

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉLUCIDATION DE L'IMPACT DE L'INFECTION PAR LE VIRUS HERPÈS
SIMPLEX 1 SUR LE NUCLÉOLE**

Par
Maria H. Lymberopoulos

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :	Patrick Labonté INRS-Institut Armand-Frappier INRS
Examineur externe :	Roger Lippé Département de pathologie et biologie cellulaire Université de Montréal
Examineur externe :	Guy Lemay Département de microbiologie et immunologie Université de Montréal
Directeur de recherche:	Angela Pearson INRS-Institut Armand-Frappier INRS

Résumé

Le gène *UL24* est conservé dans la famille des *Herpesviridae*, mais peu est connu sur sa fonction. *UL24* du virus herpès simplex 1 (VHS-1) est importante pour la réplication efficace du virus en culture cellulaire, et aussi pour la réplication dans les neurones et la réactivation dans un modèle animal. *UL24* est exprimée tardivement lors de l'infection et par fractionnement, il a été déterminé que cette protéine se localise au noyau et au cytoplasme. Notre hypothèse de départ était que *UL24* est une protéine multifonctionnelle dont la fonction varie selon sa localisation dans la cellule. Nous avons déterminé par des essais d'immunofluorescence indirecte sur des cellules infectées que la localisation de *UL24* change au cours de l'infection. Cette protéine virale se localise de manière transitoire dans les nucléoles et par la suite se retrouve plutôt en périphérie du noyau. Ce résultat renforce l'hypothèse que *UL24* pourrait jouer différents rôles lors de la réplication du virus dont un effet au niveau du nucléole.

L'infection par le VHS-1 induit plusieurs changements morphologiques et fonctionnels au nucléole, mais peu est connu sur le sort des protéines nucléolaires. Nous avons identifié au moins deux groupes de modifications induites au nucléole par le VHS-1: *UL24*-indépendantes et *UL24*-dépendantes.

Nous avons déterminé que deux composantes de la machinerie cellulaire pour la transcription par l'ARN polymérase I (ARNpolI), UBF et RPA194, sont redistribuées ensembles par le VHS-1 et de manière indépendante de l'expression de *UL24*. La fibrillarine se retrouve aussi dans cette catégorie mais le mécanisme impliqué dans sa relocalisation semble différer de celle de UBF. La réduction de la synthèse des ARNr décrite lors de l'infection pourrait être expliquée par la redistribution de ces composantes de l'ARNpolI. Bien que UBF est redistribué dans les compartiments de réplication viraux pendant l'infection, nous n'avons pas détecté de points de UBF tôt dans l'infection aux sites de synthèse de l'ADN viral. Ces résultats suggèrent que UBF pourrait ne pas être requis pour la synthèse de l'ADN viral tôt dans l'infection, mais pourrait y être impliqué dans un stade plus tardif.

Puisque *UL24* se localise au nucléole pendant l'infection, notre deuxième hypothèse était que *UL24* affecte la composition de ce compartiment et que le VHS-1

modifie le nucléole afin de favoriser sa réplication. Nous avons démontré que la nucléoline et B23 sont dispersés pendant l'infection et que cette modification est dépendante de l'expression de UL24. Comme pour la nucléoline, nous avons démontré que UL24 est suffisante pour induire la redistribution de B23 dans des essais de transfection transitoire, et que cette fonction est contenue dans le domaine N-terminal, qui est la portion conservée de UL24. De plus, des analyses mutationnelles ont révélé que le motif d'endonucléase de UL24 semble être important pour la dispersion de B23 dans des cellules infectées et transfectées. L'analyse par microscopie électronique de cellules infectées a révélé que UL24 est importante pour la sortie efficace des nucléocapsides du noyau. Puisqu'il a déjà été démontré que la nucléoline est importante pour la sortie efficace des nucléocapsides du noyau, UL24 pourrait jouer un rôle sur cette étape de la réplication virale via son effet sur la nucléoline. Nos résultats suggèrent donc que les modifications induites au nucléole par UL24 pourraient être importantes pour la réplication optimale du VHS-1.

Maria H. Lymberopoulos

Angela Pearson

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, pour son support et son encadrement fourni au cours de ces années. J'apprécie la confiance et l'encouragement donné afin de toujours viser plus haut. Merci également pour les congrès internationaux auxquels j'ai eu l'opportunité de présenter mes travaux.

Par ailleurs, j'aimerais remercier les membres du laboratoire, passés et présents, pour leur aide et d'avoir rendu ces années très agréables : Luc Bertrand, Alexandre Rochette-Legros, Huda Hyjazie, Amélie Bourget, Alain Boulende, Gabriel André Leiva-Torres, Nawel Ben Abdeljelil et Annie Rochette. Un gros merci aussi à Ginette Denis pour sa gentillesse et pour son support.

Merci également à Marcel Desrosiers pour l'entraînement en microscopie confocale et à Robert Alain et Micheline Letarte pour la microscopie électronique. Merci à Charles Dozois qui a su me transmettre son amour pour la science et pour son support pendant ma Maîtrise. J'aimerais aussi remercier Suzanne Lemieux de m'avoir permis de participer dans plusieurs aspects du programme Apprentis en Biosciences, qui fut une expérience merveilleuse et enrichissante.

Évidemment, un gros merci aux étudiants que j'ai côtoyé à l'institut, passés et présents, qui ont embellit toutes ces années d'études : Carl G., Sandra F., Romain G., Chantal B., Jean-Frédéric F., Adrien V., Raoul A.... Et à Mélissa Caza, avec qui j'ai franchi plusieurs étapes importantes, merci d'avoir toujours été là pour moi.

Je tiens à remercier spécialement ma famille pour leur amour et leur support tout le long de mes études. Merci à ma mère, mon père, mon frère, ma belle-sœur et ma belle-mère de m'avoir encouragé pendant les moments difficiles et d'avoir partagé les moments de réjouissance. Merci aussi à mon neveu et à ma nièce qui sont une source d'ensoleillement et de joie.

Finalement un très gros merci à Peter, avec qui j'ai partagé ma vie durant ces années. Merci pour ton amour, ton support, tes encouragements et ta patience. Ces années n'auraient pas été aussi belles sans toi!

Table des matières

Résumé.....	II
Remerciements	IV
Table des matières	V
Liste des figures et tableaux	IX
Liste des abréviations	XI

Chapitre 1 : Introduction

1

1. Virus herpès.....	2
1.1 Taxonomie des virus herpès.....	2
1.2 Les virus herpès humains.....	2
1.3 Pathogenèse du virus herpès simplex.....	3
1.4 Transport, latence et réactivation du VHS.....	5
1.5 Structure du VHS-1.....	6
1.6 Le cycle de réplication du VHS-1.....	7
1.6.1 Attachement et entrée.....	9
1.6.2 Transport vers le noyau.....	9
1.6.3 La transcription des gènes viraux.....	10
1.6.4 La réplication de l'ADN viral.....	11
1.6.5 Structure génomique du VHS-1 et la recombinaison.....	11
1.6.6 Les compartiments de réplication viraux.....	13
1.6.7 La formation des capsides et l'encapsidation de l'ADN viral.....	14
1.6.8 L'assemblage et la sortie des virions.....	14
2. Interaction virus – cellule hôte.....	16
2.1 Le noyau et ses sous-compartiments.....	16
2.1.1 Les corps de Cajal.....	17
2.1.2 Les Gems.....	17

2.1.3	Les splicing speckles.....	18
2.1.4	Les corps PML.....	18
2.2	Localisation de protéines au noyau.....	19
2.3	Le nucléole et la biogenèse des ribosomes.....	19
2.4	Les multiples fonctions du nucléole.....	21
2.4.1	Protéomique du nucléole.....	21
2.4.2	Le nucléole et le cycle cellulaire.....	22
2.4.3	Le nucléole et la régulation du cycle cellulaire.....	23
2.4.4	Le nucléole et la réponse au stress.....	24
2.5	Protéines majeures du nucléole à l'étude.....	24
2.5.1	La machinerie de transcription de l'ARN polymérase I.....	25
2.5.2	Fibrillarine.....	26
2.5.3	Nucléoline (C23).....	27
2.5.4	Nucléophosmine (B23).....	28
2.6	Modifications du nucléole par des virus.....	29
2.6.1	Conséquences sur la cellule et le cycle de vie viral.....	29
2.7	Modifications au noyau par le VHS-1.....	31
2.7.1	Modifications au nucléole par le VHS-1.....	32
2.7.2	Localisation de protéines du VHS-1 au nucléole.....	32
3.	La protéine virale UL24.....	33
3.1	Conservation de UL24 chez les virus herpès.....	33
3.2	UL24 du VHS-1.....	34
3.2.1	Importance de UL24 en culture cellulaire.....	34
3.2.2	Expression de la protéine UL24.....	34
3.3	Les homologues de UL24.....	36
3.3.1	UL24 du VHS-2.....	36
3.3.2	UL24 du virus herpès bovin 1.....	37
3.3.3	ORF35 du virus Varicella-Zoster.....	37
3.3.4	UL76 du cytomégalo virus humain.....	38
3.4	Études protéomiques de virus herpès.....	39

3.5	Importance de UL24 en pathogenèse.....	39
3.5.1	Importance de UL24 du VHS-1 pour la réplication et la réactivation.....	39
3.5.2	UL24 du VHS-2 en culture cellulaire et en pathogenèse.....	41
3.5.3	ORF35 du VZV en pathogenèse.....	42
3.6	Fonction putative d'endonucléase de UL24.....	42
3.7	Impact de UL24 et ses homologues sur le cycle cellulaire.....	44
4.	Hypothèses et objectifs de travail.....	45
Chapitre 2 : Première publication		46
	Résumé de la première publication.....	47
	Contribution des auteurs.....	48
	Abstract.....	50
	Introduction.....	51
	Results.....	54
	Discussion.....	60
	Materials and methods.....	64
	References.....	68
	Figures.....	72
Chapitre 3 : Deuxième publication		80
	Résumé de la deuxième publication.....	81
	Contribution des auteurs.....	81
	Abstract.....	83
	Results/discussion.....	84
	References.....	90
	Figures.....	93

Chapitre 4 : Troisième publication	98
Résumé de la troisième publication.....	99
Contribution des auteurs.....	100
Abstract.....	102
Introduction.....	103
Results.....	106
Discussion.....	111
Materials and methods.....	115
References.....	118
Figures.....	120
 Chapitre 5 : Discussion	 125
5.1 Localisation de UL24 en contexte d'infection.....	126
5.2 Effet du VHS-1 et la contribution de UL24 dans la relocalisation des protéines du nucléole.....	128
5.3 Modifications au nucléole indépendantes de UL24.....	131
5.4 Le motif d'endonucléase de UL24 et son importance dans les modifications nucléolaires.....	133
5.5 Effet de UL24 sur la sortie des nucléocapsides du noyau.....	134
5.6 Modèle des modifications nucléolaires induites par le VHS-1 et le rôle des UL24 dans l'infection.....	134
 Conclusions et perspectives	 136
 Références	 138

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1. Infection par le virus herpès simplex.....	4
Figure 2. Structure du VHS.....	6
Figure 3. Cycle de réplication du VHS.....	8
Figure 4. Génome du VHS-1.....	12
Figure 5. Les sous-compartiments du noyau.....	17
Figure 6. Les sous-compartiments du nucléole.....	21
Figure 7. Complexe d'initiation de transcription de l'ARNpoll.....	26
Figure 8. Représentation schématique de la protéine UL24 du VHS-1.....	33
Figure 9. Schéma de la région génomique entourant <i>UL24</i> du VHS-1 et de ses transcrits.....	35
Figure 10. Séquence en acides aminés de la protéine UL24 du VHS-1.....	43

Première publication

Figure 1. Construction of vHA-UL24.....	72
Figure 2. Characterization of vHA-UL24.....	73
Figure 3. Time course of HA-UL24 localization in infected cells.....	75
Figure 4. HA-UL24 localizes to nucleoli of infected cells.....	76
Figure 5. Effect of HSV-1 infection on the subnuclear distribution of nucleolin.....	77
Figure 6. Effect of HSV-1 infection on the subnuclear distribution of fibrillarin.....	78
Figure 7. Steady-state levels of nucleolin in HSV-1 infected cells.....	79

Deuxième publication

Figure 1. UBF and fibrillarin are redistributed separately during HSV-1 infection.....	93
Figure 2. UL24-independent relocalization of components of the RNAPI machinery upon infection with HSV-1	94
Figure 3. Subnuclear localization of UBF in HSV-1-infected cells.....	96
Figure 4. HSV-1 DNA synthesis begins prior to the relocalization of UBF to VRCs.....	97

Troisième publication

Figure 1. Effect of UL24 on B23 dispersal.....	120
Figure 2. Impact of UL24 mutations on B23 distribution patterns.....	121
Figure 3. Impact of UL24 mutant viruses on B23 distribution.....	122
Figure 4. Redistribution of nucleolar proteins in HSV-1 infected HFF cells.....	123
Figure 5. Electron micrographs of HSV-1 infected cells.....	124
Table 1. Quantitation of nuclear capsids and cytoplasmic particles in KOS- and UL24X-infected cells	124

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ARNm	ARN messenger
ARNpolI	ARN polymérase I
ARNr	ARN ribosomal
BHV-1	Virus herpès bovin 1
CBs	«Cajal bodies», Corps de Cajal
CRs	Compartiments de réplication viraux
DFC	Composante fibrillaire dense
DH	Domaines d'homologie
E	«Early» (ou β), précoce
EBV	Virus Epstein Barr
FC	Centres fibrillaires
GC	Composante granulaire
HA	Étiquette d'hémagglutinine
HCMV	Cytomégalovirus humain
HHV	«Human herpes virus», virus herpès humain
hpi	Heures post-infection
ICP	«Infected cell protein», protéine de cellule infectée
IE	«Immediate-early» (ou α), immédiat-précoce
KSHV	Virus du sarcome du Kaposi
L	«Late» (ou γ), tardif
LATs	«Latency associated transcripts», transcrits associés à la latence
MHV68	Gammaherpèsvirus murin 68
MOI	Multiplicité d'infection
ND10	«Nuclear domain 10», domaine nucléaire 10
NDF	«Nucleolar derived foci»
NLS	Signal de localisation nucléaire
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
NORs	«Nucleolar organizer regions», régions organisatrices nucléolaires

ORF	Cadre de lecture ouvert
PIC	Complexe de pré-initiation
PML	«Promyelocytic leukemia», leucémie promyélocytaire
PNBs	«Pre-nucleolar bodies», corps pré-nucléolaires
PR	«Perichromosomal region», région périchromosomale
PV	Poliovirus
SCID	«Severe combined immunodeficiency», immunodéficience sévère combinée
SMN	«Survival of motor neurons», survie de neurones motrices
SNC	Système nerveux central
snRNPs	«Small nuclear ribonucleoproteins», petites ribonucléoprotéines nucléaires
snoRNPs	«Small nucleolar ribonucleoproteins», petites ribonucléoprotéines nucléolaires
TK	Thymidine kinase
UBF	«Upstream binding factor»
UCE	«Upstream core element»
U _L	Région unique longue
U _s	Région unique courte
Vhs	«Virion host shutoff»
VHS-1	Virus herpès simplex 1
VHS-2	Virus herpès simplex 2
VICE	«Virion-induced chaperone-enriched»
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VP	«Viral protein», protéine virale
VZV	Virus Varicella-Zoster

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Virus herpès

1.1 Taxonomie des virus herpès

La classification des virus herpès a récemment été modifiée par le «International Committee on Taxonomy of Viruses» (ICTV) (57). L'ordre des *Herpesvirales* comprend trois familles; la famille des *Herpesviridae* qui contient des virus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles, la famille des *Alloherpesviridae* qui inclut des virus de poissons et de grenouilles, et la famille des *Malacoviridae* qui est composée d'un virus de bivalve. On retrouve trois sous-familles dans la famille des *Herpesviridae*; les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammapherpesvirinae*. Les *Alphaherpesvirinae* sont neurotropiques et ont un cycle de réplication court. Les *Betaherpesvirinae* peuvent infecter des cellules lymphoïdes et ont un cycle de réplication long. Les *Gammapherpesvirinae* sont aussi lymphotropiques avec un cycle de réplication long, mais sont oncogéniques (245). La classification des trois sous-familles était originalement définie selon des caractéristiques biologiques mais représentent aussi des lignées phylogéniques basées sur des similarités de séquences. Il est estimé que ces trois sous-familles ont surgit il y a environ 180 à 220 millions d'années (178).

1.2 Les virus herpès humains

Il existe huit espèces connues de virus herpès humains nommés *Human herpesvirus* (HHV) 1 à 8. Dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, on retrouve les HHV-1 et HHV-2, qui font partie du genre *Simplexvirus* et sont communément appelés Virus herpès simplex (VHS) 1 et 2, respectivement, ainsi que le virus Varicella-zoster, ou HHV-3, qui fait partie du genre *Varicellovirus*. Dans la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, on retrouve le HHV-5, aussi appelé cytomegalovirus humain, dans le genre *Cytomegalovirus*. Dans cette même sous-famille, on retrouve le HHV-6 et le HHV-7 dans le genre *Roseolovirus*. La sous-famille des *Gammapherpesvirinae* contient le HHV-4, ou virus Epstein-Barr, dans le genre *Lymphocryptovirus*, ainsi que le HHV-8, ou virus du sarcome de Kaposi, dans le genre *Rhadinovirus*. Les infections herpétiques sont donc responsables d'une panoplie d'infections qui affectent la majorité de la population à différents stades de leur vie.

