

Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

**L'importance des résidus hautement conservés de la protéine virale
UL24 dans la pathogenèse du virus de l'herpès simplex 1**

par
Gabriel André Leiva-Torres

Mémoire présenté
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :	Patrick Labonté, PhD. INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe :	Guy Lemay, PhD. Département de Microbiologie et Immunologie Université de Montréal
Directrice de recherche :	Angela Pearson, PhD. INRS – Institut Armand-Frappier

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre.

Aristote

Remerciement

Pour commencer, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son soutien m'a permis d'acquérir les connaissances et les compétences qui me permettront d'avancer toujours plus loin et de viser plus dans chaque étape de ma carrière scientifique. Merci pour tout.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire, présent et passé, que j'ai eu la joie de travailler. Un merci particulier à Alain Boulende Saboubanga et Alexandre Rochette Legros pour leur aide précieuse lors des expériences avec les souris. Merci aussi à Maria Lymberopoulos et Luc Bertrand pour toute l'aide et les réponses à mes questions parfois nombreuses! Je veux aussi remercier Ginette Denis, dont le travail et la gentillesse nous ont permis de travailler dans un environnement des plus agréables.

Aussi, je tiens à remercier mes parents et mon frère pour leur appui à chaque étape de mon parcours académique. Leur confiance en moi a toujours été une source d'énergie et de persévérance.

Finalement, je veux absolument remercier ma fiancée, Noémie Bérubé-Carrière. Elle m'a toujours encouragé et soutenu lorsque j'en avais le plus besoin. Je veux aussi la remercier pour sa patience, son écoute et son appui qui m'ont aidé à réussir cette étape importante.

Merci à tous!

Résumé

La majorité des adultes nord-américains sont infectés par le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1). Typiquement, après une infection oro-labiale, le virus infecte les neurones sensitifs et établit la latence dans les ganglions trigéminaux. Périodiquement, le virus se réactive, causant des infections récurrentes. Dans un modèle murin d'infection oculaire, les virus déficients en UL24 (UL24X) ont une réplication oculaire diminuée, une réplication neuronale fortement réduite et une réactivation pratiquement absente. Contrairement au virus de type sauvage (KOS), UL24X forme des plages de lyse syncytiale à des températures élevées et a une réplication réduite. UL24 est très conservé chez les *Herpesviridae*. Cinq domaines d'homologie ont été identifiés, dans lesquels plusieurs acides aminés sont hautement conservés dont certains formeraient un motif d'endonucléase de type PD (D/E)xK. Notre hypothèse est que ces résidus hautement conservés sont importants pour la pathogenèse du VHS-1.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons généré plusieurs versions mutantes du gène *UL24* codant pour une ou deux substitutions d'acides aminés hautement conservés. Des virus recombinants ont été produits en co-transfectant un vecteur contenant le gène *UL24* muté et l'ADN viral infectieux de vUL24 eGFPB contenant une cassette eGFP dans le cadre de lecture ouvert d'*UL24*. Les recombinants ont été criblés par la perte de fluorescence. Trois virus ont été produits : vUL24 E99AK101A, ciblant le site catalytique de la fonction putative d'endonucléase, vUL24 G121A, ciblant un résidu situé dans un domaine d'homologie adjacent à celui du motif d'endonucléase et vUL24 Q154A, visant un résidu hautement conservé du cinquième domaine. À 39°C, vUL24 Q154A a formé de petits syncytiums, vUL24 G121A a produit des syncytiums de taille moyenne et vUL24 E99AK101A a produit de gros syncytiums comparables à ceux d'UL24X. Aussi, la mutation des résidus E99 et K101 a engendré une baisse de la réplication virale.

Afin de déterminer l'effet de ces mutations sur la pathogenèse, les virus recombinants ont été testés dans un modèle murin d'infection oculaire. En mutant le résidu Q154A, peu d'effets ont été observés sur la réplication aiguë oculaire, tandis que la

réplication aiguë neuronale a été réduite. Lors des essais de réactivation d'explants de ganglions trigéminaux, le taux de réactivation des ganglions infectés par vUL24 Q154A était de 50 %. vUL24 G121A a eu une réplication aiguë oculaire et neuronale similaire au virus KOS et un taux de réactivation semblable à celui du virus de type sauvage. Chez vUL24 E99AK101A, la réplication aiguë oculaire a été inférieure à celle de KOS et la réplication neuronale a été diminuée de plus de 2 logs. Aussi, la réactivation a été observée chez moins de 40 % des ganglions infectés. Cette étude a permis de déterminer que le site catalytique potentiel était crucial pour la pathogenèse du virus, tandis que le résidu Q154 a eu une importance moindre et que G121 était peu important pour la pathogenèse du VHS-1, malgré sa forte conservation et que la substitution de ce résidu cause la formation de plages syncytiales. Aussi, nous corroborons l'hypothèse qu'UL24 pourrait être une protéine multifonctionnelle, puisque la mutation du motif d'endonucléase n'a pas produit un phénotype similaire à celui d'UL24X.

Gabriel André Leiva-Torres

Angela Pearson

Table des matières

Remerciement	iii
Résumé	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
1 Revue de la littérature	1
1.1 Famille des virus herpès humains	1
1.2 La pathogenèse du VHS-1	1
1.3 Structure du VHS-1	3
1.4 Cycle de réplication du VHS-1	4
1.5 Infection latente	7
1.5.1 Vue d'ensemble de l'infection latente	7
1.5.2 Les mécanismes moléculaires de la latence	8
1.5.2.1 Entrée en latence du VHS-1	8
1.5.2.2 État du génome viral latent	9
1.5.2.3 Transcrits viraux spécifiques à la latence : les « latency associated transcripts »	9
1.5.2.4 La réactivation	10
1.6 La protéine virale UL24	10
1.6.1 Importance d'UL24 en culture cellulaire	10
1.6.2 Importance d'UL24 dans la pathogenèse	11
1.6.3 Caractéristiques du gène <i>UL24</i>	12
1.6.4 Caractéristiques de la protéine UL24	13

1.6.4.1	Niveau de conservation d'UL24	13
1.6.4.2	Motif d'endonucléase PD (D/E)xK	14
1.6.5	Localisation cellulaire d'UL24	15
1.6.6	Effets sur la nucléoline	16
1.6.7	Autres activités associées à UL24 et ses homologues	17
1.7	Modèle d'infection in vivo	17
1.7.1	Cochon d'Inde	17
1.7.2	Lapin	18
1.7.3	Souris	18
2	Problématique	19
3	Matériel et méthodes	20
3.1	Cellules et virus	20
3.1.1	Lignées cellulaires	20
3.1.2	Origine des virus et production de stocks viraux	20
3.1.3	Détermination des titres viraux	21
3.2	Mutagenèse	21
3.2.1	Mutagenèse dirigée par PCR	21
3.2.2	Plasmides et sous-clonage	24
3.3	Immunobuvardage de type western	25
3.3.1	Transfection de cellules COS-7	25
3.3.2	Essais luciférase	26
3.3.3	Immunobuvardage de type western	26
3.3.4	Anticorps	27
3.4	Production de virus recombinants	27
3.4.1	Extraction de l'ADN viral	28
3.4.2	Co-transfection de l'ADN viral et du plasmide transfert	28
3.4.3	Criblage des virus recombinants	29
3.4.4	Séquençage d'UL24 à partir du génome viral	29
3.5	Cinétique d'infection	30
3.6	Étude la morphologie des plages de lyse	31

3.7	Caractérisation in vivo des virus mutants	31
3.7.1	Infection des souris	31
3.7.2	Caractérisation de la réplication oculaire aiguë	32
3.7.3	Caractérisation de la réplication neuronale aiguë	32
3.7.4	Évaluation de la capacité de réactivation des virus recombinants	33
3.7.5	Quantification de l'établissement de la latence des virus mutants	33
4	Résultats	35
4.1	Mutagenèse des acides aminés hautement conservés d'UL24	35
4.2	Expression des versions mutées d'UL24	35
4.2.1	Expression des versions mutantes d'UL24 en cellules transfectées	36
4.3	Création de virus mutants	37
4.3.1	Génération de virus par recombinaison homologue	37
4.3.2	Virus recombinants produits	38
4.4	Caractérisation des virus mutants en culture cellulaire	40
4.4.1	Expression d'UL24 chez les virus recombinants	40
4.4.2	Expression de TK chez les virus recombinants	41
4.4.3	Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants	42
4.4.4	Capacité des virus recombinants à se répliquer	45
4.5	Caractérisation in vivo des virus mutants	47
4.5.1	Modèle murin d'infection oculaire	47
4.5.2	Quantification de la réplication aiguë oculaire des virus recombinants	48
4.5.3	Quantification de la réplication aiguë neuronale des virus recombinants	50
4.5.4	Capacité de réactivation de virus recombinants	51
5	Discussion	54
5.1	L'expression des protéines UL24 avec des substitutions d'acides aminés hautement conservés.	54
5.2	Implication des résidus hautement conservés dans la formation de syncytiums	55
5.3	Implication des résidus hautement conservés dans le niveau de réplication du VHS-1 en culture cellulaire	57

5.4	Importance de certains résidus hautement conservés d'UL24 dans la réplication aiguë oculaire du VHS-1	58
5.5	Impact de la mutation des résidus hautement conservés dans la réplication neuronale aiguë du VHS-1	58
5.6	Importance différentielle des acides aminés hautement conservés d'UL24 dans la réactivation virale	60
5.7	La fonction potentielle d'endonucléase d'UL24	62
5	Conclusion	64
6	Appendice	66
	Développement d'essais pour la quantification de l'établissement de la latence	66
8	Références	71

Liste des figures

Figure 1 - Structure du VHS-1	3
Figure 2 – Structure du génome du VHS-1	4
Figure 3 – Cycle lytique de réplication du VHS-1	5
Figure 4 – Vue d’ensemble de l’infection par le VHS-1	7
Figure 5 – Représentation de la région génomique entourant UL24 et de ses transcrits	13
Figure 6 – Séquence en acides aminés de la protéine UL24	15
Figure 7 – Sous-clonage des versions mutées d’UL24 dans un plasmide d’expression mammifère	25
Figure 8 – Expression des versions mutantes UL24 dans un contexte de transfection transitoire	37
Figure 9 - Alignement des séquences d’UL24 du VHS-1 et de ses homologues chez 19 autres virus herpès	39
Figure 10 – Expression d’UL24 chez les différents virus recombinants	41
Figure 11 – Expression de TK chez les différents virus recombinants	42
Figure 12 – Morphologie des plages de lyse formées par les virus mutants pour UL24 à différentes températures	43
Figure 13 – Capacité de réplication des virus recombinants en culture cellulaire	46
Figure 14 – Déroulement typique d’une expérience avec des souris	48
Figure 15 – Niveau de réplication aiguë oculaire des virus mutant pour UL24	49
Figure 16 – Niveau de réplication aiguë neuronale des virus mutants pour UL24	50
Figure 17 – Spécificité des réactions de PCR dirigé contre le gène viral <i>ICP4</i> et le gène cellulaire <i>adipsine</i>	66
Figure 18 – Courbes standards de l’essai de qPCR utilisée pour la quantification du gène viral <i>ICP4</i> et du gène cellulaire <i>adipsine</i>	67
Figure 19 – Courbes de dissociation de l’essai de qPCR utilisée pour la quantification du gène viral <i>ICP4</i> et du gène cellulaire <i>adipsine</i>	68

Liste des tableaux

Tableau I – Liste des amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée par PCR	23
Tableau II – Liste des versions mutantes d'UL24	35
Tableau III – Taux de réactivation des virus mutants pour UL24 suite à une période de latence	52

Liste des abréviations

α	Gène immédiat-précoce
β	Gène précoce
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle's Medium
EBV	Virus d'Epstein Barr
eGFP	« enhanced Green Fluorescence Protein »
γ	Gène tardif (« late »)
$\gamma 1$	Gène « leaky late »
$\gamma 2$	Gène « true late »
GT	Ganglion trigéminal
HA	Étiquette Hémaglutinnine
HCF	Host Cell Factor
HCMV	Cytomégalovirus humain
HHV-6	Virus herpes humain 6
HHV-7	Virus herpes humain 7
Hpi	Heures post-infection
HRP	Péroxydase de raifort
HVEM	Herpes virus entry mediator
KSHV	Virus du sarcome de Kaposi
ICP	« Infected Cell Protein »
Jpi	Jours post infection
LATs	« Latency associated transcripts »
LB	milieu Luria-Bertani
MHV68	Gammaherpesvirus murin 68
MOI	Multiplicité d'infection
NCS	Sérum de veau nouveau-né
P/S	Pénicilline et streptomycine
PBS	« Phosphate buffered saline »
PFU	Unité formatrice de plages
PVDF	« Polyvinylidene fluoride »

Oct-1	« Octamer binding protein-1 »
ORF	« Open Reading Frame »
PCR	« Polymerase chain reaction »
qPCR	PCR en temps réel
RLU	Unités relatives de luminescence
SCID	« Severe Combined Immunodeficiency »
TK	Thymidine kinase virale
TTBS	« Tween-20 Tris buffered saline »
U _L	Région unique longue
U _S	Région unique courte
VHS-1	Virus de l'herpès simplex de type 1
VHS-2	Virus de l'herpès simplex de type 2
VP	Viral Protein
VZV	Virus de la varicelle

1 Revue de la littérature

1.1 Famille des virus herpès humains

La famille des virus herpès infecte une très grande variété d'hôtes, allant du poisson-chat à l'humain (Roizmann et al., 1992). Les virus herpès sont classés en trois sous-familles selon la similarité de leurs génomes et leurs propriétés biologiques (revu par Subak-Sharpe et Dargan, 1998; Davison, 2002). Les *Alphaherpesvirinae* sont des virus neurotropiques pouvant aussi s'attaquer aux muqueuses. Leur cycle de réplication est court. Généralement, ils forment des plaies apparentes sur la peau. Les virus de l'herpès simplex de type 1 (VHS-1) et 2 (VHS-2), ainsi que le virus de la varicelle (VZV) font partis de cette sous-famille de virus herpès humains. Les *Betaherpesvirinae* sont des virus qui peuvent autant s'attaquer à des cellules lymphoïdes ou d'autres tissus. Ces virus ont un cycle de réplication long. Dans cette sous-famille, nous retrouvons le cytomégalovirus humain (HCMV), le virus herpès humain 6 (HHV-6) et 7 (HHV-7). Finalement, les *Gammapherpesvirinae* sont des virus lymphotropiques ayant aussi un cycle de réplication long. Ces virus sont oncogéniques. Le virus d'Epstein Barr (EBV) et le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) forment cette sous-famille (revu par Roizman et Pellett, 2001). Dans cette étude, je me suis intéressé au VHS-1.

1.2 La pathogenèse du VHS-1

Le VHS-1 est très répandu dans la population. Selon les régions, la prévalence du virus varie de 70 % à 100 % de la population adulte (Liedtke et al., 1993). La prévalence du virus augmente avec l'âge. Ainsi, dans les pays développés, près de 30 % des enfants ont été infectés par le VHS-1, tandis qu'à la fin de l'adolescence, cette proportion augmente à 70 % (Whitley, Kimberlin et Roizman, 1998). Chez certaines personnes, l'infection peut être asymptomatique, tandis que chez d'autres, nous verrons l'apparition des plaies distinctives du virus.

Lors de l'infection aiguë, le VHS-1 cause des éruptions cutanées. Ces éruptions sont généralement bénignes et se résorbent d'elles-mêmes. Cependant, lorsque cette infection survient chez des personnes n'ayant pas un système immunitaire pleinement développé, tel que les nouveaux nés, l'infection aiguë peut être plus sévère et causer des encéphalites virales. Des plaques herpétiques au niveau des yeux, la bouche, la peau et des infections disséminées peuvent aussi se développer (revu par Kimberlin, 2004). Dans ce cas, des traitements sont nécessaires. Mais même avec les traitements, il peut y avoir des conséquences neurologiques permanentes.

En plus des infections aiguës, le VHS-1 est capable d'établir la latence chez l'hôte et peut provoquer des infections récurrentes. Près de 30 % de la population souffre d'infections herpétiques récurrentes chroniques (Liesegang, 2001). Typiquement, lors d'une infection oro-labiale, le VHS-1 établit la latence dans les ganglions trigéminaux. Généralement, suite à la réactivation du virus, l'infection affectera une région proche du site primaire d'infection. Cependant, la réactivation peut se diriger vers la cornée, provoquant des kératites virales. Ces infections oculaires récurrentes peuvent laisser des lésions permanentes. Ainsi, les infections récurrentes oculaires herpétiques sont la première cause de cécité due à un pathogène en occident (Streilein, Dana et Ksander, 1997). De plus, lorsque la réactivation survient chez une personne immunocompromise, l'infection devient alors beaucoup plus sérieuse. Chez les sidéens ou les greffés, la réactivation du VHS-1 peut causer des infections fulminantes provoquant l'infection des organes internes de l'individu et des plaques herpétiques étendues (Rand et al., 1977; Mann et al., 1984). Des traitements aux antiviraux sont donc nécessaires.

Les infections au VHS-1 peuvent être traitées avec des antiviraux de type acyclovir. Il s'agit d'un analogue de guanine inhibant la réplication de l'ADN viral (Elion et al., 1977). Surtout chez les personnes immunocompromises, l'apparition de résistance virale à l'acyclovir peut être observée (Morfin et Thouvenot, 2003), rendant le traitement beaucoup plus compliqué. Finalement, aucun vaccin n'est disponible contre le VHS-1. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires de la pathogenèse du VHS-1 est importante.

1.3 Structure du VHS-1

La structure du VHS-1 ressemble à celle des autres virus herpès (Figure 1). Le VHS-1 possède un génome d'ADN double brin d'une taille de 152 kb. Ce génome est contenu dans une capsidie de type icosaédrale d'environ 100 nm (Subak-Sharpe et Dargan, 1998). Cette capsidie est entourée par des protéines formant le tégment. La capsidie et le tégment sont entourés par une enveloppe bilipidique dans laquelle sont insérées diverses glycoprotéines virales. Onze glycoprotéines sont retrouvées à la surface du virion (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gL, gM et gN). En plus des glycoprotéines, des protéines non glycosylées (entre autres U_L20 et U_S9) sont aussi présentes à la surface du virus (revu par Roizman, Knipe et Whitley, 2007; Stannard, Fuller et Spear, 1987).

Le génome d'ADN double brin du virus a lui aussi une structure particulière. Les deux brins d'ADN sont codants. Le génome du VHS-1 code pour plus de 84 protéines (revu par Roizman, Knipe et Whitley, 2007). Il est composé de deux régions nommées Unique Longue (U_L) et Unique Courte (U_S) (Figure 2). Ces deux régions contiennent des gènes qui se retrouvent en une seule copie dans le génome (McGeoch et al., 1988).

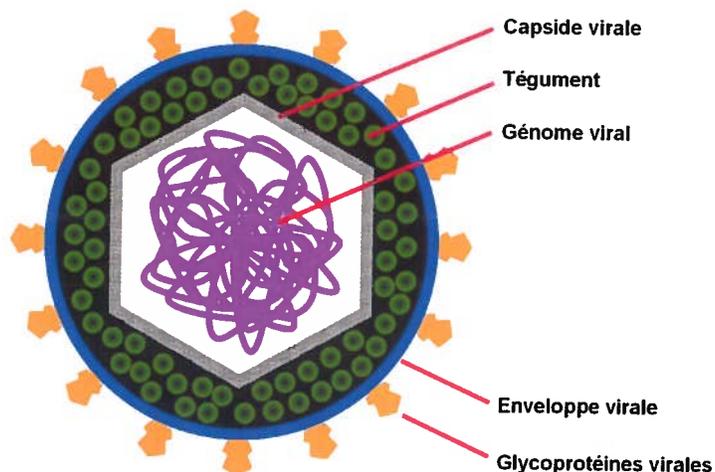


Figure 1 - Structure du VHS-1

Schéma du VHS-1 montrant les différentes parties formant le virion. Les différentes composantes sont identifiées sur la figure.

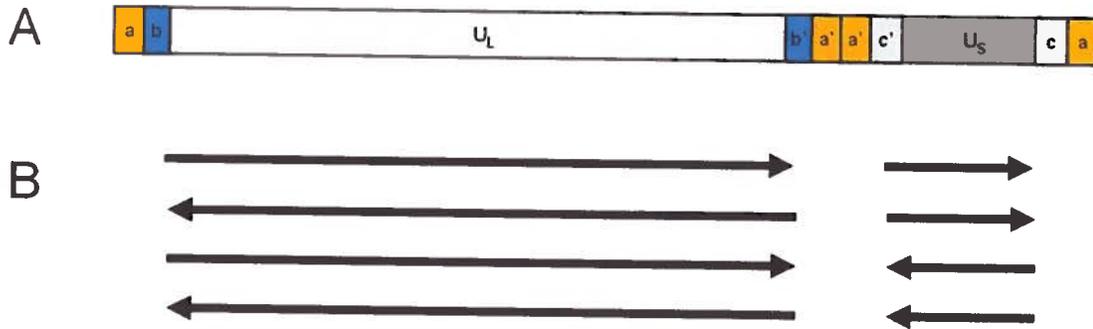


Figure 2 – Structure du génome du VHS-1

(A) Organisation du génome du VHS-1. Les régions U_L et U_S sont représentées par les boîtes grises. Les régions répétées sont représentées par les boîtes oranges et bleues. (B) Représentation des quatre isoformes du génome viral qui peuvent être produits lors de la réplication du virus suite à des mécanismes de recombinaison. Figure adaptée de Boehmer et Nimonkar (2003).

Chacune de ces deux régions est bordée par des régions inversement répétées. Les gènes présents dans les régions répétées sont retrouvés à chaque extrémité de la région U_L . Une seconde série de gènes répétés est présente à chaque extrémité de la région U_S (Perry et McGeoch, 1988). Ainsi, à une extrémité d' U_L , la région ab est présente et elle est inversement répétée à l'autre extrémité ($b'a'$). Il en va de même pour U_S , où les sections répétées se nomment $a'c'$ et ca . Cette structure particulière permet au génome du virus de recombiner lors de sa réplication, donc suite à l'infection, quatre isoformes du génome peuvent être produits (Hayward et al., 1975).

1.4 Cycle de réplication du VHS-1

Le VHS-1 possède un cycle de réplication complexe (Figure 3). La première étape du cycle de réplication du VHS-1 est l'entrée du virus dans la cellule. Pour commencer, les glycoprotéines gB et gC s'attachent à l'héparine sulfate de la surface de la cellule (Shieh et al., 1992). Cet attachement permet à gD d'interagir avec HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), ce qui permettra à gB, gH et gL de médier la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire (Spear, 2004). Suite à la fusion, la capside et les protéines du tégument sont relâchées dans le cytoplasme de la cellule. La capside est transportée vers la membrane nucléaire et le génome viral sera relâché dans le noyau (Sodeik, Ebersold et Helenius, 1997; Batterson, Furlong et Roizman, 1983; Garner,

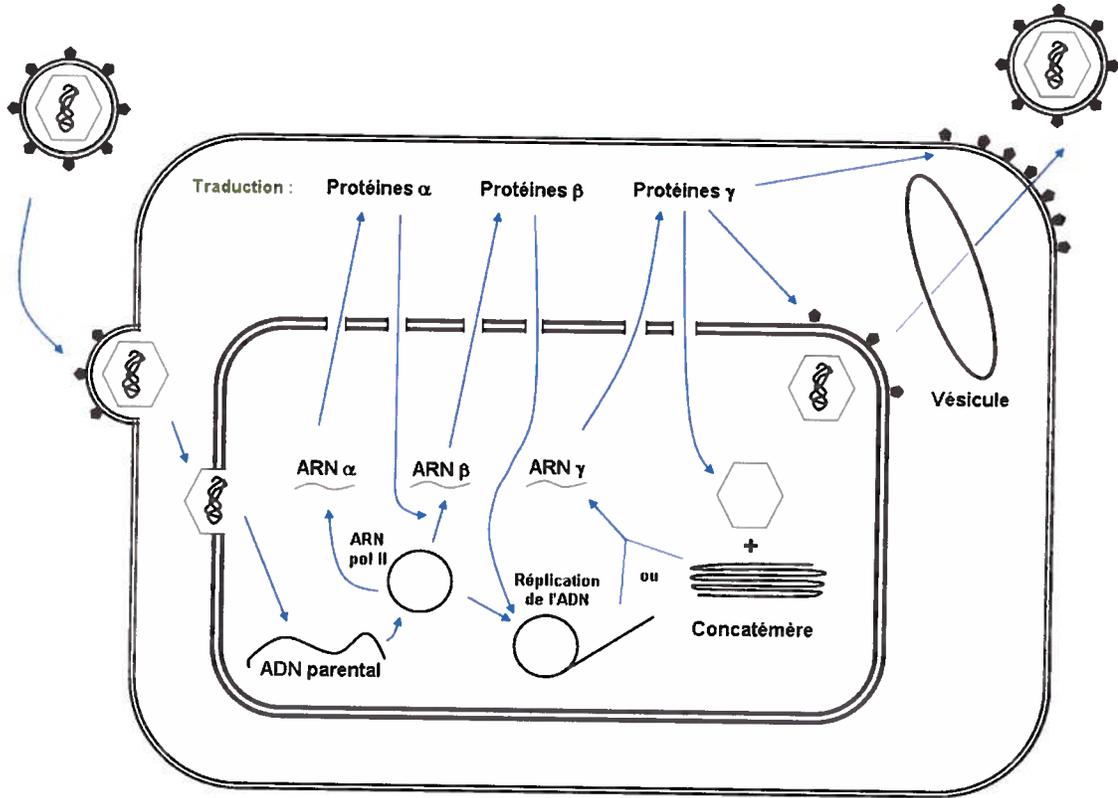


Figure 3 – Cycle lytique de réplication du VHS-1

Suite à l'entrée du virus dans la cellule, la capside est transportée vers le noyau où le génome viral sera relâché. L'expression des différentes classes de gènes se fait de façon séquentielle. Suite à la formation de nouvelles capsides et à l'encapsidation du génome, le virion acquiert son enveloppe dans les vésicules cellulaires avant de sortir de la cellule.

