

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Rôle de la partie C-terminale de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex  
1 dans le trafic intracellulaire**

Par

Carmen Elena Gonzalez Suarez

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Peter Tijssen, PhD.  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Denis Archambault, DMV, PhD.  
Département des sciences biologiques  
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Angela Pearson, PhD.  
INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Carmen Elena Gonzalez Suarez, 2014

## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout Puissant et Miséricordieux, qui m'a donné la force et la sagesse pour accomplir ce projet.

J'aimerais remercier ma directrice de recherche Angela Pearson, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance pour le développement de ce projet. Merci pour sa patience, sa disponibilité et surtout pour son encadrement et leur précieux conseils durant toute la période du travail.

Merci aussi à mes examinateurs Dr. Denis Archambault et Dr. Peter Tijseen par l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs commentaires.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour toute l'aide et ainsi que leurs réponses à mes questions. Un remerciement particulier à Nawel Ben Abdeljelil pour sa précieuse collaboration lors des expériences de microscopie confocale, pour ses bonnes idées et ses critiques pertinentes. Merci à Annie, Alex, Boury, Carolina, Gabriel, Ginette, Mirana, Nicolas, Slimane et Soumia, pour la bonne ambiance de travail mais également pour vos encouragements.

Merci aussi à Jessy Tremblay pour l'entraînement en microscopie confocale.

Un spécial remerciement à la fondation Armand-Frappier qui m'a octroyé une bourse de maîtrise; ce soutien m'a permis de me concentrer sur mes études et de consacrer plus de temps à la recherche scientifique.

Quiero agradecerle a mi madre Alma Suarez por todo su apoyo en esta etapa importante de mi vida, gracias mami por ser el mejor ejemplo de fortaleza y de perseverancia que me han permitido mantenerme siempre firme en mis propósitos e ideales y me han dado las fuerzas para vencer todos los obstáculos. Gracias a mi amado esposo Jorge Ivan Mendoza por su paciencia, su comprensión, su amor, por ser siempre mi soporte, sin tu apoyo habría sido imposible alcanzar esta meta. Gracias a mis amigos Martica y Orlando por su ayuda incondicional en todo momento. Gracias Carlos por tu ayuda y tus consejos. Gracias a mis familiares y amigos que a pesar de la distancia siempre estuvieron dándome ánimos para seguir adelante.

Merci à tous!

## Résumé

Le gène viral *UL24* du virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) est conservé parmi tous les virus de la famille des *Herpesviridae*. La protéine UL24 contient une partie N-terminale qui est hautement conservée parmi les orthologues de cette protéine dans divers virus herpès. Plusieurs études ont démontré l'importance d'acides aminés hautement conservés dans la partie N-terminale d'UL24 dans les modifications nucléolaires induites par le VHS-1 et dans la pathogenèse dans un modèle murin d'infection oculaire. En revanche, la partie C-terminale d'UL24 est pauvrement conservée, et son rôle durant l'infection n'est pas encore déterminé. Des résultats antérieurs ont démontré que lorsqu'exprimée seule, la partie C-terminale d'UL24 se retrouve au Golgi en contexte de transfection transitoire. Notre hypothèse est qu'il y a des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 qui sont importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme. Une série de vecteurs d'expression mammifère encodant UL24 du VHS-1 avec des délétions dans la partie C-terminale ont été produits. De manière intéressante, il a été observé que plusieurs formes délétées d'UL24 se localisent majoritairement dans le noyau en contexte de transfection transitoire de cellules COS-7. En analysant la séquence primaire de la partie C-terminale de la protéine UL24, il a été trouvé que le résidu T195 correspond à un site putatif de phosphorylation et la région comprise entre les acides aminés 250 et 258 correspond à un possible signal d'export nucléaire (NES). La mutagenèse dirigée ciblant des résidus prédits à faire partie d'un NES (L253, F254, V256, V258) a significativement augmenté la localisation nucléaire d'UL24 dans les cellules COS-7 transfectées, suggérant que cette protéine peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme dû à la présence d'un NES identifié dans la partie C-terminale de la protéine; cependant, l'export nucléaire d'UL24 n'a pas eu d'impact sur la distribution de la nucléoline. Pour déterminer l'importance de l'export nucléaire de la protéine UL24 pendant l'infection, des virus recombinants contenant des mutations ponctuelles dans *UL24* du VHS-1 ont été produits en utilisant le système « Bacterial Artificial Chromosome » (BAC). Il a été observé que dans les cellules infectées par le virus possédant des mutations dans le NES, la protéine UL24 est seulement détectée dans le noyau. Quoique la leptomycine B (LMB), un inhibiteur de l'export nucléaire dépendant de CRM-1 (exportine 1), bloque l'export nucléaire d'UL24 en contexte de transfection, le traitement des cellules infectées avec la LMB n'a pas eu d'effet sur la localisation d'UL24. Cela suggère que l'export nucléaire d'UL24 du VHS-1 se fait de façon indépendante de cette exportine ou il peut avoir de la redondance avec d'autres

voies d'export. Par ailleurs, il a été observé que le virus possédant des mutations dans le NES d'UL24 a produit de gros syncytia comparables à ceux d'un virus déficient en UL24. Cependant, il n'a pas été observé de différences dans sa réplication virale en comparaison au virus de type sauvage. Ces résultats ont mis en évidence la présence d'un NES dans la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 et cette propriété nouvellement découverte pourrait jouer un rôle dans le contexte d'infection virale particulièrement dans les étapes tardives de la morphogenèse virale dans le cytoplasme.

## Abstract

The *UL24* gene of herpes simplex virus 1 (HSV-1) is conserved among all *Herpesviridae* members. The UL24 protein contains an N-terminal portion that is highly conserved between the orthologs of this protein in other *Herpesviridae*. Previous studies showed the importance of several conserved amino acids in the N-terminus of UL24 for nucleolar modifications induced by HSV-1 as well as for pathogenesis in a mouse model of ocular infection. In contrast, the C-terminal domain of UL24 is poorly conserved and when expressed alone accumulates in the Golgi apparatus; however, its role during HSV-1 infection is unknown. Herein, we tested the hypothesis that there are residues in the C-terminal domain of UL24 that are important for the localisation and the functions of the protein in the cytoplasm. A series of mammalian expression vectors encoding UL24 of HSV-1 with nested deletions in the C-terminal domain were generated. Interestingly, in transient transfection experiments a pronounced nuclear staining was observed in COS-7 cells for several UL24 deleted forms. Examination of the primary sequence of the C-terminus portion of UL24 revealed that the amino acid T195 corresponds to a putative site of phosphorylation and the region between the amino acids 250 and 258 corresponds to a possible nuclear export signal (NES). Site directed mutagenesis targeting residues predicted to make up an NES (L253, F254, V256, V258) significantly enhanced nuclear localisation of the full length protein in transfected COS-7 cells suggesting that this protein is able to shuttle between the nucleus and the cytoplasm due to the presence of the NES; however, blocking the nuclear export of UL24 had no impact on the distribution of nucleolin. To determine the importance of this function during infection, recombinant viruses were generated by introduction of point mutations into the HSV-1 genome cloned as a Bacterial Artificial Chromosome (BAC). It was observed that infection with a virus that encodes UL24 harboring substitutions in the NES led to accumulation of UL24 in the nucleus. Leptomycin B (LMB), an inhibitor of CRM-1-dependent nuclear export blocked nuclear export of UL24 in transfected cells; however, in infected cells, LMB did not have an effect on the localisation of UL24 protein. This result suggests that either UL24 nuclear export is independent of CRM-1 or that there is redundancy with other export pathways. A virus that encodes a UL24 protein with mutations on the NES resulted in a syncytial phenotype similar to that observed for a virus that lacks UL24 (UL24X). Nevertheless, unlike UL24X, replication of this virus was not distinguishable from that of the corresponding wild type strain. In summary, we discovered a NES in the C-terminal portion of

the HSV-1 UL24 protein. This newly discovered property may play a role in the context viral infection, particularly in the latter stages of viral morphogenesis in the cytoplasm.

## Table des matières

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Le virus de l'herpès simplex .....	1
1.1.1 Classification.....	1
1.1.2 Pathogenèse du VHS-1 .....	2
1.1.3 Structure du VHS-1.....	3
1.1.4 Cycle de réplication du VHS-1 .....	4
1.1.5 Rôle de protéines dans les étapes tardives du cycle viral du VHS-1 .....	6
1.1.6 Latence et réactivation du VHS-1 .....	8
1.2 Transport nucléo-cytoplasmique de protéines virales .....	10
1.2.1 Les pores nucléaires.....	11
1.2.2 Les importines.....	11
1.2.3 Les exportines .....	13
1.3 La protéine virale UL24 .....	16
1.3.1 Caractéristiques d'UL24.....	16
1.3.2 Expression de la protéine UL24.....	16
1.3.3 Domaines conservés d'UL24. ....	17
1.3.4 Fonctions d'UL24.....	18
1.3.5 UL24 et ses homologues .....	19
1.4 Le système BAC .....	21
2. Problématique .....	23
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	24
2.1 Cellules et virus.....	24
2.1.1 Lignées cellulaires .....	24

2.1.2 Souches virales et production de stocks viraux .....	24
2.1.3 Détermination des titres viraux .....	25
2.2 Mutagenèse .....	25
2.2.1 Mutagenèse dirigée .....	27
2.2.2 Plasmides et sous-clonage.....	28
2.3 Production de virus recombinants par le système BAC.....	33
2.3.1 Stratégie de génération de mutations ponctuelles et insertion de petites séquences .....	33
2.3.2 Préparation des bactéries électrocompétentes pour la recombinaison .....	35
2.3.3 Préparation du fragment d'ADN .....	37
2.3.4 Electroporation et recombinaison .....	37
2.3.5 Digestion de l'ADN plasmidique des BACs .....	39
2.3.6 Transfection des cellules Vero avec les BACs recombinants.....	39
2.3.7 Purification de virus recombinants .....	40
2.3.8 Séquençage d' <i>UL24</i> à partir du génome viral .....	40
2.4 Morphologie des plages de lyse .....	41
2.5 Microscopie à contraste de phase .....	41
2.6 Cinétique d'infection dans les cellules Vero .....	41
2.7 Immunobuvardage de type Western .....	42
2.7.1 Transfection des cellules Cos-7 .....	42
2.7.2 Infection des cellules Vero.....	42
2.7.3 Lyse des cellules .....	43
2.7.4 Immunobuvardage de type Western .....	43
2.7.5 Anticorps .....	44
2.8 Immunofluorescence indirecte.....	44
2.8.1 Transfection des cellules Cos-7 .....	44
2.8.2 Infection des cellules Vero.....	45
2.8.3 Fixation des cellules.....	45
2.8.4 Immunofluorescence indirecte.....	45
2.8.5 Anticorps utilisés pour les expériences de microscopie confocale .....	46
2.8.6 Microscopie confocale .....	46

2.9 Traitement des cellules avec la leptomycine B .....	46
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....	48
3.1 Expression de formes mutées d'UL24 .....	48
3.2 Localisation intracellulaire des variantes d'UL24 en contexte de transfection transitoire .....	49
3.3 Effet des mutations ponctuelles dans la partie C-terminale d'UL24 sur sa localisation intracellulaire en contexte de transfection transitoire.....	52
3.4 Localisation intracellulaire de variantes d'UL24 en contexte de transfection transitoire suite au traitement avec la LMB .....	54
3.5 Effet de mutations ponctuelles dans la partie C terminale d'UL24 sur la nucléoline en contexte de transfection transitoire .....	56
3.6 Création des virus recombinants .....	57
3.6.1 Organisation génomique des BACs recombinants .....	58
3.6.2 Caractérisation des virus recombinants .....	58
3.6.2.1 Expression d'HA-UL24 et TK chez les virus recombinants .....	58
3.7 Localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 dans les cellules Vero infectées par les virus recombinants .....	60
3.8 Localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 dans les cellules HeLa en contexte d'infection suite au traitement avec la LMB.....	61
3.9 Capacité de réplication des virus recombinants .....	64
3.10 Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants .....	65
CHAPITRE 4 : DISCUSSION .....	67
4.1 Importance des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 sur la localisation intracellulaire .....	67
4.2 Impact des substitutions d'acides aminés de la partie C-terminale d'UL24 sur la réplication du VHS-1 en culture cellulaire .....	70
4.3 Impact des substitutions d'acides aminés de la partie C-terminale d'UL24 dans la formation de syncytiums .....	70
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	72
Références bibliographiques .....	73

## Liste de figures

Figure 1 : Structure du VHS-1 .....	3
Figure 2 : Cycle de réplication du VHS-1 .....	7
Figure 3 : Représentation schématisée des différentes étapes menant à la latence et à la réactivation du VHS-1 .....	10
Figure 4 : Modèle simplifié du transport nucléo-cytoplasmique de protéines effectué par les importines et exportines .....	12
Figure 5 : Représentation graphique des transcrits d' <i>UL24</i> du VHS-1 .....	17
Figure 6 : Stratégie de délétion dans la partie C-terminale de la protéine <i>UL24</i> .....	26
Figure 7 : Sous-clonage des formes mutées d' <i>UL24</i> codant pour des délétions dans la partie C-terminale de la protéine dans un plasmide d'expression mammifère .....	31
Figure 8 : Sous-clonage des formes mutées d' <i>UL24</i> codant pour des mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de la protéine dans un plasmide d'expression mammifère .....	32
Figure 9 : Représentation graphique des amorces utilisées lors de la production de virus recombinants par le système BAC.....	35
Figure 10 : Diagramme représentant la création de virus recombinants par l'introduction de mutations dans le BAC du VHS-1 .....	36
Figure 11 : Expression des formes mutées d' <i>UL24</i> contenant les délétions dans la partie C-terminale de la protéine dans un contexte de transfection transitoire .....	48
Figure 12 : Expression des formes mutées d' <i>UL24</i> contenant les mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de la protéine dans un contexte de transfection transitoire.....	49
Figure 13 : Localisation intracellulaire de formes mutées d' <i>UL24</i> dans un contexte de transfection transitoire .....	50
Figure 14 : Séquence primaire de la partie C-terminale de la protéine <i>UL24</i> .....	51
Figure 15 : Localisation intracellulaire de la protéine <i>UL24</i> du VHS-1 avec substitutions dans la partie C-terminale de la protéine en contexte de transfection transitoire .....	53
Figure 16 : Identification d'un NES dépendant de l'exportine CRM-1 dans la partie C-terminale de la protéine <i>UL24</i> du VHS-1 en contexte de transfection transitoire.....	55
Figure 17 : Effet de substitutions dans la partie C-terminale de la protéine <i>UL24</i> du VHS-1 sur la distribution de la nucléoline.....	56

Figure 18 : Profil de digestion avec l'enzyme EcoRV des BACs recombinants portant des mutations dans le gène <i>UL24</i> du VHS-1 .....	59
Figure 19 : Expression d'HA-UL24 et de TK chez les virus recombinants .....	60
Figure 20 : Localisation intracellulaire d'HA-UL24 en contexte d'infection.....	62
Figure 21 : L'export nucléaire de la protéine HA-UL24 est indépendant de l'exportine CRM-1 en contexte d'infection .....	63
Figure 22 : Capacité de réplication des virus recombinants en culture cellulaire .....	64
Figure 23 : Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants .....	66

## Liste des tableaux

Tableau I : Liste des amorces utilisées pour la stratégie de clonage de formes mutées d'UL24 dans la partie C-terminale de la protéine .....	27
Tableau II : Liste d'amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée par PCR .....	29
Tableau III : Amorces utilisées lors de la production de virus recombinants par le système BAC .....	34

## Liste des abréviations

ARNm : ARN messenger  
BAC : chromosome bactérien artificiel  
BIV : virus de l'immunodéficience bovine  
BoHV-1 : herpèsvirus bovin type 1  
CAS : Cellular Apoptosis Suceptibility Protein  
CPN : complexe du pore nucléaire  
CRM-1 : Chromatin Maintenance Protein 1  
DMEM : Dubelcoo's Modified Eagle Medium  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DPBS : Dubelcco's Phosphate Buffered Saline  
EBV: virus d'Epstein-Barr  
EIAV : virus de l'anémie infectieuse équine  
FBS : sérum bovin foetal  
HA : hémagglutinine  
HCF : Host Cell Factor  
HCMV: cytomégalovirus humain  
HD : domaines d'homologie  
hpi: heures post-infection  
HHV : virus herpès humain  
HVEM : médiateur de l'entrée du virus herpès  
ICTV : comité international de la taxonomie des virus  
KSHV: virus du Sarcome de Kaposi  
LATs : transcrits associés à la latence  
LB : Luria-Bertani  
LMB : leptomycine B  
LMCV : virus de la chorioméningite lymphocytaire  
MOI : multiplicité d'infection  
MHV-68 : herpèsvirus murin 68  
NCS : sérum de veau nouveau-né  
NEB : New Englands Biolabs

NES : signal d'export nucléaire  
NLS : signal de localisation nucléaire  
Oct-1 : Octamer binding protein-1  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PCR : réaction de polymérisation en chaine  
PFU : unité formatrice de plages  
PVDF : polyvinylidene fluoride  
TAP : Transporter Associated with Antigen Processing  
U<sub>L</sub> : région unique longue  
U<sub>S</sub> : région unique courte  
VHE : herpèsvirus équin type 1  
VHC : virus de l'hépatite C  
VHS : virus de l'herpès simplex  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VIF : virus de l'immunodéficience féline  
VPH : virus du papillome humain  
VZV: virus de la varicelle

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 Le virus de l'herpès simplex

### 1.1.1 Classification

Le virus de l'herpès simplex (VHS) appartient à l'ordre *Herpesvirales*. Selon la plus récente classification faite par le Comité International sur la Taxonomie de Virus (ICTV) (Davison *et al.*, 2009), l'ordre *Herpesvirales* comprend trois familles; les *Herpesviridae*, les *Alloherpesviridae* et les *Malacoherpesviridae*. Le VHS fait partie de la grande famille des *Herpesviridae*. Ces virus sont grandement disséminés dans la nature et infectent une grande variété d'hôtes comme les mammifères, les oiseaux et les reptiles (Davison *et al.*, 2009). Il existe huit virus herpès humains (HHV) qui ont été isolés (HHV-1 à -8) et divisés en trois sous-familles en fonction de leurs propriétés biologiques et la similarité de leurs génomes; les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae*, et les *Gammaherpesvirinae* (Davison, 2002, Subak-Sharpe *et al.*, 1998).

Les *Alphaherpesvirinae* sont des virus neurotropes pouvant infecter une large gamme d'hôtes. Ces virus ont un cycle de réplication court, une propagation rapide en culture cellulaire et la capacité d'établir la latence dans les neurones de ganglions sensitifs (Roizman *et al.*, 2013). Les VHS-1 et 2 ainsi que le virus de la varicelle (VZV) sont compris dans cette sous-famille de virus herpès humains. Les *Betaherpesvirinae* sont des virus ayant un spectre d'hôte restreint. Ils sont capables d'infecter les cellules lymphoïdes ou d'autres tissus. Ils ont un cycle de réplication long et une propagation lente en culture cellulaire. De plus, ils peuvent entrer en latence principalement dans les leucocytes et les cellules endothéliales (Jarvis *et al.*, 2002, Roizman *et al.*, 2013). Cette sous-famille comprend le cytomégalovirus humain (HCMV), le HHV-6 et HHV-7. Finalement, les virus appartenant à la sous-famille *Gammaherpesvirinae* infectent les lymphocytes B et T. Ils ont un cycle de réplication long et sont oncogéniques (Roizman *et al.*, 2013, Wen *et al.*, 2010). Dans cette sous-famille, on retrouve le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus du Sarcome de Kaposi (KSHV).

### 1.1.2 Pathogenèse du VHS-1

Le VHS-1 est caractérisé pour sa capacité à envahir et à se répliquer dans le système nerveux ainsi que pour sa capacité à établir une infection latente (Roizman *et al.*, 2013). L'infection au VHS-1 est très répandue dans la population mondiale. Ainsi, il a été estimé que plus de 85% de la population mondiale est séropositive pour le VHS-1 (Spruance *et al.*, 1996). L'incidence de l'infection au VHS-1 dépend de plusieurs facteurs incluant l'âge, la situation géographique et socio-économique des individus (Whitley *et al.*, 2001). La transmission du VHS-1 se fait par contact direct avec les sécrétions d'un individu infecté. L'humain est le seul réservoir pour la transmission du VHS-1 (Whitley *et al.*, 2007).

Le VHS-1 est l'agent infectieux causant plus communément des feux sauvages. Le VHS-1 est également responsable de cas de dermatites, d'infections affectant l'appareil visuel, d'encéphalite et d'herpès génital (Fatahzadeh *et al.*, 2007, Whitley *et al.*, 2007). Les infections génitales causées par le VHS-1 comprennent des symptômes cliniques moins sévères que celles causées par le VHS-2 qui est l'agent infectieux le plus souvent associé à cette pathologie (Lafferty *et al.*, 2000). Par ailleurs, il existe des risques de complications chez les nouveau-nés et les personnes immunosupprimées. Chez les nouveau-nés, l'infection herpétique est symptomatique et fréquemment mortelle. Les complications peuvent inclure des formes disséminées au niveau de plusieurs organes tels que le système nerveux central, le foie, les poumons, les glandes surrénales, la rate, le pancréas et la peau (Whitley *et al.*, 2001). Dans ces cas, des traitements antiviraux seront nécessaires.

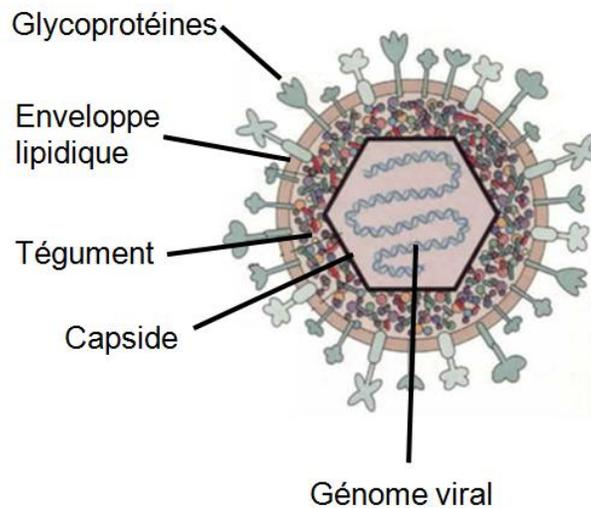
Les infections au VHS-1 peuvent être traitées avec des antiviraux de type acyclovir, valcyclovir et famcyclovir (Kimberlin *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 2009). Il s'agit d'analogues de la guanosine qui inhibent la réplication de l'ADN viral. Néanmoins, la résistance virale à l'acyclovir a été observée chez les personnes immunosupprimées, (Morfin *et al.*, 2003) rendant le traitement plus complexe.

Jusqu'à présent, aucun vaccin n'est disponible contre le VHS-1. Il est donc d'une grande importance d'étudier les mécanismes moléculaires de la pathogenèse du VHS-1 afin de permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourront mener au développement de nouveaux antiviraux ou même à la création d'un vaccin.

### 1.1.3 Structure du VHS-1

La particule virale du VHS-1 est constituée de quatre composantes: un cœur contenant la nucléocapside composée d'un génome viral et une capsidie icosaédrique, une couche protéique qui entoure la capsidie, nommée le tégument, et une enveloppe bilipidique dans laquelle sont insérées diverses glycoprotéines virales (Roizman *et al.*, 2013) (Figure 1).

Le VHS-1 possède un génome d'ADN double brin d'une longueur de 152 kb qui code pour plus de 80 protéines (Roizman *et al.*, 2013). Il est composé de deux régions appelées unique longue ( $U_L$ ) et unique courte ( $U_S$ ). Ces deux régions contiennent des gènes qui se retrouvent en une seule copie dans le génome. Chacune de ces deux régions est encadrée par des séquences inversement répétées (Baines *et al.*, 2007). Lors de la réplication du VHS-1,  $U_L$  et  $U_S$  peuvent être inversées pour former quatre isomères du génome viral (Delius *et al.*, 1976, Hayward *et al.*, 1975) présents en concentrations équimolaires (Bataille *et al.*, 1997).



**Figure 1. Structure du VHS-1.** Schéma montrant les différentes parties formant le virion. Les différents composants sont identifiés sur la figure. Tirée et modifiée de <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarfova/assets/bio307/jehodge/page01.html>

La capside contenant le génome viral est composée de 162 capsomères. Elle a une symétrie icosaédrique T=16 pour la couche externe et une symétrie T=4 pour la couche interne (Schrag *et al.*, 1989). La capside est composée de huit protéines virales telles que la protéine VP5 qui est la protéine majeure, VP19C, VP23, VP24, VP26, UL6, UL17, UL25 (Loret *et al.*, 2008).

Le tégument protéique est composé de 23 protéines virales, entre autres, les protéines ICP0, ICP4 et VP16 qui jouent un rôle dans l'initiation de la transcription virale (Loret *et al.*, 2008), la protéine « virion host shut-off » (vhs) qui entraîne la dégradation des ARNm grâce à son activité RNase intrinsèque; cette fonction exclut toutefois les ARNm viraux lorsque la protéine virale VP16 est synthétisée (Knez *et al.*, 2003, Lam *et al.*, 1996) et la protéine VP1-2 qui joue un rôle dans l'assemblage des virions à la fin du cycle viral (Kelly *et al.*, 2009).

L'enveloppe virale contient plusieurs glycoprotéines virales ainsi que certaines protéines de membrane non-glycosylées encodées par les gènes *UL20* (Ward *et al.*, 1994) et *US9* (Brideau *et al.*, 1998).

#### **1.1.4 Cycle de réplication du VHS-1**

Le cycle de réplication du virus commence avec l'entrée du virus dans la cellule hôte (Figure 2). Dépendamment du type cellulaire, le virus peut entrer par endocytose pH-dépendante ou -indépendante ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (Clement *et al.*, 2006, Connolly *et al.*, 2011, Nicola *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2003). Les glycoprotéines de l'enveloppe du VHS-1 assurent l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules. D'abord, les glycoprotéines gB et gC s'attachent à l'héparine sulfate de la surface de la cellule (Pertel *et al.*, 2001, Shieh *et al.*, 1992, WuDunn *et al.*, 1989). Bien que ce processus augmente l'efficacité de l'infection, gC ne semble pas être indispensable à cette étape puisqu'en son absence, gB lie l'héparine sulfate (Griffiths *et al.*, 1998, Herold *et al.*, 1994). Cet attachement permet à gD d'interagir avec trois classes de récepteurs : le médiateur de l'entrée du virus herpès (HVEM), membre de la famille des récepteurs de nécrose tumorale (Montgomery *et al.*, 1996), la Nectine 1 et 2, des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines, et finalement l'héparine sulfate 3-O (Laquerre *et al.*, 1998, Shukla *et al.*, 1999). Cette interaction permet d'initier la fusion

en induisant un changement conformationnel de gD, ce qui expose un domaine pro-fusion (Cocchi *et al.*, 2004). En présence de gD, gB catalyse la fusion des membranes. Des interactions de gB avec la chaîne lourde de la myosine de type IIa (NM2a) et avec la glycoprotéine associée à la myéline ont aussi été rapportées (Arii *et al.*, 2010, Suenaga *et al.*, 2010). Le complexe gH/gL est requis pour l'attachement du virus aux intégrines, mais leur rôle dans la fusion est dû à l'interaction avec gB, ce qui mène à la formation du complexe de fusion (Chowdary *et al.*, 2010)

Suite à la fusion, la capside du virus et les protéines du tégument font leur entrée dans le cytoplasme de la cellule. La capside est transportée vers la membrane nucléaire via les microtubules et le génome du virus est relâché dans le noyau (Dohner *et al.*, 2005, Sodeik *et al.*, 1997). L'ADN viral se circularise (Garber *et al.*, 1993) et la transcription des gènes viraux se fait de façon séquentielle par la polymérase à ARN II cellulaire (Honess *et al.*, 1974, Preston *et al.*, 1976). Les gènes du VHS-1 sont classés en trois groupes selon leur expression dans le temps: les gènes immédiats précoces ou alpha ( $\alpha$ ), les gènes précoces ou bêta ( $\beta$ ) et les gènes tardifs ou gamma ( $\gamma$ ). Tout d'abord, les facteurs de transcription cellulaires « Octamer binding protein-1 » (Oct-1) et « Host Cell Factor » (HCF) et la protéine virale VP16 permettront la transcription des gènes  $\alpha$  (Campbell *et al.*, 1984, LaBoissiere *et al.*, 2000, Post *et al.*, 1981). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription nécessaires à l'expression d'autres gènes viraux. Les gènes  $\beta$  codent pour des protéines qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral. La réplication du génome viral se fait selon un mécanisme de cercle roulant produisant des concatémères de génome viral (Boehmer *et al.*, 1997, Falkenberg *et al.*, 2000).

Finalement, il y a transcription des gènes tardifs qui sont divisés en deux groupes : les partiellement tardifs ( $\gamma_1$  ou « *leaky late* ») et les tardifs ( $\gamma_2$  ou « *true late* »). L'expression des gènes  $\gamma_1$  est stimulée par la réplication de l'ADN viral tandis que les gènes  $\gamma_2$  ne sont pas exprimés lorsque la réplication virale est inhibée (Holland *et al.*, 1980). Ces gènes sont principalement impliqués dans la formation de la structure du virion.

L'encapsidation du génome se fait dans le noyau. Les protéines structurales (VP5, VP19C, VP23 et VP26) sont transportées au noyau afin d'y former la capside. Les capsides vides vont contenir une seule copie de génome par un processus qui implique simultanément le clivage de l'ADN concatémérique en unités monomériques, et l'empaquetage de l'ADN, afin de former la nucléocapside (Conway *et al.*, 2011). La protéine UL15 ainsi qu'UL26 semblent être importantes

dans le clivage de l'ADN pendant la réplication. Plusieurs protéines virales telles que UL6, 15, 17, 25, 28, 32 et 33 sont nécessaires dans le processus d'empaquetage de l'ADN viral dans les capsides néoformées mais les mécanismes impliqués dans ce processus restent à être élucidés (Roizman *et al.*, 2013).