1.3 Pathogenèse du virus herpès simplex

Les infections par le VHS chez les humains ont été documentées depuis l'antiquité grecque dans les écritures d'Hippocrate. La sévérité des maladies causées par le VHS varie; dans la majorité des cas il y a apparition de lésions orales ou génitales, mais plus rarement il y a des cas plus sévères qui peuvent mettre en danger la vie de l'individu infecté. Le VHS-1 et VHS-2 peuvent être transmis via différentes voies et à des sites différents du corps mais il y a du chevauchement dans l'épidémiologie et les manifestations cliniques de ces deux infections. Des vecteurs animaux pour le VHS n'ont pas encore été décrits, donc jusqu'à présent, il semble que les humains soient le seul réservoir pour la transmission de ces virus à d'autres humains (244).

Dans la majorité des cas, l'interaction virus-hôte mène à la latence du VHS, où le virus s'établit dans un stade dormant dans les ganglions sensoriels de l'hôte. Suite à une infection oropharyngiale, normalement causé par le VHS-1, le ganglion trigéminal est infecté et cache le virus latent. L'acquisition du VHS-2 survient habituellement par contact génital et le virus latent se retrouve dans le ganglion de la racine dorsale. Rarement, l'infection peut mener à une infection du système nerveux central (SNC) qui peut être mortelle. La capacité du VHS de se répliquer dans le SNC peut mener à une dévastation neurologique comme une encéphalite. De plus, l'infection primaire peut se propager au-delà du ganglion sensoriel et devenir systémique (114). On peut retrouver une infection systémique chez des enfants qui ont une gingivostomatite primaire (114). En plus, l'infection peut être systémique chez des nouveaux-nés ou chez des patients immunosupprimés. L'infection généralisée des organes semble être la conséquence d'une virémie dans un hôte qui n'est pas capable de limiter l'infection dans les surfaces muqueuses (244).

La transmission du virus dépend d'un contact intime entre une personne infectée, qui excrète des virions, et une autre personne. Le virus doit venir en contact avec des surfaces muqueuses ou de la peau abrasée. Suite à l'infection primaire, soit au tissu muqueux oral ou génital, il y a répllication virale à ce site primaire d'infection. Par la suite, les extrémités des nerfs sensoriels sont infectés et il y transport des virions vers les ganglions trigéminaux ou de la racine dorsale, où le virus s'établit en latence (244). Plus

l'infection primaire est sévère, selon le nombre, la taille et l'étendue des lésions, plus il est probable que des récurrences vont s'ensuivre. Le virus latent est réactivé après un stimulus local tel qu'une blessure aux tissus qui sont innervés par les neurones qui contiennent du VHS latent ou par un stimulus systémique tel du stress physique ou émotionnel, l'exposition aux rayons UV, l'hypothermie ou un déséquilibre hormonal. Suite à la réactivation, le virus est détecté aux sites mucocutanés en tant que vésicules sur la peau ou d'ulcères mucosals (Figure 1) (244).

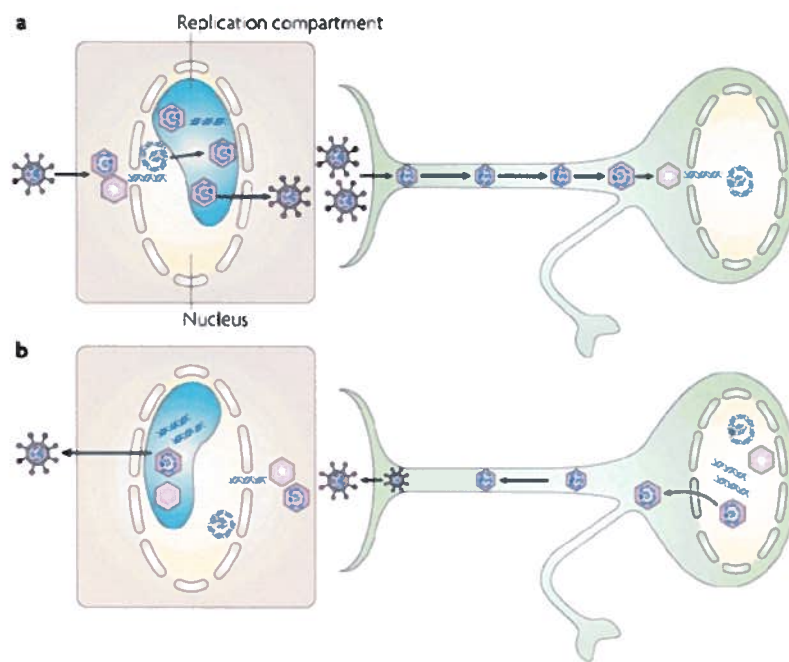


Figure 1. Infection par le virus herpès simplex. (a) La réplication virale dans les cellules épithéliales de la surface mucosale génère des virions qui peuvent se propager vers d'autres cellules épithéliales. Le virus acquiert son enveloppe dans une vésicule cytoplasmique. Les virions entrent dans les neurones sensoriels et les nucléocapsides sont transportées vers le corps neuronal. L'ADN viral est relâché dans le noyau du neurone où il se circularise. (b) Lors de la réactivation, l'expression de gènes lytiques est initiée et les capsides nouvellement formées sont transportées vers l'extrémité de l'axone. Les virions infectieux sont relâchés de l'axone et infectent les cellules épithéliales. Tiré de Knipe et Cliffe (133).

Les changements pathologiques associés avec la réplication du VHS sont similaires entre l'infection primaire et l'infection récurrente. Ces changements sont une

combinaison de mort cellulaire induite par le virus et d'une réponse inflammatoire. Les changements induits par l'infection sont le gonflement des cellules infectées, suivi de la dégénération de la membrane nucléaire. La membrane plasmique de ces cellules est affectée et il y a formation de cellules géantes multinucléées. Avec la lyse cellulaire, il y a relâche d'un fluide vésiculaire contenant une grande quantité de virions, des débris cellulaires et des cellules inflammatoires. Lors de la guérison, le liquide vésiculaire devient pustuleux avec le recrutement des cellules inflammatoires et forme une croûte (244).

Il existe quelques types de thérapies antivirales contre les infections causées par le VHS. Les plus efficaces et ceux qui sont le plus communément utilisés sont l'acyclovir, le valacyclovir, le penciclovir et la famciclovir (244, 326). Ces molécules sont des analogues de nucléosides, qui sont phosphorylés par la thymidine kinase du VHS, et en agissant comme substrat à l'ADN polymérase virale, ont l'effet d'inhiber la réplication du virus. Les deux stratégies majeures pour le développement d'un vaccin contre le VHS sont l'utilisation d'un vaccin sous-unitaire ou de vaccin composé du virus atténué (326). Des essais cliniques sur un vaccin utilisant du virus atténué n'étaient pas prometteurs car deux doses du vaccin n'ont pas livré assez d'antigènes pour induire une réponse immunitaire suffisante (183, 326). Le vaccin sous-unitaire gD-2 de VHS-1 de GlaxoSmithKline est efficace pour prévenir l'infection génitale chez les femmes qui sont séronégatives pour le VHS-1 et le VHS-2, mais n'est pas efficace chez les hommes (283). Plus spécifiquement, ce vaccin a une efficacité d'environ 73% chez les femmes séronégatives pour le VHS-1 et le VHS-2 mais n'est pas efficace chez les femmes séropositives pour le VHS-1 seulement. Ce vaccin ne s'est pas rendu sur le marché et la recherche continue pour un vaccin efficace contre le VHS.

1.4 Transport, latence et réactivation du VHS

Suite à la propagation du virus dans les tissus au site primaire d'infection, le virus entre dans les neurones sensoriels en fusionnant avec les boutons terminaux des axones. La nucléocapside est transportée de manière rétrograde dans l'axone vers le noyau du corps neuronal. L'ADN viral persiste dans le noyau en forme d'épisome associé aux nucléosomes. L'expression de gènes lytiques est réprimée et il y a expression d'un

«latency-associated transcript» (LAT). L'épissage de ce transcrit génère plusieurs espèces d'ARN nommés LATs (23, 131). Lors de la latence, aucune particule infectieuse ne peut être détectée dans les ganglions sensoriels. Suite à différents stimuli, tels que le stress et les rayons UV, il y a réactivation du virus dans une fraction des neurones qui contiennent du VHS. Le virus est par la suite acheminé par transport axonal antérograde aux tissus périphériques dans les cellules qui sont sur ou proche du site initial d'infection. Selon l'état du système immunitaire de l'hôte, la réactivation peut être asymptomatique ou créer une lésion. La sévérité des lésions récurrentes peut varier d'une lésion ponctuelle qui est invisible à l'œil nu à des lésions débilitantes chez des individus immunosupprimés (244).

1.5 Structure du VHS-1

Le VHS-1 est composé d'une capside qui contient le génome viral ainsi que de plusieurs protéines virales qui composent le tégument, qui se retrouve entre la capside et l'enveloppe virale (Figure 2).

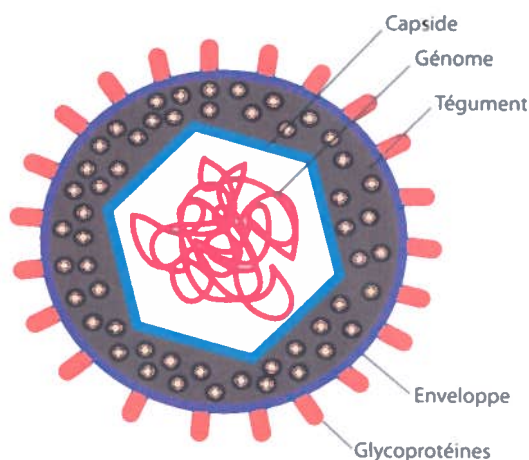


Figure 2. Structure du VHS. Schéma démontrant les parties qui composent le virion. La capside virale contient le génome à ADN du virus et est entourée du tégument. L'enveloppe du virus contient des glycoprotéines virales à sa surface.

Le génome du VHS-1 est composé d'environ 152pb et est contenu sous forme linéaire dans la capside. Le génome du VHS-1 a un contenu en G+C élevé de 68% (244). Le génome a deux composantes, une région unique longue (U_L) et une région unique

courte (U_s, pour «unique short»). Ces régions uniques sont encadrées par des régions répétées inversées. Dû à des événements de recombinaison, les régions U_L et U_s peuvent se retrouver dans des orientations inversées, générant donc quatre isomères linéaires. Dans des cellules infectées avec un virus de type sauvage, on retrouve des concentrations équimolaires de ces quatre isomères (62, 102).

La capside mesure 100 nm de diamètre et a une forme icosaédrale. Elle est composée de six différentes protéines virales, nommées VPs pour «viral proteins», qui forment 162 capsomères en forme de pentamères (244). Il y a trois types de capsides formées pendant l'infection; les capsides A ne contiennent pas d'ADN et n'ont pas de structure interne, les capsides B contiennent des protéines d'échafaudage interne mais ne contiennent pas d'ADN et les capsides C sont celles qui contiennent l'ADN (269). Les capsides A ne sont pas des précurseurs aux capsides B, ils sont plutôt des dérivés défectifs.

L'espace entre la capside et l'enveloppe virale se nomme le tégment. Ce compartiment contient au moins vingt protéines virales. Parmi celles-ci, on retrouve VP16, un transactivateur viral, et la protéine vhs («virion host shutoff»), qui est impliquée dans la dégradation des ARNm dans la cellule hôte. L'enveloppe virale est une bicouche lipidique qui contient plusieurs glycoprotéines à sa surface (244).

Plusieurs composantes des particules du VHS-1 ont été identifiées mais la composition exacte n'est pas encore connue. Une analyse des virions extracellulaires matures par spectrométrie de masse a identifié huit protéines associées à la capside, 13 glycoprotéines virales et 23 protéines du tégment (167). De plus, cette équipe a identifié 49 protéines de l'hôte dans le virion, et l'analyse de virions provenant de deux lignées cellulaires distinctes a suggéré que leur composition est largement indépendante du type cellulaire (167).

1.6 Le cycle de réplication du VHS-1

L'initiation de l'infection se fait par l'attachement du virus aux récepteurs à la surface cellulaire. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire se fait rapidement après l'attachement. Certaines protéines du tégment et la capside sont transportés aux pores nucléaires, et l'ADN viral est relâché dans le noyau. La

transcription du génome, la réplication de l'ADN viral et l'assemblage des capsides surviennent dans le noyau. Les gènes viraux sont transcrits de manière séquentielle par l'ARN polymérase II et avec la participation de facteurs viraux. Plusieurs étapes sont impliquées dans l'assemblage des virions. Suite à l'empaquetage de l'ADN dans les capsides, la capside sort du noyau et via des étapes d'enveloppement et de dé-enveloppement, il acquiert sa membrane finale (Figure 3). Le processus de maturation des virions est encore controversé et sera discuté plus bas. En utilisant des lignées permissives en culture cellulaire, ce processus prend environ 18 à 20 heures, bien que des virions peuvent être sécrétés plus tôt (244).

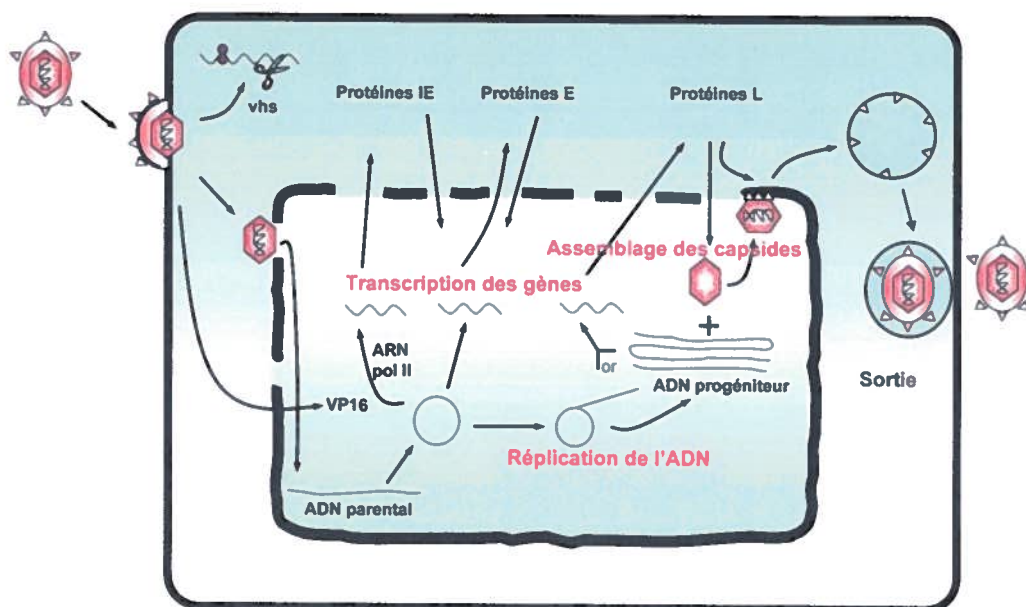


Figure 3. Cycle de réplication du VHS. Le virion se lie à la membrane plasmique et l'enveloppe virale fusionne avec celle-ci. La capside et les protéines du tégment, tels que VP16 et vhs, sont relâchés au cytoplasme. La capside est transportée au pore nucléaire où l'ADN viral est relâché au noyau. L'ADN viral est circularisé, et transcrit par l'ARN polymérase II. La transcription des gènes viraux se fait de manière séquentielle. La plupart des protéines IE régulent l'expression des gènes viraux. Les protéines E sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral, qui elle stimule l'expression des gènes L. Les gènes L sont impliqués dans l'assemblage de la capside et dans la modification des membranes pour la formation des virions. L'ADN viral est encapsidé dans le noyau et le virus acquiert sa membrane dans une vésicule cytoplasmique pour ensuite sortir enveloppé de la cellule. Adapté de Roizman *et al.* (244).

1.6.1 Attachement et entrée

L'entrée du VHS dans les cellules se fait en trois étapes. Premièrement, il y a attachement du virion à la surface cellulaire. Cet attachement initial implique l'interaction entre les glycoprotéines virales gC et gB avec les glycosaminoglycans de l'héparan sulfate à la surface cellulaire (270, 331). Deuxièmement il y a interaction entre la glycoprotéine virale gD et un des récepteurs cellulaires. L'attachement à un corécepteur implique l'interaction entre gD et une des trois familles de molécules cellulaires suivantes. Un de ces corécepteurs, «herpes virus entry mediator» (HVEM ou HVeA) fait partie de la famille des récepteurs de «tumor necrosis factor» (193, 317). Une autre famille de corécepteurs est la superfamille des immunoglobulines, dont deux membres sont HveB et HveC, aussi nommés nectine-2 α et nectine-1 α respectivement (89, 317). Ils sont exprimés dans une variété des types cellulaires dont les cellules épithéliales, les fibroblastes et les neurones. Le dernier corécepteur est le 3-*O*-sulfate héparane sulfate qui se retrouve largement distribué sur des cellules et des tissus humains (272). La troisième étape de l'entrée du virus est la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire afin de relâcher la capsid et le tégment dans le cytoplasme. Les glycoprotéines virales gD, gB et l'hétérodimère gH-gL sont requis pour la fusion (82, 157, 255). Actuellement, il est proposé que cette fusion se fait par un mécanisme d'hémifusion et par l'activité séquentielle des glycoprotéines virales (290). Il a aussi été démontré que le VHS-1 peut entrer dans certaine lignées cellulaires via un mécanisme d'endocytose pH-dépendant (205, 206). Le mécanisme exacte impliquée dans l'endocytose n'est pas connu mais il a été suggéré qu'un changement conformationnel de gB, induit à un bas pH, pourrait être une des étapes impliquées dans cette voie alternative d'entrée (67).