2003). L'ADN viral se circularise (Garber, Beverley et Coen, 1993) et la transcription des gènes commence.

La transcription des gènes viraux est séquentielle (Honest et Roizman, 1974). C'est la polymérase à ARN II cellulaire qui transcrit les gènes viraux (Preston et Newton, 1976). Tout d'abord, des facteurs de transcription viraux et cellulaires permettront l'expression des gènes viraux immédiats précoces (α). La protéine virale VP16 (présente dans le tégment) et les facteurs cellulaires Oct-1 (Octamer binding protein-1) et HCF (Host Cell Factor) permettront la transcription de ces gènes (Post, Mackem et Roizman, 1981; LaBoissiere et O'Hare, 2000; Campbell, Palfreyman et Preston, 1984). Les gènes α codent pour des facteurs de transcription nécessaires à l'expression d'autres gènes viraux.

Les gènes précoces codent pour des protéines qui permettent la réplication de l'ADN viral. La réplication du génome viral se fait sous forme de concatémère en utilisant le modèle du cercle roulant (revu par Boehmer et Lehman, 1997; Falkenberg, Lehman et Elias, 2000). Donc, plusieurs copies du génome sont liées les unes après les autres. La réplication de l'ADN viral permet l'expression des gènes tardifs (γ). Il existe deux sortes de gènes tardifs : les partiellement tardifs (« leaky late » ou γ_1) et les tardifs (« true late » ou γ_2). L'expression des γ_1 est diminuée en l'absence de réplication de l'ADN viral, tandis que les gènes γ_2 ne sont pas exprimés du tout lorsque la réplication du génome est inhibée (Holland et al., 1980; Jones et Roizman, 1979). La plupart de ces gènes codent pour des protéines nécessaires à la formation du virion.

L'étape suivante est l'encapsidation du génome. Les protéines structurales (VP5, VP19C, VP23 et VP26) sont transportées au noyau afin d'y former la capsidie. Une seule copie du génome, provenant du concatémère, est encapsidée (revu par Homa et Brown, 1997). Ce sont des protéines virales qui sont responsables du clivage du concatémère et de l'encapsidation du génome (Sheaffer et al., 2001).

Trois modèles sont proposés afin d'expliquer la sortie du virus de la cellule. Dans le premier modèle (Wild et al., 2005), la capsidie sort du noyau via des pores nucléaires élargis et acquiert son enveloppe par bourgeonnement à partir de vésicules cytoplasmiques. Dans le second modèle (Epstein, 1962), la capsidie gagne son enveloppe via la membrane interne du noyau et pénètre dans une vésicule en utilisant la membrane externe du noyau. Le virus utiliserait le système de sécrétion de la cellule. Dans le troisième modèle (Mettenleiter, 2002), la capsidie est d'abord enveloppée via la membrane interne du noyau. Par la suite, le virus est dé-enveloppé à la membrane externe du noyau. La capsidie nue acquiert son enveloppe finale à partir des vésicules cytoplasmiques (Skepper et al., 2001). Dans les trois cas, le virus sort de la cellule par fusion de la vésicule à la membrane cellulaire. Suite à de nombreuses études allant dans le même sens, c'est le troisième modèle (enveloppement/dé-enveloppement) qui est généralement accepté (revu par Roizman, Knipe et Whitley, 2007)

1.5 Infection latente

1.5.1 Vue d'ensemble de l'infection latente

Le VHS-1 a la capacité d'établir la latence chez les neurones sensitifs de l'hôte, lui permettant de produire des infections récurrentes (Figure 4). Typiquement, lors d'une infection oro-labiale, le virus produit une première infection dans les cellules épithéliales. Cette infection peut donner lieu à la plaie distinctive du VHS-1 : le feu sauvage. Par la suite, le virus infecte les neurones sensitifs innervant cette zone (Efstathiou et Preston, 2005). La capside est transportée le long de l'axone via les microtubules jusqu'au corps cellulaire (Smith, Gross et Enquist, 2001; Cook et Stevens, 1973). Le corps cellulaire de ces neurones se trouve dans le ganglion trigéminial. C'est dans ce ganglion que se regroupent trois nerfs sensitifs faciaux (Netter, 1999): l'ophtalmique, le maxillaire et le mandibulaire. Une fois dans le ganglion, il y a production de nouveaux virus et infection aiguë des autres neurones. Par la suite, la presque totalité de l'activité virale est arrêtée et la production de virus est stoppée. Le génome viral reste sous forme d'épisome dans le noyau du neurone. Durant cette période de latence, seuls les transcrits LATs (« Latency associated transcripts ») continueront à être produits en abondance (Stevens et al., 1987).

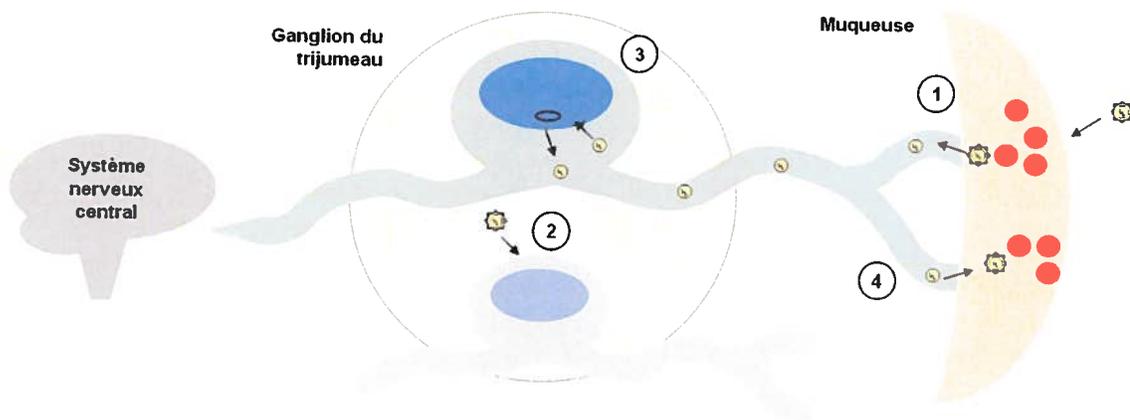


Figure 4 – Vue d'ensemble de l'infection par le VHS-1

(1) L'infection aiguë des muqueuses (2) est suivie de l'infection aiguë des neurones ganglionnaire. Par la suite, (3) le virus établit la latence dans le neurone où le génome reste sous forme d'épisome dans le noyau. (4) Le virus peut se réactiver pour produire des infections récurrentes.

En réponse à un stress, le virus peut se réactiver afin de produire une nouvelle infection. Un stress nerveux, un changement hormonal, une fièvre, une exposition aux UV ou une déficience immunitaire peuvent provoquer la réactivation. Il y aura production de nouvelles capsides qui seront transportées vers le site primaire d'infection le long de l'axone afin de produire une nouvelle infection au niveau des muqueuses (Hill et al., 1983; Miller, Danaher et Jacob, 1998). De plus, il peut arriver que le transport axonal se fasse dans la mauvaise direction et que les virus soient dirigés vers le système nerveux central. Ainsi, la forme latente du VHS-1 a aussi été détectée dans le cerveau de personnes ayant eu des encéphalites, créant une persistance virale (Nicoll, Love et Kinrade, 1993; Baringer et Pisani, 1994). Ce cycle d'infection aiguë et latente peut se poursuivre tout au long de la vie de l'individu infecté.

1.5.2 Les mécanismes moléculaires de la latence

Plusieurs mécanismes régulent l'établissement de latence, le maintien et la réactivation du VHS-1. Malgré que certains d'entre eux soient connus, beaucoup d'étapes et de mécanismes restent à identifier.

1.5.2.1 Entrée en latence du VHS-1

Dans le cadre d'une infection lytique de neurones sensitifs, VP16 du tégument est transportée le long de l'axone vers le corps cellulaire et le noyau du neurone afin de transcrire les gènes α (Holland et al., 1999). Certaines études montrent que la localisation cellulaire de VP16 est l'un des facteurs responsables de l'entrée en latence du virus. Ainsi, suite à l'infection du neurone, si VP16 ne peut se rendre dans le noyau, il n'y aura pas de transcription de gènes α et le virus entrera dans un état de latence (revu par Wysocka et Herr, 2003; Steiner et al., 1990). D'autres études montrent que si les facteurs de transcription cellulaires avec lesquels VP16 se complexe (Oct-1 et HCF) sont absents ou ne peuvent se complexer à VP16, l'expression de gène α est compromise. Il y aura donc entrée du virus en latence (Wysocka et Herr, 2003; Kristie, Vogel et Sears, 1999). Ces études tendent à montrer que l'entrée en latence du VHS-1 résulte d'une incapacité

du virus à exprimer les gènes α et à produire une infection lytique (Efstathiou et Preston, 2005).

1.5.2.2 État du génome viral latent

Suivant l'entrée en latence du virus dans le neurone, le génome viral reste sous forme d'épisome dans le noyau (Efstathiou et al., 1986). Avant d'entrer en latence, le génome se lie aux histones, mettant l'expression des gènes viraux sous le contrôle de l'acétylation des queues des histones et de la méthylation de l'ADN viral (Kent et al., 2004). Lorsque les queues d'histones sont désacétylées et que le génome viral est méthylé, l'ADN viral est compacté et l'accès aux promoteurs viraux est bloqué. Il a été démontré que lors de latence, les queues des histones sont désacétylées et l'ADN viral est méthylé, rendant l'expression des gènes viraux impossible (Deshmane et Fraser, 1989; Arthur et al., 2001; Kubat et al., 2004). La réactivation surviendrait lors de l'acétylation des queues d'histones, ce qui permettrait une libération du génome viral par les queues d'histones et une augmentation de l'accès aux promoteurs des gènes viraux. Ceci entraînerait l'expression de gènes lytiques (Efstathiou et Preston, 2005).

1.5.2.3 Transcrits viraux spécifiques à la latence : les « latency associated transcripts »

Lors de la période de latence, la presque totalité de l'activité virale est arrêtée. Seuls les « latency associated transcripts » (LATs) continuent à être produits (Stevens et al., 1987). Ces transcrits sont situés dans les régions répétées bordant la région U_L . Il s'agit de deux transcrits de 1.5 kb et 2.0 kb provenant d'un même ARNm épissé (revu par Jones, 2003). Des études ont montré que lorsque les LATs sont absents du virus, l'établissement de la latence est réduit (Sawtell et Thompson, 1992; Maggioncalda et al., 1996; Thompson et Sawtell, 1997). Aussi les LATs sont importants pour que le virus puisse se réactiver de façon efficace (Perng et al., 1994; Perng et al., 1996). Toutes ces études montrent que ces transcrits jouent un rôle crucial durant l'infection latente par le VHS-1.

1.5.2.4 La réactivation

Tel qu'expliqué précédemment, lors de la latence, le génome viral reste lié aux histones cellulaires désacétylées, réprimant l'expression des gènes. Ainsi, une acétylation des queues d'histones permet l'expression des gènes α et la réactivation du virus (Efstathiou et Preston, 2005). Les mécanismes exacts de la réactivation ne sont pas connus. Cependant, nous savons que les facteurs de transcription viraux ICP0 (Infected Cell Protein 0) et ICP4, toutes deux des protéines α , jouent un rôle clé dans l'initiation de la transcription (Halford et Schaffer, 2001; Halford et al., 2001; Arthur et al., 2001). Par exemple, ICP0 peut générer une réponse transcriptionnelle similaire à celle observée avec l'inhibiteur d'histone désacétylase Trichostatin A (Hobbs et DeLuca, 1999), connu pour promouvoir la réactivation virale. Étant donné le peu d'information connu sur la latence et la réactivation, il est nécessaire de continuer à étudier la réactivation du VHS-1 afin d'élucider les mécanismes régissant cette étape importante de l'infection.

1.6 La protéine virale UL24

UL24 est l'une des protéines virales importantes pour la pathogenèse du VHS-1 et pour la latence du virus. Il s'agit d'un des 43 gènes conservés chez les trois sous-familles de virus herpès lors de leur évolution, mais le mode d'action de la protéine reste encore inconnu (Davison, 2002).

1.6.1 Importance d'UL24 en culture cellulaire

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la protéine virale UL24 dans la réplication du VHS-1 en culture cellulaire. Pour commencer, comparativement au virus de type sauvage (KOS), lorsque la protéine n'est pas exprimée, la taille des plages de lyse formées par le virus est diminuée. De plus, le rendement cellulaire de lyse est lui aussi réduit (Jacobson, Martin et Coen, 1989). Il y a donc moins de nouveaux virus formés par cellule infectée. Donc, en absence d'UL24, la réplication du VHS-1 est moins efficace que celle du virus KOS. Un autre phénotype observé lorsque UL24 est absente est la formation de plages de type syncytiale (Sanders, Wilkie et Davison, 1982). Une

plage syncytiale résulte de la fusion des membranes cellulaires de plusieurs cellules infectées adjacentes, ce qui forme une grosse cellule plurinucléée. La formation de syncytiums chez les virus déficients en UL24 est encore plus apparente lorsque la température d'infection est plus élevée, soit 39°C (Jacobson, Martin et Coen, 1989; Tognon et al., 1991). Tout ceci montre qu'UL24 est importante pour une réplication efficace du VHS-1 en culture cellulaire.

La formation de syncytiums a aussi été observée chez d'autres virus herpès humains ayant une délétion de l'homologue d'UL24. Contrairement à la souche sauvage, chez un virus VHS-2 ayant une version d'UL24 tronquée, la formation de syncytium a été observée chez trois lignées cellulaires différentes (Blakeney et al., 2005). Cette étude montre que les effets d'une délétion d'UL24 sur la formation de syncytiums sont similaires chez d'autres virus herpès humains.

1.6.2 Importance d'UL24 dans la pathogénèse

La protéine virale UL24 joue aussi un rôle dans la pathogénèse du VHS-1. Dans un modèle murin d'infection oculaire (Leib et al., 1989), on observe une diminution d'environ 1 log de la réplication aiguë oculaire d'un virus déficient en UL24 comparé au virus de type sauvage (Jacobson et al., 1998). Aussi, la réplication aiguë neuronale du virus n'exprimant pas UL24 est plus faible de 4 logs de celle du virus KOS (Jacobson et al., 1998). En plus d'établir la latence à un niveau moindre que KOS, le virus déficient en UL24 a une réactivation pratiquement absente dans des essais d'explants des ganglions trigéminaux. Ainsi, la protéine UL24 est importante pour la pathogénèse du VHS-1 à plusieurs niveaux.

Un phénotype atténué a aussi été observé chez le VHS-2 (principal responsable de l'herpès génital) lorsque UL24 est tronquée (Blakeney et al., 2005). Dans un modèle vaginal d'infection de souris et de cochon d'Inde, ce 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, une étude a montré l'importance de l'homologue d'UL24 chez le VZV (ORF35) dans un

modèle murin de xénogreffe (Ito et al., 2005). Des greffes humaines de peau ou de cellules T ont été faites sur des souris SCID (« Severe Combined Immunodeficiency »). Lorsque les greffes sont infectées par un VZV déficient en ORF35, la réplication du virus dans les greffes est inférieure au virus de type sauvage. Ces études montrent que l'importance d'UL24 chez l'animal ne se limite pas au VHS-1, mais que les homologues d'UL24 chez d'autres virus herpès sont eux aussi cruciaux à la pathogenèse du virus.

1.6.3 Caractéristiques du gène *UL24*

Le gène *UL24* est le 24^e cadre de lecture ouvert de la région U_L du génome (McGeoch et al., 1988). Dans le locus d'*UL24*, les gènes *UL23* (*thymidine kinase, tk*), *UL25*, *UL26* et *UL26.5* sont retrouvés (Figure 5). L'orientation de *tk* étant inverse à celle d'*UL24* (McGeoch et al., 1988), une partie des cadres de lecture ouvert correspondant aux parties N-terminales d'*UL24* et de *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, Weinheimer et McKnight, 1986).

La transcription d'*UL24* est particulière (Figure 5). Six transcrits provenant de trois sites d'initiation différents et de deux sites de polyadénylation (celui d'*UL24* et celui d'*UL26*) sont produits lors de l'infection (Jacobson et al., 1993; Kibler et al., 1991; Read et Summers, 1982; McGeoch et al., 1988; Holland et al., 1984). Les transcrits courts (1.4 kb, 1.2 kb et 0,9 kb) sont exprimés de façon précoce lors de l'infection, tandis que les transcrits longs (5.6 kb, 5.4 kb et 5.2 kb) sont exprimés de façon partiellement tardive (γ_1) (Cook et Coen, 1996). À ce jour, nous ne savons pas quel transcrit est utilisé pour l'expression de la protéine UL24. Cependant, l'expression de la protéine UL24 corrèle avec l'expression des transcrits longs et tardifs. Ce sont les quatre transcrits contenant le cadre lecture ouvert complet d'*UL24* (5.6 kb, 1.4 kb, 5.4 kb et 1.2 kb) qui sont potentiellement responsables de l'expression de la protéine. De plus, suite à l'inhibition de premier site d'initiation, l'expression d'*UL24* est fortement diminuée, ce qui suggère que les transcrits provenant du premier site d'initiation (5.6 kb et 1.4 kb) sont les principaux responsables de l'expression d'*UL24* (Pearson et Coen, 2002).

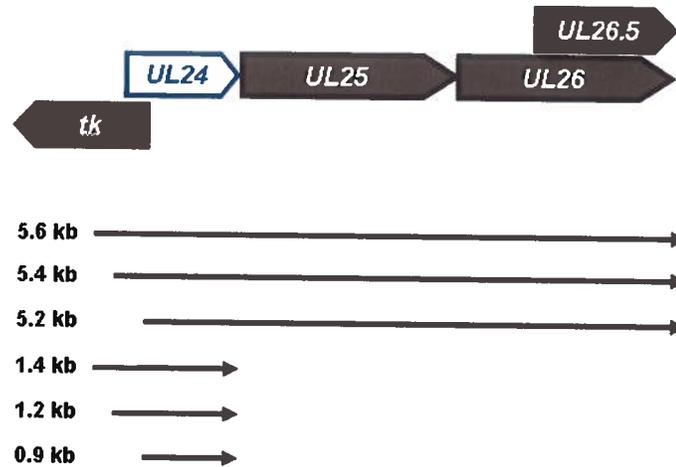


Figure 5 – Représentation de la région génomique entourant *UL24* et de ses transcrits
UL24 est représenté par la flèche bleue et blanche. Les différents gènes entourant *UL24* sont représentés par les flèches grises. Les différents transcrits d'*UL24* produits lors de l'infection y sont représentés. Adapté de Pearson et Coen (2002).

1.6.4 Caractéristiques de la protéine *UL24*

Tel que mentionné précédemment, la protéine *UL24* est exprimée de façon partiellement tardive. Cette protéine de 269 acides aminés a un poids moléculaire de 29.5 kDa (Pearson et Coen, 2002). La fonction exacte de la protéine reste encore à déterminer. Chez VHS-2 et HCMV, la protéine homologue à *UL24* a été détectée dans le virion (probablement dans le tégment pour VHS-2 et associé au tégment et à l'enveloppe pour HCMV). Elle serait donc transportée dans le virion (Hong-Yan et al., 2001; Wang, Duh et Wu, 2004). Cependant, la seule analyse protéomique où on a identifié *UL24* dans le virion était pour le gammaherpesvirus murin 68 (MHV68; Bortz et al., 2003). À ce jour, *UL24* n'a pas été détectée dans le virion du VHS-1.

1.6.4.1 Niveau de conservation d'*UL24*

UL24 est retrouvé chez un très grand nombre d'*Alphaherpesvirinae*, de *Betaherpesvirinae* et de *Gammaherpesvirinae*, tel que des virus de mammifères, d'oiseaux et même de reptile (78 souches différentes, suite à une analyse de la séquence en acides aminés d'*UL24* sur le site <http://expasy.org/tools/blast/>). La séquence d'*UL24*

est séparée en deux régions : la partie N-terminale, qui est conservée, et la partie C-terminale, plus variable (Figure 6) (Jacobson, Martin et Coen, 1989; Knizewski et al., 2006). Dans la région N-terminale (acides aminés 1 à 163), cinq domaines d'homologie ont été identifiés (Jacobson, Martin et Coen, 1989; Jacobson et al., 1998; Knizewski et al., 2006). Il s'agit de portions d'UL24 où le niveau de conservation est d'au moins 65 % (Jacobson, Martin et Coen, 1989). À l'intérieur de ces domaines, certains résidus sont hautement conservés (au moins 90% de conservation; Knizewski et al., 2006). La substitution de groupes d'acides aminés dans les domaines d'homologie II et III a un impact négatif sur la réplication du virus en culture cellulaire (Jacobson, Martin et Coen, 1989). L'importance individuelle des acides aminés hautement conservés dans les différentes UL24 est inconnue.

1.6.4.2 Motif d'endonucléase PD (D/E)xK

Malgré que la structure d'UL24 soit inconnue, une étude de bio-informatique a identifié un motif d'endonucléase de type PD (D/E)xK formé par certains des acides aminés hautement conservés (Knizewski et al., 2006). Les résidus D78, E99 et K101 formeraient le site catalytique (Figure 6). Les acides aminés H22, Y26, Q117, E69 et R75 contribueraient à l'architecture du site et pourraient être importants pour la spécificité du substrat. De plus, UL24 aurait une structure secondaire typique des endonucléases de type PD (D/E)xK, soit $\alpha\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$, où α signifie hélice alpha et β signifie feuillet beta (la structure commune à ces endonucléases a été soulignée).

Les endonucléases de types PD (D/E)xK sont principalement retrouvées dans les bactéries, les archaebactéries et les virus d'algues (revu par Pingoud et al., 2005). Ce sont les acides aminés conservés formant le site catalytique, soit PD (D/E)xK, qui caractérisent cette famille. Pour être fonctionnelles, ces enzymes forment des homodimères ou des hétérodimères (Nishino et al., 2003). Elles ont besoin d'ATP ou de GTP et d'un ion divalent, tel que le Mg^{2+} (Bond et al., 2001). Ces endonucléases permettent la résolution de structure d'ADN de type Holliday, le clivage de brin d'ADN à un site spécifique ou la recombinaison entre deux fragments d'ADN (Pingoud et al., 2005).

Une endonucléase de type PD (D/E)xK a déjà été identifiée chez VHS-1 : soit UL12 (Bujnicki et Rychlewski, 2001). UL12 est une nucléase alcaline impliquée dans l'encapsidation du génome viral (Weller et al., 1990). Lors de la réplication du génome viral, des coupures simple brin et des brèches peuvent être insérées dans la séquence. UL12 agit à ces points pour réparer ou traiter l'ADN viral afin de produire une structure maximisant l'encapsidation (Goldstein et Weller, 1998). UL12 ne partage pas beaucoup d'homologie de séquence avec UL24. Cependant, la structure secondaire prédite du potentiel motif d'endonucléase d'UL24 est similaire à celle d'UL12 (Knizewski et al., 2006).

1.6.5 Localisation cellulaire d'UL24

Des analyses en bio-informatique de la séquence d'UL24 ont prédit que la



Figure 6 – Séquence en acides aminés de la protéine UL24

Les cinq domaines d'homologie sont représentés par les boîtes vertes (selon Jacobson, Martin et Coen, 1989; Jacobson et al., 1998). Les résidus hautement conservés sont en rouge ou en blanc (selon Knizewski et al., 2006). Les acides aminés formant le site catalytique putatif sont représentés en blanc (selon Knizewski et al., 2006). La structure secondaire potentielle (Knizewski et al., 2006) est indiquée sous la séquence (α pour hélice alpha et β pour feuillet beta).

protéine pourrait se localiser dans plusieurs sous-compartiments cellulaires; des signaux de localisation mitochondriale et nucléaire y ont été détectés. Sauf que lorsqu'analysé expérimentalement par fractionnement cellulaire, UL24 s'associe principalement avec le noyau, mais elle est aussi associée à la fraction cytoplasmique (Pearson et Coen, 2002). Une étude en microscopie confocale plus récente montre que la protéine se localise par point principalement dans le nucléole, qui est une région du noyau impliquée dans la transcription des ARN ribosomiaux. UL24 est aussi retrouvée dans le cytoplasme (Lymeropoulos et Pearson, 2007). Cette localisation est maximale à 9 heures postinfection (hpi). Par la suite, UL24 se localise de façon diffuse dans le noyau et dans le cytoplasme, plus particulièrement en périphérie du noyau (Lymeropoulos et Pearson, 2007). Cette localisation nucléolaire est aussi observée hors du contexte d'infection, lorsqu'UL24 est transfectée dans la cellule de façon transitoire (Bertrand et Pearson, 2008). Cette dernière étude a aussi montré qu'UL24 peut se localiser dans le Golgi dans le cadre d'une transfection.