Par la suite, les nucléocapsides s'enveloppent à partir de la membrane nucléaire interne, d'où elles acquièrent une enveloppe primaire et certaines protéines du tégument (Mettenleiter, 2002). Les virus enveloppés fusionnent avec la membrane nucléaire externe, et les nucléocapsides alors libérées dans le cytoplasme de la cellule sont enveloppées à leur tour lors du bourgeonnement à partir des compartiments de Golgi ou des endosomes (Harley *et al.*, 2001, Mettenleiter, 2004, Turcotte *et al.*, 2005). Ces virus enveloppés sont déplacés à la surface de la cellule par un transport vésiculaire. Le virus sort de la cellule par fusion de la vésicule à la membrane cellulaire (Johnson *et al.*, 2011).

### **1.1.5 Rôle de protéines dans les étapes tardives du cycle viral du VHS-1**

Certaines glycoprotéines et protéines virales jouent un rôle dans les étapes d'enveloppement, dé-enveloppement, ré-enveloppement et transport vésiculaire du virus à la membrane plasmique.

Pendant le processus d'enveloppement, le virus acquiert son enveloppe primaire à partir de la membrane nucléaire interne. Les protéines virales UL31, UL34 et gK ont été identifiées comme étant importantes dans ce processus (Mettenleiter, 2004). UL34 est une protéine membranaire type II présent dans la membrane nucléaire et dans l'enveloppe primaire; cette protéine interagit avec UL31 pour former un complexe qui est requis pour leur localisation dans la membrane nucléaire interne (Fuchs *et al.*, 2002). En l'absence de ces protéines, l'enveloppement primaire est inhibé et les capsides s'accumulent dans le noyau (Chang *et al.*, 1997, Roller *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que la protéine cellulaire transmembranaire 140 peut inhiber la prolifération du VHS-1 en bloquant la sortie des nucléocapsides par son interaction avec la protéine UL31. Cette interaction empêche la formation du complexe UL31-UL34 nécessaire pour l'enveloppement primaire de nucléocapsides (Guan *et al.*, 2014). D'ailleurs, la gK a été impliquée dans l'enveloppement du virus à partir de la membrane nucléaire interne puisqu'un virus déficient en gK montre une prédominance de



Dans l'étape de ré-enveloppement, les nucléocapsides acquièrent leur enveloppe finale à partir des compartiments du Golgi ou des endosomes (Harley *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2011, Mettenleiter, 2002, Turcotte *et al.*, 2005). gE, gI et gD jouent un rôle important dans cette étape, car en leur absence les nucléocapsides non-enveloppées s'accumulent dans le cytoplasme (Brack *et al.*, 2000). Dernièrement, il a été démontré que l'interaction entre les protéines du tégument UL36 et UL37 est essentielle pour l'enveloppement secondaire des nucléocapsides dans le cytoplasme (Kelly *et al.*, 2014)

La protéine UL20 et gK sont impliquées dans la sortie du virus (Mettenleiter, 2004). Des études ont montré que l'absence de gK et UL20 inhibe la sortie nucléaire et l'enveloppement secondaire des virions (Avitabile *et al.*, 1994, Baines *et al.*, 1991, Foster *et al.*, 1999, Fuchs *et al.*, 1997). Une récente étude a démontré que la protéine UL37 interagit avec le complexe protéique gK-UL20 pour faciliter l'enveloppement cytoplasmique des virions (Jambunathan *et al.*, 2014).

### **1.1.6 Latence et réactivation du VHS-1**

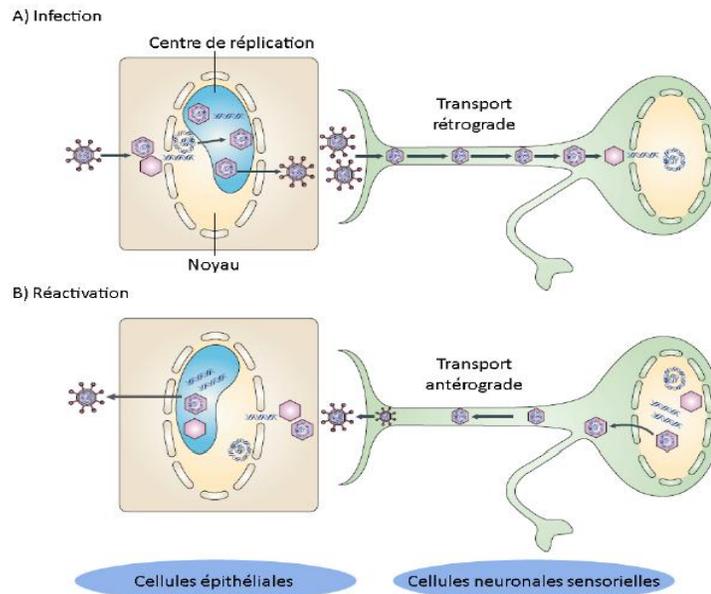
Le VHS-1 est capable d'établir la latence chez les neurones sensitifs de l'hôte et de se réactiver pour se disséminer (Figure 3). La primo-infection par le VHS-1 s'effectue au niveau des muqueuses. Par la suite, le virus infecte les neurones sensitifs et est transporté jusqu'au ganglion trijumeau où le virus peut entrer dans un cycle de réplication lytique ou en latence (Efstathiou *et al.*, 2005). Durant cette période de latence, le génome viral reste sous forme d'épisome dans le noyau du neurone et ces épisomes sont associés à des histones et organisés en nucléosomes (Deshmane *et al.*, 1989, Efstathiou *et al.*, 1986). L'expression de gènes lytiques est réprimée et seuls les transcrits associés à la latence (LATs) continueront à être produits en abondance (Spivack *et al.*, 1987, Stevens *et al.*, 1987). L'expression de *LAT* génère un transcrit primaire polyadénylé de 8,5 kb. Ce transcrit primaire est épissé pour générer un transcrit stable non polyadénylé de 2,0 kb qui s'accumule abondamment dans le noyau des neurones sensoriels. Finalement, il existe un troisième transcrit stable de 1,5 kb dérivé du transcrit de 2,0 kb par épissage alternatif (Bloom *et al.*, 2011). LAT est un précurseur de cinq microARNs (miARNs) exprimés abondamment pendant la latence et utilisés par le VHS-1 dans la régulation de la transcription des gènes viraux et cellulaires (Kramer *et al.*, 2011, Peng *et al.*, 2008, Umbach *et al.*, 2008).

Le rôle des transcrits LATs n'est pas encore très bien connu. Des études ont montré que les LATs peuvent promouvoir l'établissement de la latence (Thompson *et al.*, 1997). Aussi les LATs sont importants pour une réactivation efficace du virus (Perng *et al.*, 1994, Perng *et al.*, 1996). Les LATs semblent jouer un rôle antiapoptotique sur les neurones, ce qui permettrait à ces cellules de supporter l'infection latente (Perng *et al.*, 2000). Parmi les miARNs présents, le miARN miR-H2 possède une séquence antisens à l'activateur transcriptionnel ICP0, qui est capable d'inhiber l'expression de cette protéine. Le miARN miR-H6 a une similarité avec la séquence de l'ARNm encodant le facteur de transcription ICP4 et régule à la baisse l'expression de celle-ci (Umbach *et al.*, 2008). La régulation négative d'ICP0 et ICP4 affectera l'initiation de la transcription des gènes viraux, la réplication de l'ADN viral et ainsi la génération de nouvelles particules virales (Peng *et al.*, 2008, Thompson *et al.*, 2001, Umbach *et al.*, 2008). Récemment, il a été identifié le miARN miR-138 qui est spécifique au tissu neuronal. Ce miARN régule à la baisse l'expression du transactivateur viral ICP0 et ainsi l'expression de gènes lytiques pour promouvoir l'établissement de la latence (Pan *et al.*, 2014).

En réponse à un stress, ou dans le cas d'une déficience immunitaire le virus peut se réactiver causant des lésions récurrentes. La réactivation semble être liée au remodelage du génome viral par les histones, car une acétylation des queues d'histones permet l'expression des gènes  $\alpha$  et la réactivation du virus (Efstathiou *et al.*, 2005).

Suite à la réplication du génome, il y aura production de nouveaux virions qui seront transportés de façon antérograde le long des axones des nerfs sensitifs infectés afin de produire une nouvelle infection au niveau de muqueuses. Cependant, deux modèles ont été proposés expliquant le transport axonal antérograde du VHS-1 (Diefenbach *et al.*, 2008). Le modèle nommé "séparé" propose que les nucléocapsides sont transportées indépendamment des glycoprotéines virales et l'acquisition de l'enveloppe virale possédant les glycoprotéines se fait dans des vésicules et cônes de croissance de l'axone. Les virions sont relâchés par exocytose au niveau des terminaisons axonales (Enquist *et al.*, 2002, D. J. Holland *et al.*, 1999, Penfold *et al.*, 1994, Saksena *et al.*, 2006, Snyder *et al.*, 2007, Tomishima *et al.*, 2002). Le modèle "marié" propose que les virions enveloppés dans le corps cellulaire voyagent jusqu'aux terminaisons axonales et sont relâchés par exocytose via les varicosités et les cônes de croissance de l'axone

(Ch'ng *et al.*, 2005, del Rio *et al.*, 2005). Dernièrement, il a été démontré que les capsides sont transportées par les deux modèles (Negatsch *et al.*, 2010, Wisner *et al.*, 2011).



**Figure 3. Représentation schématisée des différentes étapes menant à la latence et à la réactivation du VHS-1.**

A) L'infection aiguë des muqueuses est suivie de l'infection aiguë de neurones. La capside est transportée de façon rétrograde jusqu'au corps cellulaire où il y a production de nouveaux virus et infection aiguë des autres neurones. Par la suite, le virus établit la latence dans les neurones où le génome reste sous la forme d'épisome dans le noyau. B) Le virus peut se réactiver et produire des infections récurrentes. Il y a production de nouvelles capsides qui seront transportées de façon antérograde afin de produire une nouvelle infection au niveau de muqueuses. Tirée et modifiée de la revue de Knipe *et al.* (2008).

## 1.2 Transport nucléo-cytoplasmique de protéines virales

Les protéines substrats d'import ou d'export nucléaire, peuvent être identifiés grâce à des séquences d'adressage spécifiques telles que le signal de localisation nucléaire (NLS) et le signal d'export nucléaire (NES) (Dargemont, 2002). Ces signaux permettent leur reconnaissance par des transporteurs protéiques comme les importines ou les exportines (Akarsu *et al.*, 2006). Le transport bidirectionnel de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme est un processus sélectif qui est produit à travers des pores nucléaires (Allen *et al.*, 2000, Fahrenkrog *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Les pores nucléaires

Les pores nucléaires constituent la seule voie de passage entre le noyau et le cytoplasme. Il en existe plusieurs centaines par noyau et leur nombre peut varier selon le type et l'état cellulaire (Akarsu *et al.*, 2006). Chaque pore nucléaire est formé à partir d'une structure élaborée appelée complexe du pore nucléaire (CPN) avec une masse d'environ 125 MDa chez les vertébrés et composé d'une centaine de protéines appelées nucléoporines (Schwartz, 2005). Des micrographies électroniques des CPN montrent une structure octogonale perpendiculaire à la membrane nucléaire, (Kirschner *et al.*, 1977) qui comprend 3 sous-structures principales : des queues cytoplasmiques longues de 35 nm environ, un corps central et un panier nucléaire (Beck *et al.*, 2004).

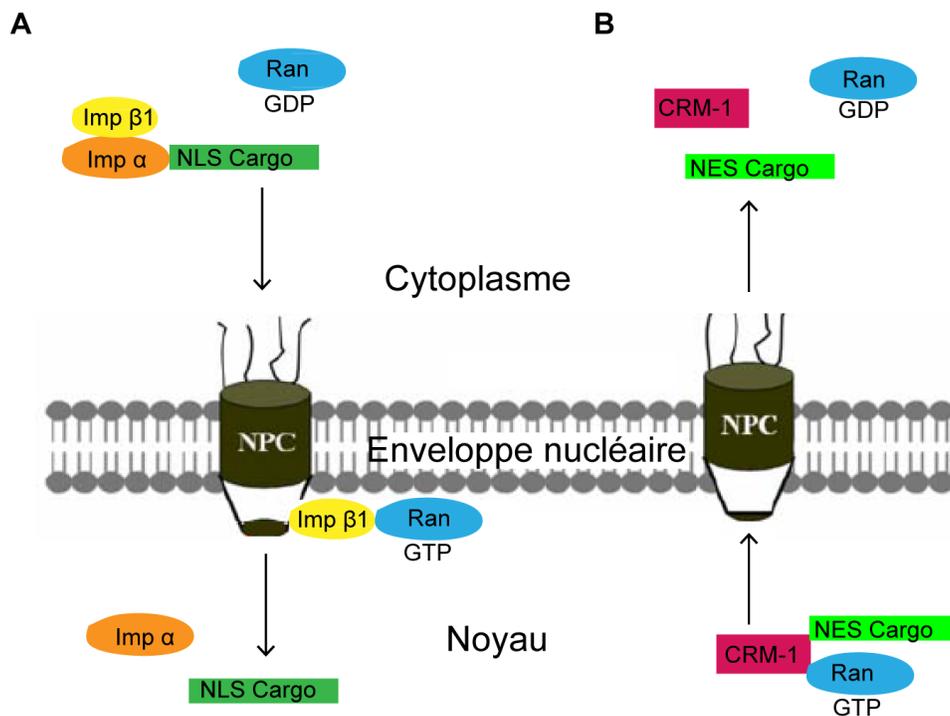
Les molécules de poids moléculaire inférieur à 40 KDa environ peuvent passer à travers les canaux nucléaires par simple diffusion passive (Fried *et al.*, 2003, Ribbeck *et al.*, 2001). Par contre, les macromolécules de masse supérieure à cette limite de diffusion sont transportées de façon sélective vers l'intérieur ou vers l'extérieur du noyau avec l'aide des transporteurs protéiques solubles (importines et exportines) qui fixent les macromolécules et interagissent également avec certaines nucléoporines (Dingwall *et al.*, 1982).

Plusieurs des nucléoporines contiennent des domaines ayant une grande nombre de répétitions d'acides aminés comme la phénylalanine et la glycine reconnues par les transporteurs de protéines lui permettant de cibler leurs substrats au pore nucléaire et d'assurer leur translocation (Rout *et al.*, 1994). Par la suite, les substrats transportés sont libérés dans le compartiment d'arrivée et les récepteurs sont recyclés pour permettre un nouveau cycle de transport (Dargemont, 2002).

### 1.2.2 Les importines

Les molécules qui vont du cytoplasme à travers les CPN vers le noyau sont transportées par des protéines appelées importines (Imamoto *et al.*, 1995). Il existe deux classes d'importines :  $\alpha$  et  $\beta$ . L'importine  $\alpha$  va reconnaître le NLS du cargo (Weis *et al.*, 1995). Postérieurement, le complexe cargo-importine  $\alpha$  est reconnu par l'importine  $\beta$ 1 qui permet la fixation au CPN (Bayliss *et al.*, 2000, Gorlich *et al.*, 1995), ce qui provoque la translocation de l'hétérotricomplexe

dans le noyau. Une fois dans le noyau, l'interaction de Ran-GTP avec l'importine  $\beta$ 1 conduit à un changement conformationnel qui abaisse son affinité pour le NLS, libérant le cargo dans le noyau. Par la suite, le complexe importine-Ran-GTP est ramené dans le cytoplasme pour un nouveau cycle d'import (Kosugi *et al.*, 2009) (Figure 4). Cette description simplifiée, représente le modèle le plus répandu dans la littérature. Il existe différents importines  $\alpha$  qui vont reconnaître différents cargos, mais il existe une seule importine  $\beta$  (Boulo *et al.*, 2007).



**Figure 4. Modèle simplifié du transport nucléocytoplasmique de protéines effectué par les importines et exportines.** A) Dans le cytoplasme, l'importine  $\alpha$  se fixe au NLS d'une protéine à transporter et forme un complexe trimérique avec l'importine  $\beta$ 1 pour leur diffusion à travers le NPC. Une fois dans le noyau, l'interaction de Ran-GTP avec l'importine  $\beta$ 1 provoque un changement de conformation, libérant le cargo dans le noyau. B) Pour l'export nucléaire, Ran-GTP stimule la fixation de l'exportine CRM-1 au NES de la protéine dans le noyau et le complexe est exporté au cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, ces complexes sont désassemblés grâce à l'hydrolyse du Ran-GTP à Ran-GDP. Tirée et modifiée de la revue de Ding *et al.* (2010).

Il existe deux principaux types de NLS, le NLS monopartite et le NLS bipartite. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou de deux groupes d'acides aminés basiques respectivement (arginine et/ou lysine) (Lange *et al.*, 2007). La séquence consensus du NLS monopartite provient de l'antigène grand T du virus SV40, elle est composée d'un groupe de sept acides aminés parmi

lesquels cinq sont basiques (Kalderon *et al.*, 1984). La séquence consensus du NLS bipartite provient de la nucléoplasmine. Cette séquence est constituée de deux groupements basiques contenant de deux à trois acides aminés basiques chacun et sont séparés par 10 ou 30 acides aminés (Robbins *et al.*, 1991, Romanelli *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont démontré la présence de NLS consensus dans quelques protéines virales qui jouent un rôle dans leur localisation nucléaire. Entre autres, la protéine ICP27 du VHS-1 possède un NLS bipartite dans la région N-terminale de la protéine. Ce NLS a été considéré comme étant important dans le contexte d'infection, car des virus recombinants contenant des mutations dans le NLS d'ICP27 ne se répliquent pas de manière efficace comparé au virus de type sauvage (Mears *et al.*, 1995). La protéine EBNA-1 du EBV et la protéine ppUL44 du HCMV contient un NLS monopartite. Des études en contexte de transfection transitoire ont montré que ces NLS sont responsables de la localisation nucléaire de ces protéines. Il reste à déterminer si ces NLS sont fonctionnels en contexte d'infection (Alvisi *et al.*, 2005, Ambinder *et al.*, 1991). Il existe également d'autres NLS qui sont différents des séquences consensus qui ont été identifiées dans quelques protéines virales. Par exemple, la protéine VP22 du herpèsvirus bovin type 1 (BoHV-1) contient un NLS atypique constitué de quatre acides aminés dont deux sont basiques. Ce NLS a été démontré fonctionnel en contexte de transfection transitoire (Zheng *et al.*, 2005). Aussi, la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (BIV) possède un NLS bipartite atypique puisque la longueur de la séquence entre les motifs de NLS est 20 acides aminés. Des études en contexte de transfection ont montré que ce NLS atypique est responsable de la localisation nucléaire de la protéine Rev du BIV (Gomez Corredor *et al.*, 2009).

### **1.2.3 Les exportines**

L'export nucléaire de molécules est fait par l'intermédiaire des protéines appelées exportines. Il y a plusieurs exportines qui vont reconnaître différents cargos (Cullen, 2003, Ossareh-Nazari *et al.*, 2001). Ainsi, la protéine CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility Protein), nommée aussi exportine 2, est responsable de l'export nucléaire de l'importine  $\alpha$  (Kutay *et al.*, 1997). L'exportine-t, elle, est responsable de la sortie du noyau des ARN de transfert (Cullen, 2003). L'exportine 4 est impliquée dans l'export du facteur d'initiation de la traduction eIF-5A (Lipowsky *et al.*, 2000). L'exportine 5 permet l'export nucléaire de protéines qui interagissent

avec les ARN double-brins (Brownawell *et al.*, 2002). L'exportine 6 est responsable de l'export nucléaire de complexes profiline-actine (Stuven *et al.*, 2003). Il a été démontré que le récepteur d'export Mex67p permet l'export d'ARNm du noyau vers le cytoplasme dans *Saccharomyces cerevisiae* (Segref *et al.*, 1997), ainsi, membres de la famille « Transporter Associated with Antigen Processing » (TAP) ont une fonction similaire chez les métazoaires (Gruter *et al.*, 1998). En plus, le facteur d'export d'ARNm TAP a été impliqué dans l'export nucléaire de la protéine ORF57 du gammaherpès virus (Williams *et al.*, 2005), la protéine EB2 du EBV (Juillard *et al.*, 2009) et la protéine ICP27 du VHS-1 (Johnson *et al.*, 2009a, Johnson *et al.*, 2009b). Par ailleurs, la calréticuline, une protéine importante dans la régulation de la concentration du calcium, est responsable de l'export nucléaire du récepteur des glucocorticoïdes (Holaska *et al.*, 2001). Finalement, il existe une autre exportine appelée CRM-1 (Chromatin Maintenance Protein 1) ou exportine 1 qui est impliquée dans l'export nucléaire des molécules, et plus spécifiquement des protéines possédant un NES (Ossareh-Nazari *et al.*, 1997, Weis, 2002). Elle représente le récepteur le plus utilisé pour l'export nucléaire de protéines, d'ARN et de ribonucléoprotéines (Akarsu *et al.*, 2006).

L'export nucléaire de protéines via CRM-1 est inhibé par la leptomycine B (LMB). Des études génétiques dans *Schizosaccharomyces pombe* ont permis d'identifier l'exportine CRM-1 comme une cible cellulaire de cet inhibiteur (Nishi *et al.*, 1994). Il a été démontré que la LMB inhibe la translocation nucléo-cytoplasmique de protéines via la liaison covalente de son groupe  $\alpha,\beta$ -insaturé  $\delta$  lactone au groupe sulfhydryle du résidu cystéine-529 localisé dans la région centrale conservée de CRM-1, ce qui mène à l'inactivation de ce récepteur (Kudo *et al.*, 1999). L'utilisation de la LMB permet de caractériser cette voie de transport.

CRM-1 fait partie de la famille des importines  $\beta$  (Petosa *et al.*, 2004). Tout d'abord, elle forme un complexe avec Ran-GTP puis se fixe au NES d'une protéine à transporter (Fornierod *et al.*, 1997, Ossareh-Nazari *et al.*, 1997, Ossareh-Nazari *et al.*, 1999). La liaison de CRM-1 à Ran-GTP provoque un changement conformationnel dans l'exportine CRM-1 qui augmente son affinité pour le NES, de sorte qu'un complexe trimérique est formé (Dong *et al.*, 2009). Ce complexe trimérique est exporté du noyau vers le cytoplasme à travers le CPN. Le complexe transféré se dissocie lorsqu'il rencontre Ran-GAP dans les filaments cytoplasmiques du CPN, stimulant Ran pour hydrolyser le GTP qui lui est lié, ce qui provoque son changement en une

conformation à faible affinité pour l'exportine CRM-1. La conformation de l'exportine CRM-1 libérée est transformée en une structure à faible affinité pour le NES, libérant le cargo dans le cytosol (Boulo *et al.*, 2007). L'exportine CRM-1 et Ran-GDP sont ramenés dans le noyau à travers le CPN (Figure 4).

Le NES reconnu par CRM-1 est une courte séquence peptidique riche en acides aminés hydrophobes. Cette séquence a été caractérisée pour la première fois dans PKI, un inhibiteur de la protéine kinase A, et dans la protéine Rev du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (Fischer *et al.*, 1995, Fornerod *et al.*, 1997, Meyer *et al.*, 1994, W. Wen *et al.*, 1995). La séquence consensus est ( $\emptyset^1 X_{2-3} \emptyset^2 X_{2-3} \emptyset^3 X \emptyset^4$ ), où  $\emptyset$  peut représenter un acide aminé hydrophobe comme la leucine, isoleucine, valine, phénylalanine et méthionine et X peut correspondre à n'importe quel acide aminé (Dong *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009). Cependant, une nouvelle classification de NES consensus a été établie basée sur les interactions avec l'exportine CRM-1. Le NES consensus a été classifié en deux types, la classe de la protéine Rev du VIH-1 ( $\emptyset^0 \emptyset^1 X \emptyset^2 XX \emptyset^3 X \emptyset^4$ ) et la classe PKI ( $\emptyset^0 XX \emptyset^1 XXX \emptyset^2 XX \emptyset^3 X \emptyset^4$ ). Ces nouveaux NES consensus diffèrent de l'ancien NES consensus par la présence de cinq et non quatre résidus hydrophobes, importants pour l'interaction avec l'exportine CRM-1 (Guttler *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont démontré la présence de NES consensus dépendant de l'exportine CRM-1 ayant un rôle dans la localisation de la protéine dans le cytoplasme, entre autres, la protéine E1 du virus du papillome humain (VPH) (Deng *et al.*, 2004), la protéine LANA2 du KSHV (Munoz-Fontela *et al.*, 2005), les protéines UL3 et UL47 du VHS-1 (P. Williams *et al.*, 2008, Zheng *et al.*, 2011) et la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (Gomez Corredor *et al.*, 2012).

D'ailleurs, il existe des NES non consensus qui ont été reportés pour d'autres protéines virales dans lesquelles aucune caractéristique structurale importante comme la présence d'acides aminés répétés n'a été identifiée. Des exemples sont la protéine Rev du virus de l'immunodéficience féline (VIF) (Fridell *et al.*, 1993) et du virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) (Otero *et al.*, 1998) et la protéine « Core » du virus de l'hépatite C (VHC) (Cerutti *et al.*, 2011).

## 1.3 La protéine virale UL24

### 1.3.1 Caractéristiques d'UL24

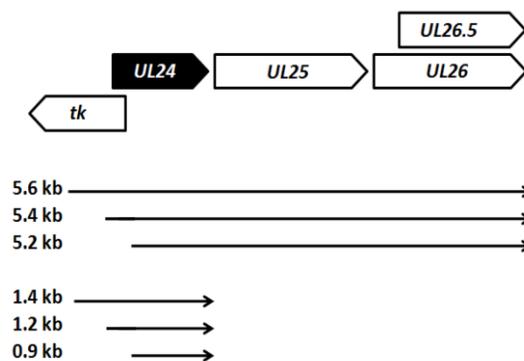
La protéine UL24 du VHS-1 est exprimée de façon tardive dans le cycle de réplication du virus. C'est une protéine hautement basique, de 269 acides aminés et d'un poids moléculaire de 29.5 kDa (Pearson *et al.*, 2002). La séquence UL24 est séparée en deux régions : la partie N-terminale, qui est hautement conservée parmi les orthologues de cette protéine dans divers virus herpès, et la partie C-terminale qui est plus variable (Jacobson *et al.*, 1989, Knizewski *et al.*, 2006). Dans la partie C-terminale, un NLS type bipartite a été identifié dont l'importance n'a pas encore été déterminée (Bertrand *et al.*, 2008).

La protéine UL24 se trouve dans plusieurs sous-compartiments cellulaires; des études de fractionnement cellulaire ont démontré qu'UL24 se retrouve associé principalement avec le noyau, mais elle est aussi associée au cytoplasme (Pearson *et al.*, 2002). À 9 heures post-infection (hpi), UL24 se localise au noyau, au cytoplasme et de façon transitoire au nucléole. Entre 9 et 15 hpi, 50 % à 70 % de la protéine UL24 se retrouve associée au noyau (Lymberopoulos *et al.*, 2007, Pearson *et al.*, 2002). À 18 hpi, UL24 se localise au cytoplasme plus particulièrement en périphérie du noyau (Lymberopoulos *et al.*, 2007). Une dernière étude a démontré que la partie N-terminale se retrouve au noyau et la partie C-terminale d'UL24 se retrouve au Golgi en contexte de transfection transitoire (Bertrand *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Expression de la protéine UL24

Le gène *UL24* est conservé dans la famille des *Herpesviridae* (McGeoch *et al.*, 1995) et il est localisé dans la région unique longue du génome viral (McGeoch *et al.*, 1988). Les cadres de lecture ouvert du gène *UL24* et le gène *tk* se chevauchent légèrement (de 66 pb) (Jacobson *et al.*, 1998). Ainsi, le promoteur de *tk* se retrouve dans le cadre de lecture ouvert d'UL24 (Coen *et al.*, 1986). Six transcrits sont produits lors de l'infection par le VHS-1 (Figure 5). Les transcrits courts (0,9; 1,2 et 1,4 kb) sont exprimés de façon précoce tandis que les transcrits longs (5,2; 5,4 et 5,6) sont produits avec une cinétique d'expression tardive (Cook *et al.*, 1996). Les transcrits de 5,6 et 1,4 kb sont produits à partir du premier site d'initiation, les transcrits 5,4 et 1,2 sont produits à partir du deuxième site d'initiation. Ces transcrits 5,6; 5,4; 1,4 et 1,2 kb contiennent le cadre de

lecture ouvert complet d'UL24 et sont potentiellement responsables de l'expression de la protéine. Il a été démontré que suite à l'inhibition du premier site d'initiation, l'expression d'UL24 est considérablement diminuée, suggérant que les transcrits 5,6 et 1,4 dérivant du premier site d'initiation sont les principaux responsables de l'expression d'UL24 (Pearson *et al.*, 2002). Les transcrits 5,2 et 0,9 kb sont produits à partir du troisième site d'initiation. Ces transcrits n'incluent pas le cadre de lecture ouvert complet d'UL24 donc ils ont le potentiel d'encoder une forme tronquée de la protéine (Pearson *et al.*, 2002).



**Figure 5. Représentation graphique des transcrits d'UL24 du VHS-1.** *UL24* est représenté par la boîte noire. Les différents gènes entourant *UL24* sont représentés par les boîtes blanches. Les différents transcrits d'*UL24* produits lors de l'infection sont représentés par des flèches noires. Les chiffres à gauche des flèches indiquent la longueur des transcrits. Adapté de Pearson *et al.* (2002).