1.6.2 Transport vers le noyau

Suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, certaines protéines du tégment restent dans le cytoplasme, comme US11 et vhs, tandis que d'autres, comme VP16, sont transportées vers le noyau avec la capsid. Cette dernière est transportée via le réseau de microtubules aux pores nucléaires (244). Suite au transport vers le noyau, les nucléocapsides s'accumulent à l'enveloppe nucléaire et s'associent

avec le complexe du pore nucléaire (11, 280). À ce pore, la nucléocapside relâche l'ADN viral dans le noyau et la capsidie vide reste du côté cytoplasmique du complexe. Une fois dans le noyau, l'ADN viral se circularise, et ceci en absence de synthèse de protéines virales (88, 223). Donc, la circularisation du génome est effectuée par des protéines cellulaires ou des protéines virales emportées jusqu'au noyau avec le virion.

1.6.3 La transcription des gènes viraux

Pendant l'infection productive, il y a plus de 80 gènes exprimés dans une cascade séquentielle hautement régulée. Plusieurs protéines virales jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique, tandis que d'autres sont des composantes de la particule virale. L'ARN polymérase II cellulaire est responsable de la transcription de tous les gènes viraux du VHS, qui se fait dans le noyau, bien que des protéines virales peuvent modifier son activité et sa structure (3, 54).

Les gènes immédiats précoces (IE pour «immediate early»), ou α , sont les premiers à être transcrits. Ils codent pour les six protéines suivantes : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 et US1.5. L'expression maximale des gènes IE se fait vers 2 à 4 heures post-infection (hpi). La protéine virale VP16, qui est une composante du tégment, stimule la transcription des gènes IE. De plus, la plupart des gènes IE jouent un rôle dans la stimulation de l'expression de gènes précoces (E pour «early») et tardifs (L pour «late»). L'expression de gènes E, aussi nommés β , requière au moins la présence de ICP4. L'expression maximale des gènes E se fait vers 4 à 8 hpi. Parmi celles-ci, on retrouve des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans le métabolisme des nucléotides. Deux groupes de protéines β ont été identifiés : les gènes β_1 sont exprimés presque en même temps que les gènes α , tandis qu'il y a un plus grand délai entre l'expression des gènes β_2 et α . Les gènes L, ou γ , codent surtout pour des protéines qui sont des composantes des particules virales. Les gènes L sont exprimés de manière maximale une fois que la réplication de l'ADN viral a débuté. Les gènes L sont séparés en deux sous-groupes, les gènes «leaky-late» (γ_1), dont l'expression ne dépend pas totalement de la réplication de l'ADN viral, et les gènes «true late» (γ_2), qui ne sont pas exprimés lorsqu'il y a inhibition de la synthèse de l'ADN viral (244).

1.6.4 La réplication de l'ADN viral

Une fois que les protéines précoces sont exprimées, plusieurs d'entre elles se localisent dans le noyau et s'assemblent sur l'ADN viral parental. L'assemblage de la machinerie de réplication sur l'ADN parental forme des structures ponctuées nommées des sites pré-réplicatifs (117, 305). Ces sites se retrouvent à proximité des structures ND10 de la cellule, où la synthèse de l'ADN viral débute sur la molécule circulaire pour générer des formes réplcatives theta (θ). Avec la progression de la synthèse de l'ADN viral, les molécules d'ADN produites et les complexes de réplication s'accumulent au noyau dans des structures globulaires nommée des compartiments de réplication (232). Après un certain temps, la synthèse de l'ADN viral change de la réplication theta à un mécanisme de cercle roulant. Ce dernier mécanisme permet la production de concatémères d'ADN dont les génomes sont en orientation tête-à-queue, et où on retrouve les quatre isomères décrits précédemment (120). Les génomes viraux individuels sont clivés du concatémère et chacun est empaqueté dans une capsid préformée (111). En fait, dû à des événements de recombinaison qui seront décrits ci-après (section 1.6.5), les concatémères produits pendant la réplication de l'ADN sont ramifiés (244). L'étape finale de la réplication de l'ADN viral est lorsque les concatémères sont clivés à des sites spécifiques pour former des unités qui sont empaquetés dans les capsides (61, 306).

Sept protéines de réplication de l'ADN viral sont connues, dont la protéine de liaison à l'ADN simple brin ICP8, le complexe hélicase-primase incluant UL5, UL8, UL52, la protéine de liaison à l'origine UL9 et l'holoenzyme de la polymérase UL30/UL42 (40, 50). Bien que ces sept protéines virales sont suffisantes pour la réplication de l'ADN du VHS-1 dans une cellule, les protéines cellulaires qui pourraient être impliquées ne sont pas encore connues.

1.6.5 Structure génomique du VHS-1 et la recombinaison

Le génome du VHS contient les deux régions uniques, U_L et U_S , qui sont bordés des séquences *b* et *c* respectivement. La séquence *a* est présente aux deux extrémités et une copie inversée est présente à la jonction U_L - U_S . Le génome du VHS peut subir des inversions géniques où les composantes U_L et U_S peuvent inverser leur orientation

pendant la réplication (Figure 4). En plus, le génome du VHS-1 contient trois origines de réplication, une copie de *oriL* et deux copies de *oriS* (244, 325).

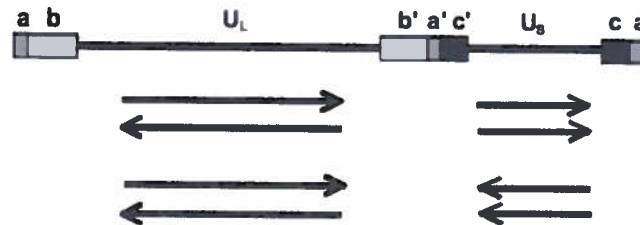


Figure 4. Génome du VHS-1. Le génome du VHS-1 est composé de deux régions uniques, U_L et U_S , chevauchés par des séquences répétées. U_L est chevauché par ab et $b'a'$, tandis que U_S est chevauché par ac et $a'c'$. Lors de l'infection, il y a inversion des deux régions uniques. Les flèches représentent les orientations possibles de U_L et U_S . Tiré de Wilkinson et Weller 2003 (325).

La recombinaison joue un rôle important dans la réplication de l'ADN viral et dans l'infection par le VHS-1 (325). Il s'agit d'un événement fréquent entre deux génomes viraux en co-infection. La recombinaison intramoléculaire mène à l'isomérisation du génome viral. Il est de pensée courante que l'inversion du génome viral est le résultat de recombinaison homologue stimulée par des bris doubles brins et que la machinerie de réplication virale est utilisée (254). Lors de la réplication du génome, il y a formation de complexes d'ADN composés d'unités génomiques arrangés en concatémères dans une orientation tête-à-queue (120, 121, 127). En fait, ces concatémères forment des structures branchées. Ces branches contiennent des structures X, qui sont caractéristiques de fourches de réplication, et des structures Y, qui se forment lorsque deux fourches de réplication fusionnent (265). La recombinaison est probablement responsable des structures branchées et contribue à la synthèse efficace des concatémères, en générant soit des matrices, soit des fourches de réplication additionnelles (182, 297). De plus, la recombinaison joue un rôle dans le maintien de la stabilité génomique par la réparation des bris doubles-brins (208). La protéine virale UL12, une alcaline nucléase, est impliquée dans la maturation des intermédiaires de

réplication qui pourraient interférer avec l'encapsidation de l'ADN dans les capsides (96, 173).

1.6.6 Les compartiments de réplication viraux

La VHS-1 utilise la compartimentalisation nucléaire afin de concentrer les facteurs viraux et cellulaires requis pour la progression du cycle de vie viral. Plusieurs des processus requis pour la réplication du VHS-1, dont la synthèse de l'ADN viral (59, 222, 233), la transcription des gènes viraux (128, 135, 152, 222, 233, 241), l'assemblage des capsides et l'empaquetage de l'ADN viral (60, 142, 316, 333) surviennent dans les compartiments de réplication (CRs) viraux. La formation des CRs commence tôt dans l'infection en tant que structures ponctuées qui s'élargissent et fusionnent pour former des grosses structures globulaires qui occupent la majorité de l'espace dans le noyau. En fait, les CRs sont formés par des petites structures qui soit bougent à travers le noyau afin de fusionner avec les compartiments adjacents ou restent relativement stationnaires et grossissent par accréition et fusionnent avec des structures avoisinantes (296). Lors de la formation des CRs, la chromatine cellulaire est marginalisée et comprimée (192, 261).

Plusieurs protéines virales, dont celles impliquées dans la réplication de l'ADN viral, comme ICP8, le transactivateur majeur ICP4, la protéine immédiat-précoce ICP27 et la protéine majeure de la capside ICP5, s'accumulent dans les CRs. Les protéines cellulaires impliquées dans la réplication du VHS-1 peuvent aussi se retrouver dans les CRs. En fait, l'ARN polymérase II, responsable de la transcription des gènes viraux, est redistribuée aux CRs pendant l'infection (142, 222, 241). En plus, d'autres protéines cellulaires dont p53 et la protéine de réplication A ont été observés dans les CRs mais leur rôle dans ces compartiments n'est pas connu (322).

La protéine virale ICP8, souvent utilisée comme marqueur pour les CRs, est une métalloprotéine de zinc multifonctionnelle de 128 kDa (86, 87). ICP8 est encodée par le gène *UL29* du VHS-1 et est exprimée avec une cinétique précoce (112). En plus d'être impliqué dans la réplication de l'ADN viral, ICP8 affecte la transcription des gènes viraux. De plus, il peut réprimer la transcription à partir des génomes parentaux viraux (93-95) mais peut aussi stimuler la transcription des gènes tardifs (87). Une étude protéomique a identifié par immunoprécipitation et par spectrométrie de masse plus de 50

protéines cellulaires et virales qui interagissent avec ICP8 (295). Ces protéines cellulaires identifiées sont impliquées dans plusieurs procédés cellulaires dont la réplication de l'ADN ou la réparation de dommages à l'ADN, la recombinaison homologue ou non-homologue et le remodelage de la chromatine.

1.6.7 La formation des capsides et l'encapsidation de l'ADN viral

Suite à la synthèse des protéines de la capside qui sont exprimées tardivement, celles-ci se localisent dans le noyau où il y a assemblage des capsides. En premier, il y a assemblage de la capside contenant un échafaudage interne. Cet échafaudage est déplacé hors de la capside lors de l'encapsidation de l'ADN. Les capsides ont un diamètre d'environ 120 nm et ont une coquille externe faite d'hexons et de pentons composés de la protéine majeure de la capside VP5. Les capsomères sont liés par des triplexes composés d'une molécule de VP19C et deux molécules de VP23 (204). La protéine UL6 sert de portail à travers lequel l'ADN viral est inséré dans la capside (203, 303).

Quatre formes de capsides intranucléaires ont été décrites (90, 202). Les procapsides, précurseurs des autres types de capsides, sont sphériques et contiennent un échafaudage composé principalement de VP22a. Lors de l'empaquetage de l'ADN viral, VP22a est clivé par la protéase UL26 et est relâché de la capside (65, 158, 226, 319). Ce clivage est associé avec un changement conformationnel de la capside où elle forme éventuellement un icosaèdre (107, 302). Chaque procapside est convertie par la suite à un des trois types de capsides matures angulaires (90). Les capsides de type A contiennent seulement la coquille icosaédrale. Les types B contiennent du matériel d'échafaudage clivé dans la coquille et les types C contiennent de l'ADN viral. Seulement les capsides de type C sortent du noyau pour devenir des virions enveloppés (243).

1.6.8 L'assemblage et la sortie des virions

Suite à l'encapsidation de l'ADN viral, la nucléocapside sort du noyau afin d'acquérir l'enveloppe. Trois modèles sont proposés pour l'acquisition de l'enveloppe; l'enveloppement/désenveloppement, le luminal et la voie du pore nucléaire.

Dans le modèle d'enveloppement/désenveloppement, il y a enveloppement primaire des nucléocapsides à la membrane interne du noyau. Il y a désenveloppement à

la membrane externe du noyau et l'enveloppement secondaire se fait dans des membranes cytoplasmiques. Ils sont par la suite transportés dans des vésicules à la membrane plasmique où la fusion entre la vésicule et la membrane plasmique relâche le virion dans l'espace extracellulaire (184, 282). Ce modèle est celui qui est le plus largement accepté.

Dans le modèle luminal, ou d'enveloppement nucléaire simple, la nucléocapside est enveloppée dans la membrane interne du noyau, entre dans une vésicule à la membrane externe du noyau, et est transporté à la membrane plasmique où il est relâché (73).

Dans le modèle du pore nucléaire, la nucléocapside sort du noyau via des pores nucléaires élargis et acquière son enveloppe en bourgeonnant dans des vésicules cytoplasmiques. Par la suite, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique où les virions sont relâchés (323).

2. Interaction virus – cellule hôte

Les virus ont une relation complexe avec leur cellule hôte. Ils utilisent la machinerie cellulaire afin de favoriser leur réplication mais doivent s'assurer que la cellule survive assez longtemps pour qu'il y ait production de virions infectieux. Plusieurs virus, incluant le VHS-1, modifient le noyau et ses sous-compartiments pendant leur réplication. Les sous-compartiments nucléaires et des exemples de modifications induites par divers virus sont discutés ci-dessous.

2.1 Le noyau et ses sous-compartiments

La présence du noyau est la caractéristique qui définit les cellules eucaryotes. Ce compartiment contient les chromosomes et est le site de plusieurs activités métaboliques majeures, telles que la réplication de l'ADN, la transcription des gènes, la maturation de l'ARN ainsi que la maturation et l'assemblage des ribosomes. Le noyau est séparé du cytoplasme par une double membrane. La membrane externe du noyau est continue avec le réticulum endoplasmique. Il y a un mouvement continu de protéines, d'ARN et de complexes ARN-protéine entre le noyau et le cytoplasme et cet échange est médié par la structure multiprotéique du complexe du pore nucléaire (144).

La majorité de l'espace du noyau est composée de chromatine qui est subdivisée en euchromatine, qui est transcriptionnellement active, et en hétérochromatine, qui est transcriptionnellement silencieuse. En plus de la présence des chromosomes, le noyau contient plusieurs sous-compartiments dans les espaces inter-chromosomaux nommés corps nucléaires, incluant le nucléole, les corps de Cajal, les gems, les «splicing speckles» et les corps PML (Figure 5). Contrairement aux compartiments contenus dans le cytoplasme, les compartiments sous-nucléaires n'ont pas de membrane qui les sépare du nucléoplasme.

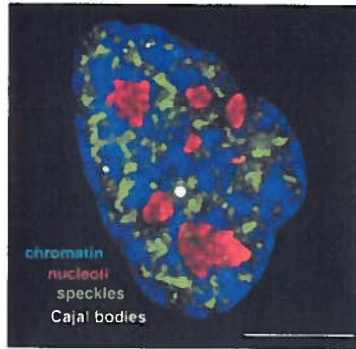


Figure 5. Les sous-compartiments du noyau. Image en microscopie à fluorescence illustrant la compartimentalisation interne du noyau. La chromatine (bleu) et certains des sous-compartiments du noyau sont démontrés; nucléoles (rouge), «speckles» (vert) et corps de Cajal (blanc). Barre = 5 µg. Tiré de Lamond et Sleeman (144).

2.1.1 Les corps de Cajal

Les corps de Cajal («Cajal bodies», CB), aussi connu sous le nom de «coiled bodies», sont souvent retrouvés en périphérie du nucléole et pourraient servir à livrer des facteurs de maturation nouvellement assemblés vers ce dernier. Ils contiennent une fraction des «small nuclear ribonucleoproteins» (snRNPs), qui sont des sous-unités des spliceosomes. On retrouve aussi aux CBs des «small nucleolar ribonucleoproteins» (snoRNPs), qui modifient et clivent le précurseur de l'ARNr. Une fonction majeure des CBs semble être la maturation des snRNPs et des snoRNPs (24). Ces RNPs nucléaires accumulent dans les CBs de manière transitoire avant de se concentrer aux «speckles» nucléaires ou au nucléole (144).

2.1.2 Les Gems

Les Gems sont des structures similaires aux CBs et sont souvent couplés avec ceux-ci. Parfois ces deux structures se chevauchent et les deux sont affectés de manière similaire par la température de croissance cellulaire ainsi que des inhibiteurs de la transcription. Les Gems contiennent la protéine SMN, pour «survival of motor neurons», qui joue un rôle dans la biogenèse cytoplasmique des snRNPs (159). La perte de la protéine SMN chez les humains mène à l'atrophie musculaire de la colonne vertébrale, une maladie dégénérative mortelle (148). SMN peut aussi être retrouvée dans les CBs.

Dans certaines lignées cellulaires transformées et tissus primaires fœtaux, SMN se localise aux gems. Par contre dans plusieurs lignées primaires et lignées cellulaires transformées, les gems et les CBs semblent être la même structure (143). Il n'est présentement pas évident pourquoi ces deux structures sont séparées dans certains types cellulaires (144).

2.1.3 Les «splicing speckles»

Les «splicing speckles» sont des structures de forme irrégulière et de taille variable qui se retrouvent dans le nucléoplasme. Ces sous-compartiments sont enrichis de facteurs d'épissage, incluant les snRNPs retrouvés dans les CBs ainsi que d'autres facteurs d'épissage (153, 281). Les speckles se retrouvent souvent proche des gènes qui sont activement transcrits mais si ces structures sont en fait des sites d'épissage est encore un sujet controversé. Il est plutôt cru qu'il s'agit de réservoirs qui fournissent des facteurs pour l'épissage des pré-ARNm de gènes qui se retrouvent à proximité (144, 145).