1.6.6 Effets sur la nucléoline

En plus de se localiser dans le nucléole, UL24 affecte la localisation d'une protéine nucléolaire. Dans les cellules qui ne sont pas infectées, la nucléoline se localise sous forme de points dans le nucléole. Lors de l'infection de cellules par le VHS-1, la protéine nucléoline est dispersée. Cependant, lorsque l'infection se fait avec un virus déficient en UL24, cette dispersion n'a pas lieu (Lymeropoulos et Pearson, 2007). La nucléoline est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la biogénèse et la maturation des ribosomes (Srivastava et Pollard, 1999). La dispersion de la nucléoline par UL24 n'est pas dépendante des autres protéines virales, puisque même lorsque transfectée seule, UL24 la disperse (Bertrand et Pearson, 2008). Il est aussi important de noter que la dispersion de la nucléoline n'est pas due à un démantèlement du nucléole, puisque la protéine nucléolaire fibrilarine conserve sa localisation normale. Cependant, il reste encore à déterminer si cette dispersion de la nucléoline par UL24 est due à une interaction directe avec UL24 ou via une autre protéine.

1.6.7 Autres activités associées à UL24 et ses homologues

Le gammaherpesvirus murin 68 (MHV68) possède un homologue à UL24 nommé ORF20 (Alba et al., 2001). Il a été montré qu'ORF20 induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Nascimento et Parkhouse, 2007). Cet arrêt est dû à une inactivation du complexe formé par la kinase Cdc2 et la Cycline B par ORF20. Cependant, dans cette étude, un lentivirus recombinant exprimant ORF20 a été utilisé plutôt que le MHV68. Cette étude laisse croire que cette capacité d'arrêter le cycle cellulaire pourrait être appliquée aux homologues d'ORF20, tel qu'UL24 chez le VHS-1. Il est à noter que des analyses protéomiques sur le nucléole ont démontré la présence de plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Berdougo et al., 2008).

Un criblage pour des gènes du HCMV impliqués dans la régulation génique a identifié l'homologue d'UL24, UL76. Il a été montré que chez des cellules transfectées de façon transitoire, UL76 peut réguler à la hausse ou à la baisse l'expression de certains gènes α (Wang, Duh et Chang, 2000). La régulation à la hausse pourrait être dominante lorsqu'UL76 est fortement exprimé dans les cellules. De plus, quand des cellules exprimant de façon constitutive UL76 sont infectées avec HCMV, la production de virions est réprimée (Wang, Duh et Wu, 2004; Migone et al., 2006). Une hypothèse est que cette répression pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'infection latente.

1.7 Modèle d'infection in vivo

Afin d'étudier la pathogenèse du VHS-1, plusieurs modèles animaux peuvent être utilisés. Ces différents modèles permettent entre autres d'étudier l'infection latente du VHS-1.

1.7.1 Cochon d'Inde

Le cochon d'Inde est un modèle d'étude utilisé principalement pour l'étude de l'infection vaginale par le VHS-1 et 2. Ce modèle permet l'étude de l'infection aiguë et latente (Stanberry et al., 1982). Dans ce modèle, l'inoculation intravaginale du virus mène

à l'apparition de vésicules ulcérées caractéristique de l'infection. Suite à l'infection aiguë neuronale, le virus établit la latence dans les ganglions nerveux de la racine dorsale. La réactivation spontanée du virus peut être observée chez le cochon d'Inde.

1.7.2 Lapin

Le lapin est utilisé pour l'étude de la latence du VHS-1. Dans ce modèle, l'infection se fait au niveau de la cornée de l'animal (Hill et al., 1986). L'infection aiguë, ainsi que l'infection latente peuvent y être étudiées. La réactivation du virus peut être provoquée en utilisant des agents chimiques tels que l'épinéphrine (Kwon et al., 1981). De plus, la réactivation spontanée peut aussi y être observée (Berman et Hill, 1985).

1.7.3 Souris

La souris est un modèle très répandu dans l'étude de la pathogenèse du VHS-1. Deux types de modèle murin sont couramment étudiés. Le premier est le modèle d'infection sous la patte arrière, où le virus se réplique de façon aiguë. Tout comme chez le cochon d'Inde, le virus infectera ensuite les neurones du ganglion de la racine dorsale pour y établir la latence (Stevens et Cook, 1971). Chez ce modèle, la réactivation spontanée n'est pas observée. Cependant, il est possible d'observer la réactivation lors d'essais d'explant des ganglions infectés de façon latente.

Dans le second modèle, l'infection se fait au niveau oculaire. Suite à l'infection aiguë dans la cornée, le VHS-1 infecte les neurones sensitifs du ganglion trigéminal et y établit la latence (Leib et al., 1989). Le virus ne se réactive pas spontanément, mais il est possible de provoquer la réactivation lors d'un essai d'explant des ganglions. Il est aussi possible de provoquer la réactivation chez l'animal en injectant de façon intrapéritonéale du Butyrate de sodium, inhibiteur d'histone désacétylase (Neumann, Bhattacharjee et Hill, 2007).

2 Problématique

Les mécanismes régulant la pathogenèse du VHS-1 ne sont pas tous connus. Certaines protéines semblent jouer un rôle important dans celle-ci. UL24 est l'une de ces protéines. Il s'agit d'une protéine conservée chez les trois sous-familles de virus herpes lors de leur évolution, mais dont le rôle dans l'infection reste encore inconnu. Cependant, il est connu que la protéine virale UL24 est importante pour la réplication normale du virus en culture cellulaire. Chez un virus déficient en UL24, la réplication est diminuée et la formation de syncytium est observée. De plus, dans un modèle murin d'infection oculaire, si le virus n'exprime pas UL24, la réplication aiguë oculaire est diminuée et la réplication aiguë neuronale est fortement affectée. Aussi, l'établissement de la latence est moins élevé que chez le virus de type sauvage, tandis que la réactivation est pratiquement nulle. Les mécanismes impliquant UL24 dans la pathogenèse du virus restent encore à découvrir. Cette protéine est conservée chez les virus herpes et certains résidus sont hautement conservés. Certains de ces acides aminés hautement conservés formeraient le site actif d'une endonucléase de type PD (D/E)xK. Cependant, cette fonction n'a pas été démontrée. Finalement, l'importance des acides aminés hautement conservés dans les fonctions de la protéine est inconnue.

Notre hypothèse est que les acides aminés hautement conservés d'UL24 sont critiques pour la pathogenèse du VHS-1, incluant ceux impliqués dans la potentielle fonction d'endonucléase.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons généré plusieurs mutants du VHS-1 contenant différentes versions d'UL24 ayant une ou deux substitutions d'acides aminés hautement conservés. Ces virus mutants ont été testés en culture cellulaire et dans un modèle murin d'infection oculaire.

3 Matériel et méthodes

3.1 Cellules et virus

3.1.1 Lignées cellulaires

Les cellules Vero et les cellules COS-7, deux lignées de fibroblastes provenant de reins de singe vert d'Afrique, ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enrichi à 5 % de sérum de veau nouveau-né (NCS), à 50 mg/ml de pénicilline et 50 unités/ml de streptomycine (P/S). Une fois une confluence de 95 % atteinte, le milieu des cellules a été enlevé et de la trypsine/EDTA (2.5 g/L de trypsine et 0.38 g/L d'EDTA) a été ajouté aux cellules. Après une incubation de 5 minutes à 37 °C et 5 % de CO₂ permettant aux cellules de se détacher, le double du volume de trypsine en DMEM à 5 % de NCS et avec P/S a été ajouté. Typiquement, 1/6 des cellules ont été passées. Les cellules ont été conservées dans un environnement à 37 °C et 5 % de CO₂.

3.1.2 Origine des virus et production de stocks viraux

Les souches virales du virus de l'herpès simplex de type 1 KOS (type sauvage), UL24X (déficient en UL24) et *tkLTRZ1* (déficient en TK) ont été fournies par Donald M. Coen (Harvard Medical School, Boston). Tous les stocks viraux ont été produits dans des flacons de 175 cm² (T175) contenant 3×10^7 des cellules Vero infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.01 dans 5 ml de milieu DMEM à 2 % de NCS et avec P/S. Les flacons ont été incubés à 37 °C et à 5 % de CO₂ et agités toutes les 15 minutes pendant 1 heure. Ensuite, l'inoculum a été remplacé par 25 ml de DMEM à 5 % de NCS et avec P/S et remis à 37 °C et à 5 % de CO₂. Lorsque 100 % des cellules montraient des effets cytopathiques, elles ont été centrifugées à 240 G pendant 5min. Les culots de cellules infectées ont été resuspendus dans du DMEM à 1 % de NCS et avec P/S à concurrence de 3 ml au total pour les culots de 3 flacons et transférés dans un nouveau tube. Par la suite, les cellules ont été brisées par trois cycles de congélation et décongélation, pour ensuite

être soniqués pendant 30 secondes (Digital Sonifier de Branson, amplitude de 50 %, pulsations de 0.5 seconde). Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 240 G et 4°C pour 5 minutes. Le surnageant contenant les particules virales a été aliquoté à des volumes de 125µl dans des cryotubes de 1.5ml. Les stocks ont été conservés à -80 °C.

3.1.3 Détermination des titres viraux

Afin de déterminer les titres viraux des différents virus, des titrages par essais de plages de lyses ont été réalisés. Des dilutions en série des stocks viraux ont été faites en duplicata dans un volume de 1 ml. Les dilutions ont été faites dans un milieu DMEM à 2 % de NCS et avec P/S. Des plaques à 12 puits préparées la veille et contenant 3×10^5 cellules Vero dans 300µl de DMEM à 2 % de NCS et P/S ont ensuite été infectées avec 100µl des dilutions 10^{-3} à 10^{-8} . Les plaques infectées ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 1 heure et agitées aux 15 minutes. Ensuite, 1ml de DMEM à 2 % de NCS et avec P/S et à 0.6 % de méthylcellulose a été ajouté à chaque puits. Deux à trois jours post infection (jpi), les cellules ont été fixées avec 1 ml de Fix (solution d'acide acétique glacial et de méthanol à une proportion de 1 : 3) a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été incubées à température de la pièce pour 45 minutes. Par la suite, les puits ont été vidés et les cellules ont été colorées avec une solution de cristal violet (250ml de méthanol, 750ml d'H₂O_{dd} et 0.5 % de cristal violet) pour un temps d'incubation d'au moins 45 minutes, rincés à l'eau et séchés. Les titres viraux ont été exprimés en unité formatrice de plages (PFU) par ml.

3.2 Mutagenèse

3.2.1 Mutagenèse dirigée par PCR

Des versions mutées d'*UL24* contenant des mutations ponctuelles encodant pour des substitutions simples ou doubles d'acides aminés ont été produites par mutagenèse dirigée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les substitutions encodaient

majoritairement pour des alanines ou pour une leucine. Pour ce faire, le plasmide pAG5 (Griffiths et Coen, 2003; fourni par Donald M. Coen, Harvard Medical School, Boston), contenant les gènes *UL22*, *UL23* et *UL24* dans un squelette pSK+ (Stratagene), a été utilisé. Des amorces synthétiques (Integrated DNA Technology) contenant les mutations désirées (« top ») et les amorces complémentaires (« GC ») (Tableau 1) ont été utilisées dans la réaction de PCR suivante (basée sur le protocole « Quick-Change » de Stratagene) : 5 µl de tampon 10X pour la polymérase PFU, 5 µl de dNTP à 2 mM, 2.5 µl d'amorce TOP à 50 ng/µl, 2.5 µl d'amorce GC à 50 ng/µl, 2.5 µl de DMSO, 25 ng de pAG5, 1 µl de polymérase PFU à 2.5 unités/µl (Fermentas) dans une réaction d'un volume total de 50 µl. La PCR est composée des trois étapes : (1) 94 °C pour 30 secondes, (2) suivi de 18 fois le cycle de 94°C pour 30 secondes, 60 °C pour 60 secondes, 68 °C pour 6 minutes (3) et 68 °C pour 6 minutes. Cette PCR permet de répliquer le plasmide au complet tout en y insérant les mutations désirées.

Afin d'éliminer le plasmide d'origine n'ayant pas été muté, 1 µl de l'enzyme de restriction DpnI (10 unités/µl, Roche) a été ajouté au produit de la PCR et le tout incubé à 37 °C pendant 4 heures. Cette enzyme reconnaît les séquences méthylées. Étant donné que le plasmide d'origine a été produit par des bactéries, donc méthylé, il a été digéré par DpnI, contrairement aux plasmides mutés non méthylés provenant de la PCR.

Ensuite, des bactéries compétentes DH5α Max Efficiency (Invitrogen) ont été transformées par choc thermique avec 2 µl du produit de la digestion suivant le protocole du fabricant (Invitrogen). Les bactéries ont été coulées sur un pétri de LB agar contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml et incubées à 37 °C pour la nuit. Des colonies obtenues ont ensuite été piquées et mises en culture individuellement dans 2 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml et incubées à 37 °C pour la nuit. L'ADN plasmidique a été purifié en utilisant le kit de MiniPrep de Promega suivant le protocole décrit par le fabricant. Ce kit utilise une méthode non organique utilisant des colonnes de résine. L'ADN a été élué dans un volume de 50µl.

Tableau I – Liste des amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée par PCR

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Mutation(s) insérée(s)	Plasmide produit
UL24H22Ltop	GCAGGGGTACGAAGCC T TACGCGCTTCTACAAG	H22L	pAG5 H22L
GC-UL24H22Ltop	CTTGTTAGAAGCGCGT A AGGCTTCGTACCCCTGC		
UL24Y26Atop	GCAGGGGTACGAAGCC G CCAAGGCGCTGGCCGAAG	Y26A	pAG5 Y26A
GC-UL24Y26Atop	CTTCGGCCAGCGCCT T GGCGGCTTCGTACCCCTGC		
UL24E69A-V70Atop	GTCACCTTAATAATGCGCAGCGGACCTGGGACCGCGC	E69A V70A	pAG5 E69AV70A
GC-UL24E69A-V70Atop	GCGCGGTCCCAGGTAC G CTGCGCATA T TAAAGGTGAC		
UL24L72Atop	GCGAAGTGGAC G CGGGACCGCGCCG	L72A	pAG5 L72A
GC-UL24L72Atop	CGGCGCGGTCCC G CGTCCACTTCGC		
UL24R75A-D78Atop	CCTGGGACCG G CCCGCCCG C CTGCATCTGC	R75A D78A	pAG5 R75AD78A
GC-UL24R75A-D78Atop	GCAGATGCAG G CGGGCGGG G CCGGTCCCAGG		
UL24I97A-I98Atop	CTGGGCGGGTTTGTGT C CGCGCAGA A CTAAAGACATGC	I97A I98A	pAG5 I97AI98A
GC-UL24I97A-I98Atop	GCATGTCTTTAGTT C T G CGGCGACACAAACCCCGCCAG		
UL24E99A-K101Atop	GGGTTTGTGTATCATAGC A CTAG C GACATGC A AATATATTTCTTCCG	E99A K101A	pAG5 E99AK101A
GC-UL24E99A-K101Atop	CGGAAGAAATATATTTGCATGT C CTAGT G CTATGATGACACAAACCC		
UL24Q117Atop	CGCCAGCAAAC G CGAG G CACGGGCCACGGGGATG	Q117A	pAG5 Q117A
GC-UL24Q117Atop	CATCCCCGTGGACCGT G CCTCGCGTTTGTGGCG		
UL24G121Atop	GAGCAACGGGCACGG C GATGAAGCAGCTGCGC	G121A	pAG5 G121A
GC-UL24G121Atop	GCGCAGCTGCTTCAT C GGCGTGGCCCGTTGCTC		
UL24Q124A-L125Atop	GGGCCACGGGATGAAG G CGCGCGCCACTCCCTGAAGC	Q124A L125A	pAG5 Q124AL125A
GC-UL24Q124A-L125Atop	GCTTCAGGGAGTGGCG C CGCCTTCATCCCCGTGGCCC		
UL24Q154Atop	CCTGGTGTTTGT C CGCG C ACGGACGCTCCGCGTC	Q154A	pAG5 Q154A
GC-UL24Q154Atop	GACGCGGAGCGTCCGT G CGGCGACAAACACCAGG		

- Pour chaque mutation, deux amorces ont été utilisées, soit l'amorce « top » et son amorce complémentaire « GC ».
- Les nucléotides permettant l'insertion de mutation sont représenté en rouge sur chaque amorce.
- Chaque mutation nommé par l'acide aminé d'origine, suivi de la position de la mutation et du résidu final après la mutagenèse.

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*. Les versions mutées qui ont été utilisées afin de produire des virus recombinants ont été sous-clonées dans un plasmide de transfert (soit pAG5 E99AK101A, pAG5 G121A et pAG5 Q154A). Il s'agit du plasmide pAG5 (nommé pAG5t). Les enzymes de restriction BglIII et Bst11071 ont été utilisées afin de sous-cloner les mutations depuis le plasmide pAG5 muté dans pAG5t (pour donner pAG5t E99AK101A, pAG5t G121A et pAG5t Q154A). De cette façon, la possibilité de présence de mutations non désirées produite lors de la réaction de PCR dans les gènes *UL22*, *UL23* ou ailleurs dans le plasmide est éliminée.

3.2.2 Plasmides et sous-clonage

Afin de vérifier l'expression des versions mutées d'*UL24* dans des cellules mammifères, les gènes mutés ont été sous-clonés depuis pAG5 dans un plasmide d'expression mammifère. Des plasmides contenant *UL24*, soit pLBPfl *UL24* (Luc Bertrand, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval) et pLBPfl HAUL24 (Bertrand et Pearson, 2008), ont été utilisés. Ce dernier encode une étiquette d'hémagglutinine en amont d'*UL24*. Pour sous-cloner les versions mutées dans pLBPfl *UL24* (Figure 7A), les enzymes Pfl2311 (2 unités/ μ l, Fermentas) et BamH1 (10 unités/ μ l, Fermentas) ont été utilisés dans la réaction suivante : 2,5 μ l de chaque enzyme, 5 μ l de tampon Tango 10X (Fermentas) et 8 μ g du plasmide pAG5 dans un volume total de 50 μ l à 37 °C pendant 2 heures. Pour sous-cloner dans pLBPfl HAUL24 (Figure 7B), les enzymes Bgl II (10 unités/ μ l, NEB) et Bst 11071 (10 unités/ μ l, Fermentas) ont été employé dans la réaction suivante : 2.5 μ l de chaque enzyme, 5 μ l de tampon O (Fermentas) et 8 μ g de plasmide dans un volume total de 50 μ l à 37 °C pendant 2 heures. Les produits des réactions ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Les bandes dont la taille correspondait au vecteur ou à l'insert ont été découpées et l'ADN extrait du gel en utilisant le kit GenElute de Sigma avec un volume final d'élution de 40 μ l. La ligase d'ADN T4 (NEB) a été utilisée afin d'introduire l'insert dans le vecteur.

Des cellules DH5 α compétentes ont été transformées par choc thermique avec le produit de la ligation et ensuite transférées sur un pétri de LB Agar à 0.1 mg/ml d'ampicilline. Des colonies ont été piquées et mise en culture afin d'isoler l'ADN plasmidique par la technique de MiniPrep tel que décrit à la section 3.2.1.

Des digestions « diagnostiques » ont permis de vérifier si l'insert a bien été lié au vecteur. Ainsi, 10 μ l du produit de la MiniPrep ont été ajouté 1 μ l de chaque enzyme correspondante, 2.5 μ l du tampon correspondant et 5 μ l de H₂O_{dd} (voir ci-dessus). Les produits de la réaction ont ensuite été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % afin de vérifier si les fragments correspondant à l'insert désiré étaient présents.

3.3 Immunobuvardage de type western

3.3.1 Transfection de cellules COS-7

Des plaques à 6 puits contenant 2×10^5 cellules COS-7 par puits ont été préparées le jour précédent la transfection visant une confluence d'environ 40%. Afin de normaliser la variation du niveau de transfection d'un échantillon à l'autre, un essai à la luciférase a été fait. Le plasmide pLBPfl muté et le plasmide pGL3 (Promega, contenant le gène de la luciférase) ont été co-transfectés en utilisant l'agent transfectant Lipofectamine (Invitrogen). La lipofectamine a été utilisée à un ratio de 1 :3 avec l'ADN (3 μ g de pLBPfl et 0.1 μ g de pGL3 pour 9.3 μ l d'agent de transfection) dans 1 ml de DMEM sans sérum ou antibiotique. Après 5 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, le milieu a été changé pour 2 ml de DMEM à 5 % de NCS et avec P/S. Après 2 jours, les cellules ont été lavées au PBS (200 mg/L de chlorure de potassium, 200 mg/L de phosphate de

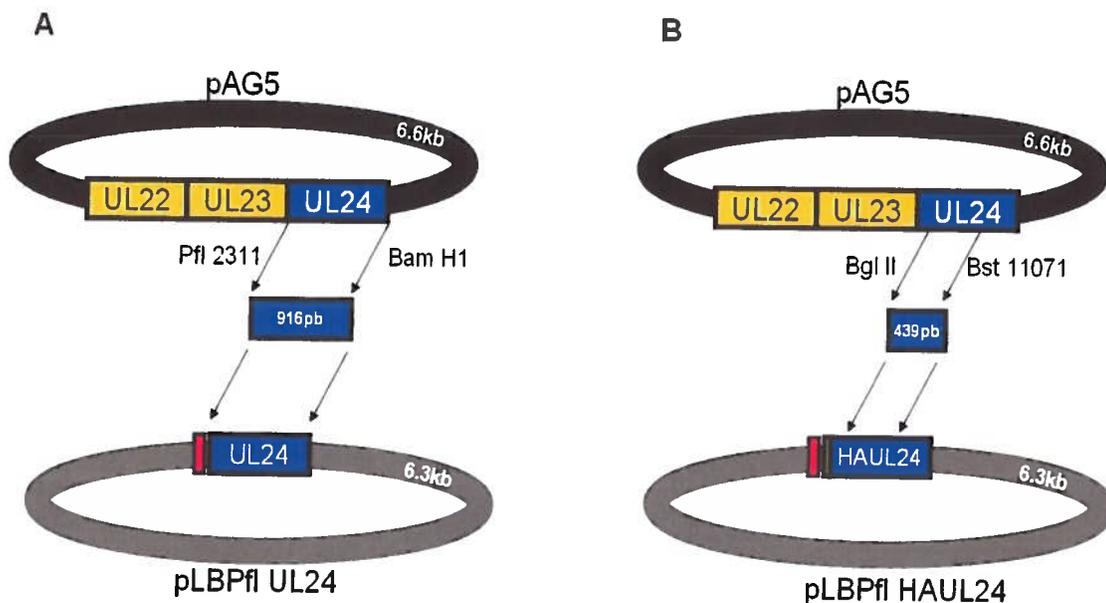


Figure 7 – Sous-clonage des versions mutées d'UL24 dans un plasmide d'expression mammifère
(A) Pour sous-cloner la version mutée d'UL24 provenant du plasmide muté dans le plasmide pLBPfl UL24, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes Pfl2311 et Bam H1. Le fragment de 916 pb provenant de pAG5 a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pLBPfl UL24 digéré. Le promoteur CMV est illustré par la boîte rouge. (B) Pour sous-cloner la version mutée d'UL24 provenant du plasmide muté dans le plasmide pLBPfl HAUL24, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes Bgl II et Bst 11071. Le fragment de 439 pb provenant de pAG5 a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pLBPfl HAUL24 digéré. Le promoteur CMV est illustré par la boîte rouge et l'étiquette hémagglutinine par la boîte verte.

