, **25**, 343-348.

- VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 2004, **10**, 789-799.
- WAGNER H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol*, 2004, **25**, 381-386.
- WEAVER B.K., KUMAR K.P., REICH N.C. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**, 1359-1368.
- WEISSMANN C., WEBER H. The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1986, **33**, 251-300.
- WEST A.P., KOBLANSKY A.A., GHOSH S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, **22**, 409-437.
- WU M.H., HUANG C.J., LIU S.T., LIU P.Y., HO C.L., HUANG S.M. Physical and functional interactions of human papillomavirus E2 protein with nuclear receptor coactivators. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **356**, 523-528.
- XU C., BAILLY-MAITRE B., REED J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 2005, **115**, 2656-2664.
- YAMAMOTO M., SATO S., MORI K., HOSHINO K., TAKEUCHI O., TAKEDA K., AKIRA S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, 2002, **169**, 6668-6672.
- YAMAMOTO M., SATO S., HEMMI H., HOSHINO K., KAISHO T., SANJO H., TAKEUCHI O., SUGIYAMA M., OKABE M., TAKEDA K., AKIRA S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 2003, **301**, 640-643.
- YAMAMOTO M., TAKEDA K., AKIRA S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*, 2004, **40**, 861-868.
- YONEYAMA M., SUHARA W., FUKUHARA Y., FUKUDA M., NISHIDA E., FUJITA T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, 1998, **17**, 1087-1095.
- YONEYAMA M., KIKUCHI M., NATSUKAWA T., SHINOBU N., IMAIZUMI T., MIYAGISHI M., TAIRA K., AKIRA S., FUJITA T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, 2004, **5**, 730-737.
- YONEYAMA M., KIKUCHI M., MATSUMOTO K., IMAIZUMI T., MIYAGISHI M., TAIRA K., FOY E., LOO Y.M., GALE M., JR., AKIRA S., YONEHARA S., KATO A., FUJITA T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 2005, **175**, 2851-2858.
- YONEYAMA M., FUJITA T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev*, 2009, **227**, 54-65.
- YUASA S., ONIZUKA T., SHIMOJI K., OHNO Y., KAGEYAMA T., YOON S.H., EGASHIRA T., SEKI T., HASHIMOTO H., NISHIYAMA T., KANEDA R., MURATA M., HATTORI F., MAKINO S., SANNO M., OGAWA S., PRALL O.W., HARVEY R.P., FUKUDA K. Zc1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*, 2010, **106**, 1083-1091.
- ZHANG S.Y., JOUANGUY E., UGOLINI S., SMAHI A., ELAIN G., ROMERO P., SEGAL D., SANCHO-SHIMIZU V., LORENZO L., PUEL A., PICARD C., CHAPGIER A., PLANCOULAIN S., TITEUX M., COGNET C., VON BERNUTH H., KU C.L., CASROUGE A., ZHANG X.X., BARREIRO L., LEONARD J., HAMILTON C., LEBON P., HERON B., VALLEE L., QUINTANA-MURCI L., HOVNANIAN A., ROZENBERG F., VIVIER E., GEISSMANN F., TARDIEU M., ABEL L., CASANOVA J.L. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*, 2007, **317**, 1522-1527.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2010/0480/33

ISBN 978-2-930404-86-8



9 782930 404868