2.1.4 Les corps PML

Les corps «promyelocytic leukemia» (PML), aussi nommés ND10 pour «nuclear domain 10», sont des complexes protéiques associés avec la matrice nucléaire dont la fonction n'est pas bien connue. Ils ont une taille moyenne d'environ 1 µm et il peut y en avoir de 10 à 30 par cellule. Les corps PML recrutent une panoplie de protéines qui sont impliqués dans une variété de processus, dont la protéine PML. PML est l'organisatrice des corps PML puisque en absence de cette dernière, les autres protéines normalement ciblées aux corps PML adoptent une localisation différente. PML a été impliquée dans l'apoptose et la sénescence, mais les mécanismes impliqués dans ces processus ne sont pas encore connus (294). PML est aussi un suppresseur de tumeur dans plusieurs types cellulaires (56). PML existe sous deux formes; en forme libre qui se retrouve à travers le cytoplasme, et conjuguée à la protéine SUMO-1 (199, 288). L'infection par le VHS-1, l'adénovirus et le cytomégalo virus humain cause un désassemblage des corps PML, ce qui suggère que ces corps pourraient jouer un rôle dans la défense antivirale de la cellule hôte (38, 68, 76, 130, 175).

2.2 Localisation de protéines au noyau

Suite à leur traduction dans le cytoplasme, certaines protéines doivent se rendre au noyau. Les protéines d'environ 50 kDa et moins peuvent passer à travers les pores nucléaires par diffusion passive (170). Les protéines avec un poids moléculaire plus élevé peuvent utiliser leur signal de localisation nucléaire (NLS) pour se rendre à ce compartiment. Les NLS sont bien définis et sont classifiés dans plusieurs catégories. La plupart sont composés d'une série d'acides aminés basiques d'une longueur précise. Le motif pat4 est normalement composé de quatre acides aminés basiques tandis que le motif pat7 débute avec un résidu proline qui est suivi de sept acides aminés dont trois des quatre derniers sont basiques. Le signal bipartite contient deux motifs séparés qui sont riches en acides aminés basiques (170). Plusieurs protéines nucléaires ne contiennent pas des NLS classiques mais peuvent interagir avec une protéine qui en contient un pour se rendre au noyau.

Certaines protéines qui se retrouvent dans le noyau doivent retourner au cytoplasme. Il existe plusieurs signaux d'export nucléaire (NES) mais un des plus communs est un signal riche en leucine, de séquence LX(2,3)LX(2,3)LXL, où des acides aminés hydrophobes peuvent substituer la leucine et le nombre de ces résidus est indiqué entre parenthèses (170, 216).

2.3 Le nucléole et la biogenèse des ribosomes

Le nucléole est le sous-compartiment du noyau le plus visible par microscopie à transmission et est connu comme étant le site de biogenèse des ribosomes. Ce compartiment contient la machinerie nécessaire à la transcription des gènes ribosomiaux et la maturation des ARNr, qui sont par la suite assemblés en ribosomes (25). Le nucléole n'est pas entouré d'une membrane, sa structure est plutôt basée sur l'interaction entre ses composantes. De plus, il s'agit d'un compartiment dynamique où plusieurs de ses composantes circulent de manière continue avec le nucléoplasme (298). Le rôle du nucléole est beaucoup plus complexe que celui qui lui a été accordé au départ et plusieurs autres fonctions lui ont été attribuées et seront discutés ci-bas.

Les cellules de mammifères contiennent plus de 100 copies de gènes d'ADNr répétés en tandem, dans une orientation tête-à-queue, et sont distribués sur plusieurs chromosomes. Les régions sur les chromosomes contenant les gènes ribosomaux sont nommés «nucleolus organizer regions» (NORs). Chez les humains, les cellules diploïdes contiennent environ 400 gènes ribosomaux distribués dans cinq paires de chromosomes contenant des NORs (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) (105, 234). Lors de l'interphase, un rassemblement de NORs de plusieurs chromosomes forme un ou plusieurs nucléoles dans une cellule. Pendant la mitose, il y a arrêt de la transcription de l'ADNr et le nucléole se désassemble. À la fin de la mitose la synthèse d'ARNr recommence et il y a formation du nucléole (235).

Chaque gène ribosomal est composé d'une région transcrite et d'un espace intergénique (80). L'ARN polymérase I (ARNpoll) est responsable de la transcription des gènes ribosomaux pour générer le précurseur de l'ARNr 47S (pré-ARNr). L'ARNr primaire synthétisé par l'ARNpoll subit des étapes de maturation pour former les ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Avec l'ARNr 5S, qui est transcrit par l'ARN polymérase III, ces ARNr constituent les composantes catalytiques et architecturales des ribosomes (194). Les ARNr s'assemblent via un processus complexe avec 80 protéines ribosomales pour former les ribosomes matures. L'ARNr 18S est une composante de la sous-unité 40S du ribosome, tandis que l'ARNr 28S, 5.8S et 5S sont des composantes de la sous-unité 60S (80). L'existence du nucléole dépend d'une machinerie transcriptionnelle fonctionnelle et sa taille est corrélée avec l'activité transcriptionnelle de l'ARNpoll (198, 285). L'organisation moléculaire de la transcription d'un gène ribosomal se fait en forme de sapin de Noël et a été décrit pour la première fois en 1969 (185). Les branches de ce sapin représentent les pré-ARNr naissants dans un gradient de longueur croissante (234).

Morphologiquement, le nucléole est composé de trois sous-compartiments. Au centre on retrouve un ou plusieurs centres fibrillaires (FC) entouré par une couche compacte nommée la composante fibrillaire dense (DFC) et le tout est par la suite entouré par une région riche en granules nommée la composante granulaire (GC) (Figure 6) (298). La localisation exacte de la génération des transcrits ribosomaux est un sujet controversé. Les FCs contiennent très peu d'ARN mais on y retrouve l'ARNpoll et l'ADNr (298). Il a été suggéré que la transcription de ces gènes survient soit dans le FC,

dans le DFC ou dans les bordures des FC/DFC (115, 227, 267). La maturation du pré-ARNr en ARNr survient dans le DFC et les granules de 15 nm observées dans le GC correspondent à des particules pré-ribosomales (227, 267).

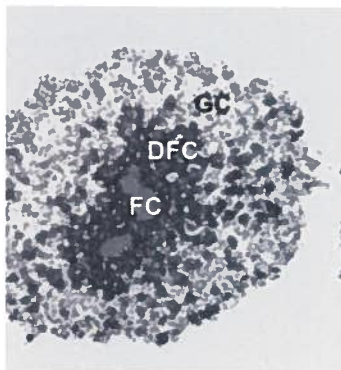


Figure 6. Les sous-compartiments du nucléole. Image en microscopie électronique d'un nucléole provenant d'un oocyte de *Xenopus*. GC: composante granulaire, DFC: composante fibrillaire dense, FC: centre fibrillaire. Adapté de Handwerger et Gall (100).

2.4 Les multiples fonctions du nucléole

Dans les dernières années, plusieurs nouvelles fonctions ont été attribuées aux nucléoles, révélant ainsi la complexité de ce sous-compartiment du noyau. En plus, des études protéomiques ont révélé la panoplie de protéines qui s'y retrouvent. Ces études protéomiques ainsi que certaines fonctions attribuées aux nucléoles seront discutés ci-bas.

2.4.1 Protéomique du nucléole

Grâce au fait que les nucléoles peuvent être isolées et purifiées, la composition protéique de ces compartiments a pu être analysée par des techniques de spectrométrie de masse à haut débit. Deux premières études protéomiques sur des nucléoles de cellules HeLa publiées en 2002 ont identifié plus de 400 protéines (5, 258). La poursuite de ces études a permis l'identification d'environ 700 protéines dans le nucléole en 2005 (<http://www.lamondlab.com/NOPdb>) (4). Plus d'un tiers de ces protéines sont impliquées dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes, tel que la transcription de l'ADNr,

la maturation de l'ARNr, ainsi que des protéines des sous-unités ribosomales. De plus, il y a une panoplie de protéines qui sont impliquées dans d'autres processus cellulaires, tels que la régulation du cycle cellulaire, la réparation de dommages à l'ADN et la maturation des ARNm (4, 141). À ce jour, l'équipe du laboratoire de Angus I. Lamond a identifié plus de 4500 protéines nucléolaires dans différents types cellulaires (<http://www.lamondlab.com/NOPdb3.0>) (1).

2.4.2 Le nucléole et le cycle cellulaire

Le nucléole subit des cycles de désassemblage et de réassemblage chaque fois que la cellule est en mitose. Ce compartiment est désassemblé lorsque les cellules entrent en mitose et à l'arrêt de la transcription (25). Différents événements surviennent au niveau du nucléole lors des phases de la mitose; la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

Au début de la prophase, une augmentation des niveaux de cyclin B1-CDK1 cause la phosphorylation de certaines composantes de la machinerie de transcription de l'ADNr dont SL1 et le «transcription termination factor-1» (104). Les transcrits naissants complétés restent associés avec des composantes de la région DFC pendant la mitose. De plus, la machinerie transcriptionnelle de l'ARNpoll reste associée aux NORs. Par contre, certaines sous-unités de la polymérase, incluant RPA39, RPA16, RPA20 et RPA194, se dissocient de manière transitoire pendant la métaphase et réapparaissent en anaphase tandis que d'autres composantes, comme UBF, y restent associés (25, 72, 154). La machinerie de maturation de l'ARNr ainsi que les pré-ARNr se dissocient du nucléole pendant la mitose. Suite à la perte de certaines sous-unités de l'ARNpoll du FC, des composantes de maturation, tels que la fibrillarine et B23, se dissocient du nucléole (154). Il est intéressant de noter qu'il y a une corrélation entre la perte de la fibrillarine du DFC et la désintégration de l'enveloppe nucléaire. En plus, son accumulation lors de la reformation du nucléole corrèle avec le rétablissement de cette enveloppe, ce qui suggère qu'un même mécanisme pourrait être impliqué dans ces deux événements (154). Plusieurs composantes de maturation sont redistribuées au cytoplasme pendant la mitose mais certains se retrouvent plutôt attachés à la surface des chromosomes condensés, nommée région périchromosomale (PR).

À l'anaphase, les composantes de la machinerie de maturation de l'ARNr restent soit associés au PR soit associés au «nucleolar derived foci» (NDF). À la fin de l'anaphase-début télophase, les niveaux de cyclin B1-CDK1 diminuent, ce qui mène à la réactivation de la transcription de l'ADNr. Le contenu des NDF est transféré vers des structures fibrogranulaires à la surface des chromosomes nommés «pre-nucleolar bodies» (PNBs) avant d'être recrutés vers les nucléoles (256).

En phase G1, les nucléoles sont réassemblés. Les composantes de maturation sont relâchées des PNBs dans un ordre défini. Premièrement, il y a relâche de composantes comme la fibrillarine, qui sont impliquées dans les étapes précoces de la maturation de l'ARNr, et recrutement aux nucléoles où le DFC s'élargit de manière progressive. Les protéines impliquées dans les étapes tardives de la maturation de l'ARNr sont par la suite recrutés pour former le GC (154, 277). Lorsque la machinerie de transcription et de maturation de l'ARNr est réassemblée sur l'ADNr, les NORs fusionnent dans le nucléoplasme pour former des nucléoles fonctionnels qui peuvent être visualisés lors de l'interphase.

2.4.3 Le nucléole et la régulation du cycle cellulaire

La fonction et la structure des nucléoles sont dynamiques à travers l'interphase. Plusieurs protéines s'associent au nucléole à des stades spécifiques du cycle cellulaire, ce qui suggère que ce compartiment pourrait réguler des aspects spécifiques de la progression du cycle cellulaire (25).

Les modifications post-traductionnelles sont des changements dynamiques qui surviennent tout au long du cycle cellulaire qui peuvent réguler une variété d'activités. Certaines de ces modifications, tels que la phosphorylation et la sumoylation, peuvent être régulées par le nucléole. Par exemple, une protéase SUMO-spécifique, SENP5, se localise au nucléole, et une inhibition de l'expression de cette protéine résulte en un défaut dans la division cellulaire (64, 97). De plus, la séquestration de certaines protéines dans le nucléole est un autre mécanisme par lequel ce compartiment peut réguler des activités spécifiques lors du cycle cellulaire. Par exemple, la transcriptase inverse de la télomérase qui ajoute les séquences nucléotidiques télomériques aux extrémités des chromosomes, demeure séquestrée dans le nucléole jusqu'à la réplication des télomères à

la phase S (328). Il a été proposé que cette séquestration est médiée par son interaction avec la nucléoline (132).

2.4.4 Le nucléole et la réponse au stress

Le nucléole peut aussi jouer un rôle dans la régulation de la réponse au stress et l'arrêt du cycle cellulaire. Un exemple de ceci est son effet sur la protéine suppresseur de tumeur p53. Lors de l'exposition d'une cellule à des formes de stress tels qu'un dommage à l'ADN, un choc thermique ou une aberration dans la biogenèse des ribosomes, p53 est stabilisé, ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose (25, 308). La stabilité de p53 est principalement régulée par deux protéines, HDM2 et p14ARF, dans les cellules non-transformées (228). L'hypothèse est que p14ARF séquestre HDM2, une E3 ubiquitine ligase, dans le nucléole, ce qui a comme effet d'éviter la dégradation de p53 par HDM2 dans le nucléoplasme (330). Il est aussi pensé que p14ARF, qui se retrouve majoritairement au nucléole, peut réguler la biogenèse des ribosomes en retardant la maturation des précurseurs de l'ARNr via son interaction avec B23 (18). Donc, le nucléole agit comme senseur pour des signaux de stress cellulaires via la stabilisation de p53. Une autre façon dont le nucléole peut coordonner la réponse au stress est par la régulation de la biogenèse des sous-unités ribosomales via le contrôle de la production de l'ARNr (177, 215). Ceci se fait via une régulation à la baisse de la transcription de l'ADNr par l'inhibition de l'interaction entre TIF-1A et l'ARNpolI (176). Les cellules peuvent donc réagir au stress en inhibant la transcription de l'ADNr.

2.5 Protéines majeures du nucléole à l'étude

Comme mentionné ci-haut (section 2.4.1), le nucléole est composé de plusieurs centaines de protéines. Dans nos études, nous avons ciblé certaines protéines majeures du nucléole (nucléoline, fibrillarine et B23) ainsi que deux composantes du complexe d'ARN polymérase I (UBF et RPA194). Ces protéines seront décrites dans les sections qui suivent.

2.5.1 La machinerie de transcription de l'ARN polymérase I

Le promoteur du gène de l'ADNr chez les mammifères est composé d'environ 150 pb et contient un «upstream core element» (UCE) et un «core» (198). L'initiation de la transcription de l'ADNr est médiée par un complexe multiprotéique nommé complexe de pré-initiation (PIC) qui inclut l'ARN polymérase I (ARNpoll), le complexe de sélectivité (SL1), et le «upstream binding factor» (UBF). SL1 est composé de «TATA box binding protein» (TBP) et d'au moins trois «TBP associated factors I» (TAFIs) (49) (Figure 7). Via les TAFIs, SL1 médie la spécificité au promoteur et la sélectivité à la polymérase, et est responsable du recrutement de l'ARNpoll au PIC. Une transcription activée par l'ARNpoll requiert UBF, qui interagit avec SL1 via son extrémité C-terminale hautement acide. UBF se lie en dimère aux régions UCE et «core» du promoteur et coopère avec SL1 pour la liaison à l'ADN (249). UBF contient plusieurs boîtes HMG, un motif reconnu pour le repliement de l'ADN (99). Ces boîtes HMG permettent au dimère de UBF de replier l'ADN et amener à proximité le «upstream core element» et le «core», ce qui facilite la formation du complexe d'initiation (12, 53). UBF active la transcription de l'ADNr par le recrutement de l'ARNpoll au promoteur, en stabilisant la liaison de SL1 et en compétitionnant avec des protéines qui se lient à l'ADN de manière non-spécifique, comme l'histone H1 (137, 138). L'ARNpoll est la composante la plus complexe du PIC. Il s'agit d'un complexe multiprotéique composé d'environ 13 protéines avec un poids moléculaire de plus de 1 MDa (249). La sous-unité RPA194 est une composante intégrale de la sous-unité catalytique de l'ARNpoll (264).

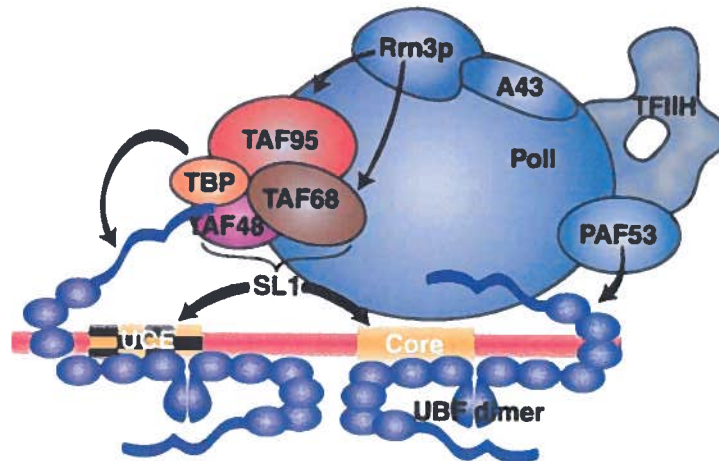


Figure 7. Complexe d'initiation de transcription de l'ARNpoll. Chez les mammifères, le promoteur de l'ADNr est composé de séquences UCE et du «core». L'initiation de la transcription de l'ADNr est médiée par le complexe de pré-initiation qui inclut l'ARNpoll, le complexe de sélectivité (SL1), et UBF. Tiré de Moss et Stafanovski (198).