3.3 Immunobuvardage de type western

3.3.1 Transfection de cellules COS-7

Des plaques à 6 puits contenant 2×10^5 cellules COS-7 par puits ont été préparées le jour précédent la transfection visant une confluence d'environ 40%. Afin de normaliser la variation du niveau de transfection d'un échantillon à l'autre, un essai à la luciférase a été fait. Le plasmide pLBPfl muté et le plasmide pGL3 (Promega, contenant le gène de la luciférase) ont été co-transfectés en utilisant l'agent transfectant Lipofectamine (Invitrogen). La lipofectamine a été utilisée à un ratio de 1 :3 avec l'ADN (3 μ g de pLBPfl et 0.1 μ g de pGL3 pour 9.3 μ l d'agent de transfection) dans 1 ml de DMEM sans sérum ou antibiotique. Après 5 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, le milieu a été changé pour 2 ml de DMEM à 5 % de NCS et avec P/S. Après 2 jours, les cellules ont été lavées au PBS (200 mg/L de chlorure de potassium, 200 mg/L de phosphate de

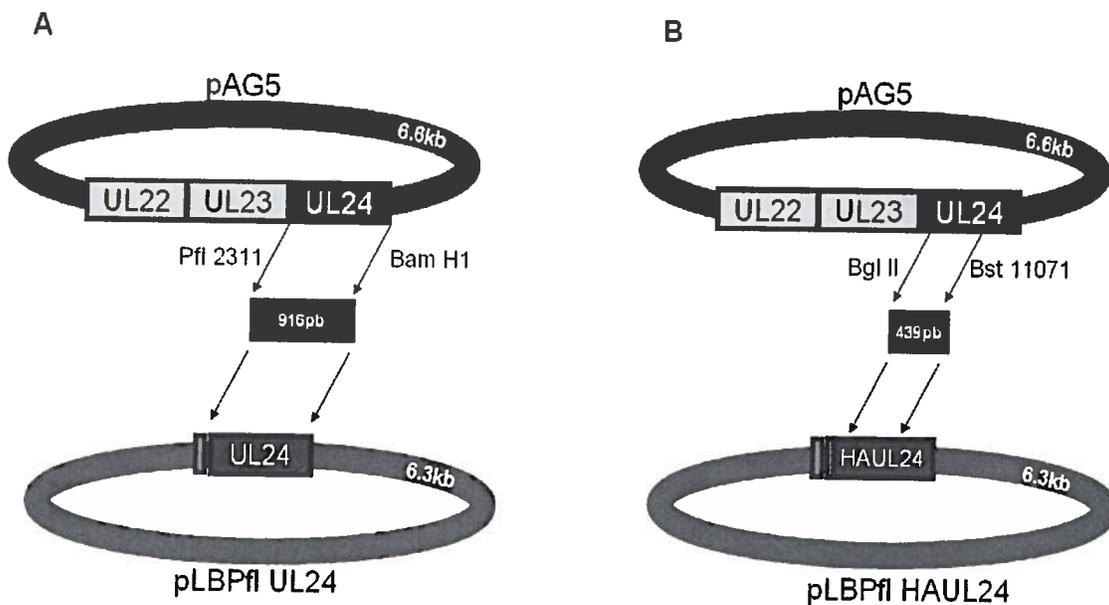


Figure 7 – Sous-clonage des versions mutées d'UL24 dans un plasmide d'expression mammifère
(A) Pour sous-cloner la version mutée d'UL24 provenant du plasmide muté dans le plasmide pLBPfl UL24, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes Pfl2311 et Bam H1. Le fragment de 916 pb provenant de pAG5 a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pLBPfl UL24 digéré. Le promoteur CMV est illustré par la boîte rouge. (B) Pour sous-cloner la version mutée d'UL24 provenant du plasmide muté dans le plasmide pLBPfl HAUL24, les deux plasmides ont été digérés par les enzymes Bgl II et Bst 11071. Le fragment de 439 pb provenant de pAG5 a été isolé et inséré par ligation dans le plasmide pLBPfl HAUL24 digéré. Le promoteur CMV est illustré par la boîte rouge et l'étiquette hémagglutinine par la boîte verte.

potassium monobasique, 8 g/L de chlorure de sodium et 2160 mg/L de phosphate de sodium dibasique), grattées et récoltées dans 500µl de PBS. Après une centrifugation à 5900 G de 5 minutes à 4°C, le culot de cellules a été resuspendu dans 150 µl de réactif de lyse cellulaire (System d'essai Luciférase de Promega). Les cellules ont été lysées pour 15 minutes à 4°C et centrifugées à 16000 G à 4°C pour 30 minutes afin de précipiter les membranes et l'ADN. Le surnageant de protéine a été utilisé pour l'essai à la luciférase et pour l'immunobuvardage.

3.3.2 Essais luciférase

Afin de normaliser la variation du niveau de transfection d'un échantillon à l'autre, 15 µl du lysat cellulaire a été ajouté à 100 µl de substrat d'essai luciférase. Les échantillons expérimentaux ont été comparés à des témoins transfectés avec des quantités croissantes de pGL3. Le luminomètre Lumat LB 9507 d'EG&G Berthold a été utilisé. Le niveau de luminescence a été exprimé en unités relatives de luminescence (RLU).

3.3.3 Immunobuvardage de type western

Après avoir déterminé les volumes de lysat qui seront utilisés, les échantillons ont été préparés en ajoutant le tampon de chargement 6X (à 0.5 % de bromophénol bleu et 10% de β-mercaptoéthanol) et chauffés à 100°C pour 1 minute. Les échantillons ont ensuite été chargés dans un gel d'acrylamide dénaturant (au SDS) à 12 % et migrés par électrophorèse dans un tampon de migration (3 g de Tris et 14.4 g de glycine dans 1 L de H₂O_{dd} à 0.1% de SDS) pour 90 minutes à 125 volts. Les protéines ont été transférées sur une membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF) via un transfert humide en présence de tampon de transfert (3 mg/ml de Tris base, 14.4 mg/ml de glycine, 20% de méthanol). La membrane a ensuite été incubée dans une solution de TTBS (2.422 g de tris, 29.2 g de NaCl dans 1 L de H₂O_{dd} à 0.05 % de Tween et à pH 7.5) à 5 % de lait pendant 1 heure (pour un immunobuvardage d'UL24) ou pendant toute la nuit (pour un immunobuvardage de TK ou HAUL24) à 4°C afin de bloquer les sites non spécifiques à l'anticorps primaire. Après avoir deux lavages de 5 minutes au TTBS, la membrane a été marquée avec l'anticorps primaire (dilué dans 10ml de TTBS à 0.5 % de gélatine, utilisé pour tous les

anticorps primaires) pour 1 heure. Après cinq lavages de 5 minutes au TTBS, la membrane a été marquée avec l'anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort (HRP; dilué dans 10 ml de TTBS à 5 % de lait, utilisé pour tous les anticorps secondaires) pour 45 minutes. La membrane a ensuite été lavée 5 fois au TTBS et la révélation a été faite en utilisant le kit ECL Plus (GE Healthcare) et des films Biomax XAR (Kodak).

3.3.4 Anticorps

Afin de marquer UL24, un anti-sérum de rat (Pearson et Coen, 2002) à une dilution de 1 :600 a été utilisé comme anticorps primaire. Un IgG de chèvre dirigé contre les Ig de rat et conjugué à la peroxydase (Oncogene) à une dilution de 1:5000 dans d'une solution TTBS à 5 % de lait a été utilisé comme anticorps secondaire. Pour marquer HAUL24, l'anticorps primaire monoclonal IgG de souris HA.11 (dilué 1 :750, Covance) et l'anticorps secondaire de chèvre IgG dirigé contre les Ig de souris et conjugué à la peroxydase (dilué 1 :10000, Calbiochem) ont été utilisés. L'anticorps primaire de lapin dirigé contre TK (dilué 1 :2500, produit par William Summers, Université de Yale) et secondaire de chèvre dirigé contre les Ig de souris et conjugué à la peroxydase (dilué 1 :10000, Jackson Immuno Research Laboratories) ont servi lors d'immunobuvardage dirigé contre TK. Finalement, pour ICP8, l'anticorps primaire IgG de souris (dilué 1:1000, Chemicon) et l'anticorps secondaire de chèvre IgG dirigé contre les Ig de rat et conjugué à la peroxydase (dilué 1:5000, Calbiochem) ont été employés.

3.4 Production de virus recombinants

Afin d'insérer les mutations dans le génome du VHS-1, la technique de recombinaison homologue (Brown et MacLean, 1998) a été utilisée avec l'ADN infectieux du virus vUL24eGFPB (produit par Luc Bertrand, INRS-Institut Armand-Frappier). Ce virus contient le gène de l'eGFP dans le cadre de lecture d'UL24.

3.4.1 Extraction de l'ADN viral

Afin d'obtenir l'ADN infectieux du virus vUL24eGFPB, deux flacons T175 contenant 3×10^7 cellules ont été infectés à une MOI de 0.01 (voir section 3.1.2). Lorsque 20 % des cellules présentaient des effets cytopathiques, les cellules ont été récoltées et le milieu enlevé par centrifugation (240G pendant 5min). Le culot de cellules a été resuspendu dans 1 ml de RSB (solution à 10 mM de Tris à pH7.5, 10 mM de KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$ et 0.5 % de Triton) et transféré dans un microtube. Suite à une incubation sur glace de 10 minutes permettant la lyse des cellules, le microtube a été centrifugé à 400 G pendant 10 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant a été centrifugé de nouveau à 16000 G pour 90 minutes à 4°C afin de précipiter le virus. Le culot a été resuspendu dans 350µl de tampon Tris-EDTA (pH7.5), soniqué (amplitude de 50 %, pulsations de 0.5 seconde). Après y avoir ajouté 120 µl de SDS à 10% (solution finale à 2.52% de SDS) et 7 µl d'EDTA à 0.5M et pH 8.0 (solution finale à 7.34mM d'EDTA), le microtube a été incubé à 37 °C pour 5 minutes afin de lyser les virus et dénaturer les protéines de la capsid. L'ADN des virus a ensuite été extrait par phénol/chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol. Après avoir resuspendu l'ADN dans 100 µl de tampon Tris-EDTA (pH 7.5), l'ADN viral a été dosé par spectrophotométrie.

3.4.2 Co-transfection de l'ADN viral et du plasmide transfert

Pour produire des virus recombinants, des cellules Vero ont été co-transfectées avec l'ADN infectieux de vUL24eGFP et le plasmide de transfert contenant la mutation désirée (Tableau I). L'agent transfectant Lipofectamine à un ratio de 1:4 (1 µg d'ADN pour 4 µl de Lipofectamine) a été utilisé en suivant le protocole du fabricant (Invitrogen). Des pétris de culture cellulaire de 60 mm contenant 8×10^5 cellules ont été préparés la veille visant une confluence de 40% et transfectés avec 1µg d'ADN viral et 500 ng de pAG5 dans 500 µl de DMEM (soit 1 mol d'ADN viral pour 45 mol de plasmide). Après cinq heures d'incubation à 37 °C et à 5 % de CO_2 , le milieu a été remplacé pour 2 ml de DMEM à 5 % NCS et P/S. Les cellules et le milieu de culture ont été récoltés et congelés à -80°C lorsque 80 % des cellules présentaient des effets cytopathiques.

3.4.3 Criblage des virus recombinants

Les virus ayant recombinés lors de la transfection ont été criblés pour la perte de l'expression d'eGFP. Les cellules congelées provenant de la transfection ont été décongelées à 37°C, puis congelés à la glace sèche et décongelés à 37 °C à deux autres reprises avant d'être soniquées (amplitude de 50 %, pulsations de 0.5 seconde). Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 4 °C. Des dilutions successives allant de 10^{-3} à 10^{-6} ont été produites dans 6 ml de DMEM à 2% NCS P/S. Des plaques à 96 puits contenant 4×10^4 cellules Vero par puits ont été préparées, et les cellules infectées avec 50 μ l des dilutions par puits. Après 1 heure d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, 150 μ l DMEM 2% NCS P/S à 0.3% de méthylcellulose a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été retournées dans l'incubateur. Une plus petite concentration de méthylcellulose comparativement à celle utilisée lors de titrages typiques a été utilisée afin de ne pas nuire à la propagation des virus recombinants. Trois jours après, les plaques ont été observées au microscope à fluorescence (système BioRad Radiance 2000 utilisant une lampe Xenon avec un microscope Nikon Eclipse TE 2000-U) afin de cribler les puits dont les plages de lyses n'étaient pas fluorescentes. Trois rondes de criblage ont été faites afin d'obtenir un puits avec une seule plage non fluorescente. Ce puits a ensuite été dilué de nouveau et des plaques à 96 puits ont été infectées. Le puits contenant une seule plage non fluorescente et dont la plaque ne contenait 12 plages non fluorescentes ou moins a été choisi comme étant le stock « Head Master ». Cette méthode permet de s'assurer que le stock provient d'un seul isolat. Des stocks viraux ont été produits.

3.4.4 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. Des pétris de culture cellulaire de 60mm contenant 1.5×10^6 cellules Vero ont été infectés avec 10 μ l du stock « HeadMaster » des virus mutants. L'infection s'est déroulée dans 500 μ l milieu DMEM 2 % NCS P/S à 37 °C et à 5 % de CO₂. Les pétris étaient agités toutes les 15 minutes pendant 1 heure. Le milieu a ensuite été remplacé par 4 ml de DMEM 5 % NCS P/S. Lorsque 85 % des cellules

montraient des effets cytopathiques, le milieu a été remplacé par 500µl de PBS pour laver les cellules. Après avoir enlevé le PBS et ajouté 500µl de nouveau PBS, les cellules ont été récoltées. Une purification de l'ADN total par extraction au phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation à l'éthanol ont été effectuées et l'ADN resuspendu dans 50µl de tampon Tris-EDTA (pH 7.5). Le gène *UL24* a ensuite été amplifié par une PCR qui s'est faite dans les conditions suivantes : 1 µl d'ADN extrait (environ 350 ng), 2.5µl de l'amorce *UL24*amont (50ng/µl, TACGTAGACGATATCGTCGCGCGA), 2.5 µl de l'amorce *UL24*aval (50ng/µl, GATCCAAATGAGTCTTCGGACCTCCG), 5 µl de dNTP (2mM), 2.5 µl de DMSO, 5 µl du tampon 10x pour Pfu, 0.5 µl de polymérase Pfu (2.5 unités/µl, Fermentas) et 31 µl d'H₂O_{dd}. L'amplification s'est faite en trois étapes : (1) 94°C pour 5 minutes, (2) suivi de 30 fois 94°C pour 45 secondes, 61°C pour 30 secondes et 68°C pour 2 minutes, (3) et finalement 68°C pour 3 minutes. Les produits (987 pb) ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% et extrait du gel grâce au kit GenElute. L'ADN extrait a été séquencé par Génome Québec.

3.5 Cinétique d'infection

Afin de vérifier l'effet des mutations sur la capacité de répllication en culture cellulaire du virus, une cinétique d'infection a été utilisée. Des tubes de culture cellulaires de 16 mm X 125mm ont été préparés la veille avec 2.5×10^5 cellules Vero dans un volume de 2 ml. Lors de cette expérience, les tubes ont été incubés de façon inclinée (environ 30°) à 37 °C et 5 % de CO₂. Les cellules ont été infectées en duplicata à une MOI de 5 dans un volume de 500 µl de DMEM à 2% de NCS et avec P/S. Les tubes ont été incubés pour 1 heure et agités aux 15 minutes. Par la suite, 1 lavage au PBS (chauffé à 37°C) et 2 lavages au DMEM à 5 % de NCS et avec P/S (chauffé à 37°C) ont été faits avant de remplacer le milieu des tubes par 2ml de DMEM à 5 % de NCS et avec P/S. Les tubes ont été incubés à 37 °C et 5 % de CO₂ pour 24 heures. Après la période d'incubation, les tubes ont été congelés à -80°C. Avant de titrer les virus produits, les tubes ont été décongelés à 37 °C et soniqués (amplitude de 50 %, pulsations de 0.5 seconde pour 30 secondes). Dans cet essai, les virus totaux produits (intracellulaires et extracellulaires) lors de l'infection sont titrés.

3.6 Étude la morphologie des plages de lyse

Afin d'étudier la morphologie des plages de lyse, des plaques à 12 puits contenant 3.5×10^5 cellules par puits ont été préparées visant une confluence de 100%. Le jour suivant, ces plaques ont été infectées dans un volume de 300 μ l de DMEM à 2% de DMEM et P/S avec les virus à raison de 5, 50 ou 500 PFU par puits pour chaque virus. Les plaques ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ et agitées aux 15 minutes pour 1 heure. Ensuite, 1ml de DMEM 2% NCS et P/S à 0.6% de méthylcellulose a été ajouté à chaque puits. Deux jours post-infection, les puits ont été observés au microscope inversé à contraste de phase afin de prendre des photos des plages de lyse formées par le virus. Un minimum de quatre plages par souche virale ont été photographiés et une photo représentative a été montré dans la figure.

3.7 Caractérisation in vivo des virus mutants

3.7.1 Infection des souris

Afin de caractériser le phénotype in vivo des virus recombinants que nous avons produits, un modèle d'infection oculaire a été utilisé (Leib et al., 1989). Les expériences ont été faites en conformité avec les normes institutionnelles des bons soins des animaux. Avant l'infection, les souris ont été acclimatées pendant une semaine. Des souris CD-1 mâles âgées de 8 semaines (Charles River) ont été infectées au niveau de la cornée. Les souris ont d'abord été anesthésiées avec une solution saline de xylazine/kétamine (xylazine à 10 mg/kg de souris et kétamine à 100 mg/kg de souris) de façon intrapéritonéale. La patte des souris a été légèrement pincée afin de vérifier l'absence de réflexe, qui signifie que la souris était profondément anesthésiée. Chaque cornée a été légèrement scarifiée douze fois de haut en bas et douze fois de gauche à droite à l'aide d'une aiguille 30G x 1/2 pouce. Par la suite, 2×10^6 PFU de virus (contenus dans environ 10 μ l de DMEM à 1 % de NCS et avec P/S) ont été déposés sur chaque oeil. Les

inoculums ont été titrés de nouveau après chaque infection afin de vérifier que la quantité de virus utilisés était correcte. Du jour 1 au jour 10 post infection (pi), l'état des souris a été vérifié quotidiennement.

3.7.2 Caractérisation de la réplication oculaire aiguë

Pour déterminer l'efficacité de réplication oculaire aiguë, les virus présents dans les larmes des souris ont été récoltés et quantifiés du jour 1 au jour 3 pi. Pour ce faire, un cryotube par souris contenant 1 ml de DMEM P/S a été préparé. Deux cotons-tiges stériles (Puritan Medical Product) ont été insérés dans un cryotube de façon à humecter le coton. Une souris a ensuite été introduite dans une chambre individuelle d'anesthésie et anesthésié à l'isoflurane (Pr Aerrane de chez Baxter Corp.). Le temps nécessaire à l'anesthésie de la souris était de 1 minute. La souris a été enlevée de la chambre et un premier oeil a été légèrement frotté avec le premier coton-tige, soit douze fois dans le sens horaire et douze fois dans le sens antihoraire. Le coton-tige a été replacé dans le cryotube et le processus recommencé avec l'autre coton-tige et le second oeil. Par la suite, les cryotubes ont été refermés, vortexés et le milieu contenant le virus a été dilué en série dans 1 ml de DMEM à 2 % de NCS et avec P/S (dilutions 10^0 à 10^{-3}) et titrés tels que décrits à la section 3.1.3.

3.7.3 Caractérisation de la réplication neuronale aiguë

Au jour 3 pi, les virus présents dans les ganglions trigéminaux (GT) ont été quantifiés. Pour ce faire, la souris a été euthanasiée par dislocation cervicale. Le crâne a ensuite été ouvert de façon à pouvoir prélever les GT en évitant la contamination avec les virus présents dans les yeux. Les 2 GT d'une souris ont été placés ensemble dans un microtube de 1.5ml à capuchon à visser contenant 1ml de DMEM P/S. Afin de titrer le virus présent dans les GT, les ganglions ont été homogénéisés mécaniquement à l'aide de pistons pour microtube. Les homogénats ont été titrés tel que décrit à la section 3.1.3 en utilisant les dilutions 10^0 à 10^{-3} .

3.7.4 Évaluation de la capacité de réactivation des virus recombinants

Dans ce modèle animal, après trente jours, la latence est établie. La capacité des virus à se réactiver a été testée dans des co-cultures de cellules Vero et de GT dissociées. Au jour 30 pi, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Le crâne a été ouvert, les GT prélevés et chaque GT placé séparément dans un puits de plaque à 24 puits contenant 1ml de milieu de récolte (DMEM contenant 100 mg/ml de pénicilline et 100 unités/ml de streptomycine et 0.05 mg/ml de Fungizone de chez Invitrogen). Par la suite, le milieu de chaque puits a été remplacé par 1ml de milieu de dissociation (100ml de milieu de récolte contenant 4.8ml de trypsine 2.5 % et 20mg de collagénase 1-A de chez Gibco) et les plaques ont été incubées pour 1 heure à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, le milieu de dissociation a été enlevé et remplacé par 1ml de milieu d'incubation (300ml de milieu de récolte ajusté à 2 % de NCS) en faisant attention de ne pas dissocier les GT. Ensuite, les GT ont été dissociés par pipettage. 500µl d'un GT dissocié a été ajouté à un premier puits d'une plaque à 6 puits contenant des cellules Vero confluentes dans 2ml de milieu d'incubation et l'autre 500µl a été ajouté à un second puits. Les co-cultures ont été placées à 37C et 5 % de CO₂ pendant 10 jours et observées quotidiennement pour l'apparition d'effets cytopathiques dans les cellules Vero indiquant la réactivation du virus.

3.7.5 Quantification de l'établissement de la latence des virus mutants

Au jour 30 pi, les GT ont été prélevés, placé individuellement dans un microtube vissable vide et congelé immédiatement par de la glace sèche. L'ADN des GT a ensuite été extrait en utilisant le kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen, qui utilise une méthode d'extraction non organique par colonne d'affinité. Deux modifications ont été apportées au protocole du kit : la digestion à la protéinase K a duré toute la nuit et l'élution finale a été répétée à trois reprises avec 200µl de H₂O_{dd} pour ensuite combiner les trois éluions. Les échantillons ont été concentrés jusqu'à un volume d'environ 50µl en utilisant l'appareil Vacufuge Plus d'Eppendorf. Une fois l'extraction finie, les ADN ont été dosés par spectrophotométrie. Les GT de deux ou trois souris par virus par expérience ont été prélevés et conservés individuellement à -80°C. L'établissement de la latence peut être

quantifié par PCR en temps réel. L'essai de qPCR est présentement en cours d'optimisation. Les détails de l'essai et de l'avancement de l'optimisation peuvent être consultés dans l'Appendice 1.

4 Résultats

4.1 Mutagenèse des acides aminés hautement conservés d'UL24

Afin d'élucider l'importance des acides aminés hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse du VHS-1, diverses versions mutantes d'UL24 correspondant à des substitutions d'un ou deux acides aminés ont été produites. Les mutations ont été insérées par mutagenèse dirigée par PCR. La mutagenèse a été faite sur le plasmide pAG5, qui contient les gènes viraux *UL22*, *UL23* et *UL24* (Griffiths et Coen, 2003). La présence des mutations a été vérifiée par séquençage. Au total, onze versions mutantes d'UL24 ont été produites (Tableau II). La mutagenèse par PCR a été faite par Huda Hyjazie et Omar Lansari, sauf pour les versions mutantes *UL24 Q117A* et *UL24 Q154A*, produites par Gabriel André Leiva. Les acides aminés ciblés ont été substitués par des alanine, sauf pour H22. Ce dernier a été changé pour une leucine. Les mutations produites ont ciblé tous les domaines d'homologie.

Tableau II – Liste des versions mutantes d'UL24

Mutation	Domaine d'homologie
H22L	I
Y26A	I
E69A V70A	II
L72A	II
R75A D78A	II
I97A I98A	III
E99A K101A	III
Q117A	IV
G121A	IV
Q124A L125A	IV
Q154A	V

4.2 Expression des versions mutées d'UL24

Avant de pousser plus loin l'étude des mutations produites chez *UL24*, il a fallu s'assurer que les diverses versions mutées de la protéine soient exprimables dans des cellules mammifères. Malgré que les mutations ne produisent qu'une ou deux substitutions en acides aminés, il est possible qu'elles affectent la structure de la protéine

UL24. Si la protéine est mal structurée, elle pourrait être dégradée par la cellule (revu par Baumeister et al., 1998) et ne serait donc pas exprimée.

Pour tester l'expression des protéines dans les cellules mammifères, les versions mutées d'*UL24* ont été sous-clonées dans les vecteurs d'expression pLBPfl *UL24* et pLBPfl HAUL24. Dans ce dernier, une étiquette hémagglutinine (HA) est présente en amont d'*UL24*, ce qui permet l'utilisation d'anticorps de haute affinité contre l'épitope. Malgré que les versions contenant l'étiquette HA n'ont pas été utilisées dans cette étude, le sous-clonage dans pLBPfl HAUL24 a quant même été fait dans le but d'obtenir des outils pouvant être utilisés dans d'autres travaux. Pour les versions *UL24* contenant les mutations H22L et Y26A, la mutagenèse a été réalisée directement (par Huda Hyjazie) dans le plasmide pKOSHAUL24 (version de pAG5 contenant l'étiquette HA en amont d'*UL24*). Cette stratégie a été utilisée, car il n'y avait pas de site de digestion entre ces mutations et l'étiquette HA. Pour ces deux versions d'*UL24*, la même stratégie de sous-clonage que celle des versions sans étiquette a été utilisée (Figure 7), de façon à conserver l'étiquette.

4.2.1 Expression des versions mutantes d'*UL24* en cellules transfectées

L'expression des différentes versions mutantes d'*UL24* a été vérifiée. Suite à la transfection de cellules COS-7 avec les différentes versions de pLBPfl *UL24*, une quantité fixe de chaque lysat (40µl) cellulaire a été chargée pour réaliser un immunobuvardage de type western (Figure 8). Toutes les versions mutées d'*UL24* ont été

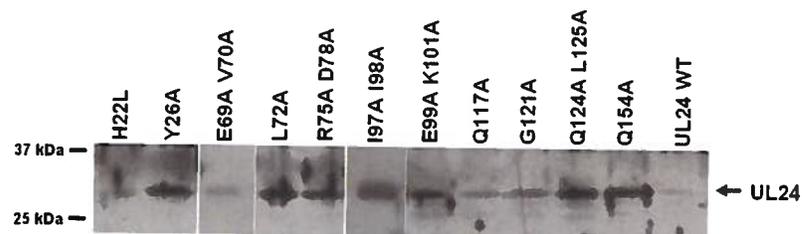


Figure 8 – Expression des versions mutantes d'*UL24* dans un contexte de transfection transitoire. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type western. La version non mutée d'*UL24* (UL24 WT) a été utilisée comme témoin. Les données de cette figure proviennent de trois expériences indépendantes.

exprimées dans des cellules mammifères (COS-7) à la taille attendue. Ainsi, la substitution des acides aminés hautement conservés d'UL24 n'a pas empêché pas l'expression de la protéine.

4.3 Création de virus mutants

4.3.1 Génération de virus par recombinaison homologue

Afin d'insérer les versions mutées d'*UL24* dans le génome du VHS-1, la capacité du virus à recombiner facilement a été utilisée. Il s'agit d'une technique déjà établie dans le domaine d'étude des virus herpès (Sanders, Wilkie et Davison, 1982). L'ADN infectieux du virus vUL24eGFPB (Luc Bertrand, non publié) a servi à produire les virus mutants. Chez ce virus, une cassette d'expression eGFP a été insérée dans le cadre de lecture d'*UL24* (entre le 2^e et le 3^e domaine d'homologie). Ainsi, les plages de lyse produites par vUL24eGFPB sont fluorescentes lorsqu'elles sont observées au microscope à fluorescence.