### 1.3.3 Domaines conservés d'UL24

La protéine virale UL24 est conservée parmi les trois sous-familles des *Herpesviridae*. Des études comparatives des séquences d'UL24 d'origines différentes ont permis d'identifier cinq domaines d'homologie (HD) dans la région N-terminale de la protéine (Jacobson *et al.*, 1989, Knizewski *et al.*, 2006). Il s'agit de régions d'UL24 où le niveau de conservation est d'au moins 65% (Jacobson *et al.*, 1989). Ces HDs contiennent des résidus hautement conservés entre les homologues d'UL24 (Knizewski *et al.*, 2006). Il a été démontré que la mutation de groupes d'acides aminés dans les HDs II et III a un effet négatif sur la réplication du virus en culture cellulaire (Jacobson *et al.*, 1989).

Une étude de bioinformatique a identifié un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK localisé dans les HDs II et III dans la région N-terminale d'UL24 (Knizewski *et al.*, 2006). Cependant, son rôle n'a pas encore été démontré. Ce motif a été identifié dans plusieurs protéines impliquées dans la recombinaison et dans la réparation de l'ADN et chez des enzymes de restriction (Bujnicki *et al.*, 2001a). Un autre motif endonucléase de type PD-(D/E)XK a déjà été identifié dans le gène *UL12* du VHS-1 (Bujnicki *et al.*, 2001b). *UL12* est une nucléase alcaline impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral mais elle n'est pas essentielle pour la réplication de l'ADN viral (Weller *et al.*, 1990). Aussi, le motif PD-(D/E)XK a été identifié dans le domaine ARN endonucléase de la protéine L du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LMCV) de la famille *Arenaviridae*. Cette ribonucléase est essentielle dans la transcription des ARNm viraux (Morin *et al.*, 2010).

#### **1.3.4 Fonctions d'UL24**

La protéine UL24 est importante pour la réplication efficace du virus en culture cellulaire. Chez un virus déficient en UL24, la réplication est diminuée et la formation de plages de type syncytiale est observée (Sanders *et al.*, 1982). Une plage syncytiale résulte de la fusion des membranes plasmiques de plusieurs cellules infectées adjacentes. La formation de syncytia chez les virus déficients en UL24 est plus marquée lorsque la température d'infection est de 39°C (Jacobson *et al.*, 1989). Il existe d'autres protéines du VHS-1 associées au phénotype de plages syncytiales; les protéines gB, gK et UL20 (Avitabile *et al.*, 2004, Foster *et al.*, 2008, Foster *et al.*, 2004, Ruyechan *et al.*, 1979). Ces protéines sont importantes dans la morphogénèse du virion de sorte qu'il a été suggéré qu'UL24 pourrait jouer un rôle dans les étapes tardives du cycle viral comme proposé par Pearson *et al.* (2002).

La protéine UL24 joue également un rôle dans la pathogénèse du VHS-1. Dans un modèle murin d'infection oculaire, une souche déficiente en UL24 démontre une réduction de titres viraux dans les muqueuses d'environ 1 log<sub>10</sub>, mais une réduction d'environ 4 log<sub>10</sub> dans les neurones, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de réactivation virale à partir de neurones infectés de façon latente (Jacobson *et al.*, 1998). De plus, les signes cliniques de la maladie sont réduits chez les souris infectées avec un virus déficient en UL24 (Leiva-Torres *et al.*, 2010). UL24 est donc un déterminant important de la neuropathogénèse.

Par ailleurs, la protéine UL24 affecte la localisation des protéines nucléolaires nucléoline et B23. Ce sont des protéines multifonctionnelles qui contribuent à la biogenèse et la maturation de ribosomes (Boisvert *et al.*, 2007). La nucléoline et B23 se localisent sous la forme de points dans le nucléole, et lors de l'infection de cellules par le VHS-1, ces protéines sont dispersées à travers le noyau. Cependant, lorsque l'infection se fait avec un virus déficient en UL24 cette dispersion n'a plus lieu (Lymberopoulos *et al.*, 2011, Lymberopoulos *et al.*, 2007). D'autre part, des études ont démontré que la partie conservée N-terminale est suffisante à induire la redistribution de la nucléoline et B23 en contexte de transfection transitoire (Bertrand *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2011).

Dernièrement, des études dans les cellules fibroblastiques humaines du prépuce non immortalisées (HFF) ont montré que suite à l'infection par le VHS-1, les différents compartiments du Golgi sont entièrement dispersés et fragmentés. Par contre, en absence d'UL24, on observe un patron de dispersion du Golgi sous forme réticulé qui s'étend à travers le syncytium. Aussi, cette même étude a démontré que l'absence d'UL24 cause une relocalisation des glycoprotéines virales gB et gD impliquées dans la fusion membranaire. Ces glycoprotéines virales semblent colocaliser avec le cytosquelette et cette association est fortement diminuée en absence d'UL24 dans les étapes tardives du cycle viral. Donc, ces changements pourraient contribuer au phénotype syncytial associé à plusieurs mutations du gène *UL24* (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013).

### **1.3.5 UL24 et ses homologues**

Plusieurs études ont montré que les homologues d'UL24 chez d'autres virus herpès sont aussi importants dans la pathogenèse du virus. Des orthologues d'UL24 du VHS-1 chez les *Alphaherpesvirinae* incluent UL24 du VHS-2 et BoHV-1, et ORF35 du VZV. Chez les *Betaherpesvirinae*, on retrouve entre autres U49 des HHV-6 et 7, et UL76 de HCMV. Finalement, chez les *Gammapherpesvirinae*, on retrouve Bxrf1 d'EBV, ORF20 de l'herpèsvirus murin 68 (MHV-68), ORF20 du KSHV et ORF37 de l'herpèsvirus équin type 1 (VHE-1) (McGeoch *et al.*, 1995, Nascimento *et al.*, 2009).

UL24 dans le VHS-2 est un déterminant de la virulence dans un modèle vaginal d'infection de souris et de cochon d'Inde. Lorsque la partie C-terminale du VHS-2 est tronquée,

le virus mutant est beaucoup moins létal et cause moins de lésions que le virus de type sauvage. De plus, la capacité de réactivation de ce virus déficient en UL24 est diminuée chez le cochon d'Inde. Aussi, ce virus mutant forme des plages syncytiales suggérant que la partie C-terminale est importante pour moduler les événements de fusion (Blakeney *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que la vaccination avec un mutant d'UL24 du VHS-2 induit à une réponse immune protectrice dans un modèle vaginal d'infection de souris et de cochon d'Inde. Cela suggère que le gène *UL24* constitue une cible prioritaire pour le développement d'un vaccin vivant atténué contre le VHS-2 (Visalli *et al.*, 2014).

Des études sur la protéine ORF37 du VHE-1 ont démontré son importance dans la neuropathogénèse. Dans un modèle murin, un virus déficient en ORF37 présente une diminution dans les symptômes neuronaux et une diminution dans la pathogénèse. Par contre, un virus déficient en ORF37 n'a pas d'effet sur la réplication virale par rapport au virus de type sauvage *in vitro* (Kasem *et al.*, 2010).

Une autre étude a montré l'importance de l'homologue d'UL24 (ORF35) chez le VZV dans un modèle murin de xénogreffe. Des greffes humaines de peau ou de cellules T ont été infectées par un VZV déficient en ORF35 et il a été démontré que la réplication du virus mutant dans les greffes est inférieure au virus de type sauvage (Ito *et al.*, 2005). Au contraire, l'absence de la protéine UL24 dans le BoHV-1, ne cause pas d'impact sur la réplication virale ou la formation de syncytia *in vitro*. L'absence d'un effet peut dépendre du type cellulaire utilisé (Whitbeck *et al.*, 1994).

Certaines impacts sur les cellules ont été associées à UL24 et ses homologues. Une étude a montré qu'UL24 chez le VHS-1 et ses homologues ORF20 chez le MHV-68 et chez KSHV, ainsi qu'UL76 chez le HCMV induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>2</sub>/M suivie par apoptose dans des cellules humaines et de souris. Cet arrêt est dû à une inactivation du complexe mitotique Cycline B/Cdc2 (Nascimento *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la protéine homologue d'UL24 chez le virus HCMV (UL76) a un effet régulateur sur l'expression de gènes  $\alpha$  dépendant du promoteur lorsqu'exprimée en contexte de transfection transitoire (Wang *et al.*, 2000). Une autre étude du même groupe a montré que l'expression stable de la protéine UL76 pendant le temps immédiat précoce de l'infection

provoque une inhibition de la production des particules virales ainsi qu'une diminution de l'accumulation de l'ADN viral. De plus, il a été observé une diminution de l'expression des protéines virales immédiates précoces, précoces et tardives (Wang *et al.*, 2004). Aussi, une étude a montré que des mutations dans le cadre de lecture du gène *UL76* ont significativement augmenté le niveau d'expression de la protéine *UL77*. Par conséquent, *UL76* régule à la baisse l'expression de la protéine *UL77* d'une manière dépendante de la ré-initiation de la transcription mais les mécanismes impliqués sont encore méconnus (Isomura *et al.*, 2010). D'autre part, il a été démontré qu'*UL76* induit un dommage à l'ADN et l'accumulation d'aberrations chromosomiques dans les cellules exprimant la protéine d'une façon transitoire. Donc, *UL76* peut être une source d'anomalies chromosomiques et cette altération de l'environnement cellulaire peut moduler la production virale (Siew *et al.*, 2009). De même, l'expression du gène *UL76* induit à l'expression de la chemokine pro-inflammatoire IL-8 provoquée par l'activation de la réponse au dommage de l'ADN. Cela a mis en évidence un rôle d'*UL76* dans le mécanisme d'induction d'IL-8 durant l'infection par le HCMV (Costa *et al.*, 2013). En plus, une étude récente a montré qu'*UL76* induit la formation d'aggrésomes nucléaires via l'interaction avec le récepteur de protéines polyubiquitinées S5a. Par conséquent, ce mécanisme peut être impliqué dans la modulation de l'expression des protéines au niveau transcriptionnel et traductionnel et aussi, il peut constituer un mécanisme régulateur utilisé pour les orthologues d'*UL76* chez les *Herpesviridae* (Lin *et al.*, 2013).

## 1.4 Le système BAC

Pour faciliter l'étude génétique du VHS-1, des virus recombinants peuvent être produits en utilisant un chromosome bactérien artificiel (BAC). Un BAC est un vecteur bactérien basé sur le facteur F, épisode qui est présent dans certaines souches d'*Escherichia coli*. Le plasmide F contrôle sa propre réplication et il est maintenu à un nombre bas de copies dans la cellule. Donc, cela permet une réduction du potentiel de recombinaison entre les fragments d'ADN transportés par le plasmide. Le facteur F permet le maintien de longues séquences d'ADN jusqu'à 300 Kb. (Shizuya *et al.*, 1992). Les BACs sont grandement utilisés pour modifier de longues séquences de différentes origines dans *E. coli*. Le système basé sur la « Red recombination » est le plus utilisé pour la modification de longues séquences d'ADN (Tischer *et al.*, 2010). Le système « Red » tient son origine du phage  $\lambda$  et permet l'insertion de molécules d'ADN double brin linéaire par

recombinaison homologue. Ce système est constitué de trois composants nommés Gam, Exo et Beta (Zagursky *et al.*, 1983). La protéine Gam inhibe la dégradation de l'ADN double brins linéaire par l'endonucléase RecBCD d'*E. coli* (Sakaki *et al.*, 1973). La protéine Exo forme une molécule homotrimérique toroïdale et a une activité exonucléase 5'-3' (Kovall *et al.*, 1997). La protéine Beta se lie à l'ADN simple brin et permet l'hybridation de l'ADN simple brin avec les séquences complémentaires ce qui facilite la recombinaison homologue avec la séquence cible (Kmiec *et al.*, 1981). La « Red recombination » peut être utilisée pour insérer une molécule d'ADN, typiquement un produit de PCR d'un gène de résistance à un antibiotique en utilisant des amorces ayant entre 40 et 60 pb homologues à la séquence cible (Tischer *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'utilisation du système BAC permet la production plus rapide de virus recombinants que la méthode traditionnelle (Feederle *et al.*, 2010). Aussi, nous pouvons insérer des mutations dans le génome viral en absence de pression de sélection pour des mutations compensatoires et il n'est pas nécessaire d'avoir un phénotype pour le criblage.

Il existe plusieurs virus herpès pour lesquels des formats BAC ont été générés comme le VHS-1 (Jurak *et al.*, 2012, Pan *et al.*, 2014), le HCMV (Hahn *et al.*, 2003, Isomura *et al.*, 2010), le KSHV (Li *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2006), le EBV (Feederle *et al.*, 2010) et le VZV (Nagaike *et al.*, 2004).

## 2. Problématique

La primo-infection par le VHS-1 s'effectue au niveau des muqueuses, suivi par une infection des neurones sensitifs qui innervent la région infectée. Le virus finit par établir une infection latente dans les ganglions trijumeaux et occasionnellement, suite à un stress ou dans le cas d'une déficience immunitaire, le virus se réactive causant des lésions récurrentes. Dans un modèle murin d'infection, une souche de VHS-1 déficiente en UL24 démontre une réduction de titres viraux dans les muqueuses d'environ 1 log<sub>10</sub>, mais une réduction d'environ 4 log<sub>10</sub> dans les neurones, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de réactivation virale à partir de neurones infectés de façon latente. UL24 est donc un déterminant important de la neuropathogénèse, mais les mécanismes moléculaires qui interviennent dans ses fonctions sont méconnus. En culture cellulaire, des virus déficients en UL24 démontrent entre autres, un phénotype de plages syncytiales provenant de la fusion membranaire des cellules infectées. UL24 joue un rôle dans la localisation de glycoprotéines virales puisqu'en son absence, on a observé une relocalisation dans les cellules HFF. UL24 contient une partie N-terminale qui est hautement conservée parmi les orthologues de cette protéine dans divers virus herpès. Plusieurs résultats de notre laboratoire ont démontré l'importance des acides aminés hautement conservés d'UL24 dans les modifications nucléolaires induites par le VHS-1 et dans la pathogénèse. Au contraire, la partie C-terminale d'UL24 est pauvrement conservée, et son rôle durant l'infection n'est pas encore déterminé. Des résultats précédents ont démontré que lorsqu'exprimée seule, la partie C-terminale d'UL24 se retrouve au Golgi en contexte de transfection transitoire et cette partie pourrait jouer un rôle dans les étapes tardives du cycle viral.

Notre hypothèse est que des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 sont importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme pendant les étapes tardives du cycle viral.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons proposé deux objectifs spécifiques : 1) produire des vecteurs d'expression de formes d'UL24 avec des délétions et substitutions dans la partie C-terminale et déterminer sa localisation intracellulaire dans le contexte de transfection transitoire, et 2) déterminer le rôle de la partie non-conservée de la protéine UL24 du VHS-1 dans la relation virus-cellule hôte.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Cellules et virus

#### 2.1.1 Lignées cellulaires

Les cellules Cos-7 et les cellules Vero sont des cellules fibroblastiques immortalisées provenant de reins de singe vert d'Afrique. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) enrichi à 5 % de sérum de veau nouveau-né (NCS); à 50 unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (P/S). Normalement, un passage 1:10 a été effectué. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> et 100 % d'humidité.

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire humaine provenant du cancer de col d'utérus. Elles ont été maintenues en culture dans milieu DMEM enrichi à 8 % de sérum bovin fœtal (FBS); à 50 unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (P/S). Typiquement, 1/10 des cellules ont été passées. Les cellules ont été conservées dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> et 100 % d'humidité.

#### 2.1.2 Souches virales et production de stocks viraux

Les souches virales du virus de l'herpès simplex 1 KOS et UL24X (déficient en la protéine UL24) (Jacobson *et al.*, 1998) provient originalement de Priscilla Schaffer et de Donald M. Coen, respectivement (*Harvard Medical School*, Boston). Le virus vHA-UL24 est un virus recombinant avec une étiquette d'hémagglutinine (HA) ajoutée en position N-terminale de la protéine virale UL24. Ce virus démontre un phénotype de type sauvage (Lymberopoulos *et al.*, 2007). Les stocks viraux ont été produits à partir de flacons de 175 cm<sup>2</sup> (T175) contenant 3x10<sup>7</sup> cellules Vero infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans 4 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Les flacons ont été incubés à 37 °C avec 5 % CO<sub>2</sub> et agités doucement toutes les 15 minutes pendant une heure. Ensuite, le milieu contenant le virus a été remplacé par 25 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S et remis dans l'incubateur pour une période de deux à trois jours. Lorsque toutes les cellules montraient des effets cytopathiques, les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse Sorvall Legend RT, «

swinging bucket rotor » 7500 6441). Le culot de cellules infectées a été resuspendu dans 1 mL de DMEM avec 2 % NCS et P/S et transféré dans un nouveau tube. Par la suite, les cellules ont été lysées par trois cycles de congélation et décongélation, puis soniquées pendant 30 secondes (amplitude de 50 %, pulsations de 0,5 secondes, sonificateur Branson digital). Ensuite, les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les particules virales a été aliquoté dans des tubes cryogéniques de 1,5 mL. Les stocks viraux ont été conservés à -80°C.

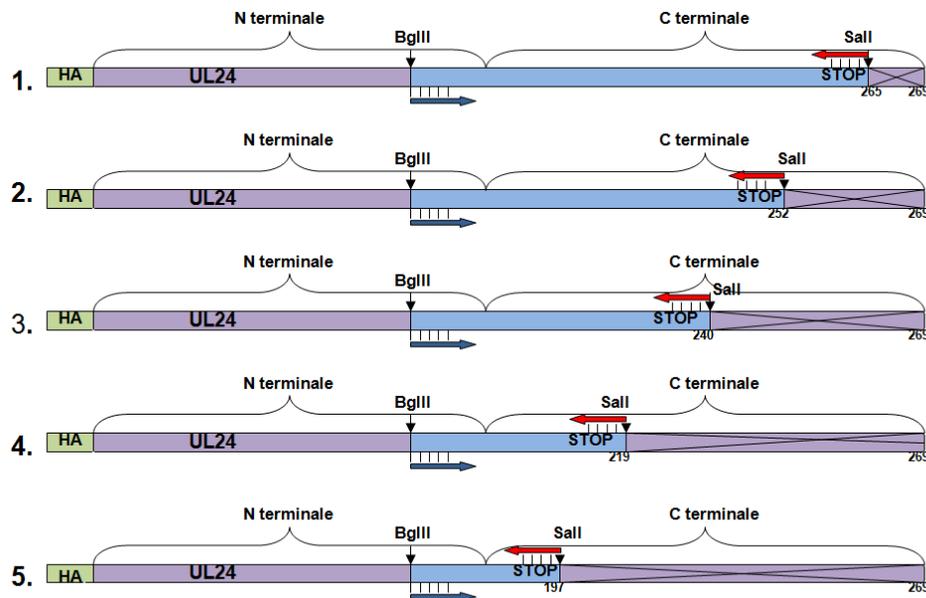
### **2.1.3 Détermination des titres viraux**

La détermination des titres viraux a été faite par un essai de plaque de lyse. La veille, des plaques de 12 puits ont été préparées contenant  $3 \times 10^5$  cellules Vero par puits. Des dilutions en série des stocks viraux à titrer ont été faites en duplicata dans un volume de 1 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Par la suite, le milieu des plaques a été remplacé par 300  $\mu$ L de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Ensuite, les cellules ont été infectées avec 100  $\mu$ L des dilutions allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$ . Les cellules infectées ont été incubées à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> et agitées toutes les 15 minutes pendant une heure. Par la suite, 1 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS, P/S et 0,5 % de méthycellulose a été ajouté à chaque puits. Les plaques ont été remises dans l'incubateur pendant deux à trois jours. Suite à cette période d'incubation, les cellules ont été fixées avec 1 mL de solution d'acide acétique glacial et de méthanol à une proportion de 1:3, et les plaques ont été incubées à température ambiante pendant une heure. Par la suite, les puits ont été vidés et les cellules ont été colorées avec une solution de cristal violet (250 mL de méthanol, 750 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> et 0,5 % (p/v) de cristal violet) pour au moins une heure. Après, les puits ont été lavés à l'eau et séchés. Les titres viraux ont été exprimés en unité formatrice de plages (PFU) par mL.

## **2.2 Mutagenèse**

Une stratégie de mutagenèse visant la partie C-terminale de la protéine UL24 a été suivie afin de produire des vecteurs d'expression pour des formes d'UL24 tronquées dans la partie non conservée de la protéine (Figure 6). Pour ce faire, des codons stops ont été introduits à l'intérieur du cadre de lecture ouvert d'UL24 dans chacun des trois cadres en utilisant des amorces

synthétiques (Integrated DNA Technology) (Tableau I) pour arrêter la traduction de la protéine après les acides aminés 265, 252, 240, 219 et 197.



**Figure 6. Stratégie de délétion dans la partie C-terminale de la protéine UL24.**

Diagramme illustrant les séries de délétions faites dans la partie C-terminale de la protéine. L'étiquette d'hémagglutinine (HA) est représentée par la boîte verte et la protéine UL24 par la boîte mauve. La boîte bleue correspond au fragment du gène de la protéine UL24 amplifié par PCR. Une stratégie de mutagenèse dirigée a été effectuée en utilisant des amorces mutagéniques (représentés par les flèches rouges) dans lesquelles des codons stops ont été introduits dans les trois cadres de lecture afin d'arrêter la traduction de la protéine après les acides aminés 265, 252, 240, 219 et 197. Les lignes croisées dans la boîte mauve représentent les régions délétées de la protéine UL24.

Chacune des amorces contenait un site de restriction. L'amorce sens qui s'hybride avec le brin antisens contenait le site de restriction pour l'enzyme BglII (New England Biolabs, NEB). Cette enzyme coupe normalement dans la partie N-terminale d'UL24. L'amorce antisens qui s'hybride avec le brin sens contenait le site de restriction pour l'enzyme Sall (NEB). Cette enzyme coupe normalement dans les vecteurs pKOSHA-UL24 et pCGPfl (Bertrand *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2007) utilisés pour le sous-clonage. Ces amorces ont été utilisées dans la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivante : 5  $\mu$ L de tampon 10X pour la polymérase PFU (Fermentas), 1  $\mu$ L de dNTP à 10 mM (Life Technologies), 2,5  $\mu$ L d'amorce sens « F » à 50  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L d'amorce antisens « R » à 50  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L de Diméthylsulfoxyde (DMSO)

(Sigma), 15 ng du plasmide pKOSHA-UL24, 1 µL de l'enzyme polymérase PFU (Fermentas) dans un volume total de 50 µL. Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de dénaturation initiale des échantillons a été réalisée (2 minutes à 95°C). Par la suite, la réaction a continué pendant 30 cycles. Chaque cycle consistait d'une étape de dénaturation (1 minute à 95°C), une étape d'hybridation des amorces (30 secondes à 59°C) et une étape d'élongation (2 minutes à 72°C). L'élongation finale a été réalisée pendant 5 minutes à 72°C pour permettre de compléter la synthèse des nouveaux fragments d'ADN.

Les produits de réaction de PCR ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %. Les bandes correspondant aux fragments amplifiés ont été découpées et l'ADN a été extrait du gel en utilisant le kit GenElute de Sigma suivant les instructions du manufacturier.

**Tableau I. Liste des amorces utilisées pour la stratégie de clonage de formes mutées d'UL24 dans la partie C-terminale de la protéine.**

Nom de l'amorce	Séquence 5'→ 3'
UL24 5'BglIIF	CCCAGATCTGCGGCACGCTGTTG
UL24CtermStop795R	CACAGTCGACTCAGTCAGTCATCGGGGTTTGGTCTTGGTGG
UL24CtermStop756R	CACAGTCGACTCAGTCAGTCACGCCGCGATCCTCTTAAG
UL24CtermStop720R	CACAGTCGACTCAGTCAGTCAGGAGGCGGGGTTTGGTC
UL24CtermStop657R	CACAGTCGACTCAGTCAGTCACCCAGAGTGTGACCTTTTCGG
UL24CtermStop591R	CACAGTCGACTCAGTCAGTCATCGCTGGGTCCTAGGCTCC

- Les nucléotides en bleu sur l'amorce sens « F » correspondent au site de restriction de l'enzyme BglII.
- Les nucléotides en vert sur chaque amorce antisens « R » correspondent au site de restriction de l'enzyme Sall.
- Les nucléotides en rouge sur chaque amorce antisens « R » correspondent aux codons stops.

### 2.2.1 Mutagenèse dirigée

Des formes mutées d'UL24 contenant des mutations ponctuelles encodant pour des substitutions d'acides aminés simples ou doubles ont été produites par mutagenèse dirigée par PCR. Les substitutions des nucléotides encodent pour des alanines puisqu'elle est le plus petite acide aminé donc cela n'affecte pas l'structure secondaire de la protéine dû à son faible encombrement stérique. Pour ce faire, le plasmide pAG5 (Griffiths *et al.*, 2003) contenant les

gènes *UL22*, *UL23* et *UL24* a été utilisé. Des amorces synthétiques (Integrated DNA Technology) contenant les mutations désirées (Tableau II) ont été utilisées dans la réaction PCR suivante : 5 µL de tampon 10X pour la polymérase PFU (Fermentas), 1 µL de dNTP à 10 mM (Life Technologies), 2,5 µL d'amorce « top » à 50 µg/µL, 2,5 d'amorce « bot » à 50 µg/µL, 2,5 µL de DMSO (Sigma), 15 ng de pAG5, 1 µL de PFU (Fermentas) dans un volume total de 50 µL. Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de dénaturation initiale des échantillons a été réalisée (30 secondes à 95°C). Par la suite, la réaction a continué pendant 18 cycles. Chaque cycle consistait d'une étape de dénaturation (30 secondes à 95°C), une étape d'hybridation des amorces (1 minute à 60°C) et une étape d'élongation (14 minutes à 68°C). Cette PCR a permis de copier le plasmide pAG5 au complet tout en y insérant les mutations désirées.

Ensuite, 1 µL de l'enzyme de restriction DpnI (Fermentas) a été ajouté au produit PCR et incubé à 37°C pendant une heure et demie. L'enzyme DpnI est une endonucléase spécifique pour l'ADN méthylé. L'ADN isolé à partir de la plupart des souches d'*E. coli* est méthylé et ainsi susceptible à la digestion par l'enzyme DpnI. Donc, cette enzyme permet d'éliminer le plasmide d'origine n'ayant pas été muté. Par la suite, des cellules DH5α compétentes ont été transformées par choc thermique avec 1 µL du produit de la digestion puis étalées sur une boîte Petri d'agar Luria-Bertani (LB) contenant 50 µg/mL d'ampicilline et incubées à 37°C pendant la nuit. Des colonies obtenues ont été mises en culture dans 2 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline et incubées à 37°C toute la nuit. L'ADN plasmidique a été purifié en utilisant le kit de miniprep de Feldan suivant le protocole décrit par le fabricant. Les plasmides obtenus ont été séquencés (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal) afin de vérifier la présence des mutations désirées et l'absence d'autres mutations dans *UL24*.

### **2.2.2 Plasmides et sous-clonage**

Pour le sous-clonage des versions mutées d'*UL24*, le plasmide pKOSHA-*UL24* (contient une étiquette HA en amont d'*UL24*) (LyMBERopoulos *et al.*, 2007) et les plasmides d'expression mammifère pCGPfl et pCGPflHA-*UL24* (encode une étiquette HA en amont d'*UL24* et dans le même cadre de lecture) (Bertrand *et al.*, 2008) ont été utilisés. Pour générer les formes mutées d'*UL24* codant pour les délétions dans la partie C-terminale de la protéine, le vecteur pBluescript SK+ (pBSK+) (Stratagene) a été digéré avec l'enzyme de restriction SmaI (NEB) (2 µL de tampon # 4 à 10X (NEB), 8 µg du plasmide pBSK+ et 1 µL de l'enzyme SmaI dans un volume

total de 20  $\mu$ L). Ce milieu réactionnel a été incubé a température ambiante pendant la nuit. La ligation du vecteur pBSK+ digéré avec le fragment amplifié par PCR contenant les mutations dans *UL24* a été réalisée en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (NEB) (1,5  $\mu$ L de tampon T4 DNA ligase, 200 ng du vecteur pBSK+ digéré, 135 ng d'insert, et 1  $\mu$ L de l'enzyme T4 DNA ligase dans un volume total de 15  $\mu$ L). L'incubation du milieu réactionnel a été maintenue à 16°C pendant la nuit.

**Tableau II. Liste d'amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée par PCR**

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'	Mutation (s) insérée (s)
UL24_T195Atop bot_UL24_T195A	CCCATGGAGCCTAGG <b>GCACAGCGAGCCCGTCGC</b> GCGACGGGCTCGCT <b>GTGC</b> CCTAGGCTCCATGGG	T195A
UL24_L253A-F254Atop botUL24_L253A-F254A	AAGAGGATCGCGGCG <b>GCCGC</b> CTGCGTGCCCGTGCC GCCACGGGCACGCAG <b>GCGGC</b> CGCCGCGATCCTCTT	L253A - F254A
UL24_V256A-V258Atop botUL24_V256A-V258A	GCTCTTCTGCG <b>CGCCCG</b> CGCGCACCAAGA TCTTGGTGCC <b>GCGGGC</b> CGCAGAAGAGC	V256A - V258A

- Pour chaque mutation, deux amorces ont été utilisées; l'amorce « top » et l'amorce « bot ».
- Les nucléotides mutés sont représentés en rouge sur chaque amorce.
- Chaque mutation est nommée par l'acide aminé d'origine, suivi de la position de la mutation et du résidu final après la mutagenèse.