Suite à la formation d'un PIC productif, il y a ouverture du promoteur où le premier ribonucléotide est incorporé et la transcription débute. Il a été démontré *in vitro* qu'une fois que l'ARNpoll s'échappe du promoteur, UBF et SL1 y restent liés afin de recruter le prochain complexe d'ARNpoll (218). Dans le contexte de la chromatine, l'ARNpoll transcrit à travers les nucléosomes soit en perturbant ou en contournant ces structures (249). En plus, UBF est distribué tout au long de l'ADNr (210) et il est pensé qu'il peut influencer l'élongation par l'ARNpoll de manière positive ou négative (197). En plus de son implication dans la stabilisation du PIC aux promoteurs, il est suggéré que UBF peut aussi jouer un rôle structural au niveau des NORs (210). Des éléments de terminaison de la transcription se retrouvent à l'extrémité 3' du gène de l'ADNr. Suite à cette terminaison, les composantes de la polymérase sont recyclés pour former l'ARNpoll compétente pour l'initiation (249).

2.5.2 Fibrillarine

Le nucléole contient les ARNr à différents stades de leur maturation mais aussi une multitude de petites molécules d'ARN. Ces petits ARN nucléolaires (snoRNAs) sont

impliqués dans les événements de clivage du précurseur d'ARNr et dans la maturation de ces ARNr pour leur empaquetage dans les ribosomes. La fibrillarine est une protéine nucléolaire de 34kDa qui s'associe avec U3 et d'autres snoRNAs (279). De plus, elle est une composante de toutes les particules ribonucléoprotéiques nucléolaires (snoRNPs) et est impliquée dans toutes les activités post-transcriptionnelles reliées à la synthèse des ribosomes; les premières étapes de la maturation des ARNr, la modification des pre-ARNr, et l'assemblage des ribosomes (301). Les eucaryotes possèdent deux types de snoRNPs, les C/D snoRNPs et les H/ACA snoRNPs, qui effectuent la méthylation séquence spécifique et la pseudouridylation de l'ARN, respectivement (237). Celles-ci sont les deux modifications de l'ARN les plus abondantes. L'inhibition de la transcription par l'ARNpoll ou le traitement de cellules avec des concentrations sous-toxiques de mercure induisent la redistribution de la fibrillarine du nucléole à des agrégats nucléoplasmiques (15, 43).

2.5.3 Nucléoline (C23)

La nucléoline, originellement nommée C23 due à sa mobilité dans un gel bidimensionnel (225), est une des protéines majeures, ainsi qu'une des protéines les plus étudiées, du nucléole. La nucléoline est phosphorylée et méthylée et peut aussi être ADP-ribosylée (92). Cette protéine est composée de trois domaines structuraux. Le domaine N-terminal est composé de régions hautement acides entrelacées de séquences basiques et contient plusieurs sites de phosphorylation. Le domaine central contient quatre domaines de liaison à l'ARN (RBD). Le domaine C-terminal, nommé GAR pour «Gly/Arg rich», est riche en résidus glycine, arginine et phénylalanine (92, 103).

La nucléoline est ubiquitaire et on la retrouve en abondance dans les régions DFC et GC du nucléole (30, 268). Par contre, on peut aussi retrouver cette protéine dans le nucléoplasme et sur la surface cellulaire (92). La nucléoline a été impliqué dans plusieurs aspects de la biogenèse des ribosomes, dont la maturation des pré-ARNr et l'assemblage des sous-unités ribosomales (91, 147, 236, 320). Cette protéine peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (207) et il a été suggéré qu'elle peut agir en tant que transporteur de protéines ribosomales vers le noyau ou dans l'export de sous-unités

ribosomales vers le cytoplasme (26, 259, 332). De plus, la nucléoline est requise pour la transcription de l'ARNr par l'ARNpolII (242).

La nucléoline est requise pour la prolifération cellulaire et son inactivation mène à une accumulation en stade G2/M et une augmentation de l'apoptose (304). Cette protéine est hautement exprimée dans des tumeurs et des cellules activement en division et est souvent utilisé comme marqueur de la prolifération (63, 247). Il est aussi pensé que la nucléoline joue un rôle plus général dans la régulation génique via son implication dans le remodelage de la chromatine (6, 191).

2.5.4 Nucléophosmine (B23)

B23, aussi nommée nucléophosmine (NPM), numatrin ou NO38, est une protéine multifonctionnelle impliquée dans plusieurs aspects des fonctions du nucléole. Il existe deux isoformes de B23, B23.1 et B23.2, qui diffèrent seulement dans leur extrémité C-terminale. B23.1 est composée de 294 aa tandis que B23.2, qui est dérivée par épissage différentiel (41, 312), est composée de 259 aa. Les deux isoformes partagent les premiers 257 aa. B23.1 est surtout retrouvée au nucléole tandis que B23.2, qui est moins abondante, est détectée dans le cytoplasme et dans le nucléoplasme (214, 312). B23 possède une activité de ribonucléase (106) et est impliquée dans la maturation de l'ARNr (257). Il a été proposé que B23 peut interagir et diriger plusieurs protéines au nucléole (71, 79, 156, 187, 291, 292). B23 peut se lier à l'ARN ainsi qu'à l'ADN double et simple brin (70, 81, 311), et peut interagir avec les particules ribonucléoprotéiques pré-ribosomales (260).

B23 a été identifié comme étant un substrat de CDK2/cyclin E et joue un rôle dans la duplication du centrosome durant la progression du cycle cellulaire. Ce processus est régulé par la phosphorylation de B23 au résidu Thr199 (211, 300). De plus, B23 possède des activités de chaperone moléculaire, tel que la prévention de l'agrégation protéique, la protection d'enzymes pendant la dénaturation thermique et de faciliter la renaturation de protéines dénaturées chimiquement (293). Cette protéine nucléaire joue aussi un rôle dans la réponse au stress. Suite à un stress cellulaire induit par un dommage à l'UV, B23 se redistribue au nucléoplasme et régule les niveaux de p53, une protéine suppresseur de tumeur, et HDM2, un régulateur négatif de p53. De plus, il lie HDM2 et

agit comme un régulateur négatif de l'interaction p53-HDM2, menant à la stabilisation de p53 (139, 140).

2.6 Modifications du nucléole par des virus

Plusieurs virus sont capables de modifier des fonctions attribuées au nucléole et en plus, différentes protéines virales peuvent se localiser dans ce sous-compartiment du noyau. La majorité des virus à ADN et les rétrovirus ont un accès plus simple au nucléole puisqu'ils se répliquent dans le noyau. Par contre, les virus à ARN qui se répliquent dans le cytoplasme doivent pouvoir faire le transit de leurs protéines à travers le noyau (109). Les virus peuvent cibler le nucléole d'une cellule pour affecter une fonction cellulaire ou utiliser des protéines nucléolaires pour favoriser sa propre réplication.

2.6.1 Conséquences sur la cellule et le cycle de vie viral

Plusieurs virus affectent le nucléole lors de la réplication. Trois exemples, dont l'adénovirus, le poliovirus et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), seront décrits ici.

Les adénovirus ont un génome à ADN linéaire qui se réplique dans le noyau. L'infection par l'adénovirus inhibe la synthèse, la maturation et la sortie des ARNr 18S et 28S du noyau (39). En plus, cette infection cause la redistribution de la fibrillarine du nucléole (231). La protéine V de l'adénovirus joue un rôle dans la livraison de l'ADN viral chez la cellule hôte et s'associe au nucléole pendant l'infection. La protéine V a la capacité de relocaliser la nucléoline et B23 au cytoplasme en contexte de transfection (174). Il a été démontré que B23 stimule la réplication de l'adénovirus (212). Un isoforme de B23, B23.1 interagit avec deux protéines virales impliquées dans la réplication de l'ADN du virus, la «preterminal protein» (pTP) et la «DNA-binding protein» (DBP) tandis que l'autre isoforme, B23.2, interagit seulement avec la DBP *in vitro*. Pendant l'infection, la localisation des deux isoformes avec pTP et DBP diffère (108). De plus, UBF est séquestré dans les centres de réplication viraux pendant l'infection et accroît la réplication de l'ADN viral (146). Par contre, l'ARNpoll n'est pas séquestré avec UBF à ces endroits. UBF s'associe aux extrémités du génome viral

linéaire, ce qui suggère qu'il pourrait être impliqué dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral.

Le poliovirus (PV) est un virus à ARN à polarité positive. Lors de l'infection par ce virus, la nucléoline est relocalisée dans le cytoplasme (309). Il a été démontré que cette relocalisation n'est pas une conséquence de l'inhibition de la transcription ou de la traduction induite par le virus car en présence d'inhibiteurs de ces deux processus, la nucléoline ne se relocalise pas au cytoplasme. Par contre, la localisation de la fibrillarine n'est pas affectée pendant l'infection indiquant qu'il ne s'agit pas d'une redistribution générale de protéines nucléolaires. De plus, la nucléoline interagit avec la région 3' non-traduite du génome de PV et il a été suggéré que cette protéine nucléolaire serait impliquée dans la réplication du virus (309). En fait, il a été démontré que la nucléoline stimule la traduction médiée par le «internal ribosome entry site» (IRES) (119). D'ailleurs, l'infection par le PV résulte en un arrêt de la transcription chez la cellule hôte par les trois ARN polymérases cellulaires. Pour ce qui en est de l'ARNpolII, la protéase virale 3C^{pro} est responsable de l'arrêt de la transcription par cette polymérase (318). La 3C^{pro} est capable de cliver TAF₁₁₀, une sous-unité du complexe SL-1, *in vitro*. L'expression de UBF et de TAF₁₁₀ est réduite dans les cellules infectées à 3-4 hpi, ce qui corrèle avec l'arrêt de la transcription de l'ADNr suite à l'infection par PV (10).

La réplication du VIH, un rétrovirus avec une phase ADN, comporte des stades dans le cytoplasme et dans le noyau, afin de générer une quinzaine de protéines virales (84). La protéine Rev et le transactivateur Tat du VIH se localisent au nucléole (221, 248). Rev se localise aux DFCs et GCs du nucléole et sa surexpression modifie l'architecture du nucléole et mène à l'accumulation de B23.1 (186). De plus, une surexpression de Rev est corrélée avec une augmentation de la proportion de cellules dans les phases G2 et M du cycle cellulaire (37, 186). Des changements dans l'architecture nucléolaire a été observé dans des lymphocytes des patients infectés avec le VIH-1, et ceci a été corrélé avec une perte de contrôle du cycle cellulaire (85). Lors de l'infection, Rev exporte les ARNm partiellement épissés du noyau. Une mutation dans le signal de localisation nucléolaire de Rev prévient sa localisation au nucléole et réduit l'efficacité de sa fonction d'export des ARNm (45). Donc, la localisation nucléolaire de Rev est importante pour la réplication efficace du VIH.

2.7 Modifications au noyau par le VHS-1

Le VHS-1 induit plusieurs modifications à la cellule afin de favoriser sa réplication. Certaines de celles qui surviennent dans le noyau et dans le nucléole (section 2.7.1) seront discutées ci-bas.

Afin que les capsides nouvellement assemblées du VHS-1 puissent se rendre à la membrane interne du noyau, ils doivent faire face à un grillage protéique qui est la lamina nucléaire. La lamina est composée principalement des protéines lamin A/C et lamin B (98). L'infection par le VHS-1 cause une perturbation de la lamina nucléaire et les protéines virales UL31 et UL34 sont impliquées dans cette modification (239, 262, 275).

Les corps PML semblent jouer un rôle dans la défense antivirale de la cellule hôte contre plusieurs virus (38, 68, 76, 130, 175). Suite à l'infection par le VHS-1, PML et Sp100, des composantes majeures des corps PML, sont dégradés (76, 78, 175). La protéine ICP0 du VHS-1 s'associe tôt dans l'infection aux corps PML et médie, soit directement ou indirectement, leur dégradation via son activité E3 ubiquitine ligase (28, 29, 42, 75, 77).

Les centromères sont des régions chromosomales spécialisées dont la structure est le support pour la construction des kinétochores. Ces derniers sont le site d'attachement des microtubules pendant la mitose et la méiose (229). En plus de l'effet de ICP0 sur les corps PML, cette protéine virale peut provoquer la dégradation des protéines majeures du centromère CENP-A et CENP-C (74, 163, 164). La dégradation de ces protéines mène à la déstabilisation du centromère, ce qui conduit à des défauts mitotiques (55, 74, 162, 164).

L'infection par le VHS-1 mène à une réorganisation des chaperones cellulaires, comme Hsc70, dans des domaines «Virus-Induced Chaperone-Enriched» (VICE). Ces domaines sont formés de manière adjacente aux CRs viraux (32, 33, 155, 160, 324). En plus des protéines chaperones, les domaines VICE contiennent des protéines ubiquitinylés et le protéasome 20S (33). Ces domaines VICE servent de centres de contrôle de la qualité des protéines et il est pensé qu'ils servent à remodeler ou dégrader des protéines aberrantes du noyau qui pourraient interférer avec l'infection productive (161).

2.7.1 Modifications du nucléole par le VHS-1

Des analyses en microscopie électronique ont déterminé que les nucléoles s'allongent et sont marginalisés au bord des noyaux pendant l'infection par le VHS-1 (20). En plus, l'ARNr est retenu dans les nucléoles (20). Une diminution d'environ 85% de la synthèse d'ARNr mature a été observée dans des cellules infectées par le VHS-1 (19, 20, 273, 287, 310). Tandis qu'il y a une inhibition de la synthèse de protéines cellulaires suite à l'infection, la synthèse de protéines ribosomales persiste et elles sont assemblés en ribosomes matures mais à un taux réduit (274). Une étude récente a démontré que lors de l'infection, le taux de biogenèse des ribosomes est modulé indépendamment de l'activité de l'ARNpoll, mais plutôt par un changement dans la maturation des ARNr (14). Plus spécifiquement, ils ont déterminé qu'à 3 hpi le taux de biogenèse des ribosomes était à environ 30% de celui dans les cellules mock-infectées. Par contre, le taux de synthèse de l'ARNr 45S était 90% de celui des cellules mock. Trois types de modifications de la voie de maturation des ARNr ont été observées pendant l'infection : (i) une diminution de la quantité de 41S, 32S, 21S et 12S; (ii) une stabilité dans la quantité de 45S et de 30S; (iii) l'apparition de nouvelles espèces d'ARNr nommées V1, V2 et V3 (V pour «viral-induced forms»). De plus, une forte diminution de la méthylation de l'ARNr a été détectée, ce qui pourrait expliquer la modification dans la maturation des ARNr. Il a été proposé que ces modifications permettraient un contrôle du taux de biogenèse, ce qui donnerait la possibilité d'échapper au stress ribosomal en plus de permettre l'assemblage de ribosomes spécialisés.

Avant le début de nos études sur l'impact du VHS-1 et de UL24 sur le nucléole, on connaissait peu sur les modifications subies aux protéines nucléolaires lors de l'infection et leur rôle dans le cycle de vie du virus. Nous aborderons les études publiées depuis, et plus particulièrement les résultats de nos propres publications, dans la section Discussion.

2.7.2 Localisation de protéines du VHS-1 au nucléole

Plusieurs protéines du VHS-1 ont été détectées au nucléole dont US11, UL12, ICP27, ICP0, ICP4, VP22, UL27.5 et ICP34.5 (44, 151, 166, 171, 195, 230, 240, 246, 251, 252). Ces protéines virales ont des rôles variés pendant l'infection et font partie de

différentes classes cinétiques d'expression. Notre laboratoire a ajouté UL24 dans la liste des protéines du VHS-1 qui se localisent au nucléole (17, 168). Nos données et celles des autres études qui ont par la suite confirmé nos résultats seront discutés dans la section Discussion.

3. La protéine virale UL24

3.1 Conservation de UL24 chez les virus herpès

Le gène *UL24* se retrouve chez la majorité des membres de la famille des *Herpesviridae*. La séquence de UL24 peut être séparée en deux parties : la région N-terminale qui est conservée parmi les *Herpesviridae*, et la région C-terminale qui est plus variable (123, 136). Dans la région N-terminale, qui est composée des acides aminés 1 à 163, on retrouve cinq domaines d'homologie (DH) dont le niveau de conservation est d'au moins 65% entre protéines analogues chez les virus herpès (Figure 8) (122, 123, 136). À l'intérieur de ces DH, il y a des acides aminés hautement conservés qui se retrouvent dans au moins 90% des homologues de UL24. Des substitutions d'acides aminés dans les DH II et III affectent la capacité du VHS-1 de se répliquer en culture cellulaire (123). Notre laboratoire a récemment déterminé l'importance de ces DH pour la localisation de UL24 en culture cellulaire ainsi que pour son effet sur le nucléole, et ces données seront discutés dans la section discussion de la thèse.

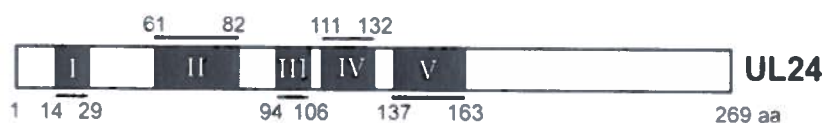


Figure 8. Représentation schématique de la protéine UL24 du VHS-1. Les cinq domaines d'homologie sont représentés par des rectangles noirs et numérotés avec des chiffres romains. Les acides aminés au début et à la fin de chaque domaine sont indiqués en haut ou en bas des barres noires. Adapté de Bertrand et Pearson (16).

3.2 UL24 du VHS-1

3.2.1 Importance de UL24 en culture cellulaire

La séquence du cadre de lecture ouvert (ORF) de *UL24* du VHS-1 a été déterminée pour la première fois lors du séquençage de la région unique longue du génome de la souche 17 (180). *UL24*, le 24^{ème} ORF dans la région unique longue, n'est pas essentiel à la réplication du VHS-1 (244). Le gène *UL24* chevauche celui de la thymidine kinase (*tk*) dans une orientation tête-à-tête et se retrouve sur le brin opposé. L'alignement des séquences en acides aminés entre *UL24* et huit herpèsvirus a révélé cinq régions hautement conservées dans son ORF (122).