Les virus mutants ont été générés en co-transfectant l'ADN génomique de vUL24eGFPB et le plasmide de transfert contenant le gène *UL24* muté (plasmide pAG5t qui contient *UL22*, *UL23* et *UL24*) dans des cellules Vero. Suite à la co-transfection, il y a eu recombinaison homologue entre les gènes *UL24* de pAGt et de vUL24eGFPB de façon à ce que la version ayant la mutation désirée soit insérée dans le génome viral et que le gène *UL24* contenant la cassette eGFP soit inséré dans le plasmide de transfert. Chez les virus où il y a eu recombinaison homologue, les plages de lyses produites n'étaient pas fluorescentes lorsqu'observées au microscope à fluorescence, puisque la cassette eGFP n'était plus présente. Ces virus recombinants ont été clonés par dilutions limitantes jusqu'à l'obtention d'une plaque unique non fluorescente représentant un isolat du virus recombinant.

4.3.2 Virus recombinants produits

Pour tester notre hypothèse que les résidus hautement conservés sont importants pour la pathogenèse, nous avons choisi trois mutations d'*UL24* pour étudier dans le contexte du génome viral. Étant donné la grande quantité de versions mutantes d'*UL24* produites, nous nous sommes concentrés sur trois versions pouvant nous permettre de répondre à notre problématique. Les versions mutantes ont été choisies en fonction de leur haut niveau de conservation et de façon à tester le potentiel motif d'endonucléase. Des versions mutantes d'*UL24* ont été choisies afin de produire des virus recombinants. Il s'agit des mutations E99A K101A (ciblant le motif d'endonucléase), G121A et Q154A. En alignant la séquence d'*UL24* avec celles de ces homologues chez des virus herpes de différentes espèces animales (humain, oiseau, reptile et autres mammifères) et différentes sous-familles, soit *Alpha*, *Beta* et *Gammaherpesvirinae*, il a été observé que ces mutations ont ciblé des résidus très fortement conservés (plus de 90% de conservation; Figure 9; Knizewski et al., 2006). L'alignement a été produit en utilisant ClustalW2 du « EMBL-European Bioinformatics Institute » (disponible sur le site du EMBL au <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Deux isolats indépendants, provenant de deux transfections différentes, ont été produits pour chacun des virus. Les isolats ont été nommés -a et -b. Ceci est commun dans le domaine de recherche sur le VHS-1. Les deux isolats permettent, entre autres, de s'assurer que le phénotype observé est bel et bien dû aux mutations insérées dans le virus et non à d'autres choses, tel que des délétions aux sites de recombinaison.

	II	III	IV	V		
EBV *	(BXRFL)	RIADCVMLISGCEI	-----RVCYVIELKTCMTSMLDLSDIRK	---SQRSGQLCQLADTVIFIHITVAFL	--GROAVTLFELIFKSGKILKTHIEI	158
KSHV *	(ORF20)	HRIADCVMLVSGGHQ	-----FVCYVVELKTCMLSHQLPIHIVRI	---SQRAGLCLQSDSIHYIAHSAPP	--GTEAWTIIFELLIFKHQKTLKTVISES	220
H5V-2 *	(UL24)	FRFPDCICVFEFAND	---KTLGGVCVILELTKICKSISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKVVVILCFILVFAQRILRVSRTIR	175
ChHV	(UL24)	FRFPDCICVFEFAND	---KTLGGVCVILELTKICKSISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKVVVILCFILVFAQRILRVSRTIR	164
H5V-1 *	(UL24)	FRFPDCICVFEFAND	---KTLGGVCVILELTKICKSISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKVVVILCFILVFAQRILRVSRTIR	164
SA8	(UL24)	ARRPDCVCFEFAND	---VTLGGVCVILELTKICRISISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKRVYLCEVILVFAQRILRVSRTIR	164
CeHV-16	(UL24)	ARRPDCVCFEFAND	---VTLGGVCVILELTKICRISISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKRVYLCEVILVFAQRILRVSRTIR	164
CeHV-1	(UL24)	ARRPDCVCFEFAND	---VTLGGVCVILELTKICRISISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKRVYLCEVILVFAQRILRVSRTIR	164
BoHV-2	(UL24)	ARRPDCVCFEFAND	---VTLGGVCVILELTKICRISISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKRVYLCEVILVFAQRILRVSRTIR	164
VZV *	(ORF35)	RRPDCVCIQIES	---SGAGKTVCFIVELKSCRFSAHLHTPTKY	---HQFCGHRQLRSDTVALLKIDYLAFF	--GSRQVYLCFILIIFVAQETILRVSRTIR	164
MDV-2	(UL24)	RRPDCICIRCFRGLNEASCACGACVILELTKICRISISGGITASKR	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	---EQRATIGKQRLRHSKLLQSLAPP	--GKRVYLCEVILVFAQRILRVSRTIR	162
CaHV-1	(UL24)	QRRPDCVCTINLEH	-----ESMGLCILIELKTCRFSQRMITASKI	---IQQRGLKQLRSDSVLLRGLVAF	--GSDIEMVTFLLVFSQRTILRVSRTIR	216
EHV-4	(UL24)	QRRPDCVCTVQFGRG	---SDAKGVCILIELKTCRFSQRMITASKI	---LQRKGGHRQLRSDSVLLRGLVAF	--GSDIEMVTFLLVFSQRTILRVSRTIR	161
DEV	(UL24)	RRPDCICMKTGEA	---EADVVICIILELTKICKFVQMTIGSKQ	---QQIWTGIRQLMESAILLERIMPP	--GCSQFLICPILLVFAQRGLDIIRIIR	216
HHV-6 *	(U49)	FRFPDCIVLLKSVDAK	---DEFAHCYFFEFKTLGKSTHQS SVHNCIHOAQYLOGLRQLRHSKISFLDQYLLA	---DEVLMVWVVICIFRQWGLKLDFTFKG	157	
HHV-7 *	(U49)	CRIFDCIIVFRHTEGK	---LLKTFHCYFFEFKTLGKSTHQS SVHNCIHOAQYLOGLRQLRHSKISFLDQYLLA	---DEVLMVWVVICIFRQWGLKLDFTFKG	157	
MuHV-68	(ORF20)	RRVVDALIVVFESS	-----PHIHCFLIELKTCIKINFHQSHITIR	---EAQVESHQRLRSDSAGALAVLAFV	--GIDPCRVTAHLIFKFSQRGLMILKSYI	156
HCMV *	(UL76)	RRIPDCVILFPDSSG	---SRGIVVCYVIEFKTIYSDADQSVRHAHSLQYAEGLRQLRHSKISFLDQYLLA	---FLRPRGGQSVVVPVSVVFFQQKARDFSTFRA	172	
GTHV	(UL24)	FRFPDCVIVYRRASP	---VPHLLFVILVELKSLHIRMARTIRKA	---LORQEGGLQRLRSDSAGALAVLAFV	--GSDIEMVTFLLVFSQRTILRVSRTIR	176
PshV-1	(UL24)	GRRPDCICVLDRAGVAG	---AFRESVCLIVELKTCRFSRSALIESGK	---NQYATGLRQLRSDSAGALAVLAFV	--GADFVHIVFVIVFAQRSMRIMEVRK	222

Figure 9 - Alignement des séquences d'UL24 du VHS-1 et de ses homologues chez 19 autres virus herpes. Les séquences d'UL24 et de ses homologues ont été alignées en bleu, des *Betaherpesvirinae* en rouge et des *Gammaherpesvirinae* en vert. Les virus écrits en noir ne sont pas classés. Les résidus E99 et K101 sont surlignés en vert, le résidu G121 en jaune et le résidu Q154 en bleu. Les résidus P77 et D78, aussi impliqués dans le motif d'endonucléase, sont surlignés en rose. Les domaines d'homologie 2 à 5 sont indiqués au-dessus des séquences. Le nom des virus a été écrit sous forme d'abréviation, soit : EBV, *Virus d'Epstein Barr*; KSHV, *Virus du sarcome de Kaposi*; H5V-2, *Virus de l'herpès simplex de type 2*; ChHV, *Chimpanzee alpha-1 herpesvirus*; H5V-1, *Virus de l'herpès simplex de type 1*; SA8, *Cercopithecine herpesvirus 2*; CeHV-16, *Cercopithecine herpesvirus 16*; CeHV-1, *Cercopithecine herpesvirus 1*; BoHV-2, *Bovine herpesvirus 2*; VZV, *Virus de la varicelle*; MDV-2, *Marek's disease virus serotype 2*; CaHV-1, *Canid herpesvirus 1*; EHV-4, *Equine herpesvirus 4*; DEV, *Duck enteritis virus*; HCMV, *Cytomégalovirus humain*; HHV-6, *Virus herpes humain 6*; HHV-7, *Virus herpes humain 7*; MHV-68, *Murine herpesvirus type 68*; GTHV, *Hawaiian green turtle herpesvirus*; PshV-1, *Psittacid herpesvirus 1*.

Les premiers virus mutants produits ont été vUL24 E99AK101A-a et -b. Les mutations de ces virus ciblent directement le site catalytique de la potentielle fonction d'endonucléase de type PD (D/E)xK. Les seconds virus produits ont été vUL24 G121A-a et -b. Chez ces virus, le résidu hautement conservé muté ne serait pas impliqué dans la potentielle fonction d'endonucléase malgré qu'il soit dans le domaine d'homologie adjacent. Les troisièmes virus produits ont été vUL24 Q154A-a et -b. La mutation dans ces virus touche l'un des rares acides aminés hautement conservés du 5e domaine d'homologie.

Afin de s'assurer que la mutation désirée a bien été insérée dans le génome du virus, l'ADN génomique de chacun des isolats a été extrait et le gène *UL24* de chacun des virus a été séquencé. Tous les virus recombinants produits contenaient la version mutée d'*UL24* attendue et n'avaient plus la cassette eGFP dans leur séquence d'*UL24*.

4.4 Caractérisation des virus mutants en culture cellulaire

L'impact de la substitution des résidus hautement conservés d'*UL24* sur le comportement du virus en culture cellulaire a été examiné.

4.4.1 Expression d'*UL24* chez les virus recombinants

Pour commencer, la capacité des virus recombinants que nous avons produits à exprimer *UL24* a été vérifiée par immunobuvardage de type western. Des cellules Vero ont été infectées avec les différents virus recombinants à une MOI de 10. Après 18 heures d'infection, les lysats cellulaires ont été récoltés et analysés par immunobuvardage de type western afin de détecter *UL24*. Les niveaux d'expression de la protéine ICP8, une protéine β , ont aussi été vérifiés afin de s'assurer que les niveaux d'infection étaient similaires entre les différents virus. En comparant les niveaux d'*UL24* et d'ICP8, il a été observé que les deux isolats de chaque virus ont exprimé *UL24* à un niveau similaire au virus KOS (Figure 10). Cependant, nous avons remarqué qu'*UL24* E99AK101A exprimée lors de l'infection migrait un peu plus vite que les autres *UL24* testées. Malgré

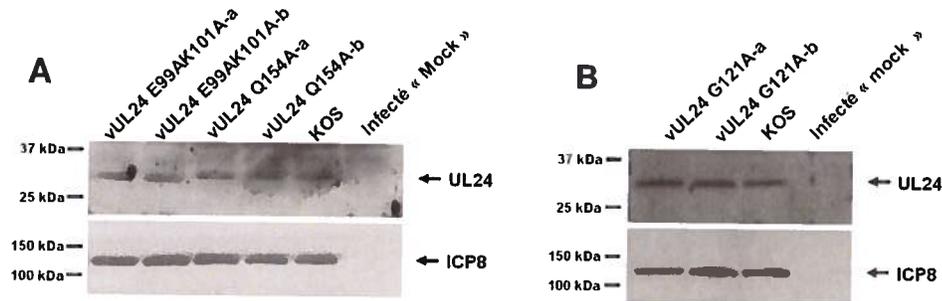


Figure 10 – Expression d’UL24 chez les différents virus recombinants. Des lysats provenant de cellules infectées pour 18 heures par les virus mutants pour UL24 ont été analysés par immunobuvardage de type western. Les niveaux d’infection ont été vérifiés en analysant la protéine virale ICP8. Des cellules infectées par le virus KOS ou non infectées (« mock ») ont été utilisées respectivement comme témoin positif et négatif. (A) Expression d’UL24 chez vUL24 E99AK101A-a et -b et de vUL24 Q154A-a et -b. (B) Expression d’UL24 chez vUL24 G121A-a et -b.

cela, suite à la génération des virus par recombinaison homologue, le niveau l'expression des versions mutées d'UL24 ont été similaire a celui de la protéine de type sauvage.

4.4.2 Expression de TK chez les virus recombinants

Tel qu'il a été expliqué précédemment, les régions 5' des cadres de lecture des gènes *UL24* et *tk* se chevauchent de 66 pb (Figure 5). Le promoteur de *tk* se retrouve donc dans la séquence d'*UL24*. Puisque les mutations E99A K101A, G121A sont dans la région générale du promoteur de *tk*, il est possible qu'elles affectent l'expression de TK.

Afin de tester les niveaux de TK exprimés chez les virus recombinants que nous avons produits, des analyses d'immunobuvardage de type western ont été réalisées. Des cellules Vero ont été infectées avec les différents virus recombinants à une MOI de 10. Étant donné que TK est une protéine β (revu par Roizman, Knipe et Whitley, 2007), les lysats cellulaires ont été récoltés 6 heures après l'infection. Les lysats ont été analysés par immunobuvardage afin de détecter TK. Encore une fois, les niveaux d’infection ont été vérifiés en analysant l’expression d’ICP8. Les deux isolats de chacun des trois virus (vUL24 E99A K101A-a et -b; vUL24 G121A-a et -b; vUL24 Q154A-a et -b) ont exprimé TK à des niveaux comparables à KOS (Figure 11). Par conséquent, les mutations insérées dans la séquence d'UL24 ne semblent pas affecter l'expression de TK chez les virus recombinants.

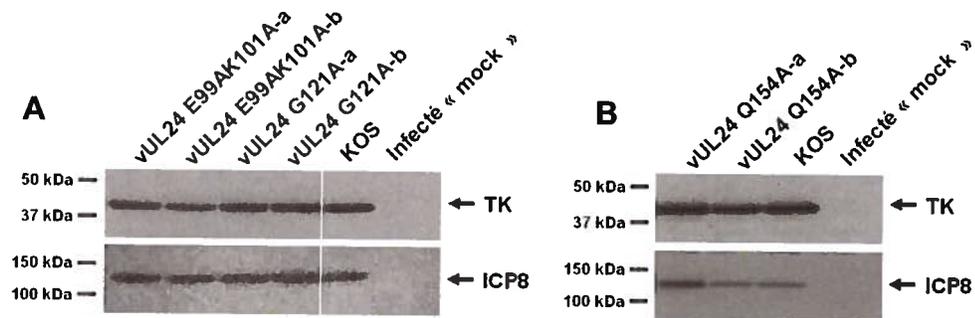


Figure 11 – Expression de TK chez les différents virus recombinants. Des lysats provenant de cellules infectées par les virus mutants pour 6 heures ont été analysés par immunobuvardage de type western pour leur expression de TK. Les niveaux d'infection ont été vérifiés en marquant la protéine virale ICP8. Des cellules infectées par le virus KOS ou non infectées (« mock ») ont été utilisées respectivement comme témoin positif et négatif. (A) Expression de TK chez vUL24 E99AK101A-a et -b et de vUL24 G121A-a et -b. (B) Expression de TK chez vUL24 Q154A-a et -b.

4.4.3 Morphologie des plages de lyse formées par les virus recombinants

Étant donné qu'un VHS-1 déficient en UL24 forme des plages de lyse de type syncytial (Sanders, Wilkie et Davison, 1982; Jacobson, Martin et Coen, 1989; Tognon et al., 1991), les plages formées par les virus recombinants que nous avons produits ont été étudiées. Pour ce faire, des plaques à douze puits contenant un tapis de cellules Vero ont été infectées par les différents virus recombinants, puis incubées à 34°C, 37 °C ou 39°C pour 2 jours sous méthylcellulose. L'infection s'est fait à faible MOI de façon à bien voir les plages individuelles. Par la suite, la morphologie des plages de lyses formées a été observée. Les virus recombinants ont été comparés au virus KOS et au virus UL24X (déficient en UL24) en parallèle. Cependant, chacune des mutations a été étudiée lors d'expériences indépendantes.

À 34°C, alors que les plages de lyse d'une expérience à l'autre ne peuvent pas être comparé directement, les virus KOS et UL24X ont formé de petites plages similaires. Tel qu'attendu, à 37°C, UL24X a formé des plages de lyse plus petites que KOS (Figure 12). Le phénotype syncytial observé avec UL24X est beaucoup plus pénétrant à 39 °C. À cette température, les syncytiums formés par ce virus sont plus évidents. À 39°C, UL24X a produit de gros syncytiums, ce que KOS n'a pas fait. Un phénotype intéressant a été

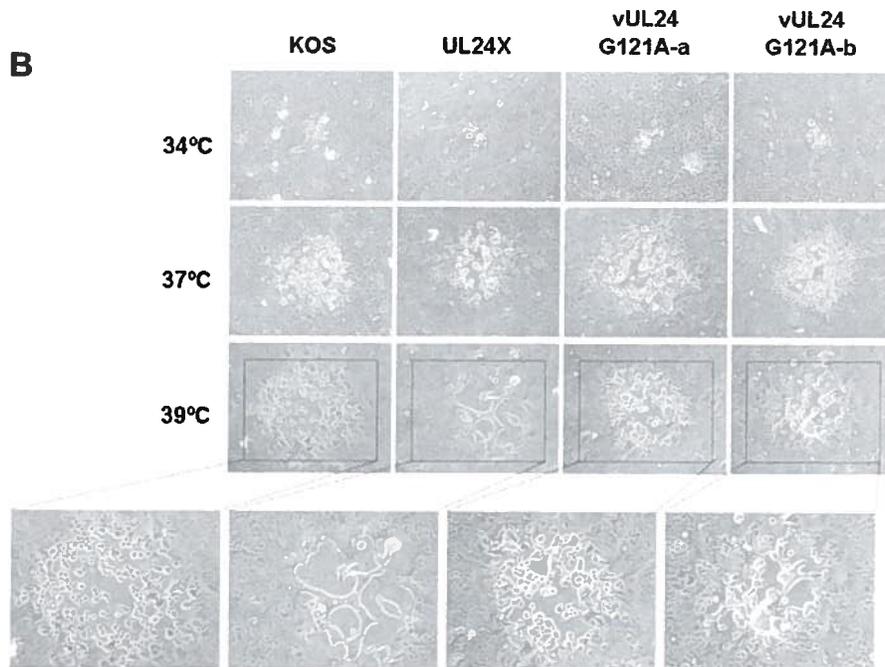
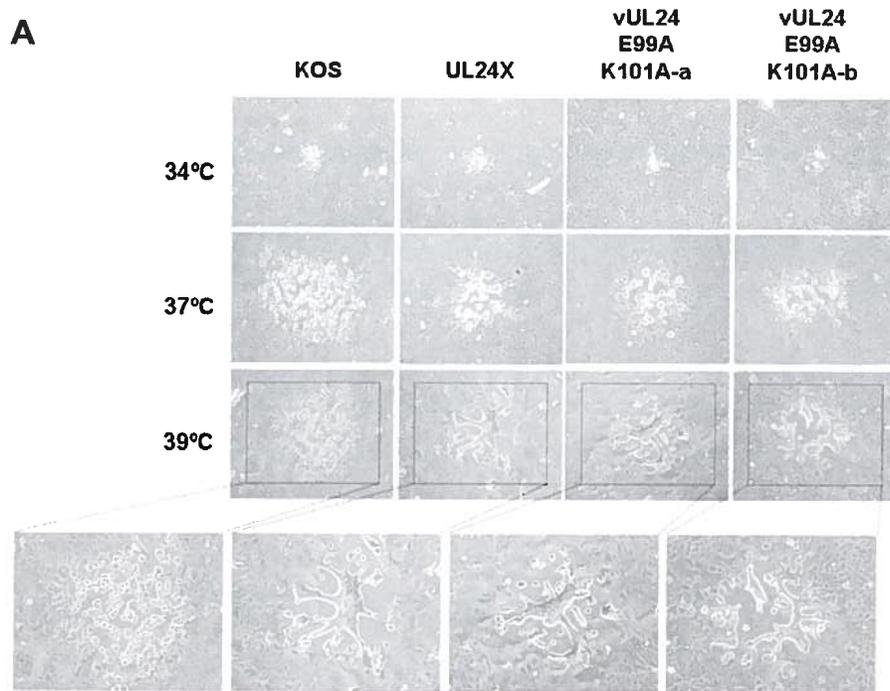


Figure 12 – Morphologie des plages de lyse formées par les virus mutants pour UL24 à différentes températures. Suite à la page 44.

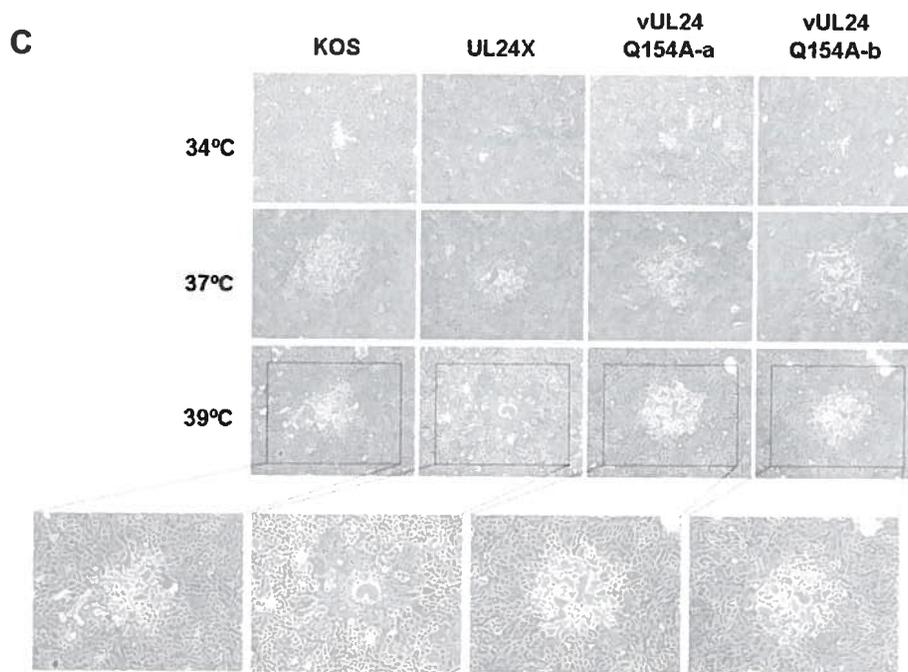


Figure 12 – Morphologie des plages de lyse formées par les virus mutants pour UL24 à différentes températures. Suite de la page 43. Chaque mutation a été étudiée lors d'expérience indépendante. Les plages illustrées représentent la morphologie typiquement observée. Les virus KOS et UL24X ont été utilisés comme témoins. Toutes les photos ont été prises à un grossissement de 100X sur des échantillons non fixés. Les plages de lyse à 39 °C ont été agrandies dans les cadres situés sous chaque figure. (A) Plages de lyses produites par les virus vUL24 E99A K101A-a et -b. (B) Plages de lyses formées par vUL24 G121-a et -b. (C) Plages de lyses générées par vUL24 Q154A -a et -b.

observé chez les deux isolats du virus vUL24 E99AK101A (Figure12A). À 34°C, les virus vUL24 E99AK101A-a et -b, KOS et UL24X ont formés des plages de lyses similaires. À cette température, le phénotype du virus UL24X est moins pénétrant. À 37°C, les deux isolats de vUL24 E99AK101A ont produits de plus petites plages de lyses que KOS. Cependant, les plages formées étaient de tailles similaires à celles formées par UL24X. Lorsque les virus ont été incubés à 39°C, température à laquelle le phénotype syncytial devient plus pénétrant (Jacobson, Martin et Coen, 1989), les virus vUL24 E99AK101A-a et -b ont produits des syncytiums semblables à ceux observés chez le virus UL24X. Ainsi, en mutant les acides aminés formant le site catalytique de la putative fonction d'endonucléase, E99 et K101, les virus ont généré des plages de lyses similaires à celles formées par un virus où UL24 a été supprimée.

La morphologie des plages de lyses formées par les virus vUL24 G121A-a et vUL24 G121A-b a été étudiée (Figure 12B). À 34°C, les deux isolats du virus ont formé des plages semblables à celles de KOS et UL24X. À 37°C, vUL24 G121A-a, vUL24 G121A -b et KOS ont produits des plages de morphologie comparable. Cependant, lorsque l'infection s'est déroulée à 39°C, vUL24 G121A-a et -b ont formés des syncytiums dont la taille variait entre des moyens syncytiums et des gros syncytiums légèrement plus petit que ceux observés chez UL24X. Malgré qu'à 37°C, la mutation de G121A chez UL24 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 lyses.