Des cellules DH5 $\alpha$  compétentes ont été transformées par choc thermique avec le produit de ligation et ensuite étalées sur une boîte Petri d'agar LB contenant de l'ampicilline à 50  $\mu$ g/mL, du Xgal à 40  $\mu$ g/mL (Promega) et de l'IPTG à 1 mM (Sigma). La méthode de sélection des colonies est basée sur le système blanc-bleu dû au fait que le plasmide pBSK+ contient le gène *LacZ* qui code pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase qui hydrolyse le lactose et autres  $\beta$ -galactosides comme le Xgal. Toutefois, cette copie du gène dans ce plasmide ne code que pour le peptide alpha qui tel quel manque d'activité  $\beta$  galactosidase. Ainsi, quand une cellule DH5 $\alpha$  est transformée avec le plasmide pBSK+ (sans insert), les polypeptides produits par les deux gènes *LacZ* (celui de la bactérie et celui du plasmide), se complètent (c'est ce qu'on appelle la complémentation alpha), et la cellule rétablit sa fonction  $\beta$ -galactosidase donnant des colonies bleues. Cependant, la complémentation alpha n'a pas lieu si le plasmide introduit dans la bactérie est un plasmide recombinant, car l'insert se localise à l'intérieur du gène *LacZ* dans le site de

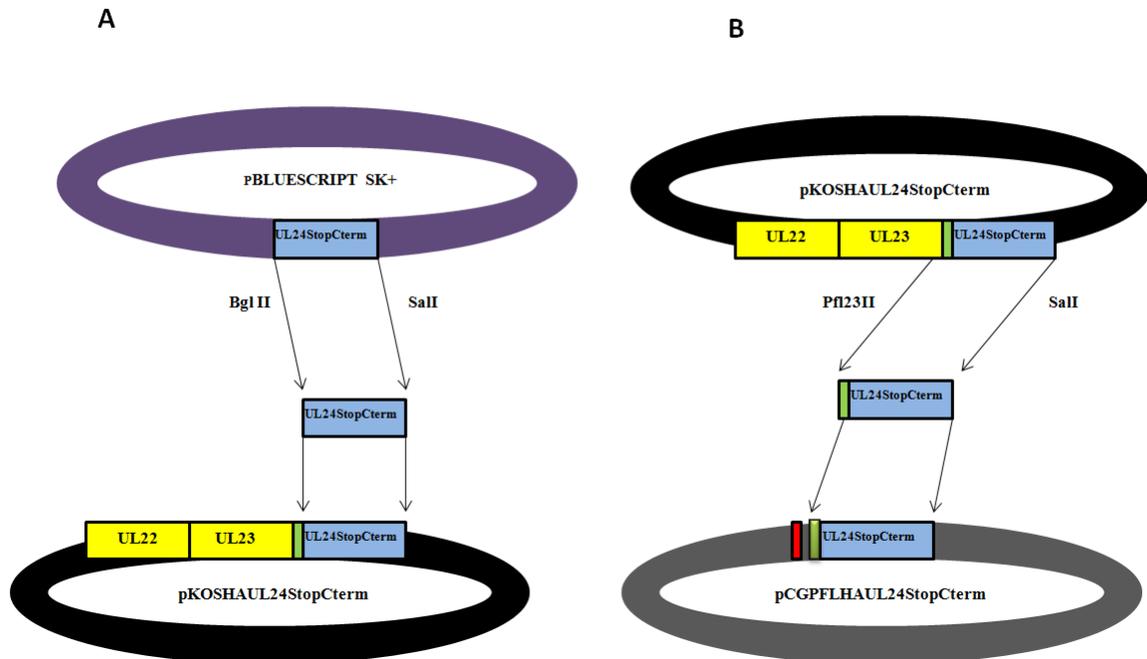
clonage multiple, donc les bactéries transformées avec ce plasmide donneront des colonies blanches.

Des colonies blanches obtenues ont été mises en culture individuellement dans 2 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL de l'ampicilline et incubées à 37°C toute la nuit. L'ADN plasmidique a été purifié en utilisant le kit de miniprep de Feldan suivant le protocole décrit par le fabricant.

Des digestions diagnostiques avec les enzymes de restriction BglIII et SalI ont été faites pour vérifier si le vecteur pBSK+ contenait l'insert de taille attendue. Par la suite, les versions mutées d'*UL24* ont été sous-clonées depuis le vecteur pBSK+ dans le plasmide pKOSHA-UL24. Ce dernier plasmide contenait un site de restriction pour l'enzyme Pfl23II, ce qui a permis un deuxième sous-clonage des formes mutées d'*UL24* dans le plasmide d'expression mammifère pCGPfl (Figure 7 A et B). Les plasmides pBSK+ et pKOSHA-UL24 ont été digérés avec les enzymes de restriction BglIII et SalI (3 µL de tampon # 3 10X (NEB), 3 µL de BSA 10X (NEB), 4 µg d'ADN plasmidique et 1 µL des enzymes BglIII et SalI (NEB) dans un volume total de 30 µL). Le milieu réactionnel a été incubé à température ambiante pendant la nuit. Les produits de digestion ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Les bandes, correspondant à la taille du vecteur ou à celle de l'insert ont été découpées et l'ADN a été extrait du gel en utilisant le Kit GenElute de Sigma suivant le protocole décrit par le fabricant. L'insert a été introduit dans le vecteur en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (1,5 µL de tampon T4 DNA ligase (NEB), 200 ng du vecteur pKOSHA-UL24 digéré, 50 ng d'insert et 1 µL de l'enzyme T4 DNA ligase (NEB) dans un volume total de 15 µL). Des bactéries compétentes ont été transformées avec le produit de ligation et ensuite étalées sur une boîte Petri d'agar LB contenant 50 µg/mL de l'ampicilline. Des colonies ont été piquées et mises en culture afin d'isoler l'ADN plasmidique par la technique de miniprep (Feldan).

Un criblage de clones a été effectué en digérant l'ADN plasmidique avec les enzymes de restriction BglIII et SalI (NEB) pour vérifier si le vecteur contenait l'insert de taille attendue. Les plasmides contenant l'insert ont été séquencés (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal) afin de vérifier la présence des délétions désirées et l'absence d'autres mutations dans *UL24*.

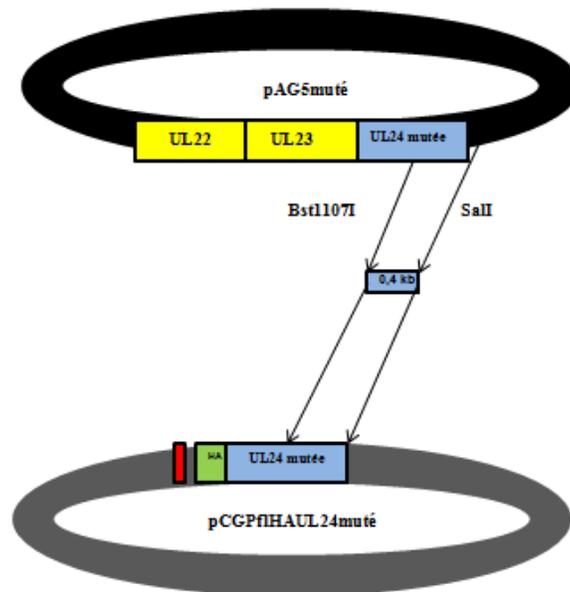
Par la suite, les formes mutées d'*UL24* codant pour des délétions dans la partie C-terminale de la protéine ont été sous-clonées à partir du plasmide pKOSHA-UL24 dans le plasmide d'expression mammifère pCGPfl. Le vecteur pKOSHA-UL24 a été digéré par les enzymes de restriction Pfl23II (Fermentas) et Sali (NEB) et le fragment obtenu a été inséré dans le vecteur pCGPfl préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction, formant le vecteur pCGPflHA-UL24StopCterm (Figure 7B).



**Figure 7. Sous-clonage des formes mutées d'*UL24* codant pour des délétions dans la partie C-terminale de la protéine dans un plasmide d'expression mammifère.**

(A) Pour sous-cloner les versions mutées d'*UL24* provenant du plasmide pBLUESCRIPT SK+ dans le plasmide pKOSHA-UL24, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes BglIII et Sali. L'insert codant pour des délétions dans la partie C-terminale a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pKOSHA-UL24 digéré pour former le vecteur pKOSHA-UL24StopCterm. L'étiquette HA est illustrée par la boîte verte. (B) Pour sous-cloner les versions mutées d'*UL24* provenant du plasmide pKOSHA-UL24StopCterm dans le plasmide pCGPfl, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes Pfl23II et Sali. L'insert codant pour des délétions a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pCGPfl digéré pour former le vecteur pCGPflHA-UL24StopCterm. Le promoteur CMV est illustré par la boîte rouge et l'étiquette HA par la boîte verte.

Par ailleurs, les formes d'*UL24* avec des mutations ponctuelles ciblant la partie C-terminale de la protéine ont été sous-clonées depuis le plasmide pAG5 dans le plasmide d'expression mammifère pCGPfiHA-*UL24* (Figure 8). Ces plasmides ont été digérés avec les enzymes *Bst*1107I (Fermentas) et *Sal*I (NEB) (1  $\mu$ L de chaque enzyme, 4  $\mu$ L de tampon O 10X (Fermentas) et 8  $\mu$ g de plasmide dans un volume total de 40  $\mu$ L). Le milieu réactionnel a été ensuite incubé à 37°C durant 2 heures. Les bandes dont la taille correspondent au vecteur ou à l'insert ont été purifiées sur gel en utilisant le kit GenElute de Sigma. La ligation a été faite afin d'introduire l'insert dans le vecteur. Par la suite, des bactéries compétentes ont été transformées avec le produit de ligation et ensuite étalées sur une boîte Petri d'agar LB contenant 50  $\mu$ g/mL de l'ampicilline. Des colonies ont été mises en culture afin d'isoler l'ADN plasmidique pour la technique de miniprep (Feldan). Des digestions diagnostiques ont été réalisées avec les enzymes *Bst*1107I (Fermentas) et *Sal*I (NEB) et les produits de réaction ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % afin de vérifier si le vecteur contenait l'insert désiré.



**Figure 8. Sous-clonage des formes mutées d'*UL24* codant pour des mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de la protéine dans un plasmide d'expression mammifère.** Pour sous-cloner les versions mutées d'*UL24* provenant du plasmide pAG5 muté dans le plasmide pCGPfiHA-*UL24*, les deux plasmides ont été digérés avec les enzymes *Bst*1107I et *Sal*I. L'insert contenant les mutations ponctuelles a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pCGPfiHA-*UL24* digéré pour former le vecteur pCGPfiHA-*UL24*muté. Le promoteur CMV est représenté par la boîte rouge et l'étiquette HA par la boîte verte.

## 2.3 Production de virus recombinants par le système BAC

Pour générer les virus recombinants par le système BAC, une technique basée sur la « Red recombination » décrit par Tischer *et al.* (2006) a été utilisée par l'usage d'un BAC contenant le génome du VHS-1 de type sauvage KOS fourni par Donald M. Coen (*Harvard Medical School, Boston*). Ce BAC a été généré à partir de la souche d'*E.coli* GS1783 qui permet l'expression transitoire des protéines « Red » car le gène qui code pour ces protéines est sous le contrôle d'un promoteur inductible à la température. Le promoteur est activé à 42°C et désactivé à 32°C. Aussi, le gène codant pour l'endonucléase I-SceI a été inséré dans le BAC sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Ces facteurs vont permettre un processus de mutagenèse efficace (Tischer *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Stratégie de génération de mutations ponctuelles et insertion de petites séquences

En bref, pour générer des mutations ponctuelles ou insérer de petites séquences dans le génome viral KOS, des amorces synthétiques mutagéniques (contenant les mutations à insérer dans le génome viral, Tableau III) (Integrated DNA Technology) ont été employées pour amplifier un marqueur de sélection positif (gène de résistance à la kanamycine). L'amorce sens à l'extrémité 5' est composée de séquences de nucléotides identiques à l'ADN cible comportant les mutations ponctuelles ou la nouvelle séquence à insérer. À l'extrémité 3', l'amorce sens est composée de séquences de nucléotides qui vont s'hybrider avec le début de la séquence nucléotidique du gène de la kanamycine. L'amorce antisens à l'extrémité 5' contient de séquences de nucléotides complémentaires à l'ADN cible possédant les mutations ponctuelles ou la nouvelle séquence à insérer. À l'extrémité 3', l'amorce antisens est composée de séquences de nucléotides qui vont s'hybrider avec la fin de la séquence de nucléotides du gène de la kanamycine (Figure 9).

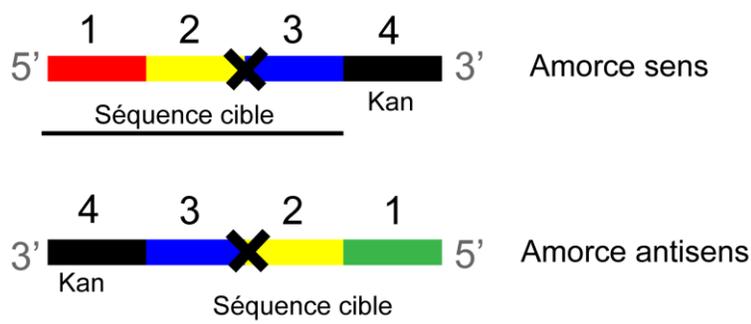
**Tableau III. Amorces utilisées lors de la production de virus recombinants par le système BAC**

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'	Mutation (s) insérée (s)
BAC_HA_UL24_F BAC_HA_UL24_R	TCCGTGGCTTCTTGCTGCCGGCGAGGGCGCAACGCCGTACGTCGGTTGCTATGTACCCATACGAT GTT CCAGATTACGCTGCCGCGAGAACGCGCAGCCTGGTCGAGGATGACGACGATAAGTA CGTACCCCTGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGGCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTACATAGCAACCAGCTACGGCGTTCAACCAATTAACCAATTCTGA	Insertion de l'étiquette HA dans la partie N-terminale d'UL24
BAC_HSV1T195A_F BAC_HSV1T195A_R	CGTGGGATGCTCCAGAGCCTGTCCAGTATACGGTCCCATGGAGCCTAGGGCACAGCGAGCC CGTCGCCCGGAGGATGACGACGATAAGTA CTGCTCGCAGACCCCGGGCAGCGCCGCGGGCGGCGAGGGCTCGCTGTGCCCTAGGCTCCAT GGGACCGTACAACCAATTAACCAATTCTGA	Mutation ponctuelle d'UL24, résidu 195, T-A
BAC_HSVL253A-F254A_F BAC_HSVL253A-F254A_R	CAAACCCCGCCTCCACGGAGGGCGGGGGGTGCTTAAGAGGATCGGGCGGCGCCCTGCGTGC CCGT GCCACCAAAGGATGACGACGATAAGTA CTCTCATTGCGAGGCAGCTCGGGTTTGGTCTGGTGGCCACGGGCAGCGCGCCGCCCGCA TCCTCTTAAGCACAACCAATTAACCAATTCTGA	Mutation ponctuelle d'UL24, résidu 253, L-A et 254, F-A

- Pour chaque mutation, deux amorces ont été utilisées, soit l'amorce sens « F » et l'amorce antisens « R ».
- Les nucléotides en noir correspondent à l'insertion de nouvelles séquences ou à la mutation ponctuelle de résidus.
- Les nucléotides en bleu correspondent aux séquences utilisées pour amplifier le gène de la kanamycine.
- Les nucléotides en vert correspondent aux séquences identiques à la séquence cible.

Par la suite, le produit amplifié par PCR (contenant le gène de la kanamycine et les mutations d'intérêt qu'on veut insérer dans le génome viral) a été inséré par électroporation dans des bactéries électrocompétentes pour la recombinaison contenant le génome viral de type sauvage KOS. La première recombinaison homologue a permis l'insertion dans le génome du fragment contenant le gène de la kanamycine et la mutation désirée. Ensuite, il a été nécessaire d'enlever le gène de la kanamycine du génome viral par l'induction de l'expression de l'enzyme I-SceI; I-SceI est une mégaendonucléase qui se retrouve dans le gène de la kanamycine et qui est rarement présente dans les séquences génomiques (Colleaux *et al.*, 1986). L'expression de cette enzyme a induit le clivage de l'ADN et une seconde recombinaison homologue a permis l'excision du gène de la kanamycine (Figure 10). Deux isolats indépendants nommées (1) et (2) ont été obtenus pour chacun des BACs recombinants. En utilisant le BAC possédant le génome viral de type sauvage KOS, des BACs contenant l'étiquette HA dans la partie N-terminale d'UL24 ont été produits pour générer les BACs recombinants BAC KOS HA-UL24 (1) et (2). Par la suite, à partir de ces BACs, des versions mutées d'UL24 contenant les mutations T195A et

L253A-F254A ont été produits pour générer les BACs recombinants BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) et BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) respectivement. Des détails expérimentaux des divers étapes pour la production des virus recombinants vont suivre dans les points 2.3.2 à 2.3.8.

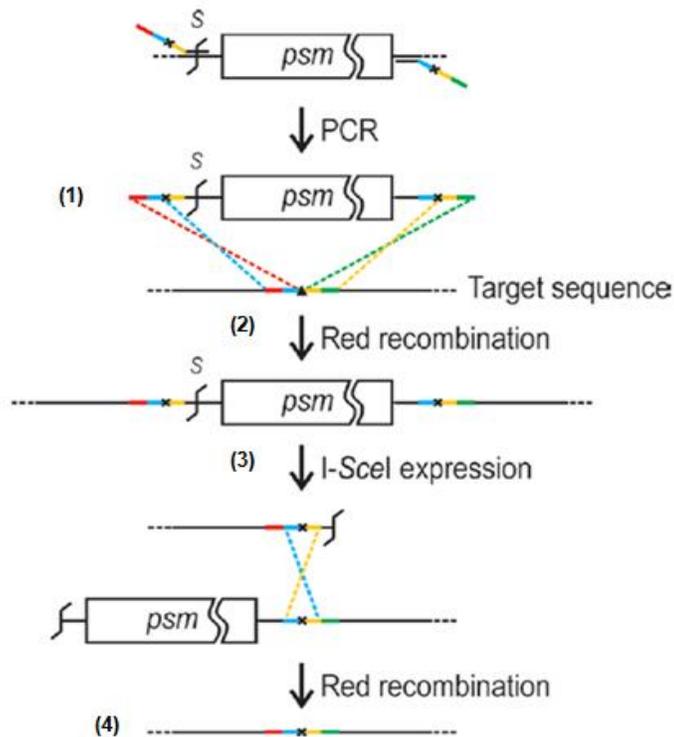


**Figure 9. Représentation graphique des amorces utilisées lors de la production de virus recombinants par le système BAC.** L'amorce sens à l'extrémité 5' (segments 1, 2 et 3) est composée de séquences de nucléotides identiques à l'ADN cible. Cette amorce à l'extrémité 3' (segment 4) est composée de nucléotides qui vont s'hybrider avec le début de la séquence du gène de la kanamycine. L'amorce antisens à l'extrémité 3' (segment 4) est composée de nucléotides qui vont s'hybrider avec la fin de la séquence du gène de la kanamycine. Cette amorce à l'extrémité 5' (segments 1, 2 et 3) contient de séquences de nucléotides complémentaires à l'ADN cible. **X**, représente la séquence insérée entre les segments 2 et 3 contenant les mutations ponctuelles ou la nouvelle séquence. Chaque segment contient 25 pb environ.

### 2.3.2 Préparation des bactéries électrocompétentes pour la recombinaison

Afin de préparer des bactéries électrocompétentes pour la recombinaison, 5 mL de milieu LB contenant 35 µg/mL de chloramphénicol ont été inoculés avec *E. coli* GS1783 (possédant le génome de type sauvage KOS) dans un tube de culture de 12 mL (# de catalogue 17-T416-2A, Ultident). La culture a été incubée à 32°C avec une agitation de 220 rpm pendant toute la nuit. Après cette période d'incubation, 50 mL de milieu LB ont été inoculés avec 1 mL de la culture contenant 35 µg/mL de chloramphénicol dans un erlenmeyer de 125 mL. La croissance bactérienne s'est déroulée à 32°C avec une agitation de 220 rpm jusqu'à une densité optique de 0,4-0,5 à 600 nm. Suite à l'obtention de la densité optique désirée, la culture a été placée dans le bain-marie à 42°C avec agitation pour 15 minutes pour favoriser la recombinaison homologue.

Ensuite, la culture a été refroidie dans un bain de glace et d'eau et par la suite la culture a été centrifugée à 7000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Beckman, modèle J2Z-1M, rotor JA-20). Ainsi, trois lavages du culot ont été réalisés avec 10 mL de glycérol 10 % froid. Au dernier lavage, les cellules ont été resuspendues avec 400 µL de glycérol 10 % froid, puis ont été aliquotées (50 µL par tube) et congelées avec de la glace sèche. Les cellules ont été gardées à -80°C et peuvent être conservées à cette température pour une période maximale d'un mois.



**Figure 10. Diagramme représentant la création de BACs recombinants par l'introduction de mutations dans le génome du VHS-1.** (1) La mutagenèse a été effectuée en utilisant des amorces pour amplifier le marqueur de sélection positif ( $Kan^r$ ) flanqué par des séquences contenant les mutations à insérer dans le génome. (2) Le fragment d'ADN linéaire amplifié a été utilisé pour la transformation des bactéries contenant le génome de type sauvage du VHS-1. Suite à un processus de recombinaison homologue, le marqueur de sélection positive et les mutations ont été insérés dans le génome. (3) Suite à l'induction de l'expression de l'enzyme I-SceI, (4) la recombinaison homologue entre les séquences homologues a provoqué l'excision du marqueur de sélection positif ( $kan^r$ ). Les lignes colorées représentent les séquences identiques à la séquence cible tandis que les lignes pointillées indiquent les événements de recombinaison homologue. *psm*, marqueur de sélection positif; x, nouvelle séquence; triangle, ancienne séquence; S, site de restriction I-SceI. Figure tirée de Tischer *et al.* (2006).

### 2.3.3 Préparation du fragment d'ADN

Pour préparer le fragment contenant la mutation à insérer dans le génome KOS, la PCR a été réalisée en utilisant comme matrice le plasmide contenant le gène de la kanamycine (pEPkan-S, fourni par Donald M. Coen) dans la réaction suivante : 1  $\mu$ L d'amorce sens « F » à 1 mM, 1  $\mu$ L d'amorce anti-sens « R » à 1 mM, 25  $\mu$ L du Master mix de la HotStar Taq DNA polymérase (Qiagen), 10 ng du plasmide pEPkan-S dans un volume total de 50  $\mu$ L. L'enzyme a été activée pendant 15 minutes à 95°C. Par la suite, la réaction a continué pendant 35 cycles. Chaque cycle consistait d'une étape de dénaturation (1 minute à 95°C), une étape d'hybridation des amorces (1 minute à 58°C) et une étape d'élongation (2 minutes à 72°C). L'élongation finale a été réalisée pendant 10 minutes à 72°C pour permettre de compléter la synthèse des nouveaux fragments d'ADN. Les produits de réaction de PCR ont été migrés sur gel d'agarose à 1 %. Les bandes correspondant aux fragments amplifiés (1,1 kb) ont été découpées et l'ADN a été extrait avec le kit NucleoSpin Extract II de Macherey-Nagel suivant le protocole décrit par le fabricant.

### 2.3.4 Électroporation et recombinaison

Afin d'insérer le fragment d'ADN contenant la mutation dans le génome KOS, 100 ng du produit PCR a été ajouté à 50  $\mu$ L de bactéries électrocompétentes pour la recombinaison sur glace. Le mélange a été mis dans une cuvette de 0,1 cm (# de catalogue 1652089, Bio-Rad) froide afin de préserver le plus possible les cellules bactériennes lors du choc thermique. Ensuite, l'électroporation a été réalisée en utilisant l'électroporateur Eppendorf 2510 (1800 volts, 25  $\mu$ F et 200  $\Omega$  de résistance). Immédiatement après le pulse électrique, 1000  $\mu$ L de milieu LB ont été ajoutés dans la cuvette. Le tout a été transféré dans un tube de culture de 12 mL puis incubé à 30°C pendant 2 heures sous agitation. Après ce temps d'incubation, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 3 minutes (centrifugeuse accuSpin Micro 17, numéro de série du rotor 7500 3524) pour concentrer les bactéries et le culot a été resuspendu dans 100  $\mu$ L de surnageant. Par la suite, 100  $\mu$ L de bactéries ont étéensemencées et étalées sur une boîte Petri d'agar LB contenant 25  $\mu$ g/mL de chloramphénicol et 35  $\mu$ g/mL de la kanamycine. Les boîtes Petri ont été incubés à 32°C pendant 24 heures.

Les colonies ayant poussé ont été mises en culture dans 3 mL de milieu LB contenant 35  $\mu$ g/mL de la kanamycine et 25  $\mu$ g/mL de chloramphénicol sous agitation. L'extraction de l'ADN

a été faite en utilisant le kit de minipréparation de Feldan. La confirmation de l'insertion du gène de la kanamycine à l'intérieur du gène *UL24* a été obtenue par PCR, en utilisant l'amorce sens HSV UL23F (5'-GCTCCAGGCGGACTTCCGTG-3') et l'amorce antisens UL24CtermStop795R (5'-CACAGTCGACTCAGTCAGTCATCGGGGTTTGGTCTTGGTGG-3') dans la réaction suivante : 1,5 µL de DMSO (Sigma), 3 µL du tampon 10x pour Pfu (Biobasic), 1 µL de dNTP à 10 mM (Life Technologies), 2,5 µL de chaque des amorces sens et antisens (50 µg/µL), 250 ng d'ADN total extrait et 0,5 µL de l'enzyme Pfu polymérase (Biobasic) dans un volume de réaction de 30 µL. Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de dénaturation initiale des échantillons a été réalisée (2 minutes à 95°C). Par la suite, la réaction a continué pendant 35 cycles. Chaque cycle consistait d'une étape de dénaturation (15 secondes à 95°C), une étape d'hybridation des amorces (30 secondes à 63°C) et une étape d'élongation (2 minutes à 72°C). L'élongation finale a été réalisée pendant 5 minutes à 72°C pour permettre de compléter la synthèse des nouveaux fragments d'ADN. Un fragment amplifié d'une taille de 2 kb environ a été obtenu. Par la suite, le produit PCR des clones positifs ont été envoyés au séquençage (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal) pour confirmer la présence de la kanamycine et des mutations désirées à l'intérieur du gène d'*UL24*.

Pour enlever le gène de la kanamycine de l'intérieur du gène *UL24*, 50 µL de la culture du bon clone (contenant le gène de la kanamycine et les mutations désirées) ont été inoculés dans 2 mL de milieu LB contenant 35 µg/mL de chloramphénicol. Ensuite, la culture a été incubée à 30°C pendant 3 heures sous agitation. Après cette période d'incubation, 400 µL d'une solution de L-(+) arabinose 10 % (Sigma) et 2 mL de milieu LB contenant 35 µg/mL de chloramphénicol ont été ajoutés à la culture. Par la suite, la culture a été incubée à 30°C pendant 2 heures suivie d'une incubation de 20 minutes à 42°C (pour favoriser la recombinaison homologue) et enfin d'une incubation d'une heure et demie à 30°C sous agitation. L'arabinose va permettre d'induire l'expression de l'enzyme I-SceI qui va se retrouver à l'intérieur du gène de la kanamycine, et ainsi entraîner une seconde recombinaison homologue qui aboutira à l'excision du gène de la kanamycine des clones.

Après ces périodes d'incubation, 5 µL de la culture ont étéensemencés sur une boîte Petri de LB contenant 35 µg/mL de chloramphénicol et 1 % de l'arabinose. Les boîtes Petri ont été incubés à 32°C pendant 24 heures. À partir de ces boîtes Petri, la même colonie a été repiquée sur

une boîte Petri de LB contenant 35 µg/mL de chloramphénicol et sur une boîte Petri de LB contenant 25 µg/mL de chloramphénicol et 35 µg/mL de la kanamycine. Par la suite, les boîtes Petri ont été incubés à 32°C pendant 48 heures. Les clones d'intérêt auront éliminé le gène de la kanamycine et ainsi ne pourront pas pousser sur une boîte Petri de LB contenant du chloramphénicol et de la kanamycine. Les clones positifs ont été vérifiés par PCR en utilisant l'amorce sens HSV UL23F et l'amorce antisens UL24CtermStop795R. Un fragment amplifié d'une taille de 0,9 kb environ a été obtenu. Par la suite, les produits PCR des clones positifs ont été envoyés au séquençage (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal) pour confirmer l'absence du gène de la kanamycine et la présence des mutations désirées à l'intérieur du gène d'*UL24*.

À partir de ces clones positifs, l'extraction de l'ADN plasmidique des BACs recombinants a été réalisée avec le kit de midi-préparation NucleoBond PC100 (Macherey-Nagel) en utilisant le protocole pour « low copy » suivant les instructions du fabricant.

### **2.3.5 Digestion de l'ADN plasmidique des BACs**

Afin de vérifier l'absence de perte de gros morceaux d'ADN génomique dans nos BACs recombinants lors de la recombinaison homologue, l'ADN des BACs a été digéré avec l'enzyme EcoRV (NEB) (2 µL de l'enzyme, 3 µL du tampon # 3.1 10X (NEB) et 3 µg du plasmide dans un volume total de 30 µL à 37°C pendant 3 heures). Cet enzyme coupe plusieurs fois dans le génome du VHS-1 mais ne coupe pas à l'intérieur du gène *UL24* dans lequel les mutations ont été introduites. Les produits de réaction ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % et révélés aux UV grâce au bromure d'éthidium.

### **2.3.6 Transfection des cellules Vero avec les BACs recombinants**

La veille de la transfection, des plaques à 6 puits ont été préparées avec  $2,5 \times 10^5$  cellules Vero par puits pour permettre une confluence de 60 %. Le lendemain, les BACs contenant le génome KOS avec les mutations dans le gène *UL24* ont été transfectés en utilisant la lipofectamine (Life Technologies) comme agent de transfection, à un ratio de 1:6

d'ADN/lipofectamine dilué dans 1,5 mL de milieu DMEM sans sérum ni antibiotique. Après 5 heures d'incubation à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub>, le milieu de transfection a été remplacé par 1,5 mL de DMEM avec 5 % NCS et P/S. En fin, 3 jours post-transfection, l'apparition d'effets cytopathiques sur les cellules due au virus a été observée. Lors de l'apparition de plages de lyses, le milieu et les cellules ont été récoltés et congelés à -80°C.