Coen *et al.* ont généré des virus avec des mutations insérées dans le promoteur de *tk* (46). De ces virus, ceux contenant des mutations dans les régions conservées de *UL24* formaient des plages de lyse de 2 à 3 fois plus petites que celles formées par le virus sauvage (123). Normalement, les cellules infectées avec une souche sauvage s'agrègent (phénotype *syn*⁺). Par contre, certains virus mutants causent la fusion des cellules, formant des syncytia (phénotype *syn*⁻ ou *syn*). Les mutations *syn* ont été identifiées dans les gènes qui codent pour gB, *UL20*, gK et *UL24* (250). Des virus avec un phénotype *syn* dû à une mutation dans *UL24* forment des plages syncytiales à 39°C, qui est une température plus pénétrante qu'à 37°C pour ce phénotype (123). D'autres études ont aussi déterminé que des mutations dans *UL24* résultent en la formation de plages syncytiales (253, 299). Donc, *UL24* est importante pour la réplication efficace du VHS-1 et joue un rôle dans l'inhibition de la fusion aberrante des cellules lors de l'infection.

3.2.2 Expression de la protéine UL24

Six transcrits de *UL24* sont exprimés pendant l'infection par le VHS-1 avec un patron de transcription complexe (Figure 9). Quatre des transcrits contiennent l'ORF entier de *UL24*, et utilisent deux sites d'initiation de la transcription différents; les transcrits de 5.6 et 1.4 kb commencent au premier site d'initiation de la transcription et les transcrits de 5.4 et 1.2kb commencent au deuxième. Les transcrits de 5.2 et 0.9 kb commencent plus loin dans l'ORF et donc coderaient pour une protéine tronquée. En

plus, deux sites de polyadénylation (polyA) sont utilisés pour la transcription de *UL24*. Les transcrits de 1.4, 1.2 et 0.9 kb sont exprimés avec une cinétique précoce et proviennent de l'utilisation du signal polyA de *UL24* tandis que les transcrits de 5.6, 5.4 et 5.2 kb sont exprimés avec une cinétique «leaky-late» et terminent au site polyA de *UL26* (51, 101). En plus des différents sites d'initiation et de terminaison de la transcription, l'expression de *UL24* subit une régulation après l'initiation de la transcription par ICP27, possiblement dû à un effet sur l'export nucléaire des transcrits longs (220), et l'accumulation de ses ARNm est réduite par l'expression de *tk* (51, 52, 101).

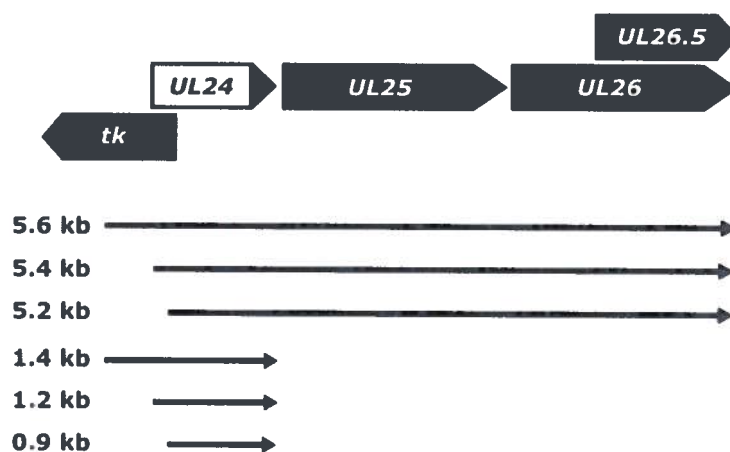


Figure 9. Schéma de la région génomique entourant *UL24* du VHS-1 et de ses transcrits. *UL24* est représenté par le carré blanc et les gènes entourants sont représentés par les carrés noirs. Les différents transcrits de *UL24* produits lors de l'infection sont représentés par les flèches noires. Adapté de Pearson et Coen (219).

Le ORF de *UL24* code pour une protéine de 269 aa, qui correspond à une masse moléculaire d'environ 29.5 kDa. Dans l'étude de Pearson et Coen (219), un antisérum contre *UL24* a été généré. *UL24* a été détectée dans des lysats de cellules infectées à partir de 11 hpi, et une plus grande quantité a été détectée à 15 hpi (219). Cet antisérum n'a pas permis la visualisation de *UL24* dans des expériences d'immunofluorescence indirecte car un patron de distribution similaire a été observé avec le sérum pré-immun.

Par contre, UL24 a pu être détectée dans des expériences de fractionnement cellulaire. Ces expériences ont permis de détecter UL24 à 9 hpi avec des niveaux similaires entre le noyau et le cytoplasme. Une augmentation de son expression a été observée à 12 et 15 hpi, et une plus grande quantité est associée au noyau. Une analyse des virions matures extracellulaires du VHS-1 par spectrométrie de masse n'a pas détecté UL24 (167).

L'utilisation d'un virus qui n'exprime pas les transcrits de 5.6 et 1.4 kb, les transcrits qui commencent au premier site d'initiation, a permis de déterminer que la majorité de UL24 exprimée provient de ces deux transcrits (219). Les transcrits qui commencent au deuxième site d'initiation, de 5.4 et 1.2kb, peuvent aussi servir d'ARNm mais semblent être plus faiblement traduits. De plus, une diminution dans l'expression des transcrits courts de UL24 ne semble pas affecter le niveau d'expression de la protéine UL24 pendant l'infection. UL24 est exprimée avec une cinétique «leaky-late», puisque son expression dépend largement, mais pas complètement, de la réplication de l'ADN viral (219).

3.3 Les homologues de UL24

3.3.1 UL24 du VHS-2

Le gène *UL24* du VHS-2 code pour une protéine de 281 aa avec une masse moléculaire estimé de 30.5 kDa (179). Il possède 75% d'identité de séquence en acides aminés avec UL24 du VHS-1. UL24 du VHS-2 peut être détectée à 9 hpi par immunobuvardage de type Western et son niveau augmente entre 12 et 24 hpi (113). Son expression est dépendante de la réplication de l'ADN viral, donc UL24 du VHS-2 est une protéine de cinétique tardive. Dans des essais d'immunofluorescence sur des cellules Vero infectées avec le VHS-2, UL24 est détectée à partir de 9 hpi. Le marquage précis varie d'une cellule à une autre mais à 9 et 12 hpi il a une localisation plutôt périnucléaire du bord cytoplasmique. À 16 hpi, UL24 se localise dans certaines cellules soit de manière diffuse soit en granules dans le noyau. En contexte de transfection, le marquage prédominant de UL24 se retrouve dans le noyau avec un marquage moins intense dans le cytoplasme. Un marquage suggérant une localisation au nucléole a aussi été observé dans

certaines cellules transfectées avec UL24 mais un co-marquage avec une protéine de ce compartiment n'a pas été effectué.

UL24 a été détectée sur des virions de VHS-2 purifiés ainsi que sur des capsides de type C, qui sont des capsides contenant l'ADN viral (113). Il a été suggéré que UL24 du VHS-2 est une protéine mineure du tégument qui s'associe faiblement aux capsides. Puisque UL24 se localise au noyau et au cytoplasme et qu'elle a été détectée dans les virions, les auteurs proposent qu'elle pourrait jouer un rôle dans la maturation des capsides et des virions du VHS-2.

3.3.2 UL24 du virus herpès bovin 1

Le virus herpès bovin 1 (BHV-1) est un important pathogène du bétail. Le BHV-1 peut causer des maladies respiratoires sévères, des lésions génitales, des avortements et des encéphalites (128). L'ORF de UL24 du BHV-1, qui a une longueur de 293 aa, a une similarité de séquence en acides aminés de 38.1% avec celui du VHS-1 (321). Par contre, dans les cinq régions hautement conservées, UL24 du BHV-1 a une identité de séquence de 80.7% avec ses homologues dans huit herpèsvirus. Chez le BHV-1, un transcrit de 5.2kb contient l'ORF de UL24 et il est le plus long transcrit d'un groupe de quatre qui sont co-terminaux en 3'. De plus, le mutant de UL24 du BHV-1 ne forme pas de syncytia dans les deux lignées cellulaires bovines testées. Il a été suggéré que cette différence observée entre l'activité antifusionnelle de UL24 du VHS-1 et de BHV-1 peut être due aux cellules hôtes testées (321).

3.3.3 ORF35 du virus Varicella-Zoster

Chez le virus Varicella-Zoster (VZV) ORF35 code pour une protéine de 285 aa qui a 33% d'identité en acides aminés avec UL24 du VHS-1. *ORF35* a une orientation tête-à-tête avec *ORF36*, le gène *tk* de VZV, mais contrairement à la situation pour VHS-1, les deux cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas. ORF35 se localise au noyau en contexte d'infection et de transfection. La réplication de virus qui n'expriment pas ORF35 est réduite dans certains types cellulaires (118).

Lors de la réplication du VZV, il y a formation de grands polycaryocytes ou syncytia, *in vitro* et *in vivo* dans la peau infectée par le VZV (21, 47). Des virus qui

n'expriment pas ORF35 ont une formation aberrante de syncytia et une taille réduite des plages de lyse (118). Ce même groupe a découvert que cette aberration est due à la perturbation de la localisation de gE à la membrane plasmique, une localisation qui est essentielle à la fusion entre cellules dans ce contexte (48). Donc, ORF35, comme UL24 joue un rôle dans des événements de fusion lors de l'infection.

3.3.4 UL76 du cytomégalo virus humain

Le gène *UL76* du cytomégalo virus humain (HCMV) code pour une protéine de 38 kDa et est composé de plus de 20 aa basiques, lui conférant un point isoélectrique estimé de 11.6 (313). En contexte de transfection, UL76 se localise en forme de points dans le noyau. Dans des expériences de co-transfection transitoire, il a été démontré que UL76 est capable de réguler l'activité de la région MIEP («major immediate-early promoter/enhancer»), qui est impliquée dans l'expression des protéines majeures immédiat-précoces (MIEs). Les MIEs, codés par la région UL122-123, sont les protéines immédiat-précoces les plus abondantes et sont reconnues comme étant des protéines régulatrices qui affectent l'expression de gènes viraux de toutes les classes cinétiques. De plus, il a été suggéré que ces MIEs pourraient être importantes pour la réactivation du virus (276, 286). UL76 est capable d'activer ou de réprimer l'expression de MIEPs et d'autres gènes du HCMV. Donc, sa localisation au noyau est en accord avec la découverte que UL76 semble avoir une fonction régulatrice (313).

Deux transcrits, de 4.5 et 5.5 kb, contiennent l'ORF de UL76 et sont exprimés avec une cinétique tardive (314). Par contre, cette protéine virale est détectable très tôt dans l'infection lorsque la synthèse *de novo* de protéines est abolie et elle se localise principalement au noyau. De plus, il a été déterminé par purification sur gradient que UL76 est associée aux particules virales (314). Plus précisément UL76 s'associe à la fraction contenant l'enveloppe virale et H-pUL76, une protéine dérivée de UL76 qui forme un complexe avec une protéine inconnue, s'associe plutôt à la fraction du tégument/capside. Dans des cellules exprimant de manière stable UL76, la production virale et la réplication de l'ADN viral est réduite (314). Ces résultats concordent avec un effet de UL76 sur l'expression des gènes du HCMV décrit auparavant (313) et pourraient

expliquer le long cycle de réplication du virus ou pourrait plutôt s'agir d'un mécanisme employé par le virus pour retourner en latence.

3.4 Études protéomiques de virus herpès et de UL24

Des études protéomiques ont été effectuées sur quelques membres des *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*, dont le cytomégalo virus humain, le cytomégalo virus murin, le virus Epstein-Barr, le virus associé au sarcome de Kaposi, le rhadinovirus de singe rhésus, le gammaherpès virus murin 68 (MHV68) et le herpès virus alcelaphine 1 (9, 13, 27, 69, 125, 129, 209, 307, 334). De ceux-ci seulement l'homologue de UL24 du MHV68, ORF20, a été détecté associée aux virions (27). Wang *et al.* ont déterminé par immunomarquage à l'or et observation au microscope électronique, ainsi que par immunobuvardage de type Western sur des virions purifiés, que UL76 du HCMV est associée aux particules virales (314).

Peu d'études protéomiques ont été effectuées sur des *Alphaherpesvirinae* à ce jour. Une étude protéomique a été effectuée sur des virions purifiés du VHS-1 suite à l'enveloppement primaire au noyau et UL24 n'a pas été détectée sur ces particules (217). Loret *et al.* ont effectué une analyse par spectrométrie de masse sur des virions matures extracellulaires du VHS-1 (167). Dans cette étude, UL24 n'a pas été détectée dans les virions extracellulaires. Similairement, Pearson *et al.* n'ont pas détecté UL24 dans des préparations de virions de VHS-1 purifiés par gradient (219). UL24 du VHS-2 a été détectée sur des virions purifiés ainsi que sur des capsides de type C (113). Il a été suggéré que UL24 du VHS-2 est une protéine mineure du tégument. Donc, il existe des disparités quant à la présence de UL24 et de ses homologues sur la particule virale.

3.5 Importance de UL24 en pathogenèse

3.5.1 Importance de UL24 du VHS-1 pour la réplication et la réactivation

Des virus mutants dans *UL24* utilisés dans plusieurs études contenaient aussi des mutations dans le cadre de lecture ouvert de *tk*. Afin de déterminer l'importance de UL24 en pathogenèse, Jacobson *et al.* (122) ont généré des virus contenant une mutation

nonsense dans *UL24*, ce qui résulte à la terminaison de *UL24* après 53 aa. Ceci correspond à 18% des 269 aa de l'ORF *UL24*. Dans les deux isolats indépendants générés, nommés *UL24XB* et *UL24XG*, l'activité de TK n'est pas affectée (122). Similairement aux virus contenant des mutations dans le promoteur de *tk*, et donc dans *UL24*, *UL24XB* et *UL24XG* se répliquent moins bien et forment des plages de lyse plus petites que le virus sauvage KOS. En fait, leur réplication est environ cinq fois moins efficace dans un cycle d'infection et ils forment aussi des plages syncytiales.

L'effet d'une déficience en *UL24* dans la pathogenèse a été étudiée dans un modèle murin d'infection oculaire (149). En bref, ce modèle consiste à faire des scarifications légères de la cornée suivi par l'infection de l'œil. Pour déterminer l'efficacité de la réplication oculaire aiguë, les virus présents dans les larmes de souris sont récoltés de 1 à 3 jours post-infection. Par la suite, pour caractériser la réplication neuronale aiguë, les ganglions trigéminaux sont récoltés et les virus présents sont quantifiés. Afin d'évaluer la capacité de réactivation des virus, les ganglions trigéminaux sont prélevés et dissociés au jour 30 post-infection, où la latence est déjà établie, et l'apparition d'effets cytopathiques sur une co-culture est analysée. L'établissement de la latence peut être quantifiée par des essais de PCR pour détecter l'ADN viral et les transcrits LAT.

Jacobson *et al.* ont testé les deux isolats indépendants, *UL24XB* et *UL24XG*, pour leur capacité de se répliquer et se réactiver de la latence suite à l'inoculation de la cornée de souris CD-1 décrite ci-haut (122). Ces virus mutants se répliquent de 10 à 30 fois moins efficacement dans les yeux que le virus sauvage KOS. Par contre, la réplication neuronale aiguë est plus sévèrement affectée, avec une diminution du titre viral d'environ 4 log₁₀, comparée à celle du virus KOS. En plus, les virus mutants ont une réactivation pratiquement absente dans des essais d'explants des ganglions trigéminaux. L'établissement de la latence a aussi été évalué en comparant le virus *UL24XB* à KOS. L'ADN viral de *UL24XB* est détecté dans les ganglions mais avec une diminution de 2 log₁₀. Le niveau des transcrits LATs a aussi été mesuré. Des LATs ont été détectés dans les ganglions infectés avec le mutant mais à environ 1 log₁₀ de moins que le virus sauvage. Donc même si les virus mutants ne sont que partiellement déficients dans la réplication oculaire, l'effet est plus marqué dans la réplication et dans la réactivation des

ganglions trigéminaux. Il a été suggéré que cette différence dans l'importance de UL24 entre les yeux et les ganglions reflète possiblement une différence entre types cellulaires, où les neurones pourraient manquer des facteurs qui peuvent compenser pour la perte de la fonction de UL24 (122).

3.5.2 UL24 du VHS-2 en culture cellulaire et en pathogénèse

Afin d'étudier la contribution de *UL24* sur la virulence du VHS-2, un virus avec une insertion β -glucuronidase (UL24- β luc), générant un polypeptide qui manque les derniers 100 aa en C-terminal de UL24, et un virus restitué (UL24R) ont été analysés pour leur habileté de réplication en culture de cellules et pour leur capacité d'infecter deux modèles animaux (22). En culture cellulaire, UL24- β luc se réplique de manière similaire au virus sauvage 186 et au virus UL24R dans trois lignées cellulaires différentes; Vero, HFF et SK-N-SH. Par contre, il y a formation de syncytiums avec le virus UL24- β luc dans ces trois lignées. Ceci suggère que la portion C-terminale, dans laquelle est insérée la cassette β -glucuronidase, est importante pour la modulation d'événements de fusion dans des cellules infectées par le VHS-2 mais qu'elle n'est pas requise pour la réplication du virus.