Finalement, les deux isolats de vUL24 Q154A ont été étudiés quant aux plages de lyse qu'ils produisent (Figure 12C). À 34°C et à 37°C, vUL24 Q154A-a et -b ont formé des plages de lyses similaires à celles observées chez KOS. Par contre, à 39°C, vUL24 Q154A-a et -b ont produits de petits syncytiums dont la taille était inférieure à ceux d'UL24X. Ainsi, la mutation de Q154 chez UL24 a affecté légèrement la morphologie des plages formées par le virus en provoquant la formation de petits syncytiums, contrairement à UL24X où la formation de syncytiums est très prononcée. Ces expériences ont montré que les trois mutations étudiées (E99A K101A, G121A et Q154A) ont eu n'ont pas eu le même impact sur la morphologie des plages de lyses lors de la réplication du VHS-1. Ce sont les mutations E99A K101A qui ont provoqué la formation des plus gros syncytiums très similaires à ceux formés par UL24X, suivi de G121A et finalement Q154A, qui a engendré de petits syncytiums.

4.4.4 Capacité des virus recombinants à se répliquer

La capacité des virus recombinants que nous avons produits à se répliquer en culture cellulaire a été quantifiée. Des cellules Vero ont été infectées à une MOI de 5. Après 24 heures, l'infection a été arrêtée. Le virus total (intracellulaire et extracellulaire) a ensuite été titré. Les virus KOS et UL24X ont été utilisés comme témoins. Le virus UL24X s'est répliqué à plus de ½ log de moins que le virus KOS (Figure 13A). Les deux

isolats de vUL24 E99AK101A ont eu un niveau de réplication similaire à celui de UL24X. Quant aux deux isolats de vUL24 G121A, leur niveau de réplication s'est approché de celui de KOS. Ainsi, en mutant le résidu G121 d'UL24, la capacité de réplication du VHS-1 en culture cellulaire était très légèrement affectée, tandis que les résidus E99 et K101 semblent plus critiques à la fonction d'UL24. Cependant, l'effet de supprimer UL24 n'ayant seulement qu'un effet plus petit à 1 log, les effets intermédiaires sont difficiles à quantifier en tenant compte de la variabilité expérimentale de cet essai.

Pour les virus vUL24 Q154A-a et -b, la capacité de réplication des deux isolats a beaucoup variée (Figure 13B). vUL24 Q154A-a s'est répliqué comme le virus KOS, contrairement à vUL24 Q154A-b, où le niveau de réplication a été inférieur à celui du virus UL24X. Ce résultat laisse croire que l'isolat -b de vUL24 Q154A contient d'autres modifications en plus de la mutation Q154A, puisque sa capacité de réplication est inférieure à celle observée avec un virus n'exprimant pas d'UL24. C'est pourquoi seul le

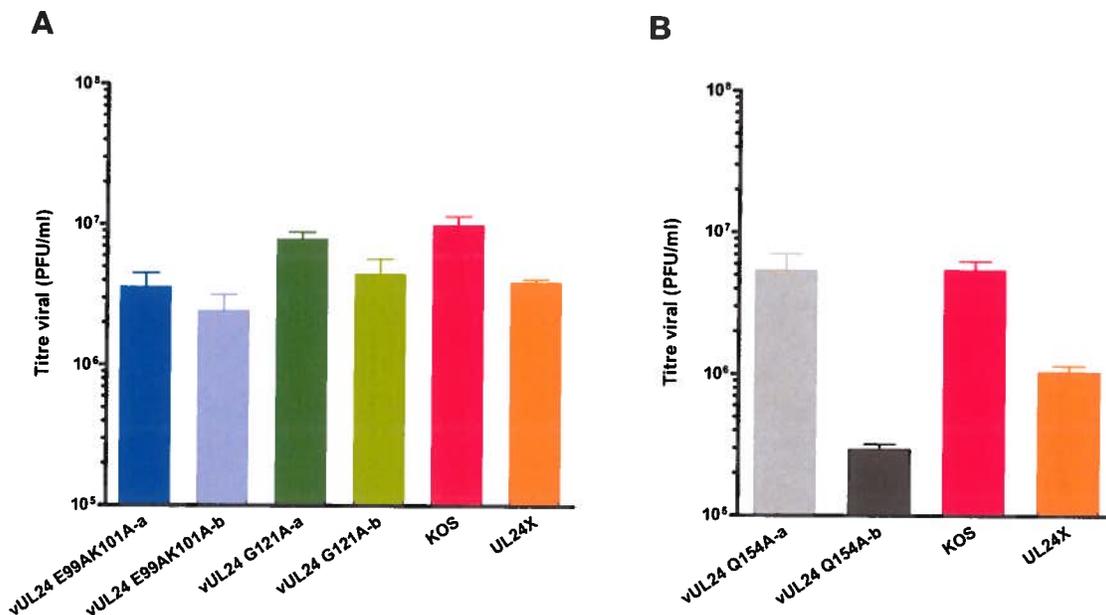


Figure 13 – Capacité de réplication des virus recombinants en culture cellulaire. Chaque virus a été testé en duplicata pour une période d'infection de 24 heures. Les virus KOS et UL24X ont servis de témoins. (A) Titres viraux pour les virus vUL24 E99AK101A-a et -b et vUL24 G121A-a et -b. (B) Titres viraux pour les virus vUL24 Q154A-a et -b.

vUL24 Q154A-a a été utilisé lors des expériences in vivo.

4.5 Caractérisation in vivo des virus mutants

Afin de déterminer l'importance des résidus hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse du VHS-1, les virus recombinants ont été étudiés dans un modèle murin d'infection oculaire (Leib et al., 1989). Ce modèle animal permet d'évaluer chacune des étapes de l'infection normalement retrouvée chez l'humain. Pour commencer, suite à l'infection, la réplication aiguë oculaire peut être quantifiée. Par la suite, le virus infecte les neurones sensitifs innervant cette région pour se répliquer dans les ganglions trigéminaux. La réplication neuronale aiguë peut aussi être mesurée. L'établissement de la latence peut y être quantifié et la capacité de réactivation du virus peut être évaluée.

4.5.1 Modèle murin d'infection oculaire

Pour caractériser l'importance des résidus hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse du VHS-1, des souris de type CD-1 ont été infectées au niveau de la cornée avec 2×10^6 PFU par oeil. Différents groupes de souris ont été infectés en parallèle avec soit un des virus recombinants que nous avons produits (un ou deux virus par expérience), le virus KOS (témoin positif), le virus UL24X (témoin négatif pour UL24) ou le virus *Δ*LTRZ1. Ce dernier virus n'exprime pas TK et est incapable de se réactiver suite à une période de latence (Davar et al., 1994) et a été utilisé comme témoin négatif pour la réactivation. Chaque virus recombinant a été testé dans au moins deux expériences indépendantes.

La réplication aiguë oculaire a été quantifiée du jour 1 au jour 3 pi (Figure 14). La réplication du virus a été déterminée en titrant les virus présents dans les larmes de la souris à raison de trois souris par virus par jour. Au jour 3 pi, les ganglions trigéminaux de trois souris par virus ont été prélevés et les virus présents titrés. De cette façon, il est

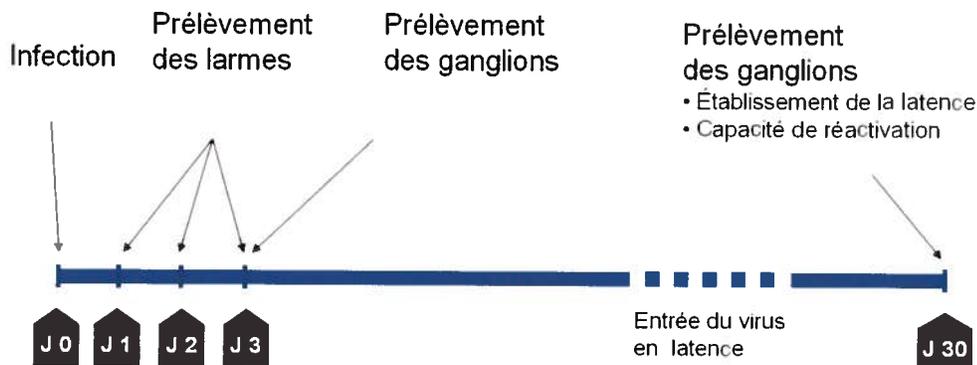


Figure 14 – Déroulement typique d’une expérience avec des souris. Lors de chaque expérience, environ 60 souris ont été divisées en plusieurs groupes et infectées en parallèle avec les différents virus. Dans ce modèle d’infection, après trente jours d’infection, la latence du VHS-1 est établit. Les manipulations effectuées à différents jours post-infection (J0, J1...) sont indiquées au-dessus de la ligne.

possible de quantifier la réplication aiguë neuronale du virus. Dans ce modèle, la latence est établie dans les trente jours suivant l’infection. Au jour 30 pi, les GT des souris ont été récoltés. En moyenne, 4 GT par groupe ont été utilisés pour quantifier le niveau d’établissement de la latence des virus par PCR quantitatif. Les autres GT ont été utilisés pour déterminer la capacité à se réactiver des différents virus. Un essai de co-culture d’explant de GT a été utilisé.

4.5.2 Quantification de la réplication aiguë oculaire des virus recombinants

La première étape de la caractérisation des virus recombinants dans le modèle murin a été de quantifier la réplication oculaire aiguë. Il a été démontré que le virus UL24X a une réplication oculaire aiguë inférieure de $1 \frac{1}{2}$ log à celle de KOS (Jacobson et al., 1998). Les virus témoins se sont comportés comme attendu (Figure 15). Ainsi, les titres du virus KOS ont atteint près de 5×10^5 PFU/ml au jour 1 pour progressivement diminuer à 2×10^4 PFU/ml au jour 3 pi. Les titres viraux d’UL24X ont été inférieurs d’un peu moins de 2 logs à ceux de KOS pour les trois jours. Quant aux titres de *tkLTRZ1*, la tendance était très similaire à celle du virus KOS.

La réplication des deux isolats de vUL24 E99AK101A a été inférieure d’au moins $\frac{3}{4}$ de log à celle de KOS, mais supérieure d’un peu plus d’un log à celle d’UL24X. Ainsi,

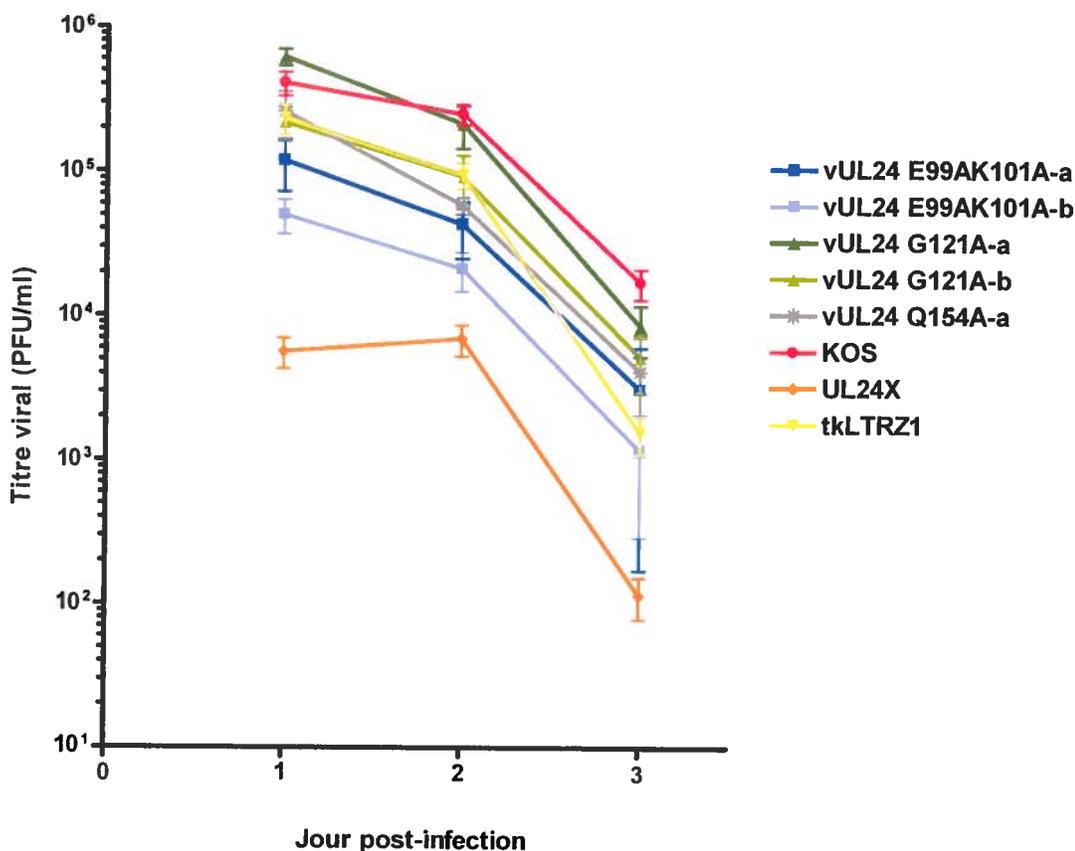


Figure 15 – Niveau de répllication aiguë oculaire des virus mutants pour UL24. Les virus présents dans les larmes des souris infectées ont été titrés du jour 1 au jour 3 pi. Chaque point représente le niveau de répllication moyen du virus pour ce jour. Les écarts types sont représentés sur le graphique. Pour les virus recombinants, les données proviennent d’au moins deux expériences indépendantes. Pour les virus témoins, les données ont été récoltées lors des sept expériences faites lors de l’étude. Le graphique représente une compilation de sept expériences.

en mutant les résidus E99 et K101, la répllication aiguë du VHS-1 dans les muqueuses est légèrement plus faible que celles de KOS. Le même effet n’a pas été observé lorsque les virus vUL24 G121A-a et -b ont été testés. Ces deux virus se sont répliqués à des niveaux similaires à celui de KOS et *tkLTRZ1*. Donc, le résidu G121 ne semble pas crucial pour la répllication aiguë du virus sur la cornée. Finalement, la mutation du résidu Q154 d’UL24 ne semble pas avoir un impact majeur sur la répllication du VHS-1 dans les muqueuses, puisque le virus vUL24 Q154A-a s’est répliqué à moins de ½ log inférieur à KOS tout en suivant la même tendance.

4.5.3 Quantification de la réplication aiguë neuronale des virus recombinants

Dans le cadre d'une infection oro-labiale, le VHS-1 infecte les neurones sensitifs des ganglions trigéminaux et s'y réplique. Ainsi, au jour 3 pi, les ganglions trigéminaux des souris infectées ont été prélevés, homogénéisés et les virus présents ont été titrés. Ceci a permis de quantifier la réplication aiguë neuronale de chacun des virus recombinants.

Le niveau de réplication des virus témoins a été tel qu'attendu (Figure 16). Le

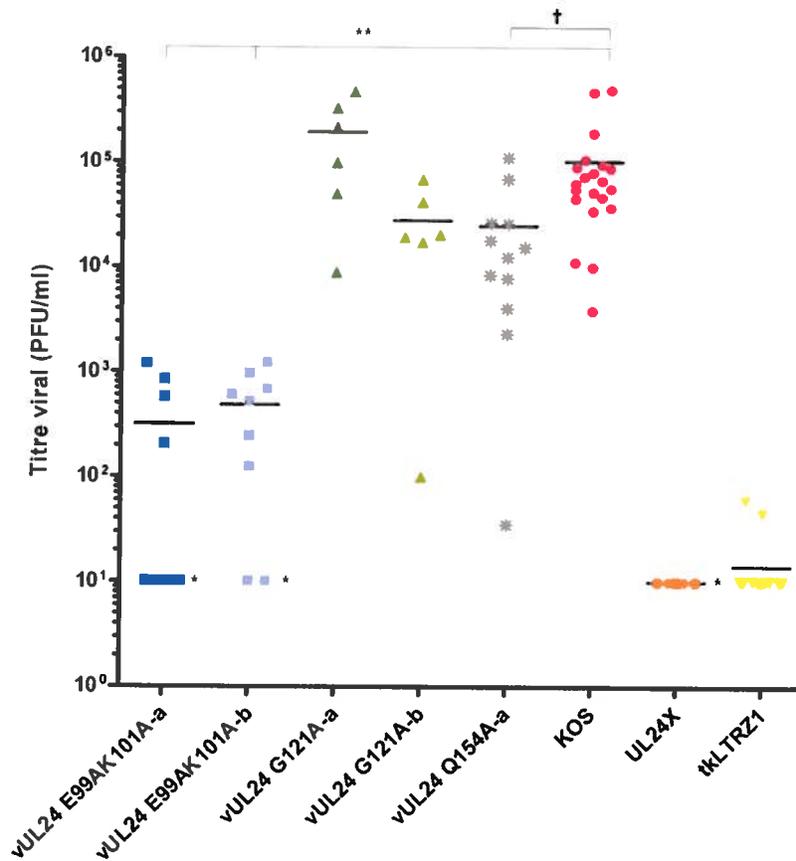


Figure 16 – Niveau de réplication aiguë neuronale des virus mutants pour UL24. Les virus présents dans les ganglions trigéminaux des souris infectées ont été titrés au jour 3 pi. Chaque point représente les titres viraux dans les ganglions d'une souris. Pour les virus mutants, les données proviennent de deux expériences indépendantes et pour les virus témoins, les données ont été récoltées lors des sept expériences faites lors de cette étude. Le graphique représente une compilation de sept expériences.

* : Titre viral sous le seuil de détection (1×10^1 PFU/ml)

** : Statistiquement différent de KOS ($p < 0.015$, test T-Student)

† : Statistiquement différent de KOS ($p = 0.027$, test T-Student)

virus KOS s'est répliqué à un niveau d'environ 2×10^5 PFU/ml. Le virus UL24X s'est répliqué à un niveau inférieur à notre seuil de détection (10^1 PFU/ml) et la grande majorité des virus *tkLTRZ1* se sont aussi multipliés à un niveau inférieur à notre seuil de détection.

La réplication aiguë neuronale des virus vUL24 G121A-a et vUL24 G121A-b a été étudiée. Malgré que les moyennes des niveaux de réplication ne soient pas identiques à celle de KOS, il n'y avait pas de différence statistiquement significative. Ainsi, les virus vUL24 G121A-a et -b ont eu une réplication neuronale aiguë s'apparentant à celle du virus KOS. Ensuite, le niveau de réplication de vUL24 Q154A-a dans les neurones ganglionnaires a été mesuré. Le niveau de réplication de ce virus a été légèrement inférieur d'environ 8 fois à celui du virus de type sauvage. Dans ces expériences, il a été observé que ce virus se répliquait à un niveau statistiquement inférieur à KOS. Donc, en mutant le résidu Q154, il semble y avoir une diminution de la réplication neuronale. Finalement, les virus vUL24 E99AK101A-a et b ont été analysés. Chez ces deux virus, un phénotype bien particulier a été observé. Chez certaines souris, le niveau de réplication des virus était d'environ 2 logs inférieurs à celui de KOS (soit environ 3×10^2 PFU/ml). Chez les autres souris, le niveau de réplication était sous le seuil de détection (10^1 PFU/ml). Chez aucune des souris testées, il n'a été détecté de réplication à un niveau intermédiaire à ces deux populations.

4.5.4 Capacité de réactivation de virus recombinants

La dernière étape de la caractérisation des virus recombinants dans le modèle murin a été d'évaluer la capacité de réactivation de ces virus. Pour ce faire, les GT des souris infectées ont été prélevés après 30 jours d'infection. Les GT ont été dissociés et mis en culture sur un tapis de cellules Vero afin d'observer l'apparition d'effets cytopathiques signifiant la réactivation virale.

Tel qu'attendu, la réactivation a été observée chez la totalité des ganglions infectés par KOS (Tableau III). Il n'y a eu aucune réactivation détectée chez les ganglions infectés par UL24X ou *tkLTRZ1*. Donc, tous nos témoins se sont comportés normalement.

Tableau III – Taux de réactivation des virus mutants pour UL24 suite à une période de latence

Virus	Taux de réactivation *
KOS	71/71 (100%)
UL24X	0/60 (0%)
<i>tk</i> LTRZ1	0/25 (0%)
vUL24 E99AK101A-a	10/38 (26.3%) †‡
vUL24 E99AK101A-b	18/44 (40.9%) †‡
vUL24 G121A-a	31/32 (96.9%)
vUL24 G121A-b	45/48 (93.8%)
vUL24 Q154A-a	17/34 (50.0%) †‡

* : Représente le nombre de ganglions ayant réactivés sur le nombre total de ganglions testés dans des essais de co-culture d'explants. Les virus recombinants ont été étudiés lors de deux expériences indépendantes et les virus témoins lors des sept expériences. Le tableau représente une compilation de sept expériences.

† : Statistiquement différent de KOS ($p < 0.0001$, test du X^2)

‡ : Statistiquement différent d'UL24X ($p < 0.0001$, test du X^2)

Lors des essais réalisés avec les ganglions infectés par vUL24 E99AK101A-a et -b, les taux de réactivation ont été de beaucoup inférieurs à celui observé chez KOS. Les deux isolats du virus se sont réactivés à des niveaux statistiquement inférieurs à KOS (26 % de réactivation pour l'isolat A et 40 % pour B). Donc, en mutant les résidus E99 et K101 d'UL24, la capacité du VHS-1 à se réactiver était grandement diminuée.

Ensuite, la capacité de réactivation des virus vUL24 G121A A et B a aussi été étudiée. Chez les deux isolats, le taux de réactivation observé a été très similaire à celui du virus de type sauvage. Donc, l'acide aminé G121, malgré le haut taux de conservation (plus de 90 % chez différents virus herpès; Figure 9; Knizewski et al., 2006), ne semble pas être important pour la réactivation du virus.

Finalement, chez le virus vUL24 Q154A-a, un phénotype intermédiaire a été observé. La réactivation a été vue chez 50 % des ganglions, ce qui est statistiquement

différent de KOS et d'UL24X. Avec ces premiers résultats, il semble que le résidu Q154 d'UL24 soit important, mais pas crucial, à la réactivation du VHS-1.

5 Discussion

Le but de cette étude a été d'élucider l'importance des résidus hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse. Pour ce faire, diverses versions d'UL24 dont les mutations insérées codaient pour une ou deux substitutions visant les acides aminés hautement conservés de la protéine ont été produites. Trois des versions mutantes ont été choisies pour générer des virus recombinants : vUL24 E99AK101A, vUL24 G121A et vUL24 Q154A. Le premier virus a ciblé le site catalytique de la fonction potentielle d'endonucléase d'UL24. Le second a touché un résidu hautement conservé dans un domaine d'homologie adjacent à ce site, mais n'étant pas prédit pour être impliqué dans cette fonction putative. Le troisième virus a ciblé l'un des rares acides aminés hautement conservés du cinquième domaine d'homologie. Tous les virus ont ciblé des acides aminés très fortement conservés chez les virus herpès (Figure 9). Ces virus ont été caractérisés en culture cellulaire et dans un modèle murin d'infection oculaire.

5.1 L'expression des protéines UL24 avec des substitutions d'acides aminés hautement conservés.

Dans les études précédentes, l'analyse d'UL24 s'est faite soit avec des virus n'exprimant pas UL24 (Jacobson et al., 1998; Jacobson, Martin et Coen, 1989) ou avec des virus n'exprimant pas UL24 de type sauvage et peu (ou pas) de TK de type sauvage, ou dans le contexte d'autres mutations (Sanders, Wilkie et Davison, 1982; Jacobson, Martin et Coen, 1989). Ceci empêchait d'étudier exclusivement l'importance des régions conservées de la protéine sans affecter directement d'autres protéines du virus ou d'autres parties d'UL24. Parmi les différentes versions mutantes d'UL24 générées dans cette étude, trois ont été choisies afin de produire des virus mutants pour UL24, soit vUL24 E99AK101A-a et -b, vUL24 G121A-a et -b, et vUL24 Q154A-a. Chez les virus recombinants produits dans la présente étude, l'expression de TK a été similaire à celle de KOS (Figure 11). Ainsi, le phénotype observé lors de la réplication dans les neurones et

lors de la réactivation virale était dû aux mutations insérées dans *UL24* et non à une baisse de l'expression de TK.

Les virus mutants que nous avons produits arborant des mutations ponctuelles dans des résidus hautement conservés d'*UL24* ont exprimé *UL24* à des niveaux similaires au virus de type sauvage KOS (Figure 10). Chez ces virus, le phénotype observé n'a donc pas été causé par une baisse de l'expression d'*UL24*. Chez les virus v*UL24* E99K101A-a et -b, dans le cadre d'infection de cellules Vero (Figure 10) la taille apparente d'*UL24* était légèrement plus petite que celle de KOS, ce qui n'était pas le cas lors de la transfection d'*UL24* seule (Figure 8). Il se peut que lors de l'infection, certaines modifications post-traductionnelles soient faites sur les résidus E99 et/ou K101 par d'autres protéines virales ou cellulaires. Par exemple, la lysine pourrait être la cible de plusieurs méthylations (revu par Walsh, 2006). Cependant, il serait étonnant que ce résidu soit méthylé, puisque dans le cadre de la potentielle fonction d'endonucléase, cela pourrait entraîner un encombrement du site de liaison à l'ADN et nuire à cette interaction (revu par Kovall et Matthews, 1999). Afin de cerner d'un peu plus près quelle est la modification en question, la production de virus exprimant soit la mutation E99A ou la mutation K101A serait utile. Ainsi, il serait possible de savoir quel résidu subit la modification et par la suite identifier la modification en question.