### **2.3.7 Purification de virus recombinants**

Le milieu et les cellules congelés provenant de la transfection ont été décongelés à 37°C, suivi par deux autres cycles de gel (sur glace sèche) et de dégel. Les cellules ont ensuite été soniquées pour 30 secondes à 50 % d'amplitude et pulsations de 0,5 secondes. Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C (centrifugeuse Sorvall Legend RT, « swinging bucket rotor » 7500 6441). Des dilutions successives allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-11</sup> ont été préparées dans 2 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S (200 µL du milieu contenant le virus dans 1,8 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S). Des plaques à 6 puits contenant 1x10<sup>6</sup> cellules Vero par puits ont été préparées la veille, et les cellules ont été infectées avec 500 µL des dilutions 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-11</sup> par puits. Après une heure d'incubation à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> et agitation à chaque 15 minutes, 1,5 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS, P/S et 0,25 % de méthylcellulose a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été réincubées à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub>. Après deux jours d'incubation, un puits possédant juste une plage de lyse a été sélectionné. Ce puits a été choisi pour faire une deuxième ronde de purification pour s'assurer que le stock viral provient d'un seul isolat. Pour conserver nos virus d'origine, nous avons produit des « Master stocks ». À partir de ces stocks, nous avons produit des « Submaster stocks » qui nous ont permis finalement de produire des « Working stocks » lesquels ont été utilisés pour faire nos expériences. Tous les stocks viraux ont été produits comme décrit dans le point 2.1.2.

### **2.3.8 Séquençage d'*UL24* à partir du génome viral**

La séquence d'*UL24* de nos virus recombinants a été vérifiée afin de s'assurer qu'elle ne contenait que les mutations désirées. L'extraction d'ADN viral a été faite à partir de 100 µL du « Master stock » en utilisant 100 µL d'une solution de phénol/chloroforme 1 (25:24, v/v; Life Technologies) suivi d'une précipitation avec 1 mL d'éthanol 100 %. L'ADN a été resuspendu dans

50 µL de tampon Tris-EDTA (pH 8.0). Le gène *UL24* a ensuite été amplifié par PCR en utilisant l'amorce sens HSV UL23F (50 µg/µL), l'amorce anti sens UL24CtermStop795R (50 µg/µL) et 100 ng de l'ADN viral extrait. Les produits PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 1 % et ceux qui avaient une taille d'environ 0,9 kb ont été séquencés (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal).

## **2.4 Morphologie des plages de lyse**

Afin d'étudier la morphologie des plages de lyse produits par les virus recombinants, des plaques à 6 puits contenant  $1 \times 10^6$  cellules Vero par puits ont été préparées pour avoir une confluence de 100 %. Le jour suivant, des dilutions en série (de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) des stocks viraux ont été faites en duplicata dans un volume de 1 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Par la suite, le milieu des plaques de 6 puits a été remplacé par 500 µL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Ensuite, les cellules ont été infectées avec 100 µL des dilutions  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$ . Les cellules infectées ont été incubées à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> et agitées chaque 15 minutes pendant une heure. Par la suite, 1,5 mL de milieu DMEM avec 2 % NCS, P/S et 0,5 % de méthycellulose ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été remises en incubation à 37°C ou à 39°C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant deux jours. Par la suite, les puits ont été observés au microscope inversé à contraste de phase afin de prendre des photos des plages de lyse formées par les virus.

## **2.5 Microscopie à contraste de phase**

La morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants ont été visualisées à l'aide du microscope Nikon Elipse TE 2000-U (objectif 10X) équipé d'une camera CoolSNAP HQ. Tous les photos ont été prises à un grossissement de 100X sur des échantillons fixés. Les images en format tif obtenues ont été assemblées avec le programme Adobe Photoshop.

## **2.6 Cinétique d'infection dans les cellules Vero**

Afin de vérifier la capacité des virus recombinants à se répliquer en culture cellulaire, une cinétique d'infection a été réalisée. Le jour précédent à l'infection, des tubes de culture cellulaire de 16 mm x 125 mm ont été préparés avec  $2,5 \times 10^5$  cellules Vero par tube dans un volume de 2 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S. Les tubes contenant les cellules ont été

incubés de façon inclinée à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été infectées en duplicata à une MOI de 0,001 dans un volume de 500 µL de milieu DMEM avec 2 % NSC et P/S. Les tubes ont été incubés pendant une heure et agités doucement chaque 15 minutes. Par la suite, deux lavages ont été effectués avec 2 mL de solution Dubelcco's Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS) (chauffé à 37°C) et un lavage avec 2 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S (chauffé à 37°C). Ensuite, les tubes ont été reincubés avec 2 mL du milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant le temps indiqué. Suite à la période d'incubation, les tubes ont été congelés à -80°C. Par la suite, afin de titrer les virus totaux produits, les tubes ont été décongelés à 37°C et soniqués pendant 30 secondes (amplitude de 50 %, pulsations de 0,5 secondes) et la détermination des titres viraux a été faite par comptage de plaque de lyse comme décrit dans le point 2.1.3.

## **2.7 Immunobuvardage de type Western**

### **2.7.1 Transfection des cellules Cos-7**

Des plaques à 6 puits contenant 3,5x10<sup>5</sup> cellules Cos-7 par puits ont été préparées le jour précédent la transfection pour avoir une confluence d'environ 60 %. Les plasmides pCGPFLHA-UL24 contenant les délétions ou les mutations ponctuelles dans la partie C-terminale ont été transfectés en utilisant l'agent transfectant fugene 6 (Roche). Le fugene 6 a été utilisé à un ratio de 1:6 avec l'ADN (1,5 µg de chaque plasmide pour 9,0 µL de fugene 6) dans 2 mL de DMEM sans sérum ni antibiotique. Après 3 à 5 heures d'incubation à 37°C, le milieu a été changé pour 2 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S. Après deux jours post-transfection, une lyse cellulaire a été faite.

### **2.7.2 Infection des cellules Vero**

Le jour précédent l'infection, les cellules Vero ont été mises en culture à raison de 1x10<sup>6</sup> cellules dans des plaques à 6 puits. Par la suite, les cellules Vero ont été infectées ou non (« mock ») par les virus recombinants à une MOI de 10 dans un volume de 500 µL de milieu DMEM avec 2 % NSC et P/S. Les cellules ont été incubées pendant une heure et agitées chaque 15 minutes. Par la suite, deux lavages ont été effectués avec 2 mL de milieu DPBS (chauffé à 37°C) et un lavage avec 2 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S (chauffé à 37°C). Ensuite, les cellules

ont été reincubées avec 2 mL du milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant 18 heures. Après cette période d'incubation, les cellules ont été lysées.

### **2.7.3 Lyse des cellules**

Après la transfection ou l'infection, les cellules ont été lavées au DPBS et lysées en présence de tampon RIPA (50 mM Tris, 1 % Triton, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS, 500 mM NaCl) auquel un comprimé inhibiteur de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a été ajouté. Ce mélange a été incubé pendant 15 minutes sur glace. Après cette incubation, les cellules ont été grattées, récoltées puis centrifugées à 13000 rpm pendant 40 minutes à 4°C (centrifugeuse Eppendorf 5415R, rotor F45-24-11). Le surnageant contenant les protéines a été récupéré et utilisé pour l'immunobuvardage ou congelé à -80°C.

### **2.7.4 Immunobuvardage de type Western**

Les échantillons contenant les protéines ont été préparés en ajoutant le tampon de chargement 6X (avec 0,5 % (p/v) de bromophénol bleu et 10 % de β- mercaptoéthanol) et chauffés à 100°C pour 1 min. Ensuite les échantillons ont été chargés dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 12,5 % et migrés par électrophorèse dans un tampon de migration 1X (3 g de Tris et 14,4 g de glycine dans 1L de ddH<sub>2</sub>O avec 0,1 % de SDS) à 100 V pour 120 minutes. Les protéines ont été transférées sur une membrane de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) en présence de tampon de transfert (3 g de Tris, 14,4 g de glycine et 20 % de méthanol) à 0,4 mA pour 15 minutes, 0,6 mA pour 30 minutes, 0,75 mA pour 15 minutes, 0,8 mA pour 15 minutes et 1 mA pour 15 minutes. Après une heure et demie de transfert, la membrane a été ensuite incubée dans une solution TTBS (2,422 g de Tris, 29,2 g de NaCl dans 1 L de ddH<sub>2</sub>O à 0,05 % de Tween et à pH 7,5) avec 5 % de lait déshydraté (Skim Milk Powder, BioShop) pendant toute la nuit à 4°C afin de bloquer les sites non spécifiques à l'anticorps primaire. Après cette incubation, deux lavages de 5 min au TTBS ont été réalisés.

L'anticorps primaire (dilué dans 10 mL de TTBS avec 0,5 % de gélatine) a été appliqué à la membrane pendant une heure sous agitation. Après 3 lavages de 5 minutes au TTBS, l'anticorps secondaire (dilué dans 10 ml de TTBS avec 5 % de lait déshydraté) a été appliqué pendant une heure sous agitation. Ensuite, la membrane a été lavée 5 fois au TTBS et la

révélation a été faite par chemiluminescence à l'aide des solutions Immun-Star HRP Substrate (Biorad) et des films de chemiluminescence ECL (GE Healthcare).

### **2.7.5 Anticorps**

Pour marquer HA-UL24, l'anticorps primaire monoclonal IgG de souris HA.11 (dilution 1/500, Covance) et l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la peroxydase (dilution 1/2500, Jackson ImmunoResearch) ont été utilisés. L'anticorps primaire de souris dirigé contre TK (dilution 1/250, produit par William Sumers, Université de Yale) et l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, Jackson ImmunoResearch) ont servi lors de l'immunobuvardage dirigé contre TK. La glycoprotéine virale gD a été détectée à l'aide de l'anticorps primaire monoclonal de souris (dilution 1/2500, Abcam) et un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de souris conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, Jackson ImmunoResearch). L'anticorps primaire monoclonal IgG de lapin dirigé contre la tubuline  $\alpha$  (dilution 1/2000, Abcam) et l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de lapin et conjugué à la peroxydase (dilution 1/7500, Bethyl) ont été employés pour marquer l' $\alpha$  tubuline utilisée comme contrôle de charge. L'anticorps primaire monoclonal IgG de souris GAPDH (dilution 1/1000) et l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, Jackson ImmunoResearch) ont été utilisés pour la détection de la protéine GAPDH utilisée comme contrôle de charge.

## **2.8 Immunofluorescence indirecte**

### **2.8.1 Transfection des cellules Cos-7**

Le jour précédent la transfection, des cellules Cos-7 ont été mises en culture sur des lamelles de microscope numéro 1.5 (Fisherbrand) stériles dans des plaques de 24 puits à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules/puits afin d'obtenir une confluence d'environ 60 %. Après 24 heures, les plasmides d'expression pCGPFLHA-UL24 contenant les délétions ou les mutations ponctuelles correspondant à la partie C-terminale d'UL24 ont été transfectés en utilisant l'agent transfectant fugene 6 (Roche). Le fugene 6 a été utilisé à un ratio de 1:6 avec l'ADN (0,25  $\mu$ g de chaque plasmide pour 1,5  $\mu$ L de fugene 6) dans 500  $\mu$ L de milieu DMEM sans sérum ni antibiotique.

Après 3 à 5 heures d'incubation à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>, le milieu a été changé pour 500 µL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S. Deux jours post-transfection, les cellules ont été fixées.

### **2.8.2 Infection des cellules Vero**

La journée précédente à l'infection, les cellules ont été mises en culture sur des lamelles de microscope numéro 1.5 (Fisherbrand) stériles dans des plaques de 24 puits à une densité de  $1 \times 10^5$  cellules/puits pour avoir un tapis de cellules confluentes le lendemain. Le jour de l'infection, les cellules ont été infectées ou non (« mock ») par les virus recombinants à une MOI de 10 dans 200 µL de milieu DMEM avec 2 % NCS et P/S. Elles ont été incubées pendant une heure à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> et agitées doucement toutes les 15 minutes. Ensuite, le milieu a été retiré et deux lavages ont été réalisés avec 2 mL de DPBS (chauffé à 37°C) et un lavage avec 2 mL de milieu DMEM avec 5 % NCS et P/S (chauffé à 37°C). Les cellules ont été remises dans l'incubateur à 37 °C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant 9 heures ou 18 heures. Après ces temps d'incubation, les cellules ont été fixées.

### **2.8.3 Fixation des cellules**

Suite à la transfection ou l'infection, le milieu des puits contenant les cellules a été enlevé puis les cellules ont été rincées avec 500 µL de DPBS et fixées avec 200 µL d'une solution de paraformaldéhyde 2 % diluée dans « Phosphate Buffered Saline » (PBS) 1X (pH 7,3) pendant 10 minutes. Par la suite, les cellules ont été lavées avec 500 µL de DPBS.

### **2.8.4 Immunofluorescence indirecte**

Pour perméabiliser les cellules, celles-ci ont été incubées dans 0,1 % Triton X-100 dilué dans PBS 1X à température ambiante sur un agitateur à faible vitesse pendant 10 minutes suivi de deux lavages au PBS 1X pendant 5 minutes. Par la suite, ces cellules ont été traitées dans 200 µL de tampon de blocage (8 mL de PBS 1X, 2 mL de NCS et 50 µL de Tween 20) pendant 30 minutes à température ambiante afin de bloquer les sites non spécifiques à l'anticorps primaire. Par la suite, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire choisi (dilué dans la solution de blocage) pendant une heure dans une chambre humide à 37°C. Après 4 lavages de 5 minutes au PBS 1X, les cellules ont été incubées avec une solution d'anticorps secondaire contenant un colorant pour le noyau dilué dans la solution de blocage. Cette incubation a été faite à 37 °C dans

une chambre humide pendant une heure. Après 4 lavages de 5 minutes au PBS 1X, les lamelles ont été immobilisées sur des lames de microscope (Fisherbrand) en utilisant la solution de montage « ProlongGold antifade reagent » (Life Technologies).

### **2.8.5 Anticorps utilisés pour les expériences de microscopie confocale**

Afin de détecter HA-UL24, l'anticorps primaire monoclonal de rat haute affinité dirigé contre HA (dilution 1/50, Roche) a été utilisé. Pour le marquage de la nucléoline, un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre la nucléoline (dilution 1/50, Abcam) a été employé. Pour la détection de la cycline B1, un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre la cycline B1 (dilution 1/50, Abcam) a été utilisé. Des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de rat, de lapin ou de souris et conjugués à un Alexa 488 (dilution 1/500, Life Technologies) ont été utilisés. Finalement, pour faire le marquage du noyau, le colorant Draq5 (dilution 1/250, Biostatus Limited) a été employé.

### **2.8.6 Microscopie confocale**

Les cellules ont été visualisées à l'aide du microscope Zeiss Axio Observer Z1 (objectif 63X, N.A.1.4) (Zeiss LSM780) équipé d'une diode laser à 405 nm, un laser argon multi-ligne à 458/488/514 nm, un laser DPSS à 561 nm et un laser HeNe à 633 nm. Les images en format tif obtenues ont été assemblées avec le programme Adobe Photoshop. La microscopie confocale a été faite au Service de microscopie confocal de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

## **2.9 Traitement des cellules avec la leptomycine B**

Les cellules Cos-7 et les cellules HeLa ont été traitées avec la LMB (Sigma) pour déterminer si l'export nucléaire de la protéine UL24 était dépendante de l'exportine CRM-1. Les cellules Cos-7 ont été cultivées et transfectées comme décrit dans le point 2.7.1. Après 22 heures de transfection, les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL ou 25 ng/mL de LMB diluée dans 500 µL de milieu DMEM avec 5 % NCS pendant 5 heures. Pour les études d'infection, les cellules HeLa ont été cultivées, infectées à une MOI de 50 ou non (« mock ») comme décrit dans le point 2.7.2. À 8 hpi, les cellules ont été traitées avec 20 ng/mL de LMB diluée dans 500 µL de milieu DMEM avec 8 % FBS pendant 5 heures. Après ces temps d'incubation, les cellules ont été lavées et fixées. La localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 a été analysée par

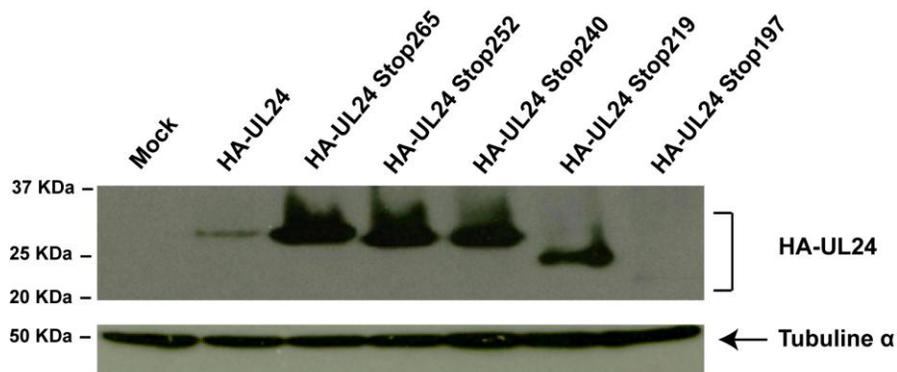
immunofluorescence indirecte et microscopie confocale. La quantification du marquage nucléaire vs cytoplasmique dans les cellules Cos-7 en l'absence ou en présence de la LMB a été faite en utilisant le logiciel ZEN (Zeiss). La moyenne du ratio de l'intensité moyenne de fluorescence noyau/cytoplasme (N/C) a été calculée à partir de 30 cellules provenant de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée utilisant le test « one-way ANOVA ».

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

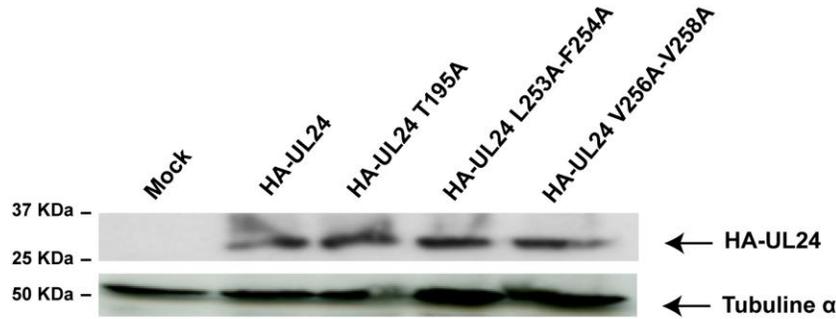
### 3.1 Expression de formes mutées d'UL24

Afin d'élucider l'importance des résidus de la partie C-terminale de la protéine UL24 dans la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme, divers vecteurs d'expression d'UL24 sous forme tronquée ou mutée ponctuellement dans la partie C-terminale ont été produits. Un diagramme montrant la stratégie de délétion est présenté dans la figure 6. Au total, cinq formes mutées d'UL24 dans lesquelles la traduction de la protéine est arrêtée de manière prématurée aux acides aminés 265, 252, 240, 219 et 197, et trois formes mutées d'UL24 contenant les mutations ponctuelles T195A, L253A-F254A, V256A-V258A ont été produites (chaque mutation a été nommée par l'acide aminé d'origine, suivi de la position de la mutation et du résidu final après la mutagenèse).

Avant de déterminer l'effet de mutations produites chez *UL24*, l'expression de diverses formes mutées de la protéine dans les cellules de mammifères a été vérifiée. Pour tester cette expression, les formes mutées d'*UL24* ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression pCGPflHA-UL24 (Figure 7B et 8) lequel a une étiquette HA en amont d'UL24, ce qui permet la reconnaissance de cette dernière grâce à l'utilisation d'un anticorps de haute affinité contre l'épitope.



**Figure 11. Expression des formes mutées d'UL24 contenant les délétions dans la partie C-terminale de la protéine dans un contexte de transfection transitoire.** Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western. La version non mutée d'HA-UL24 a été utilisée comme témoin. La protéine tubuline  $\alpha$  a été utilisée comme contrôle de charge. La taille de certaines bandes du marqueur est indiquée à gauche de la figure. La position d'HA-UL24 et de la tubuline  $\alpha$  est indiquée à droite de la figure.

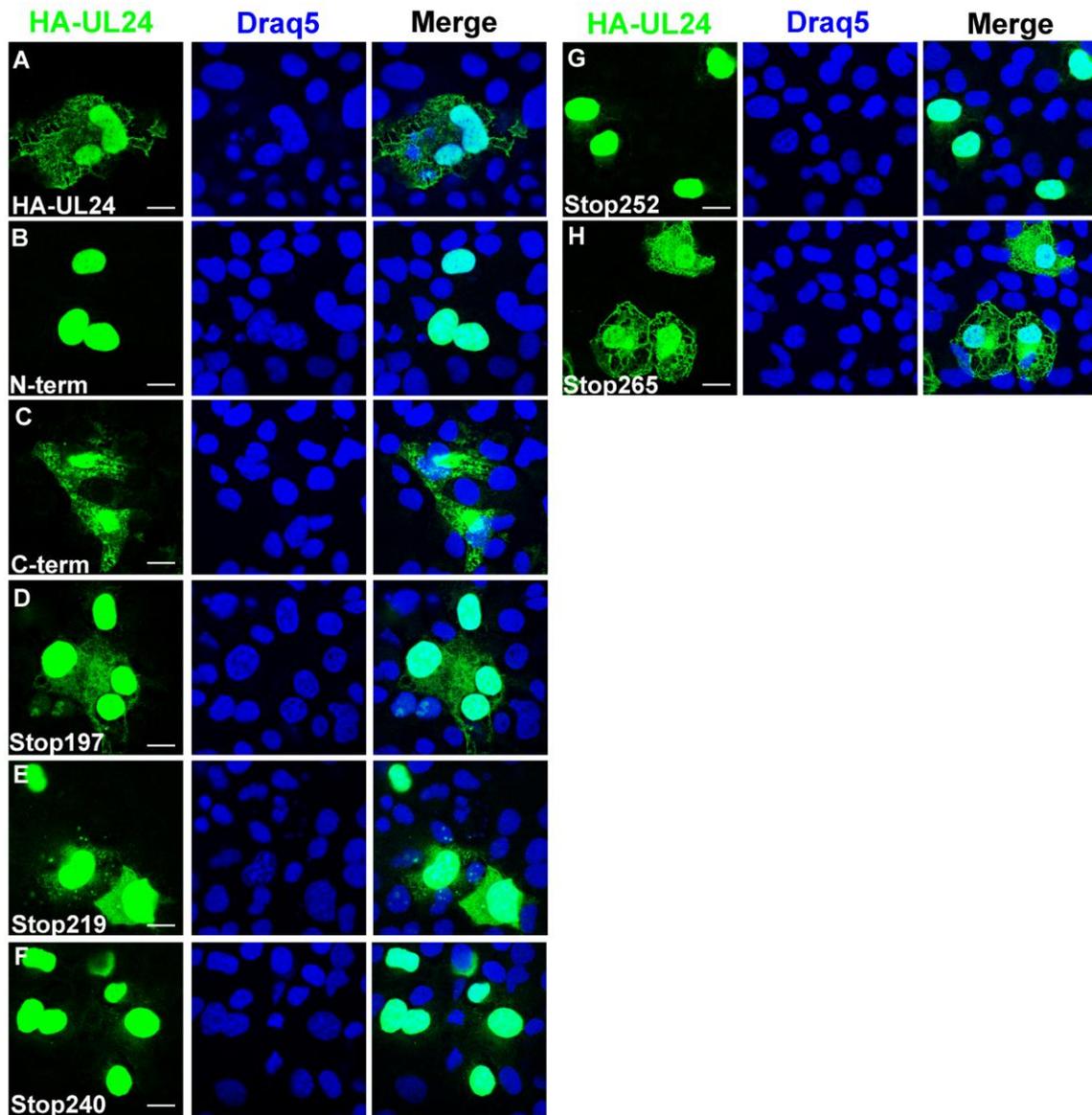


**Figure 12. Expression des formes mutées d’UL24 contenant les mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de la protéine dans un contexte de transfection transitoire.** Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western. La version non mutée d’HA-UL24 a été utilisée comme témoin. La protéine tubuline  $\alpha$  a été utilisée comme contrôle de charge. La taille de certaines bandes du marqueur est indiquée à gauche de la figure. La position d’HA-UL24 et de la tubuline  $\alpha$  est indiquée à droite de la figure.

Suite à la transfection de cellules Cos-7 avec différentes versions de pCGPfiHA-UL24, une quantité fixe de chaque lysat cellulaire (40  $\mu$ l) a été chargée pour réaliser un immunobuvardage de type Western (Figures 11 et 12). Toutes les formes mutées d’UL24 ont été exprimées dans les cellules Cos-7 à la taille attendue. Ainsi, la délétion des acides aminés dans la partie C-terminale d’UL24 n’a pas empêché l’expression de la protéine même si un niveau d’expression diminué a été observé pour la protéine HA-UL24 de type sauvage et pour le mutant HA-UL24Stop197 (Figure 11).

### 3.2 Localisation intracellulaire des variantes d’UL24 en contexte de transfection transitoire

Grâce à la microscopie confocale, la localisation intracellulaire de formes mutées d’UL24 a été observée en contexte de transfection transitoire par immunofluorescence indirecte (Figure 13). Plusieurs résultats de notre laboratoire ont déjà démontré que la protéine HA-UL24 (1-269 acides aminés) se retrouve dans le noyau et le cytoplasme, que le domaine N-terminal d’HA-UL24 (1-192 acides aminés) se localise exclusivement dans le noyau en contexte de transfection transitoire et que le domaine C-terminal d’HA-UL24 (190-269 acides aminés) se retrouve au cytoplasme (Bertrand *et al.*, 2008) (Figure 13 A-C).



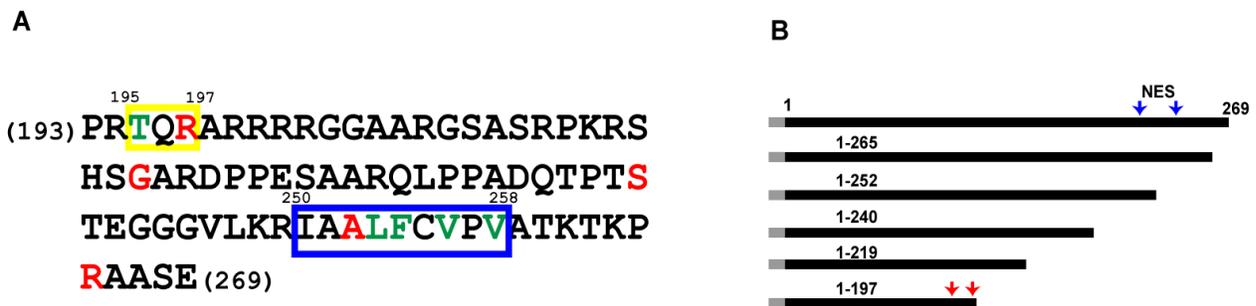
**Figure 13. Localisation intracellulaire de formes mutées d'UL24 dans un contexte de transfection transitoire.**

(A-C) Images de microscopie confocale montrant la localisation d'HA-UL24 et des parties N-terminale et C-terminale d'UL24 respectivement. (D-H) Localisation des variantes d'UL24 avec délétions dans la partie C-terminale. HA-UL24 a été détectée en utilisant un anticorps primaire reconnaissant l'étiquette HA et un anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488, vert). La coloration au Draq5 a permis de révéler les noyaux (bleu). La fusion d'images d'HA-UL24 et Draq5 (merge) sont montrées dans la colonne de droite. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.

Les résultats obtenus suite à la transfection des cellules Cos-7 avec des vecteurs exprimant les formes tronquées d'UL24 ont démontré que certains de ces délétions affectent la localisation de la protéine dans le cytoplasme. Il a été observé que pour les mutants HA-

UL24Stop197 et HA-UL24Stop219, la protéine se retrouve dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme (Figure 13, D et E). Pour les mutants HA-UL24Stop240 et HA-UL24Stop252 la protéine se localise juste dans le noyau (Figure 13, F et G). Par contre, pour le mutant HA-UL24Stop265, la protéine est distribuée de façon uniforme entre le noyau et le cytoplasme (Figure 13 H). Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale d'UL24 contient des résidus qui sont importants pour la localisation de la protéine dans le cytoplasme.

Dans le but d'identifier les résidus jouant un rôle dans la localisation cytoplasmique d'UL24, la séquence primaire de la partie C-terminale d'UL24 a été analysée. Grâce au logiciel Motifscan, il a été trouvé que les acides aminés 195, 196, 197 équivalant à la thréonine, glutamine et arginine respectivement peuvent correspondre à un site putatif de phosphorylation par la protéine kinase C (Figure 14). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude récente montrant que le résidu T195 d'UL24 est phosphorylé en contexte d'infection (Bell *et al.*, 2013).