Les modèles d'infection vaginale murins et du cochon d'Inde permettent d'analyser l'infection dans la phase aiguë et latente de l'infection herpétique. En plus, le modèle du cochon d'Inde permet d'étudier l'infection aiguë ainsi que la réactivation de la latence. Dans des souris BALB/c, UL24- β luc est non-virulent jusqu'à des doses de 400 fois la LD₅₀ de la souche parentale. De plus, il y a très peu de lésions formées et la sévérité de la maladie est retardée et réduite avec le virus mutant. Dans les cochons d'Inde Hartley, un bas niveau d'infection aiguë a été observé ainsi qu'aucune mortalité avec le virus UL24- β luc. Ce virus peut s'établir en latence dans les ganglions de la racine postérieure et se réactiver pour former des lésions herpétiques, mais à des niveaux réduits par rapport à la souche sauvage. Donc, UL24 du VHS-2 est un déterminant de virulence, au moins dans les deux modèles animaux testés (22).

3.5.3 ORF35 du VZV en pathogenèse

Puisque l'infection par le VZV est hautement hôte-spécifique, l'infection de cellules de la peau humaine et de xénogreffes de cellules T, greffées dans le modèle de souris SCIDhu, s'avère utile pour étudier les mécanismes de pathogenèse du VZV *in vivo* (189, 190). Dans ce modèle, ORF35 était important pour la réplication efficace du VZV. Par contre, ORF35 semblait plus important pour la virulence du VZV dans les cellules de la peau que dans les cellules T (118). Ces résultats sont consistants avec les observations que la formation de syncytia, et la propagation du virus entre les cellules, sont nécessaires pour la réplication optimale du VZV dans des cellules de l'épiderme humain (21, 188).

3.6 Fonction putative d'endonucléase de UL24

Une étude bioinformatique a identifié un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK, un domaine qui se retrouve dans divers endonucléases, dans la séquence du gène *UL24* du VHS-1 (Figure 10) (136). Ce domaine est formé par certains acides aminés hautement conservés dans les DHs II et III. Les résidus D78, E99 et K101 formeraient le site catalytique, tandis que les résidus H22, Y26, E69, R75 et Q117 contribueraient à l'architecture de ce site et seraient importants pour la spécificité du substrat (136). En utilisant le programme Meta-BASIC, une méthode de comparaison de profil de séquence riche en structure secondaire prédite, Knizewski *et al.* (136) ont pu identifier ce domaine dans 18 virus de la famille des *Herpesviridae*.

I
 1 MAARTRSLVE RRRVLMAGVR **S**HTRFYKALA EEVREFHATK ICGTLLTLLS
 II
 51 GSLQGRSVFE ATRVTLICE**V** **D**LGP**R**RP**D**CI CVFEFANDKT LGGVCV**I****I****E****L**
 III
 101 **K**TCKYISSGD **T**ASKRE**Q**RAT **G**MK**Q**LRHSLK LLQSLAPPGD KIVYLCFVLV
 IV
 V
 151 **F**VA**Q**RTLRSV RVTRLVPQKV SGNITAVVRM LQSLSTYTPV IEPRTQRARR
 V
 201 RRGGAARGSA SRPKRSHSGA RDPPEAARQ LPPADQTPTS TEGGGVLKRI
 251 AALFCVPVAT KTKPRAASE

Figure 10. Séquence en acides aminés de la protéine UL24 du VHS-1. Les cinq domaines d'homologie sont encadrés en bleu (selon 122, 123) et les acides aminés hautement conservés sont en caractères gras (selon 136). Les acides aminés qui forment le site catalytique putatif sont en rouge et ceux qui seraient importants pour la spécificité du substrat sont en bleu.

Plusieurs familles d'endonucléases contiennent des domaines PD-(D/E)XK, dont des endonucléases de restriction, des enzymes de réparation d'ADN, des résolvas de jonction Holliday, des recombinases et d'autres enzymes qui clivent l'ADN. La structure commune de ces endonucléases inclut quatre feuillets β et deux hélices α dans l'ordre suivant : $\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta$. Le motif PD-(D/E)XK constitue le site actif responsable pour le clivage des substrats. Par contre, la fonction d'endonucléase de UL24 n'a pas encore été démontrée.

Le gène *UL12* du VHS-1, une exonucléase alcaline, contient aussi un motif PD-(D/E)XK (31). *UL12* joue un rôle dans l'empaquetage et dans la maturation de l'ADN viral dans les virions infectieux (96, 173, 238). Elle possède une activité d'endonucléase processive pour l'ADNdb et une activité d'endonucléase pour l'ADNsb (110). L'activité endonucléase de *UL12* médie l'échange de brins d'ADN dans des événements de

recombinaison, et ces derniers jouent un rôle intrinsèque dans le cycle de vie des herpesvirus (297).

3.7 Impact de UL24 et ses homologues sur le cycle cellulaire

Il a été démontré que l'homologue de UL24 dans le gammaherpesvirus 68 murin (MHV68), ORF20, peut affecter le cycle cellulaire (201). Le MHV68 est un virus modèle pour les gammaherpesvirus, tel que le virus Epstein-Barr et le virus du sarcome de Kaposi, qui permet d'étudier l'infection et la pathogenèse dans des souches murines de laboratoire. Il a été démontré que l'expression de ORF20 induit un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M, suivi de l'induction de l'apoptose dans des cellules murines et humaines. ORF20 semble bloquer l'activation déphosphorylation-dépendante de Cdc2 menant à l'inactivation du complexe Cdc2-cyclinB. La même équipe a démontré que les homologues de UL24 du VHS-1, du HCMV et du KHSV induisent aussi un arrêt du cycle cellulaire (200). Ces virus sont des représentants des *Alpha*-, *Beta*- et *Gammapherpesvirinae* et le mécanisme par lequel ils affectent le cycle cellulaire semble être aussi par l'inactivation du complexe Cdc2-cyclinB.

4. Hypothèse et objectifs de travail

La protéine UL24 du VHS-1 est importante pour des hauts titres viraux, surtout dans les neurones, ainsi que pour la réactivation efficace de la latence dans un modèle murin d'infection. En culture cellulaire, l'infection par un virus déficient en UL24, UL24X, mène à la formation de plages syncytiales. UL24 est exprimée de façon tardive et est associée avec le noyau et le cytoplasme de cellules fractionnées.

Le phénotype du virus UL24-déficient suggère qu'il s'agit d'une protéine multifonctionnelle mais son rôle lors de l'infection n'est pas défini. Le but de ce travail était d'analyser la contribution de UL24 dans la relation entre le virus et la cellule hôte. Notre hypothèse de départ était que UL24 est une protéine multifonctionnelle dont la localisation varie afin d'effectuer ses différentes fonctions.

L'infection par le VHS-1 induit des changements morphologiques et fonctionnels au nucléole, mais peu est connu sur ce qui survient aux protéines de ce compartiment. Notre deuxième hypothèse était que le VHS-1 modifie le nucléole afin de favoriser sa réplication.

Les objectifs du projet de thèse étaient: (I) d'élucider la localisation de UL24 pendant l'infection, (II) de déterminer l'effet du VHS-1 sur les protéines du nucléole, (III) d'élucider le rôle de UL24 dans les modifications du nucléole et dans la réplication du VHS-1.

CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION

Involvement of *UL24* in Herpes-Simplex-Virus-1-Induced Dispersal of Nucleolin.
Maria H. Lymberopoulos and Angela Pearson. *Virology*. 2007. 363:397-409.

Résumé de la première publication

Titre : Implication de *UL24* dans la dispersion de la nucléoline induite par le virus herpès simplex 1.

Le gène *UL24* du virus herpès simplex 1 (VHS-1) est important pour la réplication du virus mais sa fonction n'est pas encore connue. Nous avons généré un virus recombinant, vHA-*UL24*, qui code pour *UL24* avec un épitope d'hémagglutinine à son extrémité N-terminale. Par des essais d'immunofluorescence indirecte, nous avons déterminé que la localisation de *UL24* change au cours de l'infection. À 9 hpi, nous avons détecté HA-*UL24* en foyer dans le noyau ainsi qu'en petits points dans le cytoplasme. Plus tard, vers 18 hpi, HA-*UL24* se retrouve plutôt en périphérie du noyau. En effectuant des co-marquages avec des protéines virales ou cellulaires, nous avons trouvé que le foyer de marquage de *UL24* dans le noyau à 9 hpi co-localise avec la nucléoline, une protéine majeure du nucléole. De plus, ce marquage se retrouvait juxtaposé à celui de la fibrillarine, qui est une autre protéine majeure du nucléole. L'analyse des modifications nucléolaires induites par le VHS-1 a révélé qu'à 18 hpi la nucléoline est dispersée à travers le noyau. En plus, la fibrillarine est redistribuée d'un amas de points dans le noyau à quelques points prominants. On a démontré que la dispersion de la nucléoline était dépendante de l'expression de *UL24*. Tandis que la redistribution de la fibrillarine ne l'était pas. Donc, nous avons identifié que la nucléoline est dispersée pendant l'infection par le VHS-1 et que cette modification est *UL24*-dépendante.

Contribution des auteurs

Maria H. Lymberopoulos : Expériences pour les figures 2A, 3, 4, 5, 6 et 7 et génération des figures. Contribution aux travaux pour la figure 2B. Rédaction de la section matériel et méthodes et des légendes du manuscrit ainsi que commentaires sur le manuscrit complet.

Angela Pearson : Génération du virus HA-UL24 (Figure 1) et des travaux pour la figure 2B, C et D. Rédaction du manuscrit.

Involvement of *UL24* in Herpes-Simplex-Virus-1- Induced Dispersal of Nucleolin

Running title: UL24 involvement in nucleolin distribution

Maria H. Lymberopoulos and Angela Pearson*

*INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec
531 boul. des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7
CANADA*

angela.pearson@iaf.inrs.ca

* Corresponding author
INRS-Institut Armand-Frappier
531 boul. des Prairies
Laval, Quebec H7V 1B7 CANADA
Phone: 1 (450) 687-5010
FAX: 1 (450) 686-5501
angela.pearson@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

UL24 of herpes simplex virus 1 is important for efficient viral replication, but its function is unknown. We generated a recombinant virus, vHA-*UL24*, encoding *UL24* with an N-terminal hemagglutinin tag. By indirect immunofluorescence at nine hours post-infection (hpi), we detected HA-*UL24* in nuclear foci and in cytoplasmic speckles. HA-*UL24* partially co-localized with nucleolin, but not with ICP8 or coilin, markers for nucleoli, viral replication compartments, and Cajal bodies respectively. HA-*UL24* staining was often juxtaposed to that of another nucleolar protein, fibrillarin. Analysis of HSV-1-induced nucleolar modifications revealed that by 18 hpi, nucleolin staining had dispersed, and fibrillarin staining went from clusters of small spots to a few separate but prominent spots. Fibrillarin redistribution appeared to be independent of *UL24*. In contrast, cells infected with a *UL24*-deficient virus retained foci of nucleolin staining. Our results demonstrate involvement of *UL24* in dispersal of nucleolin during infection.

Keywords: *UL24*, nucleolus, nucleolin, fibrillarin, herpes simplex virus 1

INTRODUCTION

UL24 is considered a core herpesvirus gene (Davison, 2002) and it has been found in all mammalian and avian herpesviruses sequenced to date. *UL24* is important for efficient viral replication, especially in neurons, and for efficient reactivation from latently infected trigeminal ganglia in a mouse model of herpes simplex virus 1 (HSV-1) eye infection (Jacobson et al., 1998). In cell culture, *UL24*-null strains exhibit a small plaque and a syncytial plaque phenotype (*syn*), the latter of which is especially prominent at elevated temperatures (Jacobson et al., 1989; Sanders et al., 1982; Tognon et al., 1991). The *UL24* and *tk* (*UL23*) genes of HSV-1 partially overlap at their 5'ends and are transcribed divergently (Fig. 1). *UL24* encodes a 29.5 kD protein expressed with leaky-late kinetics (Pearson and Coen, 2002). Recently, *UL24* was shown to contain a putative PD-(D-E)XK endonuclease motif that is present in certain restriction enzymes and recombinases (Knizewski et al., 2006). *UL24* is one of four HSV-1 genes that when mutated can confer a *syn* phenotype (reviewed in Spear, 1993). The others, *UL20*, *gK* and *gB* each encode membrane proteins. *gB* is required for virus entry (Cai et al., 1988) and is necessary for membrane fusion (Cai et al., 1988; Turner et al., 1998). Both *UL20* and *gK* encode proteins that exhibit perinuclear localization and function during viral egress at the stages of de-envelopment and secondary envelopment respectively (Avitabile et al., 1994; Foster and Kousoulas, 1999; Hutchinson and Johnson, 1995). The function of *UL24* is unknown.

The biology of HSV-1 is closely tied to the nucleus, as viral DNA replication, transcription, capsid assembly and DNA packaging all occur within this organelle (reviewed in Roizman and Knipe, 2001). The nucleus contains multiple sub-domains (reviewed in Lamond and Sleeman, 2003), the most well-characterized of these being nucleoli, which are the sites of rRNA synthesis and the initial assembly of ribonuclear particles (reviewed in Carmo-Fonseca et al., 2000). The nucleolus forms around the nucleolar organizer region, which consists of the sites on chromosomes that contain rDNA. Nucleoli are comprised of three functionally distinct sub-compartments, namely the fibrillar center (FC) containing the rDNA, which is in turn surrounded by the dense fibrillar component (DFC)—the site of rRNA transcription and initial stages of rRNA

processing, and the remaining space consists of the granular component (GC)—the site of initial ribosome assembly. Nucleoli are dynamic structures that change morphologically and biochemically during the cell cycle (reviewed in Carmo-Fonseca et al., 2000; Olson et al., 2000). Even though nucleoli and other nuclear sub-structures are not membrane-bound, several can be isolated biochemically and are amenable to proteomic analysis (Andersen et al., 2002; Lam et al., 2002). Such studies on nucleoli have revealed the presence of multiple proteins other than those involved in ribosome biogenesis. In accordance with these findings, new roles have recently been discovered for nucleoli. For example, they appear to be involved in the regulation of protein activity by acting as sites of sequestration (Kashuba et al., 2003 and reviewed in Carmo-Fonseca et al., 2000). Distinct from nucleoli are the electron dense Cajal bodies that are thought to play a role in pre-assembly of nuclear transcription complexes (reviewed in Gall, 2001; Matera, 2003), and PML bodies (also known as ND10 sites), which were originally identified because they are disrupted in acute Promyelocytic Leukemia. Although the exact function of PML bodies is unknown, it has been proposed that they associate with chromatin and thereby affect gene expression (Ching et al., 2005).

HSV infection results in a reconfiguration of the nuclear architecture. PML bodies are disrupted soon after HSV infection (Maul et al., 1993, Maul et al., 1996; Uprichard and Knipe, 1997). As infection proceeds, viral replication compartments coalesce (Taylor et al., 2003), chromatin is marginalized (Monier et al., 2000), the nuclear lamina are disrupted (Simpson-Holley et al., 2004, Scott and O'Hare, 2001) and viral replication compartments are positioned adjacent to the nuclear membrane (Simpson-Holley et al., 2004). Electron microscopy studies have shown that during HSV infection, nucleoli become enlarged and sometimes elongated with retention of rRNA in the GC (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996). The role of viral proteins in the modification of nucleoli during infection is largely unknown.

In previous fractionation experiments we found that UL24 of HSV-1 was between 50 and 70% nuclear-associated (Pearson and Coen, 2002), however the precise spatial and temporal distribution of UL24 during infection remains to be elucidated. We generated a virus that expresses the UL24 protein with a hemagglutinin (HA) affinity tag allowing for easy detection by indirect IF microscopy. With this virus we investigated

the subcellular localization of UL24 over time in cells infected in culture, and identified nucleoli as an organelle targeted by UL24. We also investigated the impact of HSV-1 infection on the sub-nuclear distribution of nucleolar proteins, and tested the impact of *UL24* on this phenomenon. Our results have uncovered a role for *UL24* in the redistribution of nucleolin during infection thus suggesting a novel function for *UL24* in the host cell.

RESULTS

Construction and characterization of vHA-UL24. In order to investigate the function of *UL24* we wished to determine with which subcellular compartment(s) UL24 associated during infection. Original attempts to use our UL24 anti-serum (Pearson and Coen, 2002) in indirect immunofluorescence (IF) experiments were unsuccessful due to insufficient sensitivity. Thus, we engineered a recombinant virus in the KOS background such that it encoded the UL24 protein as a C-terminal fusion to a nine amino acid HA tag (Fig. 1). Because the 5' ends of the *UL24* and *tk* open reading frames overlap, we designed the sequence of the tag such that none of the nine codons inserted within *tk* were stop codons. Infectious viral DNA from *tkLTRZ-1* was co-transfected with the BamHI fragment of pKOSHA-UL24 into Vero cells. Screening for recombinant viruses was based on the formation of white plaques, which differentiated them from the starting virus, *tkLTRZ-1*, that contains the *lacZ* gene inserted within *tk* and thus forms blue plaques upon X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) staining.

To test whether HA-UL24 was stably expressed, we infected Vero cells in culture with either vHA-UL24 or KOS, and harvested cell lysates 16 hpi. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, electro-transferred to PVDF membrane, and analyzed by Western blot with a monoclonal antibody directed against the HA affinity tag (Fig. 2A, top panel). A band corresponding to the expected molecular mass of HA-UL24 was detected in the lysates of cells infected with vHA-UL24 (lane 3) but not of cells infected with KOS (lane 2) or mock-infected cells (lane 1). The membrane was then stripped and incubated with antiserum raised against recombinant UL24 (Pearson and Coen, 2002) (Fig. 2A, middle panel). A protein of the same molecular mass as that detected by the HA antibody was present on the anti-UL24 blot (lane 3), furthermore, a protein of the expected molecular mass for untagged UL24 was observed in lysates from cells infected with KOS (lane 2), thus strongly suggesting that vHA-UL24 expressed the full-length tagged UL24. As a loading control, the membrane was stripped and incubated with an antibody against the viral protein gB (Fig. 2A, bottom panel). Expression levels of HA-UL24 and UL24 were similar despite the presence of a nucleotide substitution in the Kozak consensus sequence resulting from insertion of the HA tag sequence.