5.2 Implication des résidus hautement conservés dans la formation de syncytiums

Il est connu que lorsqu'*UL24* n'est pas exprimé par le VHS-1, le virus forme des syncytiums lors de l'infection de cellules en culture et que ce phénotype est plus pénétrant quand l'infection se déroule à 39 °C (Jacobson, Martin et Coen, 1989; Tognon et al., 1991). Les différents virus produits ont été testés quant à la formation de syncytiums. v*UL24* E99AK101A a formé des syncytiums semblables à ceux d'*UL24X*. v*UL24* G121A a eu un phénotype syncytial allant d'intermédiaire à fortement prononcé, tandis que v*UL24* Q154A a produit de petits syncytiums (Figure 12). Donc, des mutations

ciblant différents résidus hautement conservés ont toutes affecté la morphologie des plages, mais à des degrés différents.

La formation de syncytiums ne semble pas être exclusivement liée à la potentielle fonction d'endonucléase, puisque les virus ayant d'autres résidus hautement conservés mutés ont aussi formé des syncytiums. Cependant, il est intéressant de voir que la mutation de Q154 a conduit à la formation de petits syncytiums. Ces résultats laissent croire que plus le résidu est éloigné du potentiel site catalytique, moins l'impact sur la formation de plage syncytiales semble grand. Il faut cependant tenir compte du fait que vUL24 E99AK101A est un double mutant contrairement aux deux autres souches testées, ce qui pourrait aussi expliquer l'apparition de syncytiums. Aussi, la structure d'UL24 étant inconnue, il est possible que le repliement de la protéine provoque le rapprochement de Q154 au site catalytique, lui permettant d'être impliqué dans cette fonction. Une analyse plus approfondie de la structure tertiaire d'UL24 permettrait d'élucider cette hypothèse.

Il est connu que d'autres gènes viraux sont impliqués dans la formation de syncytiums. Les protéines virales UL20 et gK inhibent la formation de syncytium causée par la co-transfection des protéines virales de fusion gB, gD, gH et gL (Avitabile et al., 2004). UL24 pourrait jouer un rôle similaire puisque son absence du virus engendre ce phénotype. De plus, lors de la transfection d'UL24 dans des cellules épithéliales, la protéine se localise dans le Golgi (Bertrand et Pearson, 2008), lieu que les glycoprotéines virales traversent. Aussi, dans le modèle de sortie du virus d'enveloppement/dé-enveloppement, le virion acquiert son enveloppe virale à partir des vésicules dérivées du réseau trans-Golgi et des endosomes (Skepper et al., 2001; Turcotte, Letellier et Lippe, 2005). Ce lieu pourrait être un site favorable pour qu'UL24 joue son rôle. Aussi, les résidus hautement conservés de la protéine seraient cruciaux, dans la mesure où leur activité permettrait une inhibition optimale de la fusion cellule-cellule.

5.3 Implication des résidus hautement conservés dans le niveau de réplication du VHS-1 en culture cellulaire

La capacité des différents virus recombinants à se répliquer en culture cellulaire a été étudiée. Il a déjà été montré que lorsque la protéine UL24 est absente du virus, la réplication en culture cellulaire est diminuée (Jacobson, Martin et Coen, 1989; Jacobson et al., 1998). Dans la présente étude, ce sont les effets de mutations ponctuelles dans les résidus hautement conservés de la protéine, n'empêchant pas son expression, qui ont été étudiés. La mutation du site catalytique de la putative fonction d'endonucléase (E99A K101A) a provoqué une diminution de $\frac{1}{2}$ log de la réplication après 24 heures d'infection, soit à un niveau similaire au virus déficient en UL24 (Figure 13A). Ces résultats semblent démontrent que ces deux acides aminés hautement conservé d'UL24 sont important pour la réplication du VHS-1. Aussi, puisque ces deux résidus forment le site catalytique de l'endonucléase potentielle, l'hypothèse qu'UL24 joue cette fonction semble être corroborée. Aussi, en mutant le résidu G121, la réplication du virus n'a pas semblé être affectée, malgré que ce résidu soit fortement conservé (Figure 8). Quant au résidu Q154, il faudra l'étude d'un autre isolat viral afin de confirmer le phénotype observé avec vUL24 Q154A-a. Ce virus s'est répliqué à un niveau similaire au virus KOS. Advenant que le prochain isolat soit similaire à l'isolat A et en tenant compte que la mutation de G121 provoque la formation de syncytiums tout en maintenant un niveau de réplication similaire à KOS, il sera possible de conclure que la formation de syncytiums ne corrèle pas directement avec une diminution de la capacité du virus à se répliquer. Les virus vUL24 G121A-a et -b seront donc des outils intéressants pour étudier les mécanismes moléculaires de la formation de syncytiums dans le contexte d'une réplication de niveau similaire à celui du virus de type sauvage. En effet, à ce jour, il n'y a aucune publication de mutations d'UL24 qui causent la formation de syncytiums sans affecter l'efficacité de réplication.

5.4 Importance de certains résidus hautement conservés d'UL24 dans la réplication aiguë oculaire du VHS-1

Afin de déterminer l'importance des acides aminés hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse du VHS-1, les différents virus recombinants que nous avons produits ont été testés dans un modèle murin d'infection oculaire. Lorsqu'UL24 n'est pas exprimée, la réplication oculaire du VHS-1 est réduite de 1.5 log par rapport à KOS (Jacobson et al., 1998). Cependant, les virus dont la mutation cible des résidus hautement conservés prédits pour ne pas être impliqués dans la fonction d'endonucléase (G121 et Q154; Knizewski et al., 2006) ont présenté une réplication similaire à celle du virus KOS (Figure 15). Un patron différent a été observé lors de l'étude des virus arborant des mutations dans le site catalytique de la fonction putative. vUL24 E99AK101A-a et -b ont eu une réplication intermédiaire à celle de KOS et UL24X (Figure 15). Ainsi, le motif d'endonucléase pourrait être important pour la réplication du virus chez l'animal. Aussi, le fait que ces virus se répliquent à un niveau supérieur à UL24X renforce l'hypothèse qu'UL24 soit une protéine multifonctionnelle (Lymberopoulos et Pearson, 2007). Si UL24 n'avait qu'une seule activité, potentiellement d'endonucléase (Knizewski et al., 2006), en inhibant le site catalytique, un phénotype similaire à celui d'UL24X pourrait être observé, ce qui n'est pas le cas. Aussi, dans cette étude, seules des mutations ciblant la partie N-terminale de la protéine ont été étudiées. Il est possible que la région C terminale de la protéine soit importante pour une autre fonction d'UL24. L'étude *in vivo* de VHS-1 ayant une délétion de la portion N-terminale de la protéine aidera à élucider si les diverses fonctions d'UL24 sont propres à l'une ou l'autre des portions de la protéine. Ces virus sont présentement à l'étude dans le laboratoire.

5.5 Impact de la mutation des résidus hautement conservés dans la réplication neuronale aiguë du VHS-1

La capacité de réplication dans les neurones des virus ayant des mutations dans les résidus hautement conservés d'UL24 a été étudiée. Chez des virus n'exprimant pas UL24,

la réplication neuronale est diminuée de 4 logs par rapport à KOS (Jacobson et al., 1998). Lorsque le résidu dans le domaine d'homologie adjacent au potentiel site catalytique (G121) est muté, la réplication neuronale aiguë ne semble pas avoir été affectée (Figure 16). Ainsi, malgré son haut niveau de conservation, le résidu G121 ne semble pas être important pour la réplication du VHS-1 dans les cellules du système nerveux, ni dans les muqueuses.

En mutant un acide aminé hautement conservé du cinquième domaine d'homologie (Q154), une baisse de la réplication virale a été détectée (Figure 16). Malgré qu'il s'agisse de résultats préliminaires pour cette mutation (un seul isolat a été testé), il est possible de voir que Q154 est un résidu important pour la réplication neuronale, mais ne semble pas l'être pour la réplication dans les muqueuses. Comme pour des virus n'exprimant pas UL24, l'importance du résidu Q154 varie selon le type de cellule infectée. Les cellules neuronales sont des cellules qui ne se divisent pas. Une hypothèse serait que UL24 pourrait contrebalancer l'absence dans les neurones d'un état propice à la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Ainsi, un virus déficient en UL24 aurait moins de problèmes de réplication dans les muqueuses que dans les neurones. Par exemple, un virus n'ayant pas de thymidine kinase virale (TK, impliqué dans la phosphorylation de nucléotides; revu par Roizman, Knipe et Whitley, 2007) se réplique mal dans les neurones, malgré que la réplication dans les muqueuses soit normale. Puisque les neurones ne se répliquent pas, la machinerie cellulaire impliquée dans la synthèse de nucléotides, essentielle à la réplication de l'ADN, n'est pas active. Le virus doit donc contrebalancer ce manque, d'où la difficulté d'un virus déficient en TK à se répliquer dans les neurones, mais non dans les muqueuses (Ho et Mocarski, 1988; Coen et al., 1989; Jacobson et al., 1993). Il reste cependant à déterminer si UL24 joue un rôle dans des mécanismes propres aux neurones.

Le phénotype observé lors de l'analyse de la réplication aiguë neuronale des virus arborant les mutations du potentiel site catalytique (E99A et K101A) a été surprenant. Deux phénotypes distincts ont été observés chez chacun des deux isolats (Figure 16). Chez certaines souris, la réplication était d'environ 2 logs sous le niveau de KOS. Chez

les autres souris, la réplication a été sous le seuil de détection. Une hypothèse serait que les résidus E99 et K101 sont critiques pour la réplication neuronale et que certains virus aient acquis des mutations supplémentaires lors de l'infection suite à une pression de sélection. Donc, la réplication dans les neurones pourrait être due à des mutations permettant l'apparition de révertants. Aussi, des mutations compensatoires ailleurs dans *UL24* ou dans un autre gène pourraient avoir eu lieu. Ces mutations permettraient au virus ayant une mutation dans le motif d'endonucléase de se répliquer dans les neurones de la souris. De plus, ces mêmes virus pourraient être ceux chez qui la réactivation a été observée (chez 26 % des ganglions trigéminaux pour l'isolat A et 40 % pour le B). Ces modifications supplémentaires viendraient corroborer l'importance de ce motif pour *UL24*. Le séquençage d'*UL24* des virus provenant des ganglions trigéminaux infectés permettrait de vérifier cette hypothèse. Néanmoins, l'étude des virus vUL24 E99AK101A A et B a permis déterminer que le troisième domaine d'homologie d'*UL24* est important pour la réplication neuronale du VHS-1.

5.6 Importance différentielle des acides aminés hautement conservés d'*UL24* dans la réactivation virale

La dernière étape de cette étude a été de caractériser l'importance des résidus hautement conservés d'*UL24* dans la réactivation virale. Suite à l'établissement de la latence, la capacité de réactivation des virus a été testée dans des essais de co-cultures des explants de ganglions trigéminaux. Chez les virus où *UL24* n'est pas exprimée, la réactivation du VHS-1 est pratiquement nulle (Jacobson et al., 1998). Lorsque le résidu G121 a été muté, les taux de réactivation virale ont été similaires à KOS (Tableau IV). Ainsi, malgré que cet acide aminé soit très conservé chez les virus herpès, il ne semble pas être important pour la pathogenèse autant au niveau de la réplication aiguë dans les muqueuses et les neurones que dans la réactivation virale. En fait, le seul phénotype particulier que les méthodes utilisées dans cette étude nous ont permis de détecter a été la formation de syncytiums. Ceci est un nouveau phénotype viral et fait contraste avec les études précédentes, où des virus déficients en *UL24* ont tous produit ce type de plaque et

ont eu une pathogénèse réduite (Jacobson et al., 1998). Ainsi, l'étude de ce résidu a permis de discriminer la formation de plages syncytiales de la diminution de la pathogénèse lorsqu'UL24 est muté. La formation de ce type de plage de lyse n'est donc pas liée à une diminution de la réplication virale et de la réactivation.

Les virus ayant le site catalytique de la fonction putative d'endonucléase mutée (vUL24 E99AK101A-a et -b) ont eu des taux de réactivation significativement inférieurs à celui de KOS (soit 26 % et 40 % de réactivation, contre 100 % pour KOS), tout en restant supérieurs au taux de UL24X (de 0 %). Il est donc plausible que lorsque cette fonction potentielle est directement affectée, la capacité de réactivation du virus est largement réduite. Plus d'une hypothèse peut expliquer cette réduction. Premièrement, le site catalytique potentiel pourrait jouer un rôle direct dans le processus de réactivation du virus. Par exemple, UL24 pourrait altérer la structure du génome afin de permettre un accès optimal aux promoteurs viraux en permettant une libération du génome viral des histones lors de la réactivation. L'homologue d'UL24 chez HCMV a déjà été impliqué dans l'expression génique (Wang, Duh et Chang, 2000). Deuxièmement, tel que démontré précédemment, la fonction putative d'endonucléase pourrait être importante pour la réactivation due à son implication dans la réplication neuronale du virus. Malgré que le virus puisse se réactiver, une diminution de la réplication neuronale entraînerait une diminution de la production virale, suivie d'une diminution du nombre de neurones infectés de façon latente, et de façon indirecte, une diminution de la réactivation. Troisièmement, s'il y a une baisse de l'établissement de la latence chez ces virus (ce qui reste à confirmer), il y aura moins de neurones infectés de façon latente. Ceci additionné à l'hypothèse précédente entraînerait une grande diminution du nombre de virus pouvant réactiver, d'où le faible taux de réactivation observé. La quantification de l'établissement de la latence de vUL24 E99AK101A-a et -b permettra de déterminer laquelle de ces hypothèses est la bonne. Ensuite, en infectant les souris avec de plus hauts titres viraux de façon à obtenir un niveau d'établissement de la latence similaire à celui de KOS, il serait possible de vérifier si la réduction de la réactivation est due au rôle direct des résidus mutés. Cette méthode a déjà été utilisée lors de l'étude de TK (Chen, Pearson, Coen et Chen 2004).

Un autre point intéressant est que la capacité de réactivation du virus contenant les mutations ciblant directement le site catalytique potentiel n'est pas tombée proche de zéro comme chez UL24X (Tableau IV et Jacobson et al., 1998). Donc, la fonction potentielle d'endonucléase d'UL24 ne semble pas la seule à être importante pour la pathogenèse du VHS-1. Ceci vient encore une fois appuyer l'hypothèse qu'UL24 soit une protéine multifonctionnelle déjà avancée par notre groupe (LyMBERopoulos et Pearson, 2007).

Chez vUL24 Q154A-a, la réactivation virale a été observée chez 50 % des ganglions infectés (Tableau IV). Le phénotype *in vivo* observé chez ce virus est intéressant dans la mesure où il s'agit de la première étude visant le cinquième domaine d'homologie. Ainsi, malgré qu'il s'agisse que des résultats provenant d'un seul isolat, il semble que le résidu Q154 soit important pour la réactivation virale. Trois hypothèses peuvent expliquer ce qui a été observé. Malgré son éloignement, Q154 pourrait être impliqué dans la fonction potentielle d'endonucléase, et ce, malgré qu'il n'a pas été prédit pour le faire (Knizewski et al., 2006). Suite au repliement de la protéine, Q154 pourrait se rapprocher du site catalytique et ainsi contribuer de façon directe à cette fonction. L'autre option est que ce résidu est important pour la structure tertiaire de la protéine. En le mutant, la conformation d'UL24 pourrait être légèrement modifiée, affectant du fait même l'activité putative d'endonucléase. Pour ces deux hypothèses, une étude structurale d'UL24 serait grandement utile. Finalement, Q154 pourrait jouer un rôle dans une autre fonction d'UL24 importante pour la réactivation, donc en mutant le résidu la réactivation est compromise. L'étude de facteur interagissant avec UL24 dans le cadre d'une co-immunoprécipitation suite à l'infection de neurone permettrait de clarifier ce point.

5.7 La fonction potentielle d'endonucléase d'UL24

Tel qu'expliqué précédemment, une étude en bio-informatique a prédit qu'UL24 pourrait être une endonucléase de type PD (D/E)xK (Knizewski et al., 2006), cependant la fonction n'a pas été démontrée. Les résultats obtenus en culture cellulaire et *in vivo* avec

les virus contenant des mutations ponctuelles dans le potentiel site catalytique montrent que ce site est très important pour la biologie du virus. Il reste à vérifier si cette fonction est réelle. Pour commencer, malgré qu'une possible structure secondaire typique des endonucléases de type PD (D/E)xK a été prédite (Knizewski et al., 2006), une étude de la structure d'UL24, par cristallographie par exemple, aiderait à savoir si la structure d'UL24 s'apparente à un sous-type d'endonucléases particulier. Aussi, des essais de digestion d'ADN cellulaire et viral pourraient être utilisés. En comparant la protéine de type sauvage avec celle ayant le site actif putatif muté (UL24 E99A K101A), il serait possible de vérifier la capacité de clivage d'UL24 et l'importance des résidus E99 et K101 dans cette fonction. Ces études permettront de déterminer si le phénotype observé avec les virus ayant les mutations E99A et K101A est bel et bien dû à une inhibition de la potentielle fonction d'endonucléase.

5 Conclusion

Dans cette étude, l'importance des résidus hautement conservés d'UL24 dans la pathogenèse du VHS-1 a été étudiée. Parmi les versions mutées du gène, trois ont été choisies afin de générer des virus recombinants permettant de tester l'importance de la potentielle fonction d'endonucléase d'UL24. Les virus vUL24 E99AK101A-a et -b (ciblant le site catalytique putatif) ont démontré une réplication en culture cellulaire diminuée, ont produit des syncytiums et ont eu une pathogenèse fortement réduite. vUL24 Q154A-a (résidu hautement conservé du 5^e domaine d'homologie d'UL24) a produit de petits syncytiums et la pathogénicité de ce virus a été affectée, surtout au niveau de la réactivation. Quant à vUL24 G121A-a et -b (adjacent à ce site, mais n'étant pas prédit pour être impliqué dans cette fonction), la formation de syncytiums a été observée, mais la pathogenèse ne semble pas avoir été réduite. Ainsi, le motif d'endonucléase d'UL24 semble être important pour la pathogenèse du virus, tandis que les autres résidus hautement conservés de la protéine qui ont été testés n'ont pas une importance aussi cruciale qu'E99 et K101.

L'importance des acides aminés testés dans cette étude pourra être appliquée aux autres virus de la famille des *Herpesviridae*. Étant donné que des phénotypes similaires à ceux d'UL24X ont été observés lors de l'étude des homologues d'UL24 chez VHS-2 et VZV, l'importance des résidus E99, K101, G121 et Q154 pourrait être similaire chez ces virus. Il s'agit de deux *Alphaherpervirinae* humains dont la formation de syncytiums a été observée lorsque l'homologue d'UL24 n'est pas exprimé. De plus, chez ces virus, UL24 est important pour une pathogenèse optimale du virus (Blakeney et al., 2005; Ito et al., 2005). L'étude des résidus hautement conservés d'UL24 chez VHS-2 et VZV aiderait à éclaircir cette question.

Aussi, l'étude du résidu G121 d'UL24 du VHS-1 a permis de discriminer la formation de syncytiums de la baisse de la pathogénicité observée lors de l'infection avec des virus déficients en UL24. En mutant ce résidu, la formation de syncytium a été observée sans qu'il y ait de baisses du niveau de réplication en culture cellulaire et sans

que la pathogénicité du virus soit affectée. En utilisant les virus vUL24 G121A-a et -b, il sera possible d'étudier les mécanismes moléculaires de la formation de plages syncytiales sans affecter d'autres aspects de la biologie du virus. De plus, l'étude de ce résidu a soulevé une question intéressante. Pourquoi un résidu aussi conservé n'est-il pas important pour la pathogenèse du virus? Une étude plus poussée de ces virus permettrait de répondre à cette question.

Il a été prédit qu'UL24 serait une endonucléase de type PD (D/E)xK (Knizewski et al, 2006), mais la fonction n'a pas été démontrée. Dans la présente étude, le motif d'endonucléase a été muté. Autant la réplication en culture cellulaire que la pathogenèse du VHS-1 ont été fortement affectées. Ceci suggère que le motif est très important pour UL24. Ainsi, la possibilité d'une fonction d'endonucléase de type PD (D/E)xK semble réaliste étant donné l'importance des résidus formant le potentiel site catalytique (soit E99 et K101). L'étude plus exhaustive des autres résidus formant ce site potentiel permettra d'élucider la fonction d'UL24. Aussi, en mutant le motif d'endonucléase (E99 et K101A), la pathogenèse a été réduite, mais jamais à un niveau aussi bas que chez UL24X. Ainsi, si la putative fonction d'endonucléase était la seule fonction d'UL24, un phénotype similaire à celui d'UL24X aurait été observé. Donc, l'étude de vUL24 E99AK101A a permis de déterminer qu'UL24 pourrait jouer plus d'une fonction lors de l'infection virale.

Finalement, puisque la réplication neuronale et la réactivation du VHS-1 sont fortement réduites lors de la mutation du motif d'endonucléase, l'élaboration de traitements ciblant ce site permettrait une diminution de l'infection neuronale, parfois associée à des encéphalites, en particulier chez les nouveau-nés. De plus, en ciblant ces acides aminés, la réactivation serait réduite, ce qui pourrait être utile lors du traitement des infections récurrentes chez les individus immunodéprimés. Alliée à un traitement à l'acyclovir, ce type de thérapie serait fortement efficace. En continuant d'étudier le mécanisme d'action d'UL24, l'élaboration de tel traitement sera possible.

6 *Appendice*

Développement d'essais pour la quantification de l'établissement de la latence

Afin de quantifier l'établissement de la latence des virus mutants, un essai de PCR en temps réel (qPCR) sera utilisé. L'ADN total provenant des ganglions trigéminaux prélevés chez des souris après trente jours d'infection sera utilisé. Pour chacune des expériences, les ganglions d'environ deux souris par virus ont été prélevés et conservés individuellement à -80°C. Chaque ganglion trigéminal sera traité individuellement. Suite à l'extraction de l'ADN total des ganglions (voir section 3.7.5), un essai de qPCR utilisant le SYBr Green sera employé afin de quantifier le nombre de génomes viraux total présent dans chaque ganglion. En ce moment, l'ADN total d'environ le quart des ganglions a été extrait. Dans cette section, l'avancement de la mise au point de cet essai est décrit.

Pour quantifier les génomes viraux, le gène viral *ICP4* a été amplifié. Les amorces 4-1 et 4-2 (Kramer et Coen, 1995) ont été utilisées afin d'amplifier ce gène viral. Le kit DyNAmo SYBr Green (Fynnzymes) a été employé lors de cet essai de qPCR. Pour chaque réaction de 10 µl, 5 µl de DyNAmo 2x, 0.2 µl de l'amorce 4-1 (15 pmol/µl), 0.2 ml de l'amorce 4-2 (15 pmol/µl) et 3.6 µl d'H₂O_{dd}. Les échantillons ont été quantifiés dans l'appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Science). L'amplification s'est fait en deux étapes : (1) 94°C pour 5 minutes, (2) suivi de 35 cycles de 94°C pour 15 secondes, 60°C pour 15 secondes, 72°C pour 20 secondes et 85°C pour 10 secondes (acquisition des données à 85°C). La spécificité de cette réaction a été testée lors d'une PCR « classique » sur l'ADN total provenant de cellules Vero infectées avec KOS et UL24X (Figure 17) et un seul produit spécifique a été formé par cette réaction. Afin de produire une courbe standard permettant de quantifier les génomes viraux présents dans les GT, le plasmide EcoRIB (Campbell, Palfreyman et Preston, 1984) a été utilisé. Ce plasmide contient une copie du gène viral *ICP4*. En ce moment, la gamme dynamique de cet essai



Figure 17 – Spécificité des réactions de PCR dirigées contre le gène viral *ICP4* et le gène cellulaire *adipsine*. Les réactions de PCR dirigées vers ces deux gènes ont été testées lors de PCR indépendantes sur l'ADN total provenant d'infection de cellule Vero par le virus KOS et UL24X en duplicata. Les produits de ces réactions ont été migrés dans un gel d'agarose à 1%. É signifie l'échelle de poids moléculaire.

va de 10^3 à 10^7 molécules d'EcoRIB (Figure 18A). La courbe standard dans cette gamme est fiable, puisque la valeur du coefficient de détermination de la régression linéaire (R^2) est supérieure à 0,99. De plus, le produit spécifique est détecté à 85°C, température d'acquisition de la fluorescence (Figure 19 A). Cependant, il a été démontré que dans les ganglions infectés de façon latente, environ 10^2 génomes viraux d'UL24X ont été détectés dans un ganglion (Jacobson et al., 1998). Lorsque la quantité d'ADN servant à l'amplification est faible, la formation de dimère d'amorces non spécifique peut être observée (comme dans le cas du témoin sans ADN). Pour détecter 10^2 copies d'ICP4. Il faudra donc optimiser un peu plus l'essai afin d'augmenter la sensibilité tout en conservant la spécificité de l'essai.