**Figure 14. Séquence primaire de la partie C-terminale de la protéine UL24.**

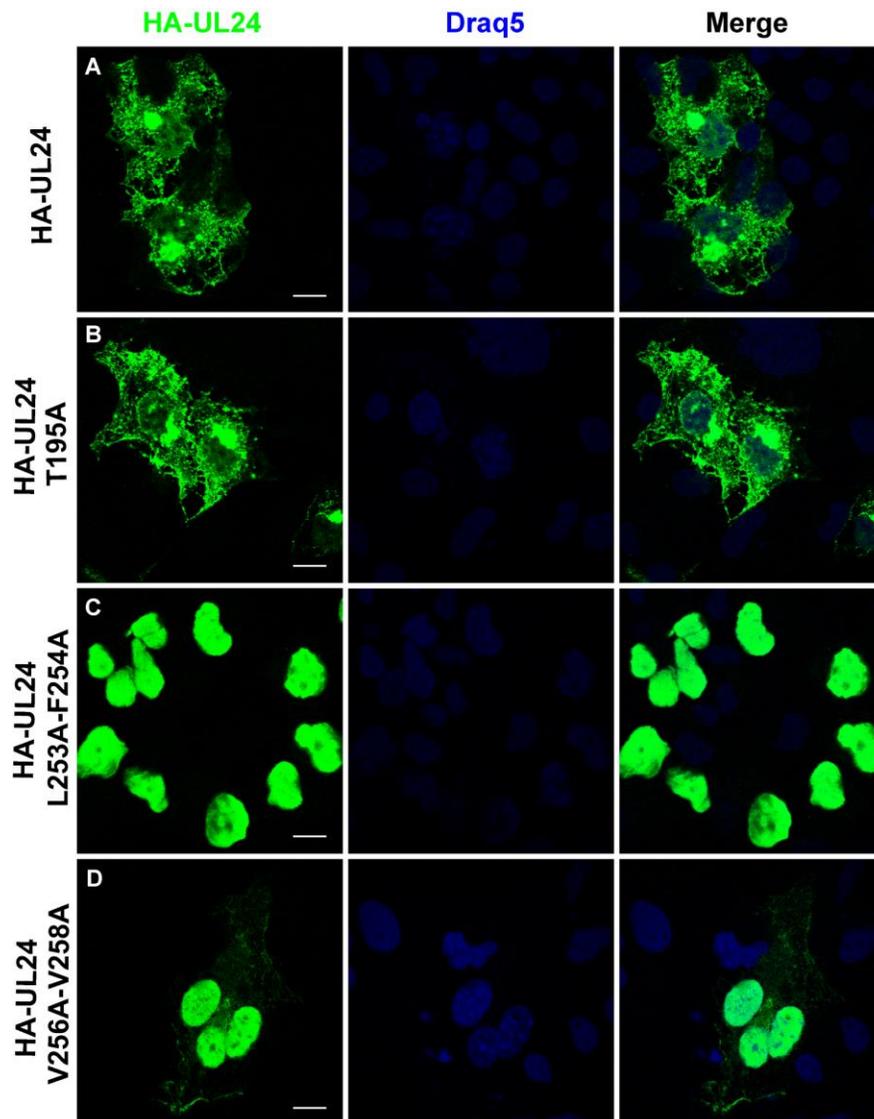
A. Séquence en acides aminés de la partie C-terminale d'UL24 (aa 193-269). Les acides aminés en rouge correspondent au dernier acide aminé exprimé par les formes tronquées d'UL24. Les acides aminés encadrés en jaune correspondent à un possible site de phosphorylation identifié en utilisant le logiciel MotifScan. Les acides aminés encadrés en bleu correspondent à un possible signal d'export nucléaire (NES) qui a été identifié en comparant avec des séquences reportées par d'autres protéines. Les acides aminés en vert ont été ciblés pour substitution pour déterminer leur importance dans la localisation et la fonction de la protéine dans le cytoplasme. B. Représentation schématique de la protéine HA-UL24 du VHS-1 et ses formes tronquées. L'étiquette HA est représentée par la boîte grise. Les flèches bleues et rouges indiquent la position du NES et du site de phosphorylation respectivement.

De plus, il a été observé que pour le mutant HA-UL24Stop265 (Figure 13 H), la protéine se localise de façon uniforme dans le noyau et le cytoplasme, suggérant que la région entre les acides aminés 241 et 265 autorise la localisation cytoplasmique à la protéine UL24 et que cette région contient une séquence correspondant à un putatif NES (Figure 14).

Normalement, un NES a une séquence consensus composée de quatre ou cinq résidus hydrophobes ( $\emptyset^0 X_{0-2} \emptyset^1 X_{2-3} \emptyset^2 X_{2-3} \emptyset^3 X \emptyset^4$ ) où  $\emptyset$  peut représenter une leucine, une isoleucine, une valine, une phénylalanine ou une méthionine et où X correspond à n'importe quel acide aminé (Dong *et al.*, 2009, Guttler *et al.*, 2010). Néanmoins, il existe d'autres séquences différentes de celle ci-dessus qui correspondent à un NES. Dans ces séquences, on ne retrouve pas une caractéristique structurale importante dans le nombre d'acides aminés qui séparent les résidus hydrophobes ainsi que dans la position de ces résidus. Ces séquences non consensus ont été reportées pour quelques protéines virales comme la protéine Rev du VIF (Fridell *et al.*, 1993) et du EIAV (Otero *et al.*, 1998) et la protéine « Core » du virus VHC (Cerutti *et al.*, 2011). Nos résultats ont démontré la présence d'un possible NES non consensus entre les acides aminés 250 et 258 (IAALFCVPV), lequel a été identifié par comparaison avec des séquences rapportées pour d'autres protéines (Cerutti *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2009). Dans ce NES potentiel, les résidus hydrophobes 250, 253, 254, 256, 258 correspondant à une isoleucine, une leucine, une phénylalanine et deux valines respectivement (Figure 14 A) pourraient être importants pour la localisation et les fonctions d'UL24 dans le cytoplasme.

### **3.3 Effet des mutations ponctuelles dans la partie C-terminale d'UL24 sur sa localisation intracellulaire en contexte de transfection transitoire**

Afin de déterminer si le résidu T195, correspondant au site de phosphorylation, et les résidus L253, F254, V256, V258, correspondant à un motif putatif NES sont importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme, ils ont été remplacés par des alanines par mutagenèse dirigée. Les cellules Cos-7 ont été transfectées avec les différents plasmides d'expression d'UL24 avec des substitutions dans la partie C-terminale, et la localisation de ces divers mutants a été analysée par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale (Figure 15).



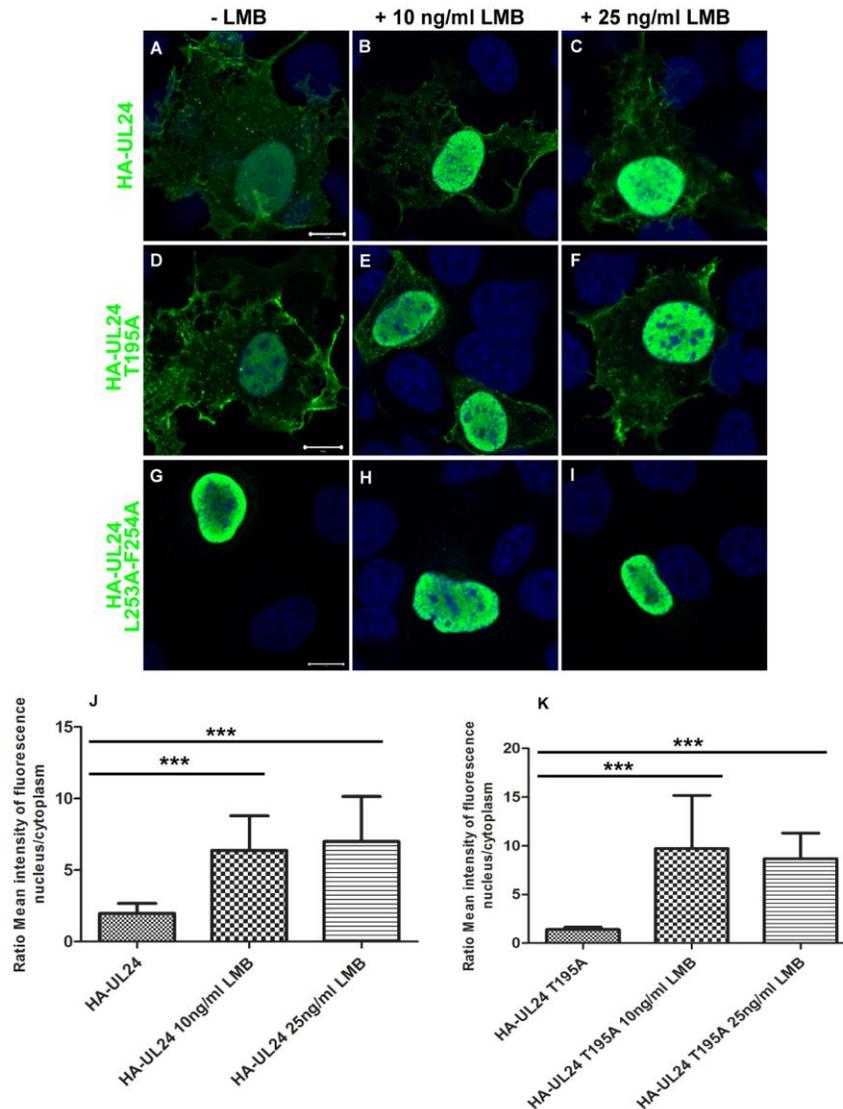
**Figure 15. Localisation intracellulaire de la protéine UL24 du VHS-1 avec substitutions dans la partie C-terminale de la protéine en contexte de transfection transitoire.** (A-D) Images de microscopie confocale montrant la localisation d'HA-UL24 de type sauvage et les formes substituées d'UL24 soit sur le site de phosphorylation ou sur le motif putatif NES. HA-UL24 a été détectée en utilisant un anticorps primaire reconnaissant l'étiquette HA et un anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488, vert). Le marquage du noyau a été fait en utilisant du Draq5 (bleu). La fusion d'images d'HA-UL24 et Draq5 (merge) est montrée dans la colonne de droite. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.

Nos résultats montrent que lors du remplacement de la T195 par l'alanine, la protéine HA-UL24 reste localisée de façon similaire à celle de type sauvage (Figure 15, A et B). Ce qui suggère que le site de phosphorylation T195 ne joue pas un rôle dans la localisation cytoplasmique de la protéine UL24 du VHS-1 en contexte de transfection transitoire.

En revanche, la protéine UL24 avec les substitutions L253A et F254A s'accumule au noyau et n'est pas détectée dans le cytoplasme, contrairement à la protéine HA-UL24 de type sauvage (Figure 15, A et C). De façon similaire, les substitutions V256A et V258A ont provoqué une accumulation de la protéine HA-UL24 majoritairement dans le noyau. La protéine a toutefois été détectée dans le cytoplasme, mais très faiblement (Figure 15 A et D). Ces résultats indiquent que ces acides aminés hydrophobes sont importants pour l'export nucléaire de la protéine UL24 et qu'elles correspondent bien à un NES.

### **3.4 Localisation intracellulaire de variantes d'UL24 en contexte de transfection transitoire suite au traitement avec la LMB**

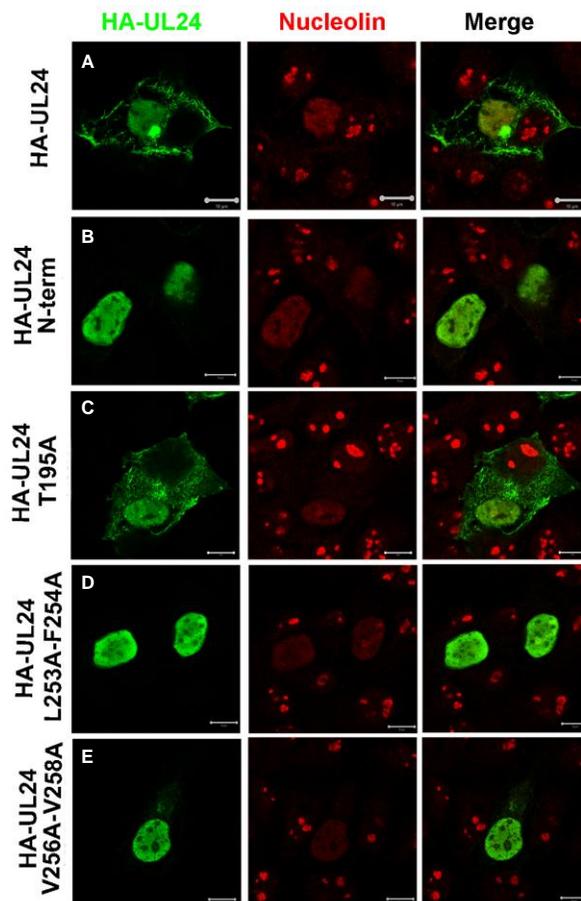
Afin de déterminer si l'export nucléaire d'UL24 du VHS-1 dépendant du NES est effectué par l'exportine CRM-1, la LMB a été utilisée puisqu'elle est un inhibiteur spécifique de cette voie d'export nucléaire. Pour ce faire, des cellules Cos-7 ont été transfectées avec un plasmide encodant HA-UL24 de type sauvage ou avec un plasmide encodant HA-UL24 dont le site de phosphorylation T195A ou le NES ont été modifiés. Vingt-deux heures post-transfection les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL ou 25 ng/mL de LMB pendant 5 heures. Il a été trouvé que la plus faible concentration de LMB était suffisante pour provoquer l'accumulation nucléaire de la protéine HA-UL24 de type sauvage et d'HA-UL24 T195A (Figure 16, A-F). Comme attendu, le traitement des cellules avec la LMB n'a eu aucun effet sur la localisation de la protéine UL24 dont le NES est muté, celle-ci restant localisée au noyau. (Figure 16, G-I). Ces résultats ont été confirmés en quantifiant le ratio de l'intensité moyenne de fluorescence noyau/cytoplasme (N/C) d'UL24 en absence ou en présence de LMB. Ainsi, suite au traitement des cellules exprimant HA-UL24 et HA-UL24 T195A (contenant le site de phosphorylation modifié) avec les différents concentrations de LMB, le ratio d'intensité moyenne de fluorescence N/C était significativement plus haut comparativement aux cellules qui n'ont pas subi le traitement (Figure 16, J-K). Par conséquent, ces résultats indiquent que la protéine UL24 du VHS-1 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme d'une façon dépendante de l'exportine CRM-1 en contexte de transfection.



**Figure 16. Identification d'un NES dépendant de l'exportine CRM-1 dans la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 en contexte de transfection transitoire.** Des cellules Cos-7 ont été transfectées avec un plasmide encodant HA-UL24 de type sauvage (A-C) ou avec des plasmides encodant HA-UL24 dont les sites de phosphorylation (D-F) ou le NES (G-I) ont été modifiés. Vingt-deux heures post-transfection, les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL (B, E et H) ou 25 ng/mL (C, F et I) de LMB pendant 5 heures. Par la suite, les cellules ont été lavées et fixées et les images représentatives ont été acquises par microscopie confocale. HA-UL24 a été révélée en utilisant un anticorps primaire spécifique reconnaissant l'étiquette HA et un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 488 (vert). Le marquage du noyau a été fait en utilisant du Draq5 (bleu). Les barres d'échelle représentent 10 μm. (J-K) Quantification du ratio de l'intensité moyenne de fluorescence noyau/cytoplasme (N/C) pour HA-UL24 (J) et HA-UL24 T195A (K) dans les cellules Cos-7 en l'absence ou en présence de 10 ng/mL ou de 25 ng/mL de LMB en utilisant le logiciel ZEN (Zeiss). La moyenne du ratio N/C a été obtenue à partir de 30 cellules provenant de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart type de la moyenne. \*\*\*, p<0.001 comparé au contrôle par le test « one-way ANOVA ».

### 3.5 Effet de mutations ponctuelles dans la partie C-terminale d'UL24 sur la nucléoline en contexte de transfection transitoire

Dès lors, l'une des caractéristiques de la protéine UL24 est d'induire la dispersion de la nucléoline. Il est connu que la nucléoline peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, plus de se retrouver au noyau, elle peut se retrouver dans le cytoplasme et dans les membranes de cellules (Chen *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2011). Nous avons voulu savoir si l'export nucléaire de la protéine UL24 joue un rôle dans la dispersion de la nucléoline.



**Figure 17. Effet de substitutions dans la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 sur la distribution de la nucléoline.** Images de microscopie confocale montrant des cellules Cos-7 transfectées avec un vecteur exprimant HA-UL24 de type sauvage (A), la partie N-terminale d'HA-UL24 (B) ou les formes mutées d'HA-UL24 dans la partie C-terminale (C-E). Les cellules ont été immunomarquées pour HA (vert) et pour la nucléoline (rouge). La fusion d'images pour HA-UL24 et la nucléoline (merge) est montrée dans la colonne de droite. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.

Pour cette étude, les cellules Cos-7 ont été transfectées avec un plasmide encodant HA-UL24 de type sauvage, un plasmide encodant la partie N-terminale d'HA-UL24 ou un plasmide encodant HA-UL24 dont le site de phosphorylation T195A ou le NES ont été mutés. La distribution de la nucléoline a ensuite été analysée par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale (Figure 17). Les variantes d'UL24 contenant les substitutions dans la partie C-terminale de la protéine ont provoqué la dispersion de la nucléoline de façon similaire à HA-UL24 de type sauvage et la partie N-terminale d'HA-UL24 (Figure 17, A-E). Par conséquent, ces résultats suggèrent que la redistribution de la nucléoline ne dépend pas de l'habilité d'UL24 de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme.

### **3.6 Création de virus recombinants**

Tous les résultats précédemment présentés ont été obtenus en contexte de transfection transitoire. Dans la volonté d'étudier l'impact des mutations de la partie C-terminale sur la biologie du virus, divers mutants du VHS-1 ont été générés. Pour cela, la technique décrite par Tischer et collaborateurs a été utilisée. Cette technique permet la modification de longues séquences d'ADN sur un BAC contenant le génome viral de type sauvage (Tischer *et al.*, 2010). Pour tester notre hypothèse que des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 sont importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme, les BACs recombinants générés possédaient une étiquette d'HA en amont de la protéine UL24, ce qui a permis sa détection facile par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale. Les mutations L253A-F254A, ciblant le NES d'UL24, ont été insérées dans le génome du VHS-1 en forme de BAC pour les étudier en contexte d'infection. Ces mutations ont été choisies étant donné qu'elles ont montré un rôle majeur dans la localisation intracellulaire d'UL24 en contexte de transfection transitoire. Ainsi, la mutation T195A, ciblant le site de phosphorylation d'UL24 a été utilisée pour la production des BACs recombinants afin d'étudier son impact lors de l'infection. Deux isolats indépendants des versions mutées d'UL24 ont été produits pour chacun des BACs recombinants, et nommés (1) et (2). Entre autres, les deux isolats permettent d'avoir une plus grande confiance que le phénotype observé est dû aux mutations insérées dans le génome viral et non à de potentielles mutations non désirées sur le génome viral qui auraient pu se produire lors de la recombinaison.

Par cette méthode, les virus recombinants BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) ont été produits dans un premier temps puis les virus recombinants BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) et BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) dans un second temps.

Afin de nous assurer que la séquence d'UL24 ne contenait que les mutations désirées, l'ADN génomique de chacun des isolats a été extrait et le gène *UL24* de chaque virus a été séquencé. Tous les virus recombinants produits contenaient la version mutée d'*UL24* attendue.

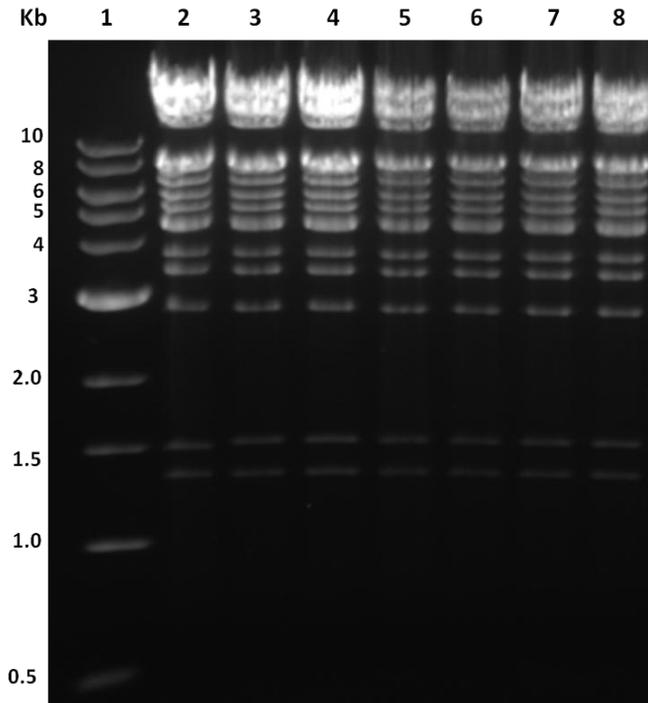
### **3.6.1 Organisation génomique des BACs recombinants**

Afin de vérifier que les BACs recombinants n'avaient pas perdu des gros morceaux d'ADN génomique lors de la recombinaison homologe, l'ADN des BACs portant les mutations dans le gène *UL24* ont été digérés avec l'enzyme EcoRV. Tous les mutants produits avaient un profil de digestion similaire au BAC HSV-1 KOS de type sauvage (Figure 18). Ces résultats ont suggéré que l'organisation génomique des BACs recombinants n'a pas été modifiée lors du processus de recombinaison homologe et que ces BACs pouvaient être utilisés pour la production des virus recombinants.

### **3.6.2 Caractérisation des virus recombinants**

#### **3.6.2.1 Expression d'HA-UL24 et de TK chez les virus recombinants**

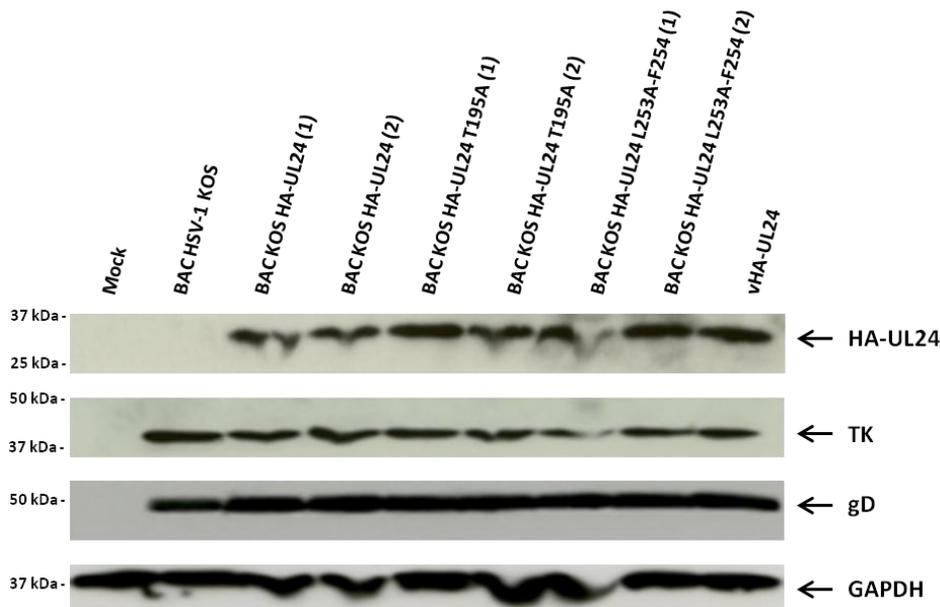
Étant donné que les gènes *UL23*, codant pour TK, et *UL24* se chevauchent partiellement, la capacité des virus recombinants à exprimer HA-UL24 et TK a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Des cellules Vero ont été infectées avec les différents virus recombinants à une MOI de 10. À un temps de 18 hpi, les lysats cellulaires ont été récoltés et analysés par immunobuvardage de type Western afin de détecter HA-UL24 et TK. Le niveau d'expression de la gD, une glycoprotéine virale exprimée lors de la phase tardive de réplication, a aussi été vérifié afin de s'assurer que le niveau d'infection était similaire entre les différents virus.



**Figure 18. Profil de digestion obtenu avec l'enzyme EcoRV des BACs recombinants portant des mutations dans le gène *UL24* du VHS-1.** L'ADN du BAC HSV-1 KOS de type sauvage et des BACs KOS mutés a été digéré avec l'enzyme EcoRV. Les produits de réaction ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% et révélés aux UV grâce au bromure d'éthidium. Ligne 1, marqueur 1kb DNA ladder; ligne 2, BAC HSV-1 KOS; ligne 3, BAC KOS HA-UL24 (1); ligne 4, BAC KOS HA-UL24 (2); ligne 5, BAC KOS HA-UL24 T195A (1); ligne 6, BAC KOS HA-UL24 T195A (2); ligne 7, BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1); ligne 8, BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (2). La taille des bandes du marqueur est indiquée à gauche de la figure.

Pour chacun des virus recombinants, une bande a été observée dont le poids moléculaire correspond à celui d'HA-UL24. Cette donnée a été confirmée grâce au virus vHA-UL24 (Lymberopoulos *et al.*, 2007) utilisé comme témoin positif (Figure 19). Par contre, cette bande n'a pas été observée dans les cellules non infectées (« mock ») ou infectées par le virus de type sauvage BAC HSV-1 KOS ne possédant pas d'étiquette HA. Les niveaux d'expression d'HA-UL24 des deux isolats de chaque virus contenant les mutations ont été similaires au BAC KOS HA-UL24 toute comme le niveau d'expression de la gD a été similaire entre les différents virus recombinants et le virus de type sauvage BAC HSV-1 KOS (Figure 19). Par conséquent, suite à la production des virus recombinants via le système BAC, l'expression des versions mutées de la protéine HA-UL24 n'a pas été affectée puisque leurs niveaux d'expression ont été similaires à celui de la protéine de type sauvage. Par ailleurs, les deux isolats de chacun de virus

recombinants ont exprimé TK à des niveaux similaires au virus de type sauvage BAC HSV-1 KOS (Figure 19). Ainsi, l'insertion de l'étiquette HA dans la séquence UL24 n'a pas affecté l'expression de TK chez les virus recombinants.



**Figure 19. Expression d'HA-UL24 et de TK chez les virus recombinants.** Les cellules Vero ont été infectées ou non (« mock ») par les virus recombinants à une MOI de 10. Des lysats de protéines ont été récoltés à 18 hpi et analysés par immunobuvardage de type Western. Les cellules infectées par le virus vHA-UL24 ou par le virus BAC HSV-1 KOS ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif pour la détection d'HA-UL24. Les cellules infectées par le virus BAC HSV-1 KOS ont été utilisées comme témoin positif pour la détection de TK. Le niveau d'infection a été vérifié en analysant l'expression de la glycoprotéine virale gD. La protéine cellulaire GAPDH a servi de témoin de charge. La taille de certaines bandes du marqueur est indiquée à gauche de la figure.

### 3.7 Localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 dans les cellules Vero infectées par les virus recombinants

La localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 suite à l'infection par les virus recombinants a été étudiée. Les cellules Vero ont été infectées ou non (« mock ») à une MOI de 10 par les virus vHA-UL24, BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) (Figure 20 A) ou par les virus contenant les mutations dans le site de phosphorylation (BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2)), et le NES (BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) ou (2)) (Figure 20 B). À 9 et 18 hpi, les

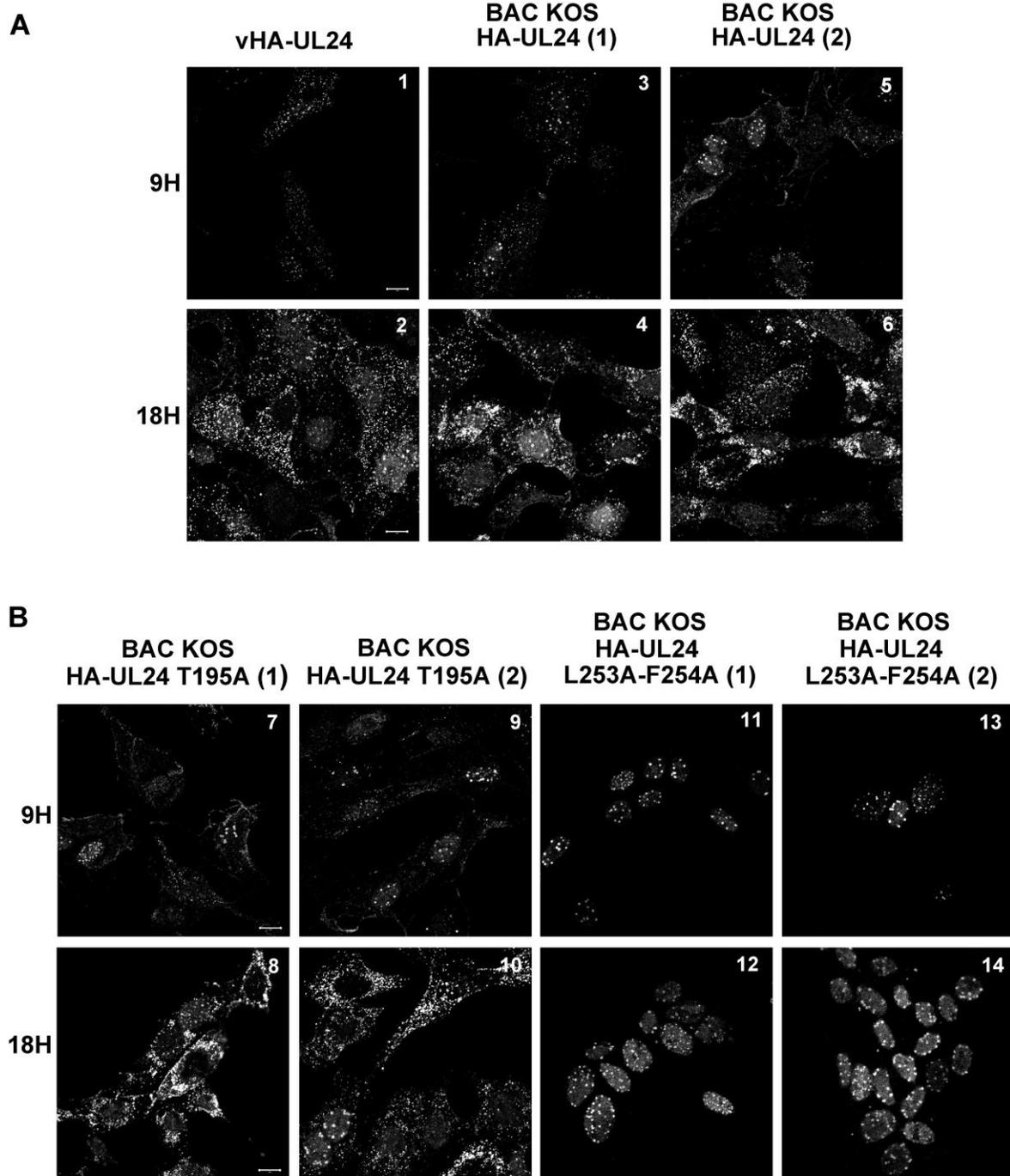
cellules ont été fixées et la localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 a été analysée par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale.