Étant donné que la quantité d'ADN extrait peut varier d'un échantillon à l'autre, les résultats ont été normalisés en amplifiant le gène cellulaire *adipsine*. Ce gène cellulaire a été amplifié en utilisant les amorces MT-1 et MT-2 (Kramer et Coen, 1995) dans la réaction suivante : 5 μ l de DyNAmo 2x, 0.2 μ l de l'amorce MT-1 (15 pmol/ μ l), 0.2 ml de l'amorce MT-2 (15 pmol/ μ l), et 3.6 μ l d'H₂O_d. L'amplification s'est fait en deux étapes : (1) 94°C pour 5 minutes, (2) suivi de 35 fois le cycle de 94°C pour 30 secondes, 55°C pour 15 secondes, 72°C pour 20 secondes (acquisition des données à 72°C). La spécificité de cette réaction a été testée lors d'une PCR « classique » sur l'ADN total provenant de cellules Vero infectées avec KOS et UL24X (Figure 17) et un seul

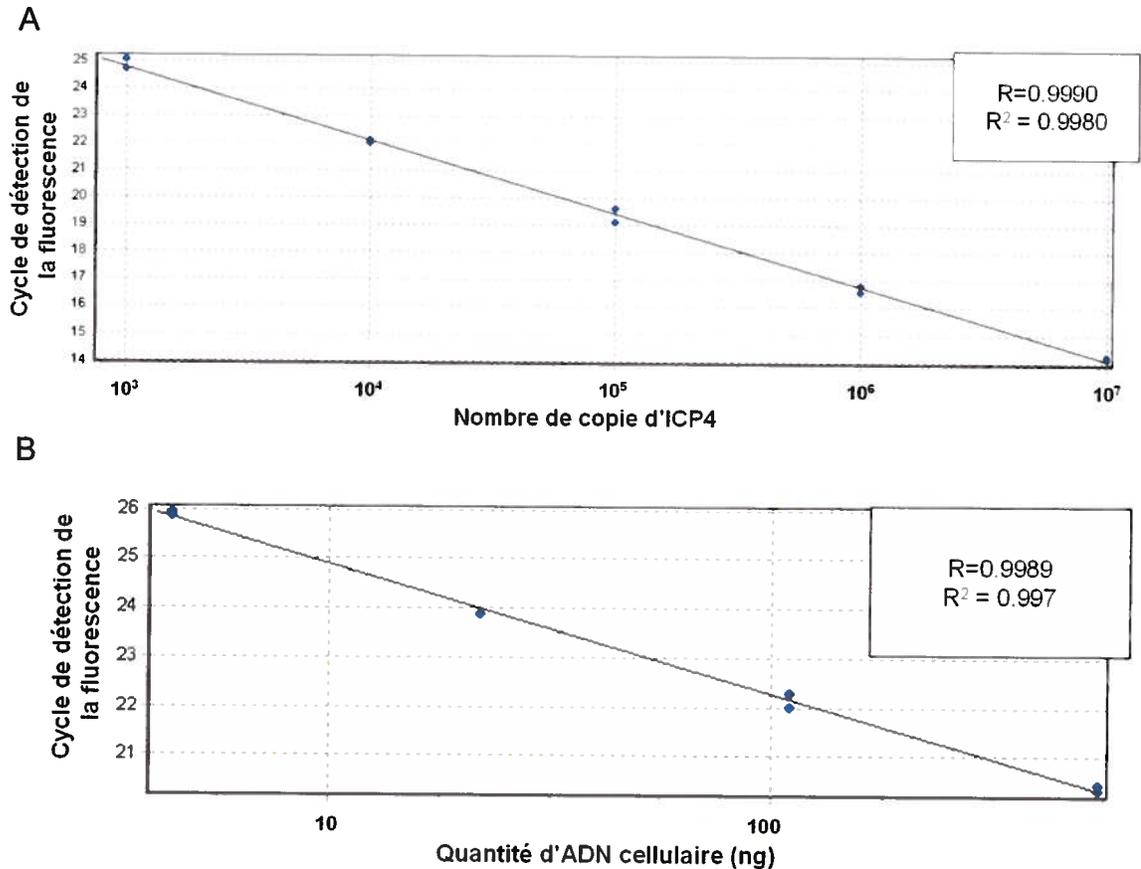


Figure 18 – Courbes standards de l’essai de qPCR utilisée pour la quantification du gène viral *ICP4* et du gène cellulaire *adipsine*. Les courbes standard ont été formées avec les échantillons servant de témoins dont la quantité est connue en fonction du cycle d’amplification où la fluorescence est détectée. Les témoins ont été testés en duplicata. Les courbes ont été générées par le logiciel Rotor Gene 6 de Corbett Life Science. (A) Courbe standard pour la quantification du gène viral *ICP4*. Les quantités de molécules utilisées vont de 10³ à 10⁷ molécules d’EcoRIB. (B) Courbe standard pour la quantification du gène cellulaire *adipsine*. Les quantités d’ADN cellulaire utilisé vont de 0,44 ng à 55 ng.

produit spécifique a été formé par cette réaction. Pour cet essai, la qPCR est au point. L’ADN total provenant de ganglions non infectés sera utilisé comme standard. La gamme dynamique de cet essai permet de quantifier le nombre de génomes cellulaires murin présents dans les échantillons expérimentaux (Figure 18B). De plus, la courbe standard est fiable ($R^2 > 0,99$). Aussi, dans la gamme dynamique de l’essai, seul le produit spécifique est détecté (Figure 19B). Cette normalisation permettra d’exprimer les résultats en nombre de génomes viraux par ganglion infecté.

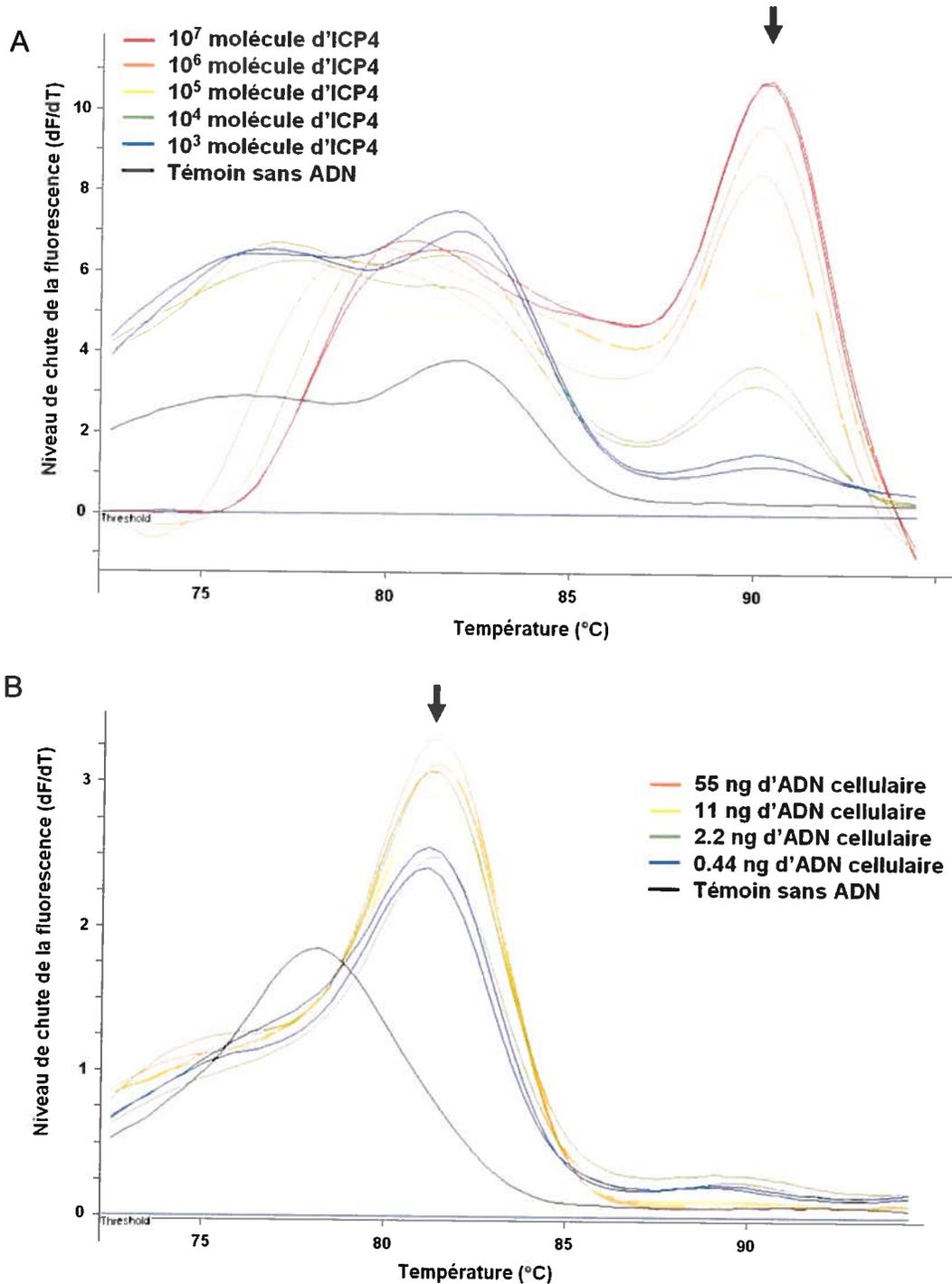


Figure 19– Courbes de dissociation de l'essai de qPCR utilisée pour la quantification du gène viral *ICP4* et du gène cellulaire *adipsine*. Chaque pic représente la dissociation du produit formé par la PCR. Le pic spécifique à chaque réaction est indiqué par une flèche noire. Le pic du témoin sans ADN représente les dimères d'amorces formés lorsqu'il y a peu ou pas d'ADN servant de matrice. (A) Courbe de dissociation de la réaction dirigé vers *ICP4*. Les différentes quantités de copie d'EcoRIB ont été testées en duplicata. (B) Courbe de dissociation de la réaction dirigé vers *adipsine*. Les différentes quantités d'ADN cellulaire ont été testées en duplicata.

Suite à l'optimisation de la qPCR dirigée vers *ICP4* et à l'extraction de l'ADN de tous les ganglions, il sera possible de quantifier l'établissement de la latence des différents virus recombinants testés dans le modèle murin d'infection oculaire. Ceci permettra de vérifier l'importance des résidus hautement conservés d'UL24, et en particulier ceux formant le motif d'endonucléase, dans la latence du VHS-1.

8 Références

- Alba, M. M., D. Lee, F. M. Pearl, A. J. Shepherd, N. Martin, C. A. Orengo, et P. Kellam. 2001. VIDA: a virus database system for the organization of animal virus genome open reading frames. *Nucleic Acids Res* 29 (1):133-6.
- Arthur, J. L., C. G. Scarpini, V. Connor, R. H. Lachmann, A. M. Tolkovsky, et S. Efstathiou. 2001. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol* 75 (8):3885-95.
- Avitabile, E., G. Lombardi, T. Gianni, M. Capri, et G. Campadelli-Fiume. 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. *J Virol* 78 (15):8015-25.
- Baringer, J. R., et P. Pisani. 1994. Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 36 (6):823-9.
- Batterson, W., D. Furlong, et B. Roizman. 1983. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol* 45 (1):397-407.
- Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl, et E. Seemuller. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92 (3):367-80.
- Berdougo, E., M. V. Nachury, P. K. Jackson, et P. V. Jallepalli. 2008. The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell Cycle* 7 (9): 1184-90.
- Berman, E. J., et J. M. Hill. 1985. Spontaneous ocular shedding of HSV-1 in latently infected rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 (4):587-90.
- Bertrand, L., et A. Pearson. 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *Journal of General Virology* 89 (5):1142 - 1151.
- Blakeney, S., J. Kowalski, D. Tummolo, J. DeStefano, D. Cooper, M. Guo, S. Gangolli, D. Long, T. Zamb, R. J. Natuk, et R. J. Visalli. 2005. Herpes Simplex Virus Type 2 UL24 Gene Is a Virulence Determinant in Murine and Guinea Pig Disease Models. *J. Virol.* 79 (16):10498-10506.
- Boehmer, P. E., et I. R. Lehman. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 66:347-84.
- Bond, C. S., M. Kvaratskhelia, D. Richard, M. F. White, et W. N. Hunter. 2001. Structure of Hjc, a Holliday junction resolvase, from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (10):5509-14.
- Bortz, E., J. P. Whitelegge, Q. Jia, Z. H. Zhou, J. P. Stewart, T. T. Wu, et R. Sun. 2003. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol* 77 (24):13425-32.

- Brown, S. M., et A. R. MacLean. 1998. *Herpes Simplex Virus Protocols*. Humana Press ed.
- Bujnicki, J. M., et L. Rychlewski. 2001. 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):219-30.
- Campbell, M. E., J. W. Palfreyman, et C. M. Preston. 1984. Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J Mol Biol* 180 (1):1-19.
- Chen, S. H., A. Pearson, D. M. Coen et S. H. Chen. 2004. Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. *J Virol* 78 (1):520-3.
- Coen, D. M., M. Kosz-Vnenchak, J. G. Jacobson, D. A. Leib, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, K. L. Tyler, et D. M. Knipe. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (12):4736-40.
- Coen, D. M., S. P. Weinheimer, et S. L. McKnight. 1986. A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* 234 (4772):53-9.
- Cook, M. L., et J. G. Stevens. 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun* 7 (2):272-88.
- Cook, W. J., et D. M. Coen. 1996. Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1 UL24mRNA Expression via Differential Polyadenylation. *Virology* 218 (1):204-213.
- Davar, G., M. F. Kramer, D. Garber, A. L. Roca, J. K. Andersen, W. Bebrin, D. M. Coen, M. Kosz-Vnenchak, D. M. Knipe, X. O. Breakefield, et et al. 1994. Comparative efficacy of expression of genes delivered to mouse sensory neurons with herpes virus vectors. *J Comp Neurol* 339 (1):3-11.
- Davison, A. J. 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* 86 (1-2):69-88.
- Deshmane, S. L., et N. W. Fraser. 1989. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 63 (2):943-7.
- Efstathiou, S., A. C. Minson, H. J. Field, J. R. Anderson, et P. Wildy. 1986. Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *J Virol* 57 (2):446-55.
- Efstathiou, S., et C. M. Preston. 2005. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res* 111 (2):108-19.
- Elion, G. B., P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, et H. J. Schaeffer. 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5716-20.
- Epstein, M. A. 1962. Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* 12:589-97.
- Falkenberg, M., I. R. Lehman, et P. Elias. 2000. Leading and lagging strand DNA synthesis in vitro by a reconstituted herpes simplex virus type 1 replisome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (8):3896-900.

- Garber, D. A., S. M. Beverley, et D. M. Coen. 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197 (1):459-62.
- Garner, J. A. 2003. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev* 55 (11):1497-513.
- Goldstein, J. N., et S. K. Weller. 1998. In vitro processing of herpes simplex virus type 1 DNA replication intermediates by the viral alkaline nuclease, UL12. *J Virol* 72 (11):8772-81.
- Griffiths, A., et D. M. Coen. 2003. High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J Virol* 77 (3):2282-6.
- Halford, W. P., C. D. Kemp, J. A. Isler, D. J. Davido, et P. A. Schaffer. 2001. ICP0, ICP4, or VP16 expressed from adenovirus vectors induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in primary cultures of latently infected trigeminal ganglion cells. *J Virol* 75 (13):6143-53.
- Halford, W. P., et P. A. Schaffer. 2001. ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J Virol* 75 (7):3240-9.
- Hayward, G. S., R. J. Jacob, S. C. Wadsworth, et B. Roizman. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (11):4243-7.
- Hill, J. M., J. B. Dudley, Y. Shimomura, et H. E. Kaufman. 1986. Quantitation and kinetics of induced HSV-1 ocular shedding. *Curr Eye Res* 5 (3):241-6.
- Hill, T. J., W. A. Blyth, D. A. Harbour, E. L. Berrie, et A. B. Tullo. 1983. Latency and other consequences of infection of the nervous system with herpes simplex virus. *Prog Brain Res* 59:173-84.
- Ho, D. Y., et E. S. Mocarski. 1988. Beta-galactosidase as a marker in the peripheral and neural tissues of the herpes simplex virus-infected mouse. *Virology* 167 (1):279-83.
- Hobbs, W. E., 2nd, et N. A. DeLuca. 1999. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0. *J Virol* 73 (10):8245-55.
- Holland, D. J., M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, P. Armati, et A. L. Cunningham. 1999. Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *J Virol* 73 (10):8503-11.
- Holland, L. E., K. P. Anderson, C. Shipman, Jr., et E. K. Wagner. 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, L. E., R. M. Sandri-Goldin, A. L. Goldin, J. C. Glorioso, et M. Levine. 1984. Transcriptional and genetic analyses of the herpes simplex virus type 1 genome: coordinates 0.29 to 0.45. *J Virol* 49 (3):947-59.
- Homa, F. L., et J. C. Brown. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* 7 (2):107-122.
- Honess, R. W., et B. Roizman. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14 (1):8-19.

- Hong-Yan, Z., T. Murata, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, et Y. Nishiyama. 2001. Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* 22 (3):321-7.
- Ito, H., M. H. Sommer, L. Zerboni, A. Baiker, B. Sato, R. Liang, J. Hay, W. Ruyechan, et A. M. Arvin. 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. *J Virol* 79 (8):4819-27.
- Jacobson, J. G., S.-H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, et D. M. Coen. 1998. Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* 242 (1):161-169.
- Jacobson, J. G., S. L. Martin, et D. M. Coen. 1989. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J. Virol.* 63 (4):1839-1843.
- Jacobson, J. G., K. L. Ruffner, M. Kosz-Vnenchak, C. B. Hwang, K. K. Wobbe, D. M. Knipe, et D. M. Coen. 1993. Herpes simplex virus thymidine kinase and specific stages of latency in murine trigeminal ganglia. *J Virol* 67 (11):6903-8.
- Jones, C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* 16 (1):79-95.
- Jones, P. C., et B. Roizman. 1979. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol* 31 (2):299-314.
- Kent, J. R., P. Y. Zeng, D. Atanasiu, J. Gardner, N. W. Fraser, et S. L. Berger. 2004. During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J Virol* 78 (18):10178-86.
- Kibler, P. K., J. Duncan, B. D. Keith, T. Hupel, et J. R. Smiley. 1991. Regulation of herpes simplex virus true late gene expression: sequences downstream from the US11 TATA box inhibit expression from an unreplicated template. *J Virol* 65 (12):6749-60.
- Kimberlin, D. 2004. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 11 Suppl 2:65A-76A.
- Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, et K. Ginalski. 2006. Human Herpesvirus 1 UL24 Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease. *J. Virol.* 80 (5):2575-2577.
- Kovall, R. A., et B. W. Matthews. 1999. Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. *Curr Opin Chem Biol* 3 (5):578-83.
- Kristie, T. M., J. L. Vogel, et A. E. Sears. 1999. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (4):1229-33.
- Kubat, N. J., R. K. Tran, P. McAnany, et D. C. Bloom. 2004. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J Virol* 78 (3):1139-49.
- Kwon, B. S., L. P. Gangarosa, K. D. Burch, J. deBack, et J. M. Hill. 1981. Induction of ocular herpes simplex virus shedding by iontophoresis of epinephrine into rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 (3):442-9.

- LaBoissiere, S., et P. O'Hare. 2000. Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol* 74 (1):99-109.
- Leib, D. A., D. M. Coen, C. L. Bogard, K. A. Hicks, D. R. Yager, D. M. Knipe, K. L. Tyler, et P. A. Schaffer. 1989. Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J Virol* 63 (2):759-68.
- Liedtke, W., B. Opalka, C. W. Zimmermann, et E. Lignitz. 1993. Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *J Neurol Sci* 116 (1):6-11.
- Liesegang, T. J. 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 20 (1):1-13.
- Lymberopoulos, M. H., et A. Pearson. 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363 (2):397-409.
- Maggioncalda, J., A. Mehta, O. Bagasra, N. W. Fraser, et T. M. Block. 1996. A herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion immediately upstream of the LAT locus establishes latency and reactivates from latently infected mice with normal kinetics. *J Neurovirol* 2 (4):268-78.
- Mann, S. L., J. D. Meyers, K. L. Holmes, et L. Corey. 1984. Prevalence and incidence of herpesvirus infections among homosexually active men. *J Infect Dis* 149 (6):1026-7.
- McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame, D. McNab, L. J. Perry, J. E. Scott, et P. Taylor. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69 (Pt 7):1531-74.
- Mettenleiter, T. C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76 (4):1537-47.
- Migone, F., P. Deinnocentes, B. F. Smith, et R. C. Bird. 2006. Alterations in CDK1 expression and nuclear/nucleolar localization following induction in a spontaneous canine mammary cancer model. *J Cell Biochem* 98 (3):504-18.
- Miller, C. S., R. J. Danaher, et R. J. Jacob. 1998. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* 9 (4):541-62.
- Morfin, F., et D. Thouvenot. 2003. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* 26 (1):29-37.
- Nascimento, R., et R. M. Parkhouse. 2007. Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* 88 (Pt 5):1446-53.
- Netter, F. H. 1999. *Atlas d'anatomie humaine, 2e édition*. Translated by Kamina, P. Maloine ed. Canada.
- Neumann, D. M., P. S. Bhattacharjee, et J. M. Hill. 2007. Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. *J Virol* 81 (11):6106-10.
- Nicoll, J. A., S. Love, et E. Kinrade. 1993. Distribution of herpes simplex virus DNA in the brains of human long-term survivors of encephalitis. *Neurosci Lett* 157 (2):215-8.
- Nishino, T., K. Komori, Y. Ishino, et K. Morikawa. 2003. X-ray and biochemical anatomy of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 family nuclease: similarity between its endonuclease domain and restriction enzymes. *Structure* 11 (4):445-57.

- Pearson, A., et D. M. Coen. 2002. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 76 (21):10821-10828.
- Perng, G. C., E. C. Dunkel, P. A. Geary, S. M. Slanina, H. Ghiasi, R. Kaiwar, A. B. Nesburn, et S. L. Wechsler. 1994. The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *J Virol* 68 (12):8045-55.
- Perng, G. C., H. Ghiasi, S. M. Slanina, A. B. Nesburn, et S. L. Wechsler. 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. *J Virol* 70 (2):976-84.
- Perry, L. J., et D. J. McGeoch. 1988. The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69 (Pt 11):2831-46.
- Pingoud, A., M. Fuxreiter, V. Pingoud, et W. Wende. 2005. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62 (6):685-707.
- Post, L. E., S. Mackem, et B. Roizman. 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):555-65.
- Preston, C. M., et A. A. Newton. 1976. The effects of herpes simplex virus type 1 on cellular DNA-dependent RNA polymerase activities. *J Gen Virol* 33 (3):471-82.
- Rand, K. H., L. E. Rasmussen, R. B. Pollard, A. Arvin, et T. C. Merigan. 1977. Cellular immunity and herpesvirus infections in cardiac-transplant patients. *N Engl J Med* 296 (24):1372-7.
- Read, G. S., et W. C. Summers. 1982. In vitro transcription of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (17):5215-9.
- Roizman, B., D. M. Knipe, et R. J. Whitley. 2007 Herpes Simplex Viruses. In *Fields Virology*, edited by Knipe, D. M.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Roizman, B., et P. E. Pellett. 2001. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *Fields Virology*, edited by Knipe, D. M. and P. M. Howley: Lippincott Williams & Wilkins.
- Roizmann, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, et M. J. Studdert. 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123 (3-4):425-49.
- Sanders, P. G., N. M. Wilkie, et A. J. Davison. 1982. Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 63 (2):277-95.
- Sawtell, N. M., et R. L. Thompson. 1992. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J Virol* 66 (4):2157-69.
- Sheaffer, A. K., W. W. Newcomb, M. Gao, D. Yu, S. K. Weller, J. C. Brown, et D. J. Tenney. 2001. Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol* 75 (2):687-98.
- Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, et P. G. Spear. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 116 (5):1273-81.

- Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne, et A. Minson. 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* 75 (12):5697-702.
- Smith, G. A., S. P. Gross, et L. W. Enquist. 2001. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6):3466-70.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, et A. Helenius. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136 (5):1007-21.
- Spear, P. G. 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6 (5):401-10.
- Srivastava, M., et H. B. Pollard. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 13 (14):1911-22.
- Stanberry, L. R., E. R. Kern, J. T. Richards, T. M. Abbott, et J. C. Overall, Jr. 1982. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *J Infect Dis* 146 (3):397-404.
- Stannard, L. M., A. O. Fuller, et P. G. Spear. 1987. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J Gen Virol* 68 (Pt 3):715-25.
- Steiner, I., J. G. Spivack, S. L. Deshmane, C. I. Ace, C. M. Preston, et N. W. Fraser. 1990. A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia. *J Virol* 64 (4):1630-8.
- Stevens, J. G., et M. L. Cook. 1971. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* 173 (999):843-5.
- Stevens, J. G., E. K. Wagner, G. B. Devi-Rao, M. L. Cook, et L. T. Feldman. 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235 (4792):1056-9.
- Streilein, J. W., M. R. Dana, et B. R. Ksander. 1997. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today* 18 (9):443-9.
- Subak-Sharpe, J. H., et D. J. Dargan. 1998. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes* 16 (3):239-51.
- Thompson, R. L., et N. M. Sawtell. 1997. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol* 71 (7):5432-40.
- Tognon, M., R. Guandalini, M. G. Romanelli, R. Manservigi, et B. Trevisani. 1991. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res* 18 (2-3):135-50.
- Turcotte, S., J. Letellier, et R. Lippe. 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79 (14):8847-60.
- Walsh, C. 2006. Chapter 5 - Protein Methylation. In *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*: Roberts and Co. Publishers.
- Wang, S. K., C. Y. Duh, et T. T. Chang. 2000. Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 81 (Pt 10):2407-16.

- Wang, S. K., C. Y. Duh, et C. W. Wu. 2004. Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J Virol* 78 (18):9750-62.
- Weller, S. K., M. R. Seghatoleslami, L. Shao, D. Rowse, et E. P. Carmichael. 1990. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is not essential for viral DNA synthesis: isolation and characterization of a lacZ insertion mutant. *J Gen Virol* 71 (Pt 12):2941-52.
- Whitley, R. J., D. W. Kimberlin, et B. Roizman. 1998. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 26 (3):541-53; quiz 554-5.
- Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, et P. Walther. 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* 79 (2):1071-83.
- Wysocka, J., et W. Herr. 2003. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* 28 (6):294-304.