À 9 hpi, il a été observé que dans les cellules infectées par les virus BAC KOS HA-UL24 (1) et (2), la protéine HA-UL24 était localisée au noyau et au cytoplasme d'une façon similaire à celle décrite pour le vHA-UL24 (LyMBERopoulos *et al.*, 2007) (Figure 20 A, panneaux 1, 3 et 5). À 18 hpi, la protéine HA-UL24 était associée au noyau et au cytoplasme, plus particulièrement en périphérie du noyau (Figure 20 A, panneaux 2, 4 et 6). Une localisation similaire d'HA-UL24 a été observée pour le virus contenant la mutation dans le site de phosphorylation à 9 et 18 hpi (Figure 20 B, panneaux 7-10). Au contraire, dans les cellules infectées par les virus contenant les mutations dans le NES, la protéine HA-UL24 a été seulement détectée dans le noyau sous la forme de points (Figure 20 B, panneaux 11-14). Ces résultats indiquent qu'en contexte d'infection, la protéine HA-UL24 du VHS-1 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, et que ceci est dû à la présence d'un NES identifié dans la partie C-terminale de la protéine.

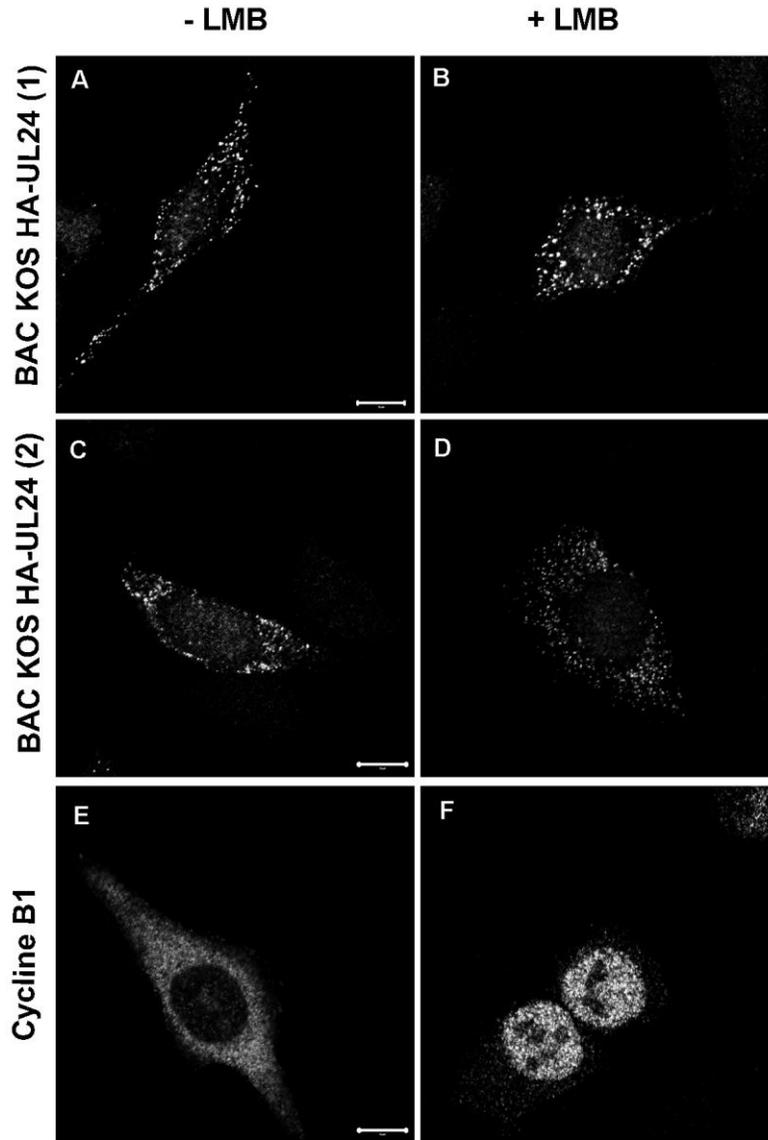
### **3.8 Localisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 dans les cellules HeLa en contexte d'infection suite au traitement avec la LMB**

Afin de déterminer si l'export nucléaire d'UL24 du VHS-1 est dépendant de l'exportine CRM-1 en contexte d'infection, les cellules HeLa ont été infectées ou non (« mock ») par le virus BAC KOS HA-UL24 (1) et (2). À 8 hpi, les cellules ont été traitées avec 20 ng/mL de LMB pendant 5 heures (Figure 21, B et D). Pour valider notre expérience, les cellules HeLa non infectées ont subi le même traitement avec la LMB pour la détection de la cycline B1 (Figure 21, F), une protéine qui possède un NES dépendant de l'exportine CRM-1 (Yang *et al.*, 1998).

Bien que la LMB ait bloqué l'export nucléaire d'HA-UL24 en contexte de transfection transitoire (Figure 16), le traitement de cellules infectées avec la LMB n'a pas eu d'effet sur la localisation de la protéine HA-UL24 (Figure 21, A-D). Par contre, la LMB a inhibé l'export nucléaire de la cycline B1 utilisée comme témoin positif (Figure 21, E-F). Ces résultats suggèrent que l'export nucléaire de la protéine HA-UL24 n'est pas dépendant de l'exportine CRM-1 en contexte d'infection.



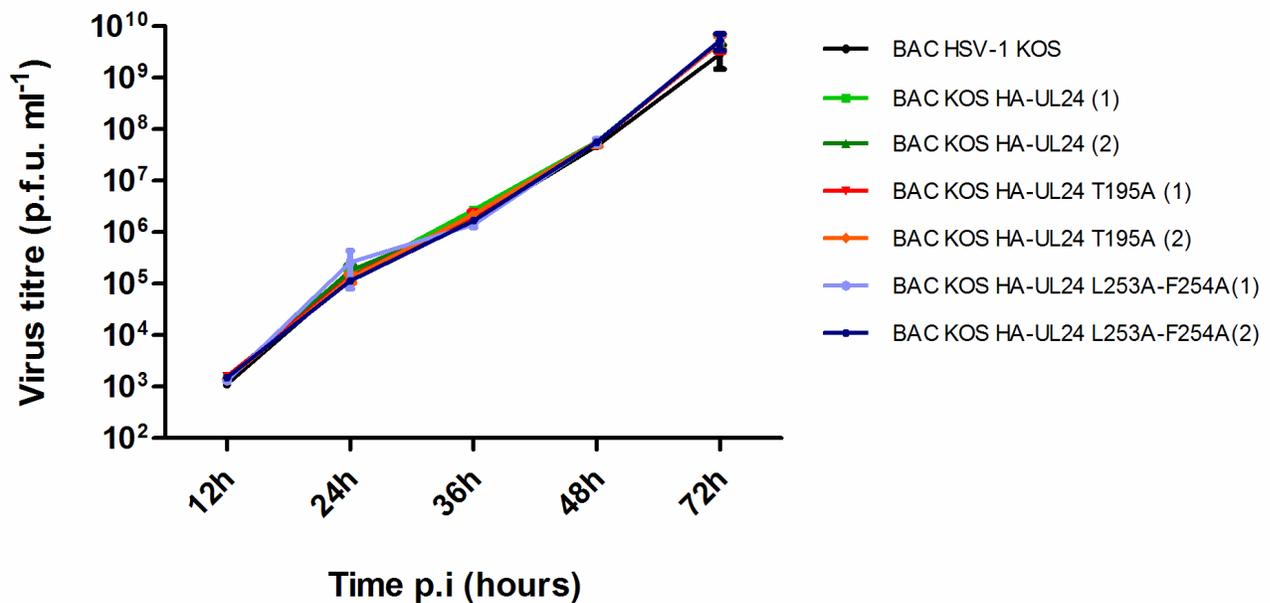
**Figure 20. Localisation intracellulaire d'HA-UL24 en contexte d'infection.** Les cellules Vero ont été infectées par les virus recombinants vHA-UL24 (A, panneaux 1-2), BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) (A, panneaux 3-6), BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) (B, panneaux 7-10) ou par le virus BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) (B, panneaux 11-14). À 9 et 18 hpi, les cellules ont été fixées et immunomarquées en utilisant un anticorps primaire dirigé contre l'étiquette HA et un anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488). Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.



**Figure 21. L'export nucléaire de la protéine HA-UL24 est indépendant de l'exportine CRM-1 en contexte d'infection.** Les cellules HeLa ont été non infectées (« mock ») (E et F) ou infectées par les virus BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) (A-D). À 8 hpi, les cellules ont été traitées avec 20 ng/mL de LMB pendant 5 heures (B, D, et F). Par la suite, les cellules ont été fixées et les images représentatives ont été acquises par microscopie confocale. La distribution intracellulaire d'HA-UL24 a été analysée en utilisant un anticorps primaire monoclonal dirigé contre l'étiquette HA et un anticorps secondaire spécifique conjugué à un fluorochrome Alexa Fluor 488. La détection de la protéine cycline B1 a été utilisée comme témoin positif de l'export nucléaire sensible à la LMB. Les barres représentent 10  $\mu$ m.

### 3.9 Capacité de réplication des virus recombinants

La capacité des virus recombinants à se répliquer en culture cellulaire a été analysée. Des cellules Vero ont été infectées à une MOI de 0.001 pour évaluer plusieurs cycles de réplication virale. À différents temps post-infection, l'infection a été arrêtée et les virus totaux ont été titrés par comptage des plages de lyse. Le virus de type sauvage BAC KOS HSV-1 a été utilisé comme témoin. Il a été observé que les deux isolats du BAC KOS HA-UL24 ont eu un niveau de réplication similaire à celui de KOS. Aussi, en mutant le résidu T195 ciblant le site de phosphorylation et les résidus L253 et F254 ciblant le NES, la capacité de réplication du VHS-1 en culture cellulaire n'a pas été affectée (Figure 22). Donc, les résidus substitués dans la partie C-terminale de la protéine UL24 ne semblent pas être importants pour la réplication virale dans les cellules Vero puisque les virus portant ces mutations se répliquaient d'une façon similaire au virus KOS.

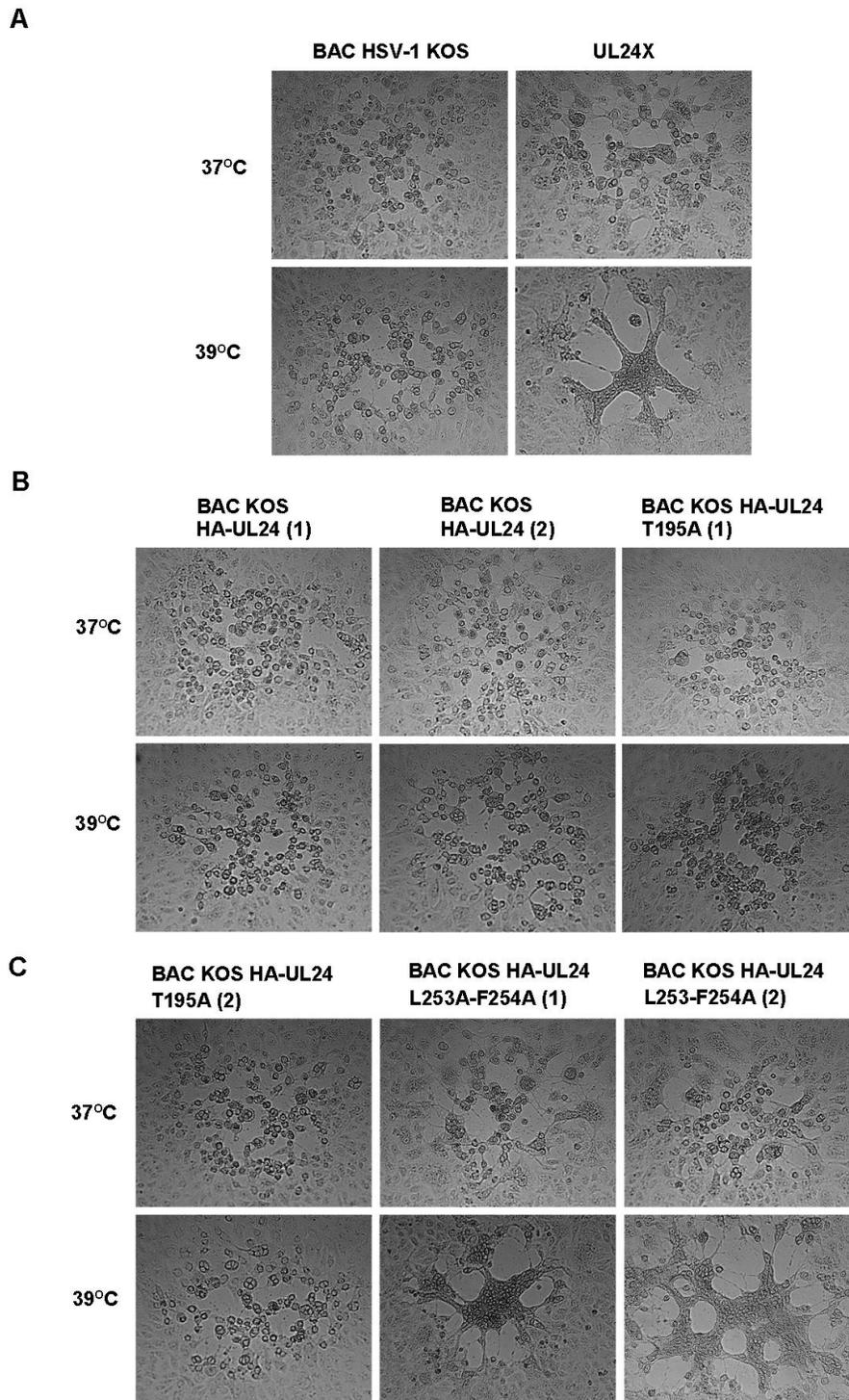


**Figure 22. Capacité de réplication des virus recombinants en culture cellulaire.** Les cellules Vero ont été infectées par les différents virus recombinants à une MOI de 0,001. À différents temps post-infection, les cellules et le surnageant ont été récoltés pour déterminer la production des particules infectieuses totales. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne de deux expériences indépendantes.

### 3.10 Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants

Étant donné qu'un virus déficient en UL24 forme des plages de lyse de type syncytial (Jacobson *et al.*, 1989), la morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants produits a été étudiée. Pour ce faire, des plaques à 12 puits contenant des cellules Vero ont été infectées par les différents virus recombinants, puis incubées à 37°C ou 39°C pour 2 jours. Par la suite, la morphologie des plages de lyse formées a été observée au microscope à contraste de phase. Les virus recombinants ont été comparés au virus de type sauvage BAC HSV-1 KOS et au virus déficient en UL24 (UL24X) en parallèle.

À 37°C, les plages de lyse formées par le virus recombinants BAC KOS HA-UL24 (1) et (2), les virus BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) ont été similaires à celles formées par le virus BAC HSV-1 KOS (Figure 23, A-C). Par contre, le virus BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) ont produits des plages de lyse similaires à celles formées par le virus UL24X (Figure 23, A et C). Lorsque les virus ont été incubés à 39°C, température à laquelle le phénotype syncytial devient plus évident, UL24X a produit de gros syncytia, ce que les virus BAC HSV-1 KOS, BAC KOS HA-UL24 (1) et (2), les virus BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) n'ont pas fait (Figure 23, A-C). Par contre, les virus BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) ont produits des syncytia semblables à ceux observés chez le virus UL24X (Figure 23, A et C). Ainsi, en mutant les nucléotides qui codent pour les acides aminés formant le NES, L253 et F254, les virus ont généré des plages syncytiales similaires à celles formées par un virus où UL24 a été supprimée.



**Figure 23. Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants.** Les plages de lyse illustrent la morphologie typiquement observée à 37°C et 39°C. (A) Les virus BAC HSV-1 KOS et UL24X ont été utilisés comme témoins. (B) Plages de lyse produites par les virus BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) et BAC KOS HA-UL24 T195A (1). (C) Plages de lyse produites par les virus BAC HSV-1 HA-UL24 T195A (2) et BAC HSV-1 HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2).

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

### 4.1 Importance des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 sur la localisation intracellulaire

Le but de cette étude a été d'élucider l'importance des résidus dans la partie C-terminale d'UL24 dans la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme. Pour ce faire, nous avons produit une série de vecteurs d'expression mammifère encodant UL24 du VHS-1 avec des délétions dans la partie C-terminale de la protéine. Ces délétions n'ont pas empêché l'expression de la protéine même si nous avons observé un niveau d'expression faible pour le mutant HA-UL24Stop197 (Figure 11). Ce niveau faible peut être dû au fait qu'il s'agit d'une grande délétion et cela peut affecter le repliement de la protéine, la rendant possiblement moins stable. De plus, un niveau d'expression augmenté a été observé pour les mutants HA-UL24Stop265, HA-UL24Stop252, HA-UL24Stop240 et HA-UL24Stop219 en comparaison avec la protéine HA-UL24 de type sauvage (Figure 11). Il est possible que la partie C-terminale au complète affecte la stabilité de la protéine et que celle-ci soit un peu dégradée. Au contraire, en présence de certaines portions de la partie C-terminale, une expression plus stable de la protéine a été observée et cela indique que la partie C-terminale peut jouer un rôle dans la structure et la stabilité de la protéine UL24. L'étude de la localisation intracellulaire de ces versions tronquées d'UL24 a montré que pour les mutants HA-UL24Stop197 et HA-UL24Stop219, la protéine est retrouvée dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme. Par contre, pour les formes HA-UL24Stop240 et HA-UL24Stop252, la protéine était seulement détectée dans le noyau (Figure 13). Cela a mis en évidence un possible rôle du NLS type bipartite et des acides aminés basiques localisés entre les résidus 199 et 229 dans la partie C-terminale de la protéine. Ces résidus semblent être importants pour la localisation nucléaire de la protéine car en son absence UL24 est aussi détectée dans le cytoplasme. De plus, cette étude a montré que la région comprise entre les acides aminés 253 et 265 ont été critiques pour la localisation cytoplasmique de la protéine UL24 du VHS-1. En analysant la séquence primaire de la partie C-terminale d'UL24, nous avons trouvé qu'au début de la partie C-terminale, le résidu T195 correspond à un site de phosphorylation et la région comprise entre les acides aminés 250 et 258 (IAALFCVPV) correspond à un putatif NES. Donc, ces sites pourraient être importants pour la fonction d'UL24 lors de l'infection.

La phosphorylation des acides aminés peut induire des modifications structurales de la protéine ayant des répercussions fonctionnelles très importantes telles que un changement de sa localisation cellulaire, une affectation de sa fonction ou de sa capacité d'association avec d'autres protéines (Corbin-Lickfett *et al.*, 2010). La mutagenèse dirigée du résidu T195 (ciblant le site de phosphorylation) n'a pas eu d'effet sur la localisation cytoplasmique de la protéine. Par contre, ce site de phosphorylation pourrait contribuer à la fonction d'UL24 dans le cytoplasme. En revanche, la mutagenèse dirigée ciblant des résidus prédits à faire partie d'un NES (L253, F254, V256, V258) a significativement augmenté la localisation nucléaire d'UL24 (Figure 15). Cela suggère que l'accumulation cytoplasmique de la protéine UL24 est due à la présence d'un NES identifié dans la partie C-terminale de la protéine. Étant donné la nouvelle classification de NES consensus (qui indique cinq et non 4 résidus hydrophobes importants pour l'interaction avec l'exportine CRM-1), il serait intéressant de déterminer si le résidu I250 joue un rôle dans l'export nucléaire d'UL24. La mutagenèse ponctuelle de ce résidu permettrait d'élucider cette fonction. D'ailleurs, les résidus ciblant le NES sont conservés parmi des orthologues d'UL24 tel que UL24 du VHS-2 et BoHV-1 et 2, ces résidus pourraient jouer ainsi un rôle dans l'export nucléaire d'UL24 de ces virus herpès.

Par ailleurs, il a été observé que les variantes d'UL24 contenant les substitutions dans la partie C-terminale de la protéine n'ont pas eu d'impact sur la distribution de la nucléoline (Figure 17). D'après nos résultats, la redistribution de la nucléoline ne dépend pas de l'export nucléaire de la protéine UL24. La propriété d'UL24 d'induire la dispersion de la nucléoline reste dépendante de la partie N-terminale d'UL24 ainsi que de la protéine entière (Bertrand *et al.*, 2008). Il a été démontré que lors d'une infection virale, la redistribution de la nucléoline est essentielle pour la réplication du génome viral, cette redistribution peut altérer la biogenèse de ribosomes dans la cellule hôte (Masiuk, 2008). D'ailleurs, des études ont montré que la régulation à la baisse de la nucléoline augmente l'expression de la protéine p53 et inhibe la transcription de l'ARN polymérase I. Cette inactivation peut causer des perturbations dans les fonctions nucléolaires, dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la duplication du centrosome (Tajrishi *et al.*, 2011).

Afin de déterminer si ces mêmes résidus étaient importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme en contexte d'infection, des virus recombinants possédant des mutations dans le site de phosphorylation et dans le NES d'UL24 du VHS-1 ont été

produits en utilisant le système BAC. Il a été observé que dans les cellules infectées par les virus possédant la mutation dans le site de phosphorylation (BAC HSV-1 HA-UL24 T195A (1) et (2)), la protéine UL24 se localise de façon similaire à la protéine de type sauvage, tandis que dans les cellules infectées par les virus possédant les mutations dans le NES (BAC HSV-1 HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2)), UL24 est seulement détectée dans le noyau (Figure 20). Cela suggère que la protéine UL24 du VHS-1 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à la présence d'un NES dans la partie C-terminale de la protéine. Par ailleurs, la distribution d'UL24 (sous forme de points) dans le noyau provoquée par le virus contenant les mutations dans le NES peut être associée à une surexpression de la protéine ou à la formation d'aggrésomes nucléaires comme observé chez son orthologue UL76 (Lin *et al.*, 2013).

Il a été observé que l'export nucléaire de la protéine UL24 est indépendant de l'exportine CRM-1 en contexte d'infection malgré qu'en contexte de transfection l'export nucléaire d'UL24 est dépendant de cette exportine. Le mécanisme par lequel la protéine UL24 du VHS-1 est exportée dans le cytoplasme reste à être élucidé. Des études précédentes ont montré des interactions de protéines contenant un NES avec d'autres récepteurs d'export différents de CRM-1, tel que l'exportine t (Cullen, 2003), l'exportine 2 (Kutay *et al.*, 1997), l'exportine 4 (Lipowsky *et al.*, 2000), l'exportine 5 (Brownawell *et al.*, 2002) et le facteur d'export d'ARNm TAP (Johnson *et al.*, 2009a, Juillard *et al.*, 2009, Williams *et al.*, 2005). Ces études montrent qu'il y a une variété de récepteurs impliqués dans l'export nucléaire et il est probable qu'un des ces récepteurs alternatifs permette l'export nucléaire d'UL24 du VHS-1, ou il peut avoir de la redondance entre CRM-1 et d'autres voies d'export. Enfin, il est possible que lors de l'infection, UL24 interagisse avec d'autres protéines virales et/ou cellulaires qui peuvent intervenir dans l'export nucléaire de la protéine.

Par ailleurs, l'identification d'un NES dans la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 permet le développement de stratégies ciblant le NES pour caractériser les fonctions de la protéine plus particulièrement dans les étapes tardives de la morphogénèse virale dans le cytoplasme.

## **4.2 Impact des substitutions d'acides aminés de la partie C-terminale d'UL24 sur la réplication du VHS-1 en culture cellulaire**

Des études antérieures ont montré qu'une souche du VHS-1 déficiente en UL24, présente une diminution de la réplication virale en culture cellulaire (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989). Dans cette étude, nous avons analysé l'effet des mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de la protéine UL24 sur la réplication du VHS-1 en culture cellulaire. Les mutations du site de phosphorylation (T195A) et du NES (L253A-F254A) n'ont pas provoqué une diminution de la réplication virale (Figure 22). Par conséquent, l'export nucléaire d'UL24 ainsi que la partie C-terminale de la protéine ne semblent pas être importants pour la réplication virale en culture cellulaire puisque ces virus se répliquent d'une façon similaire au virus de type sauvage KOS. Étant donné que la partie C-terminale d'UL24 se retrouve dans le cytoplasme, que dans ce compartiment ont lieu les étapes tardives du cycle viral du VHS-1 tel que le dé-enveloppement, le ré-enveloppement et la sortie du virus, la partie C-terminale pourrait être impliquée dans la morphogénèse et dans la dissémination du virus de cellule à cellule.

Par ailleurs, l'export nucléaire dépendant du NES de certaines protéines virales est important pour l'efficacité de réplication virale comme démontré pour la protéine REV du VIH (Daelemans *et al.*, 2002, Fleta-Soriano *et al.*, 2014) et la protéine Core du VHC (Cerutti *et al.*, 2011).

## **4.3 Impact des substitutions d'acides aminés de la partie C-terminale d'UL24 dans la formation de syncytiums**

Des études ont montré qu'une souche du VHS-1 déficient en UL24 forme des plages syncytiales lors de l'infection de cellules en culture et ce phénotype est plus évident lorsque l'infection se déroule à 39°C (Jacobson *et al.*, 1989, Tognon *et al.*, 1991). Il a été trouvé que les virus BAC KOS HA-UL24 (1) et (2) et les virus BAC KOS HA-UL24 T195A (1) et (2) (ciblant le site de phosphorylation) ont formé de plages de lyses semblables au virus de type sauvage (BAC HSV-1 KOS) mais n'ont pas formé de syncytiums (Figure 23 A-C). Par contre, les virus BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) (contenant les mutations dans le NES), ont formé des syncytia semblables à ceux d'un virus déficient en UL24X (UL24X) (Figure 23 A et C).

Malgré le fait qu'à 37°C, cette mutation ne semble pas influencer la réplication du virus, lorsque l'infection se fait à une température plus élevée, cette mutation affecte grandement la morphologie des plages de lyse. Ce même phénotype a été observé par le virus vUL24-G121A, ciblant un résidu hautement conservé du quatrième domaine d'homologie (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Étant donné que lorsque les cellules sont infectées avec les virus ciblant le NES (BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2)) la protéine UL24 se retrouve exclusivement au noyau, ces résultats montrent l'évidence d'un rôle de la partie C-terminale de la protéine UL24 dans le cytoplasme par la formation de syncytiums. Cela suggère que la partie C-terminale d'UL24 joue un rôle dans l'inhibition de la fusion membranaire aberrante des cellules pendant l'infection. En plus, une étude du laboratoire a montré que l'absence d'UL24 cause une relocalisation des glycoprotéines virales dans les étapes tardives du cycle virale et cette relocalisation peut être associée au phénotype de plages syncytiales (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Donc, il est possible que la partie C-terminale d'UL24 soit impliquée dans la distribution des glycoprotéines virales durant les étapes tardives de l'infection puisque son absence dans le cytoplasme provoque la formation de plages syncytiales.

## CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, l'importance des résidus de la partie C-terminale de la protéine UL24 dans la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme a été étudiée. Pour ce faire, une stratégie de mutagenèse dans la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 a été utilisée afin d'identifier les résidus importants pour la localisation et les fonctions de la protéine dans le cytoplasme.

Suite à cette étude, il a été observé que la mutation dans le gène *UL24* codant pour le résidu T195 (ciblant le site de phosphorylation) n'a pas affectée la localisation intracellulaire de la protéine UL24 du VHS-1. Par contre, la localisation cytoplasmique d'UL24 est dépendante de la présence d'un NES identifié dans la partie C-terminale de la protéine. Grâce à ce NES, la protéine UL24 du VHS-1 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et cette propriété nouvellement découverte pourrait jouer un rôle dans les étapes tardives de la morphogenèse virale dans le cytoplasme. D'ailleurs, il a été trouvé que l'export nucléaire d'UL24 du VHS-1 est dépendante de l'exportine CRM-1 en contexte de transfection. En revanche, l'export nucléaire d'UL24 est indépendante de cette exportine en contexte d'infection suggérant qu'un autre récepteur d'export est impliqué dans l'export nucléaire d'UL24 durant l'infection. Une étude plus approfondie est requise pour identifier cette exportine impliqué dans l'export nucléaire de la protéine UL24 du VHS-1. Par ailleurs, il a été observé que la redistribution de la nucléoline ne dépend pas de l'export nucléaire de la protéine UL24. Donc, UL24 a des fonctions nucléaires et cytoplasmiques indépendantes.

D'autre part, les virus BAC KOS HA-UL24 L253A-F254A (1) et (2) (ciblant le NES) ont produit de gros syncytia semblables à ceux d'un virus déficient en UL24 et n'ont pas démontré une diminution du niveau de réplication virale en culture cellulaire. Ce phénotype sera confirmé par la production d'un virus « rescue » pour ce mutant dans lequel la séquence de type sauvage sera réinsérée dans le génome. En utilisant ces virus, il sera possible d'élucider les mécanismes moléculaires de la formation des plages syncytiales sans affecter d'autres aspects de la biologie du virus. En plus, ces virus pourront être utilisés pour investiguer le rôle de la partie C-terminale de la protéine UL24 dans les étapes tardives de la morphogenèse virale et dans la pathogenèse.

## Références bibliographiques

- Akarsu H, Boulo S, Ruigrok RWH & Baudin F (2006) Le trafic nucléoplasmique des protéines et des ribonucléoprotéines du virus de la grippe. *Virologie* 10:301-309.
- Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E & Goldberg MW (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *Journal of cell science* 113 ( Pt 10):1651-1659.
- Alvisi G, Jans DA, Guo J, Pinna LA & Ripalti A (2005) A protein kinase CK2 site flanking the nuclear targeting signal enhances nuclear transport of human cytomegalovirus ppUL44. *Traffic* 6(11):1002-1013.
- Ambinder RF, Mullen MA, Chang YN, Hayward GS & Hayward SD (1991) Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *Journal of virology* 65(3):1466-1478.
- Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y & Kawaguchi Y (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
- Avitabile E, Lombardi G, Gianni T, Capri M & Campadelli-Fiume G (2004) Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *Journal of virology* 78(15):8015-8025.
- Avitabile E, Ward PL, Di Lazzaro C, Torrisi MR, Roizman B & Campadelli-Fiume G (1994) The herpes simplex virus UL20 protein compensates for the differential disruption of exocytosis of virions and viral membrane glycoproteins associated with fragmentation of the Golgi apparatus. *Journal of virology* 68(11):7397-7405.
- Baines JD & Pellett PE (2007) Genetic comparison of human alphaherpesvirus genomes. *Human Herpesviruses*. Edited by Arvin, A., Campadelli-fiume, G., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K., Cambridge University Press., 61-69.
- Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G & Roizman B (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *Journal of virology* 65(12):6414-6424.
- Bataille D & Epstein AL (1997) Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *Journal of virology* 71(10):7736-7743.
- Bayliss R, Littlewood T & Stewart M (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102(1):99-108.

- Beck M, Forster F, Ecke M, Plitzko JM, Melchior F, Gerisch G, Baumeister W & Medalia O (2004) Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306(5700):1387-1390.
- Bell C, Desjardins M, Thibault P & Radtke K (2013) Proteomics Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells Reveals Dynamic Changes of Viral Protein Expression, Ubiquitylation, and Phosphorylation. *Journal of proteome research* 12(4):1820-1829.
- Ben Abdeljelil N, Rochette PA & Pearson A (2013) The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* 444(1-2):263-273.
- Bertrand L (2011) Identification et caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1. *Thèse de doctorat*. INRS-Institut Armand-Frappier.
- Bertrand L & Pearson A (2008) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *The Journal of general virology* 89(Pt 5):1142-1151.
- Blakeney S, Kowalski J, Tummolo D, DeStefano J, Cooper D, Guo M, Gangolli S, Long D, Zamb T, Natuk RJ & Visalli RJ (2005) Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *Journal of virology* 79(16):10498-10506.
- Bloom D & Kwiatkowski D (2011) HSV-1 Latency and the roles of the LATs. In : *Alphaherpesviruses : Molecular Virology*. Edited by Weller, S.K.: Caister Academic Press. 295-315.
- Boehmer PE & Lehman IR (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annual review of biochemistry* 66:347-384.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J & Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7):574-585.
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW & Baudin F (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus research* 124(1-2):12-21.
- Brack AR, Klupp BG, Granzow H, Tirabassi R, Enquist LW & Mettenleiter TC (2000) Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *Journal of virology* 74(9):4004-4016.
- Brideau AD, Banfield BW & Enquist LW (1998) The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *Journal of virology* 72(6):4560-4570.
- Brownawell AM & Macara IG (2002) Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *The Journal of cell biology* 156(1):53-64.

- Bujnicki JM & Rychlewski L (2001a) Grouping together highly diverged PD-(D/E)XK nucleases and identification of novel superfamily members using structure-guided alignment of sequence profiles. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3(1):69-72.
- Bujnicki JM & Rychlewski L (2001b) The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis. *Virus genes* 22(2):219-230.
- Campbell ME, Palfreyman JW & Preston CM (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *Journal of molecular biology* 180(1):1-19.
- Cerutti A, Maillard P, Minisini R, Vidalain PO, Roohvand F, Pecheur EI, Pirisi M & Budkowska A (2011) Identification of a functional, CRM-1-dependent nuclear export signal in hepatitis C virus core protein. *PloS one* 6(10):e25854.
- Ch'ng TH & Enquist LW (2005) Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system. *Journal of virology* 79(17):10875-10889.
- Chang YE, Van Sant C, Krug PW, Sears AE & Roizman B (1997) The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *Journal of virology* 71(11):8307-8315.
- Chen X, Kube DM, Cooper MJ & Davis PB (2008) Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16(2):333-342.
- Chouljenko DV, Kim IJ, Chouljenko VN, Subramanian R, Walker JD & Kousoulas KG (2012) Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *Journal of virology* 86(8):4262-4270.
- Chowdary TK, Cairns TM, Atanasiu D, Cohen GH, Eisenberg RJ & Heldwein EE (2010) Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature structural & molecular biology* 17(7):882-888.
- Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY & Shukla D (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *The Journal of cell biology* 174(7):1009-1021.
- Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH & Campadelli-Fiume G (2004) The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19):7445-7450.
- Coen DM, Weinheimer SP & McKnight SL (1986) A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* 234(4772):53-59.

- Colleaux L, d'Auriol L, Betermier M, Cottarel G, Jacquier A, Galibert F & Dujon B (1986) Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell* 44(4):521-533.
- Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS & Longnecker R (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature reviews. Microbiology* 9(5):369-381.
- Conway JF & Homa FL (2011) Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of Herpes Simplex Virus. In : *Alphaherpesviruses : Molecular Virology*. Edited by Weller, S.K.: Caister Academic Press. 175-193.
- Cook WJ & Coen DM (1996) Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 UL24 mRNA expression via differential polyadenylation. *Virology* 218(1):204-213.
- Corbin-Lickfett KA, Rojas S, Li L, Cocco MJ & Sandri-Goldin RM (2010) ICP27 phosphorylation site mutants display altered functional interactions with cellular export factors Aly/REF and TAP/NXF1 but are able to bind herpes simplex virus 1 RNA. *Journal of virology* 84(5):2212-2222.
- Costa H, Nascimento R, Sinclair J & Parkhouse RM (2013) Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response. *PLoS pathogens* 9(9):e1003609.
- Cullen BR (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences* 28(8):419-424.
- Daelemans D, Afonina E, Nilsson J, Werner G, Kjems J, De Clercq E, Pavlakis GN & Vandamme AM (2002) A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22):14440-14445.
- Dargemont C (2002) Export nucléaire des protéines et homéostasie cellulaire. *M/S : médecine sciences* 18(12):1237-1244.
- Davison AJ (2002) Evolution of the herpesviruses. *Veterinary microbiology* 86(1-2):69-88.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ & Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Archives of virology* 154(1):171-177.
- del Rio T, Ch'ng TH, Flood EA, Gross SP & Enquist LW (2005) Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *Journal of virology* 79(7):3903-3919.
- Delius H & Clements JB (1976) A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: evidence for inversions of the unique DNA regions. *The Journal of general virology* 33(1):125-133.

- Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW, Broker TR & Chow LT (2004) Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *Journal of virology* 78(24):13954-13965.
- Deshmane SL & Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of virology* 63(2):943-947.
- Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW & Cunningham AL (2008) Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Reviews in medical virology* 18(1):35-51.
- Ding Q, Zhao L, Guo H & Zheng AC (2010) The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Virologica Sinica* 25(2):79-85.
- Dingwall C, Sharnick SV & Laskey RA (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30(2):449-458.
- Dohner K & Sodeik B (2005) The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current topics in microbiology and immunology* 285:67-108.
- Dong X, Biswas A, Suel KE, Jackson LK, Martinez R, Gu H & Chook YM (2009) Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* 458(7242):1136-1141.
- Efstathiou S, Minson AC, Field HJ, Anderson JR & Wildy P (1986) Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *Journal of virology* 57(2):446-455.
- Efstathiou S & Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus research* 111(2):108-119.
- Enquist LW, Tomishima MJ, Gross S & Smith GA (2002) Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Veterinary microbiology* 86(1-2):5-16.
- Fahrenkrog B & Aebi U (2002) The vertebrate nuclear pore complex: from structure to function. *Results and problems in cell differentiation* 35:25-48.
- Falkenberg M, Lehman IR & Elias P (2000) Leading and lagging strand DNA synthesis in vitro by a reconstituted herpes simplex virus type 1 replisome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(8):3896-3900.
- Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R & Johnson DC (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(24):10187-10192.
- Fatahzadeh M & Schwartz RA (2007) Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57(5):737-763; quiz 764-736.

- Feederle R, Bartlett EJ & Delecluse HJ (2010) Epstein-Barr virus genetics: talking about the BAC generation. *Herpesviridae* 1(1):6.
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW & Luhrmann R (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82(3):475-483.
- Fleta-Soriano E, Martinez JP, Hinkelmann B, Gerth K, Washausen P, Diez J, Frank R, Sasse F & Meyerhans A (2014) The myxobacterial metabolite ratjadone A inhibits HIV infection by blocking the Rev/CRM1-mediated nuclear export pathway. *Microbial cell factories* 13:17.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M & Mattaj IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90(6):1051-1060.
- Foster TP, Chouljenko VN & Kousoulas KG (2008) Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *Journal of virology* 82(13):6310-6323.
- Foster TP & Kousoulas KG (1999) Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *Journal of virology* 73(10):8457-8468.
- Foster TP, Melancon JM, Baines JD & Kousoulas KG (2004) The herpes simplex virus type 1 UL20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *Journal of virology* 78(10):5347-5357.
- Fridell RA, Partin KM, Carpenter S & Cullen BR (1993) Identification of the activation domain of equine infectious anemia virus rev. *Journal of virology* 67(12):7317-7323.
- Fried H & Kutay U (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60(8):1659-1688.
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H & Mettenleiter TC (1997) The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *Journal of virology* 71(7):5639-5646.
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N & Mettenleiter TC (2002) The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *Journal of virology* 76(1):364-378.
- Garber DA, Beverley SM & Coen DM (1993) Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1):459-462.
- Gomez Corredor A & Archambault D (2009) The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *Journal of virology* 83(24):12842-12853.

- Gomez Corredor A & Archambault D (2012) The bovine immunodeficiency virus Rev protein: identification of a novel nuclear import pathway and nuclear export signal among retroviral Rev/Rev-like proteins. *Journal of virology* 86(9):4892-4905.
- Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E & Prehn S (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Current biology : CB* 5(4):383-392.
- Griffiths A & Coen DM (2003) High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *Journal of virology* 77(3):2282-2286.
- Griffiths A, Renfrey S & Minson T (1998) Glycoprotein C-deficient mutants of two strains of herpes simplex virus type 1 exhibit unaltered adsorption characteristics on polarized or non-polarized cells. *The Journal of general virology* 79 ( Pt 4):807-812.
- Gruter P, Tabernero C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK & Izaurralde E (1998) TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Molecular cell* 1(5):649-659.
- Guan Y, Guo L, Yang E, Liao Y, Liu L, Che Y, Zhang Y, Wang L, Wang J & Li Q (2014) HSV-1 nucleocapsid egress mediated by UL31 in association with UL34 is impeded by cellular transmembrane protein 140. *Virology* 464-465C:1-10.
- Guttler T, Madl T, Neumann P, Deichsel D, Corsini L, Monecke T, Ficner R, Sattler M & Gorlich D (2010) NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nature structural & molecular biology* 17(11):1367-1376.
- Hahn G, Rose D, Wagner M, Rhiel S & McVoy MA (2003) Cloning of the genomes of human cytomegalovirus strains Toledo, TownevarRIT3, and Towne long as BACs and site-directed mutagenesis using a PCR-based technique. *Virology* 307(1):164-177.
- Harley CA, Dasgupta A & Wilson DW (2001) Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *Journal of virology* 75(3):1236-1251.
- Hayward GS, Jacob RJ, Wadsworth SC & Roizman B (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11):4243-4247.
- Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR & Spear PG (1994) Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *The Journal of general virology* 75 ( Pt 6):1211-1222.
- Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J & Paschal BM (2001) Calreticulin Is a receptor for nuclear export. *The Journal of cell biology* 152(1):127-140.

- Holland LE, Anderson KP, Shipman C, Jr. & Wagner EK (1980) Viral DNA synthesis is required for the efficient expression of specific herpes simplex virus type 1 mRNA species. *Virology* 101(1):10-24.
- Holland DJ, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P & Cunningham AL (1999) Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *Journal of virology* 73(10):8503-8511.
- Honess RW & Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of virology* 14(1):8-19.
- Imamoto N, Shimamoto T, Takao T, Tachibana T, Kose S, Matsubae M, Sekimoto T, Shimonishi Y & Yoneda Y (1995) In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *The EMBO journal* 14(15):3617-3626.
- Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T & Tsurumi T (2010) The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PloS one* 5(7):e11901.
- Ito H, Sommer MH, Zerboni L, Baiker A, Sato B, Liang R, Hay J, Ruyechan W & Arvin AM (2005) Role of the varicella-zoster virus gene product encoded by open reading frame 35 in viral replication in vitro and in differentiated human skin and T cells in vivo. *Journal of virology* 79(8):4819-4827.
- Jacobson JG, Chen SH, Cook WJ, Kramer MF & Coen DM (1998) Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* 242(1):161-169.
- Jacobson JG, Martin SL & Coen DM (1989) A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *Journal of virology* 63(4):1839-1843.
- Jambunathan N, Chouljenko D, Desai P, Charles AS, Subramanian R, Chouljenko VN & Kousoulas KG (2014) Herpes Simplex Virus 1 Protein UL37 Interacts with Viral Glycoprotein gK and Membrane Protein UL20 and Functions in Cytoplasmic Virion Envelopment. *Journal of virology* 88(11):5927-5935.
- Jarvis MA & Nelson JA (2002) Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Current opinion in microbiology* 5(4):403-407.
- Jayachandra S, Baghian A & Kousoulas KG (1997) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *Journal of virology* 71(7):5012-5024.

- Johnson DC & Baines JD (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature reviews. Microbiology* 9(5):382-394.
- Johnson LA, Li L & Sandri-Goldin RM (2009a) The cellular RNA export receptor TAP/NXF1 is required for ICP27-mediated export of herpes simplex virus 1 RNA, but the TREX complex adaptor protein Aly/REF appears to be dispensable. *Journal of virology* 83(13):6335-6346.
- Johnson LA & Sandri-Goldin RM (2009b) Efficient nuclear export of herpes simplex virus 1 transcripts requires both RNA binding by ICP27 and ICP27 interaction with TAP/NXF1. *Journal of virology* 83(3):1184-1192.
- Juillard F, Hiriart E, Sergeant N, Vingtdoux-Didier V, Drobecq H, Sergeant A, Manet E & Gruffat H (2009) Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *Journal of virology* 83(24):12759-12768.
- Jurak I, Silverstein LB, Sharma M & Coen DM (2012) Herpes simplex virus is equipped with RNA- and protein-based mechanisms to repress expression of ATRX, an effector of intrinsic immunity. *Journal of virology* 86(18):10093-10102.
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF & Smith AE (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311(5981):33-38.
- Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T, Tsujimura K, Madbouly H, Yamaguchi T, Ohya K & Fukushi H (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400(2):259-270.
- Kelly BJ, Bauerfeind R, Binz A, Sodeik B, Laimbacher AS, Fraefel C & Diefenbach RJ (2014) The interaction of the HSV-1 tegument proteins pUL36 and pUL37 is essential for secondary envelopment during viral egress. *Virology* 454-455:67-77.
- Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2009) Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus research* 145(2):173-186.
- Kimberlin DW & Whitley RJ (Édit) (2007) Antiviral therapy of HSV-1 and -2. *Human Herpesviruses*. Edited by Arvin, A., Campadelli-fiume, G., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K., Cambridge University Press., 1153-1174
- Kirschner RH, Rusli M & Martin TE (1977) Characterization of the nuclear envelope, pore complexes, and dense lamina of mouse liver nuclei by high resolution scanning electron microscopy. *The Journal of cell biology* 72(1):118-132.
- Kmiec E & Holloman WK (1981) Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *The Journal of biological chemistry* 256(24):12636-12639.

- Knez J, Bilan PT & Capone JP (2003) A single amino acid substitution in herpes simplex virus type 1 VP16 inhibits binding to the virion host shutoff protein and is incompatible with virus growth. *Journal of virology* 77(5):2892-2902.
- Knipe DM & Cliffe A (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature reviews. Microbiology* 6(3):211-221.
- Knizewski L, Kinch L, Grishin NV, Rychlewski L & Ginalski K (2006) Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *Journal of virology* 80(5):2575-2577.
- Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M & Yanagawa H (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *The Journal of biological chemistry* 284(1):478-485.
- Kovall R & Matthews BW (1997) Toroidal structure of lambda-exonuclease. *Science* 277(5333):1824-1827.
- Kramer MF, Jurak I, Pesola JM, Boissel S, Knipe DM & Coen DM (2011) Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia. *Virology* 417(2):239-247.
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M & Horinouchi S (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(16):9112-9117.
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R & Gorlich D (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90(6):1061-1071.
- LaBoissiere S & O'Hare P (2000) Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells. *Journal of virology* 74(1):99-109.
- Lafferty WE, Downey L, Celum C & Wald A (2000) Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. *The Journal of infectious diseases* 181(4):1454-1457.
- Lam Q, Smibert CA, Koop KE, Lavery C, Capone JP, Weinheimer SP & Smiley JR (1996) Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *The EMBO journal* 15(10):2575-2581.
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE & Corbett AH (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of biological chemistry* 282(8):5101-5105.
- Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R & Glorioso JC (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which

- differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of virology* 72(7):6119-6130.
- Leiva-Torres GA, Rochette PA & Pearson A (2010) Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *The Journal of general virology* 91(Pt 5):1109-1116.
- Li X & Zhu F (2009) Identification of the nuclear export and adjacent nuclear localization signals for ORF45 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* 83(6):2531-2539.
- Lin SR, Jiang MJ, Wang HH, Hu CH, Hsu MS, Hsi E, Duh CY & Wang SK (2013) Human cytomegalovirus UL76 elicits novel aggresome formation via interaction with S5a of the ubiquitin proteasome system. *Journal of virology* 87(21):11562-11578.
- Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, Hartmann E, Kutay U & Gorlich D (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *The EMBO journal* 19(16):4362-4371.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of virology* 82(17):8605-8618.
- Lymberopoulos MH, Bourget A, Ben Abdeljelil N & Pearson A (2011) Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412(2):341-348.
- Lymberopoulos MH & Pearson A (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.
- Masiuk M (2008) Nucleolin-characteristics of protein and its role in biology of cancers and viral infections. *Adv Cell Biol.* 35:1-19.
- McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE & Telford EA (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of molecular biology* 247(3):443-458.
- McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE & Taylor P (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *The Journal of general virology* 69 ( Pt 7):1531-1574.
- Mears WE, Lam V & Rice SA (1995) Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *Journal of virology* 69(2):935-947.
- Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology* 76(4):1537-1547.
- Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus research* 106(2):167-180.

- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2009) Herpesvirus assembly: an update. *Virus research* 143(2):222-234.
- Meyer BE & Malim MH (1994) The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & development* 8(13):1538-1547.
- Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ & Spear PG (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
- Morfin F & Thouvenot D (2003) Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 26(1):29-37.
- Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, Jamal S, Frangeul A, Baronti C, Charrel R, de Lamballerie X, Vonrhein C, Lescar J, Bricogne G, Gunther S & Canard B (2010) The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS pathogens* 6(9):e1001038.
- Munoz-Fontela C, Collado M, Rodriguez E, Garcia MA, Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Nombela C & Rivas C (2005) Identification of a nuclear export signal in the KSHV latent protein LANA2 mediating its export from the nucleus. *Experimental cell research* 311(1):96-105.
- Nagaike K, Mori Y, Gomi Y, Yoshii H, Takahashi M, Wagner M, Koszinowski U & Yamanishi K (2004) Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli. *Vaccine* 22(29-30):4069-4074.
- Nascimento R, Dias JD & Parkhouse RM (2009) The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Archives of virology* 154(7):1143-1149.
- Negatsch A, Granzow H, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W, Teifke JP & Mettenleiter TC (2010) Ultrastructural analysis of virion formation and intraaxonal transport of herpes simplex virus type 1 in primary rat neurons. *Journal of virology* 84(24):13031-13035.
- Nicola AV, Hou J, Major EO & Straus SE (2005) Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *Journal of virology* 79(12):7609-7616.
- Nicola AV, McEvoy AM & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Journal of virology* 77(9):5324-5332.
- Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S & Beppu T (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *The Journal of biological chemistry* 269(9):6320-6324.

- Ossareh-Nazari B, Bachelierie F & Dargemont C (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278(5335):141-144.
- Ossareh-Nazari B & Dargemont C (1999) Domains of Crm1 involved in the formation of the Crm1, RanGTP, and leucine-rich nuclear export sequences trimeric complex. *Experimental cell research* 252(1):236-241.
- Ossareh-Nazari B, Gwizdek C & Dargemont C (2001) Protein export from the nucleus. *Traffic* 2(10):684-689.
- Otero GC, Harris ME, Donello JE & Hope TJ (1998) Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Journal of virology* 72(9):7593-7597.
- Pan D, Flores O, Umbach JL, Pesola JM, Bentley P, Rosato PC, Leib DA, Cullen BR & Coen DM (2014) A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency. *Cell host & microbe* 15(4):446-456.
- Pearson A & Coen DM (2002) Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 76(21):10821-10828.
- Penfold ME, Armati P & Cunningham AL (1994) Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14):6529-6533.
- Peng W, Vitvitskaia O, Carpenter D, Wechsler SL & Jones C (2008) Identification of two small RNAs within the first 1.5-kb of the herpes simplex virus type 1-encoded latency-associated transcript. *Journal of neurovirology* 14(1):41-52.
- Perng GC, Dunkel EC, Geary PA, Slanina SM, Ghiasi H, Kaiwar R, Nesburn AB & Wechsler SL (1994) The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *Journal of virology* 68(12):8045-8055.
- Perng GC, Ghiasi H, Slanina SM, Nesburn AB & Wechsler SL (1996) The spontaneous reactivation function of the herpes simplex virus type 1 LAT gene resides completely within the first 1.5 kilobases of the 8.3-kilobase primary transcript. *Journal of virology* 70(2):976-984.
- Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, Slanina SM, Hofman FM, Ghiasi H, Nesburn AB & Wechsler SL (2000) Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 287(5457):1500-1503.

- Pertel PE, Fridberg A, Parish ML & Spear PG (2001) Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279(1):313-324.
- Petosa C, Schoehn G, Askjaer P, Bauer U, Moulin M, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Baudin F, Mattaj IW & Muller CW (2004) Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Molecular cell* 16(5):761-775.
- Post LE, Mackem S & Roizman B (1981) Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters. *Cell* 24(2):555-565.
- Preston CM & Newton AA (1976) The effects of herpes simplex virus type 1 on cellular DNA-dependent RNA polymerase activities. *The Journal of general virology* 33(3):471-482.
- Ribbeck K & Gorlich D (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *The EMBO journal* 20(6):1320-1330.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA & Dingwall C (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64(3):615-623.
- Roizman B, Knipe DM & Whitley RJ (2013) Herpes Simplex Viruses. In *Fields Virology*, 6th edn, edited by Knipe, D.M. and P. M.Howley: Lippincott Williams & Wilkins.
- Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J & DeSalvo D (2000) Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *Journal of virology* 74(1):117-129.
- Romanelli MG & Morandi C (2002) Importin alpha binds to an unusual bipartite nuclear localization signal in the heterogeneous ribonucleoprotein type I. *European journal of biochemistry / FEBS* 269(11):2727-2734.
- Rout MP & Wentz SR (1994) Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends in cell biology* 4(10):357-365.
- Ruyechan WT, Morse LS, Knipe DM & Roizman B (1979) Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *Journal of virology* 29(2):677-697.
- Sakaki Y, Karu AE, Linn S & Echols H (1973) Purification and properties of the gamma-protein specified by bacteriophage lambda: an inhibitor of the host RecBC recombination enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(8):2215-2219.

- Saksena MM, Wakisaka H, Tijono B, Boadle RA, Rixon F, Takahashi H & Cunningham AL (2006) Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. *Journal of virology* 80(7):3592-3606.
- Sanders PG, Wilkie NM & Davison AJ (1982) Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *The Journal of general virology* 63(2):277-295.
- Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ & Chiu W (1989) Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56(4):651-660.
- Schwartz TU (2005) Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Current opinion in structural biology* 15(2):221-226.
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Luhrmann R & Hurt E (1997) Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *The EMBO journal* 16(11):3256-3271.
- Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD & Spear PG (1992) Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of cell biology* 116(5):1273-1281.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y & Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(18):8794-8797.
- Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD & Spear PG (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
- Siew VK, Duh CY & Wang SK (2009) Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *Journal of biomedical science* 16:107.
- Snyder A, Bruun B, Browne HM & Johnson DC (2007) A herpes simplex virus gD-YFP fusion glycoprotein is transported separately from viral capsids in neuronal axons. *Journal of virology* 81(15):8337-8340.
- Sodeik B, Ebersold MW & Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of cell biology* 136(5):1007-1021.
- Spivack JG & Fraser NW (1987) Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *Journal of virology* 61(12):3841-3847.
- Spruance SL, Tying SK, DeGregorio B, Miller C & Beutner K (1996) A large-scale, placebo-controlled, dose-ranging trial of peroral valaciclovir for episodic treatment of recurrent herpes genitalis. Valaciclovir HSV Study Group. *Archives of internal medicine* 156(15):1729-1735.

- Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML & Feldman LT (1987) RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235(4792):1056-1059.
- Stuven T, Hartmann E & Gorlich D (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *The EMBO journal* 22(21):5928-5940.
- Subak-Sharpe JH & Dargan DJ (1998) HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus genes* 16(3):239-251.
- Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y & Arase H (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(2):866-871.
- Tajrishi MM, Tuteja R & Tuteja N (2011) Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & integrative biology* 4(3):267-275.
- Thompson RL & Sawtell NM (1997) The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *Journal of virology* 71(7):5432-5440.
- Thompson RL & Sawtell NM (2001) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *Journal of virology* 75(14):6660-6675.
- Tischer BK, Smith GA & Osterrieder N (2010) En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* 634:421-430.
- Tischer BK, von Einem J, Kaufer B & Osterrieder N (2006) Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *BioTechniques* 40(2):191-197.
- Tognon M, Guandalini R, Romanelli MG, Manservigi R & Trevisani B (1991) Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus research* 18(2-3):135-150.
- Tomishima MJ & Enquist LW (2002) In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons. *Journal of virology* 76(16):8310-8317.
- Turcotte S, Letellier J & Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *Journal of virology* 79(14):8847-8860.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM & Cullen BR (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.

- Visalli RJ, Natuk RJ, Kowalski J, Guo M, Blakeney S, Gangolli S & Cooper D (2014) Vaccination with a HSV-2 UL24 mutant induces a protective immune response in murine and guinea pig vaginal infection models. *Vaccine* 32(12):1398-1406.
- Wang SK, Duh CY & Chang TT (2000) Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 81(Pt 10):2407-2416.
- Wang SK, Duh CY & Wu CW (2004) Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *Journal of virology* 78(18):9750-9762.
- Wang Y, Mao M & Xu JC (2011) Cell-surface nucleolin is involved in lipopolysaccharide internalization and signalling in alveolar macrophages. *Cell biology international* 35(7):677-685.
- Ward PL, Campadelli-Fiume G, Avitabile E & Roizman B (1994) Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *Journal of virology* 68(11):7406-7417.
- Weis K (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Current opinion in cell biology* 14(3):328-335.
- Weis K, Mattaj JW & Lamond AI (1995) Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* 268(5213):1049-1053.
- Weller SK, Seghatoleslami MR, Shao L, Rowse D & Carmichael EP (1990) The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is not essential for viral DNA synthesis: isolation and characterization of a lacZ insertion mutant. *The Journal of general virology* 71 ( Pt 12):2941-2952.
- Wen KW & Damania B (2010) Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer letters* 289(2):140-150.
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY & Taylor SS (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82(3):463-473.
- Whitbeck JC, Lawrence WC & Bello LJ (1994) Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* 200(1):263-270.
- Whitley RJ, Kimberlin DW & Prober CG (Édit) (2007) Pathogenesis and disease. *Human Herpesviruses*. Edited by Arvin, A., Campadelli-fiume, G., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K., Cambridge University Press., 589-601.
- Whitley RJ & Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.
- Williams BJ, Boyne JR, Goodwin DJ, Roaden L, Hautbergue GM, Wilson SA & Whitehouse A (2005) The prototype gamma-2 herpesvirus nucleocytoplasmic shuttling protein, ORF 57,

transports viral RNA through the cellular mRNA export pathway. *The Biochemical journal* 387(Pt 2):295-308.

Williams P, Verhagen J & Elliott G (2008) Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. *Journal of virology* 82(21):10946-10952.

Wilson SS, Fakioglu E & Herold BC (2009) Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert review of anti-infective therapy* 7(5):559-568.

Wisner TW, Sugimoto K, Howard PW, Kawaguchi Y & Johnson DC (2011) Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms. *Journal of virology* 85(12):5919-5928.

WuDunn D & Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of virology* 63(1):52-58.

Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA & Kornbluth S (1998) Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes & development* 12(14):2131-2143.

Zagursky RJ & Hays JB (1983) Expression of the phage lambda recombination genes *exo* and *bet* under *lacPO* control on a multi-copy plasmid. *Gene* 23(3):277-292.

Zheng C, Brownlie R, Babiuk LA & van Drunen Littel-van den Hurk S (2005) Characterization of the nuclear localization and nuclear export signals of bovine herpesvirus 1 VP22. *Journal of virology* 79(18):11864-11872.

Zheng C, Lin F, Wang S & Xing J (2011) A novel virus-encoded nucleocytoplasmic shuttling protein: the UL3 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of virological methods* 177(2):206-210.

Zhu FX, Li X, Zhou F, Gao SJ & Yuan Y (2006) Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 by bacterial artificial chromosome-based mutagenesis. *Journal of virology* 80(24):12187-12196.