We characterized the replication of vHA-UL24 in cell culture. The viral yield of vHA-UL24 was compared to that of the wild type KOS virus and the *UL24*-null virus UL24XB (Jacobson et al., 1998) in a one-step growth curve. Vero cells were infected at an MOI of 5 and total virus (supernatant and cell-associated) was harvested and titrated. The viral yield obtained for vHA-UL24 was similar to that obtained for KOS (Fig 2B). In contrast, the viral yield of UL24XB was decreased between 5 and 10-fold as described previously (Jacobson et al., 1998).

We tested whether the nine amino acid insertion within TK, caused by the addition of the HA tag to UL24, resulted in the inactivation of the enzyme. Because TK is required to activate the drug acyclovir (ACV), viruses that do not express TK are not sensitive to the drug (Coen and Schaffer, 1980). To determine if vHA-UL24 expressed functional TK, sensitivity to ACV was tested in a plaque reduction assay comparing vHA-UL24 to KOS, using *tkLTRZ1* as a negative control. We found that vHA-UL24 exhibited sensitivity to ACV similar to that of KOS, while *tkLTRZ1* was resistant (Fig. 2C). Thus, we concluded that vHA-UL24 retained TK activity.

Viruses deficient in *UL24* form small plaques at 37°C, and syncytial plaques especially at 39°C, while at 34°C the plaques are non-syncytial (Jacobson et al., 1989). We compared the plaque phenotype of vHA-UL24 to that of KOS and UL24XB at 34, 37, and 39°C. At 34°C no syncytial plaques were observed with any of the viruses tested (Fig. 2D, top panels). At 37°C the plaques formed by vHA-UL24 and by KOS were similar and were clearly larger than those formed by UL24X (Fig. 2D, middle panels). At 39°C (Fig. 2D, bottom panels) the *UL24* deficient phenotype is fully penetrant and accordingly, we observed that all plaques formed by UL24XB at this elevated temperature were syncytial. In contrast, even at 39°C the plaques formed by vHA-UL24, while appearing slightly smaller than those formed by KOS, were non-syncytial, suggesting that the HA tag did not impair whatever UL24 activity is responsible for inhibiting the formation of syncytial plaques. We concluded from our characterization of vHA-UL24 that HA-tagged UL24 expressed upon infection was at least partially functional and appeared to retain all activities of wild-type UL24 at 37°C in cell culture, the temperature at which all of our subsequent experiments were conducted.

Time course of HA-UL24 expression. We investigated the kinetics of HA-UL24 expression and localization. Vero cells grown on coverslips were infected in parallel with either vHA-UL24 (Fig. 3, A panels) or, as a negative control, KOS (Fig. 3, B panels), at an MOI of 10. At 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, and 24 hpi cells were fixed and stored at 4°C until the end of the time course. A negative control was included for each time point because we expected non-specific staining, much of which was likely due to the expression of Fc receptors encoded by the late genes *gI* and *gE* (Johnson et al., 1988), would vary with time. Once all cells were fixed, the coverslips were processed in parallel to minimize variability in staining. Cells were visualized by confocal microscopy with the same laser intensity and other parameters used for each time point. At 3 hpi we did not observe any difference in staining between cells infected with KOS and vHA-UL24 (data not shown). At 6 hpi we observed slightly stronger staining in vHA-UL24-infected than in KOS-infected cells. At 9 hpi there was some cytoplasmic speckled staining. There was also diffuse nuclear staining, and foci of nuclear staining. This represented the major staining pattern observed. By 12 hpi the foci of nuclear staining was not as evident but the diffuse nuclear staining and the speckled cytoplasmic staining appeared to increase. We did not observe a large difference between 12 and 15 hpi, however, by 18 hpi the diffuse nuclear staining had cleared from many of the cells and a more prominent perinuclear staining was observed. This staining pattern intensified at 21 hpi. By 24 hpi this pattern was lost and there was intense staining throughout the cells (data not shown). The significance of the staining pattern at this late time in infection when the cells are dying is unclear. Regardless, the foci of nuclear staining we observed at 9 hpi appeared to be transient in nature.

Sub-nuclear localization of HA-UL24. The foci of nuclear staining at 9 hpi was striking in that none of the other three proteins encoded by genes associated with the *syn* phenotype exhibit this localization, and thus we examined it further. Through a series of co-staining confocal microscopy experiments we tested whether the staining we observed corresponded to a known nuclear sub-structure, which might provide clues as to the function of UL24. The nucleus comprises multiple sub-domains that are structurally and functionally distinct. Viral replication compartments are one of the major nuclear sub-

structures in HSV-1-infected cells. We tested whether nuclear HA-UL24 localized to replication compartments by co-staining for HA and the viral single-stranded binding protein ICP8 at 9 hpi (Fig. 4A panels 1-3). At this time in infection the replication compartments occupied most, but not all, of the nucleus. Despite this distribution, we noted that the foci of HA-staining in nuclei did not co-localize with ICP8, implying that UL24 does not localize to viral replication compartments. We next co-stained infected cells for HA and nucleolin, a marker for nucleoli (Fig. 4B panels 4-6). We found that the foci of HA staining did co-localize with nucleolin suggesting that HA-UL24 was present in nucleoli. To confirm the nucleolar localization of HA-UL24, we co-stained infected cells for HA and fibrillarin, a marker for the DFCs of nucleoli (Fig. 4C, panels 7-9). We found that foci of HA nuclear staining were generally located in the same regions that were stained for fibrillarin. However, upon closer examination it became evident that this was not strict co-localization, but that the staining for HA and fibrillarin were closely juxtaposed. This result was consistent with nucleolar localization of HA-UL24, but implied that HA-UL24 did not specifically localize to DFCs. At this time post-infection, both chromatin and nucleoli are marginalized to the edges of nuclei due to the growing replication compartments. To verify that the foci of nuclear staining we observed for HA-UL24 did not simply correspond to the sub-nuclear space left unoccupied by viral replication compartments, we tested whether HA-UL24 co-localized with another nuclear sub-structure by co-staining for HA and coilin, a marker for Cajal bodies. We did not observe co-localization using these two antibodies (Fig. 4D, panels 9-12). We also co-stained for HA and histone H1, which is present diffusely throughout the nucleoplasm. Such as has been seen previously (Simpson-Holley et al., 2004), we observed similar intensity staining for histone H1 both along the inner periphery of nuclei and extending to protrusions within nuclei (Fig. 4E panel 14). As expected, we observed some co-staining between HA and histone H1 due to the diffuse nature of histone H1 localization, and the partial diffuse nuclear distribution of HA-UL24. However, the pattern of histone H1 staining differed from the general pattern observed for HA-UL24 in that for the latter, little peripheral nuclear staining was observed, and the foci of staining were typically the most intense staining seen within nuclei (panels 13-15). This result shows that the pattern of nuclear staining for HA-UL24 did not simply represent all space left unoccupied by

viral replication compartments, and is consistent with our conclusion that the foci of nuclear staining for HA-UL24 we observed corresponds to a distinct sub-nuclear compartment—the nucleolus.

The role of *UL24* in virus-induced nucleolar modifications. It has been observed that nucleoli are altered during the course of HSV-1 infection (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996) but little is known about the details of this alteration. In our staining for nucleolar markers, we found that at 9 hpi, the staining for nucleolin was more diffuse than expected. We therefore went on to test the effect of HSV-1 infection on the staining patterns of nucleolin and also of fibrillarin later in infection (Figs. 5 and 6). Mock-infected cells, or cells infected at an MOI of 10 with KOS, were fixed and stained at 9 and 18 hpi. Inocula were back-titrated to confirm the MOI used in the experiments. As expected, in mock-infected cells, nucleolin staining was present in one or two relatively large, prominent spots within each nucleus. Very little staining in the nucleoplasm was visible (Fig. 5, panels 1 and 2). As we had seen before, at 9 hpi with KOS the foci of staining was still often visible though less prominent, and the diffuse nuclear staining seemed to increase somewhat (Fig. 5, panels 3 and 4). Strikingly, in KOS-infected cells at 18 hpi, foci of nucleolin staining were rarely visible and only some diffuse staining remained (Fig. 5, panels 5 and 6). We also looked at the effect of HSV-1 infection on the staining pattern of fibrillarin. In a previous report, fibrillarin staining was found to increase in intensity over the course of HSV-1 infection of rabbit fibroblasts (Lopez-Iglesias et al., 1988). Interestingly, in our experiments we did not observe an increase in fibrillarin staining in infected cells. In mock-infected Vero cells, fibrillarin was present in a characteristic collection of small spots clustered together at one or two sites within the nucleus (Fig. 6, panels 1 and 2). At 9 hpi with KOS, the clusters of spots appeared to disperse (Fig. 6, panels 3 and 4), and by 18 hpi, instead of clusters of smaller spots, only a few distinct, sometimes slightly larger spots were detected within nuclei (Fig. 6, panel 5 and 6).

Because of the co-staining between HA-UL24 and nucleolar markers at 9hpi, when we began to observe more diffuse staining for nucleolin, we hypothesized that UL24 had a role in virus-induced nucleolar modifications. To test this hypothesis, we

compared the staining patterns for nucleolin and fibrillarin of cells infected with two independent isolates of a *UL24*-deficient virus, UL24XB and UL24XG (Jacobson et al., 1998), to that which we saw with KOS-infected cells. In cells infected with either UL24XB or UL24XG, changes in the pattern of fibrillarin staining were similar to that which we observed in wild-type-infected cells, both at 9 and 18 hpi (Fig. 6, panels 7-14). However, we obtained a different result for nucleolin. In the absence of a functional *UL24* gene, we found that prominent foci of nucleolin staining persisted, even at 18 hpi (Fig. 5, panels 7-14). On average, at 18 hpi, 83% of cells infected with a *UL24*-deficient virus (113 out of 139 cells total for UL24XB, and 119 out of 142 cells total for UL24XG) retained foci of nucleolin staining, as compared to 2% of KOS-infected cells (3 out of 165 cells total). The staining pattern was not perfectly identical to that of uninfected cells, which would be expected due to the marginalization of chromatin and nucleoli during infection.

We wanted to determine if the pattern of nucleolin staining that we observed in wild-type infected cells late in infection was indeed due to the physical dispersal of the protein from the original nucleolar foci as opposed to a decrease in steady-state levels of the protein. To test this latter possibility, mock-infected Vero cells, or cells infected at an MOI of 10 with either KOS or UL24XB, were harvested at 18 hpi. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and nucleolin protein detected by Western blot (Fig. 7). The intensity of the signal for nucleolin in the three lysates was similar, indicating that there was no major difference in the steady-state levels of nucleolin. These results led us to conclude that *UL24* is involved in HSV-1-induced nucleolar modifications at the level of nucleolin spatial distribution.

DISCUSSION

We have taken a cell biological approach to investigate the role of UL24 in the infected cell. We generated a recombinant virus that expresses UL24 as a fusion protein with an HA tag, and determined the localization of this protein in cells infected in culture through indirect IF. We observed staining for HA-UL24 in both the cytoplasm and the nucleus, and identified the nucleolus as a nuclear sub-compartment targeted by UL24. We investigated virus-induced nucleolar modifications and found that, in addition to fibrillarin, the distribution of nucleolin was markedly altered in HSV-1-infected cells. Interestingly, this alteration of the host-cell architecture was partially dependent on *UL24*, identifying a novel function for this widely conserved, but poorly understood gene.

Kinetics of UL24 localization. We did not detect any specific staining for HA-UL24 until 6 hpi. This is earlier than we had detected previously by Western blotting with UL24 antiserum (Pearson and Coen, 2002) and likely reflects increased sensitivity of the assay used here. The staining at this early time was very weak. At 9 hpi we observed accumulation of HA-UL24 in nucleolar structures as well as diffuse nuclear staining, and speckled staining in the cytoplasm. From 9 to 15 hpi, the overall intensity of staining increased and we saw staining for HA-UL24 distributed between the cytoplasmic and nuclear compartments, which is similar to our previous fractionation results, where over the time period of 9 to 15 hpi, 50-70% of UL24 was nuclear-associated (Pearson and Coen, 2002). In fractionation experiments, HA-UL24 was also detected in both the nuclear-associated and cytoplasmic fractions (data not shown). The nucleolar localization of HA-UL24 was transient and by 12 hpi few foci of nuclear staining remained. This result may suggest that the function of nucleolar-localized UL24 is important prior to the very late stages of the HSV-1 life cycle. An association between both UL24 of HSV-2 (Hong-Yan et al., 2001) and the HCMV homolog UL76 (Wang et al., 2000) with nucleoli in the context of transient transfections has also been seen. This similarity suggests a conserved function for this pool of UL24. However, it is worth noting that in HCMV-infected cell lysates, UL76 was detected as early as 1 hpi, even in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide. It is possible that

differences in detection sensitivities are responsible for the discrepancy between the kinetics of appearance of UL76 and the UL24 proteins of HSV-1 and HSV-2 in infected cells, however it may also represent a fundamental difference in the role of UL24 between alpha and beta herpesviruses. At 18 and 21 hpi, we observed what appeared to be clearing of the diffuse nuclear staining concomitant with prominent perinuclear staining. The perinuclear staining pattern was similar to what is observed for other viral proteins encoded by genes that when deleted lead to a syncytial plaque phenotype, namely *UL20* (Ward et al., 1994) and *gK* (Hutchinson and Johnson, 1995). This result could indicate that like UL20 and gK, UL24 functions during viral egress, as proposed previously (Pearson and Coen, 2002). UL24 of HSV-2 and UL76 of HCMV have been detected in gradient purified virions (Hong-Yan et al., 2001; Wang et al., 2004), thus the cytoplasmic staining that we have observed could also represent staining of virions. The exact nature of the perinuclear localization at late times, and whether loss of UL24 activity affects assembly and egress of newly synthesized viral particles, remains to be established.

Nucleolar localization of UL24. We found that UL24 localized to nucleoli during infection, although a virally modified form of nucleoli. Nucleoli form around rDNA. Although we have no direct evidence that UL24 interacts with RNA or DNA, it is a highly basic protein with a predicted pI of 10.87, which would be consistent with nucleic acid binding activity. Furthermore, the putative endonuclease motif recently identified in UL24, if functional, would also suggest nucleic acid binding activity. It is known that during the course of HSV infection rRNA is retained in nucleoli (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996), and thus UL24 might somehow contribute to this retention. Interestingly, UL24 appeared to be excluded from viral replication compartments, which are involved in viral DNA replication (de Bruyn Kops and Knipe, 1988), viral gene expression (Leopardi et al., 1997; Phelan et al., 1997; Rice et al., 1994), and encapsidation of viral DNA (de Bruyn Kops et al., 1998; Lamberti and Weller, 1998; Taus et al., 1998); however, we do not believe that its absence necessarily precludes a role for UL24 in these processes. In addition to UL24, only a limited number of HSV-1-encoded proteins have been detected in nucleoli during the course of infection, namely

US11 (MacLean et al., 1987, Puvion-Dutilleul, 1987), ICP27 (Rice and Knipe, 1990), and ICP0 (Morency et al., 2005). The relationship, if any, between UL24 and these other nucleolar-associated viral proteins remains to be determined. All of these proteins are known to play a role in the regulation of gene expression, which by association suggests that the nucleolar pool of UL24 may also have a regulatory function. Consistent with this hypothesis is the observation that in transient transfection assays HCMV UL76 modulates expression of certain reporter constructs (Wang et al., 2000).

A role for *UL24* in HSV-1-induced nucleolar modification. Although it has been well established that HSV-1 infection results in dramatic changes to nuclear architecture, knowledge regarding the impact on nucleoli is limited. Electron microscopic analyses have shown that nucleoli become elongated and are marginalized to the inner edges of the nucleus, and rRNA is retained within nucleoli (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996). By immunogold staining of infected rabbit fibroblasts, fibrillarin was found to increase in intensity and was localized not only to nucleoli, but also to viral dense bodies (Lopez-Iglesias et al., 1988). Fibrillarin is involved in multiple aspects of ribosome biogenesis. Temperature sensitive mutations in yeast fibrillarin have revealed roles in rRNA processing, rRNA methylation and assembly of ribosomes (Tollervey et al., 1993). Interestingly, in KOS-infected Vero cells, although we did observe a disaggregation of fibrillarin spots, we did not detect an overall increase in staining for this marker as was seen in the previous report (Lopez-Iglesias et al., 1988). This difference cannot be attributed to strain variation because KOS was used in both studies, and thus perhaps reflects differences due to cell type.

During the course of infection, we found that staining for nucleolin dispersed becoming diffuse throughout the nucleus, despite there being little, if any change in steady-state levels of nucleolin in mock, KOS-, or UL24X-infected cells. Nucleolin is a multifunctional nuclear phosphoprotein involved in rDNA transcription, rRNA processing and ribosome assembly, and it has been attributed with both positive and negative regulatory functions (reviewed in Srivastava and Pollard, 1999; Tuteja and Tuteja, 1998). Because the formation of nucleoli depends on active rDNA transcription, the dispersal of nucleolin and fibrillarin may be related to the approximate 85% decrease

in rRNA synthesis that is associated with HSV-1 infection (Stenberg and Pizer, 1982; Wagner and Roizman, 1969). In addition, because the phosphorylation state of nucleolin regulates its function, it is possible that the major change in its subnuclear localization is mediated by post-translational modification. However, further experimentation will be required to test this hypothesis.

We discovered a role for *UL24* in HSV-1-induced nucleolar modification. We made the intriguing observation that the disappearance of foci of nucleolin staining in KOS-infected cells was not evident in cells infected with either of two independent isolates tested of a *UL24*-deficient virus. The UL24XB and UL24XG strains were generated by insertion of stop codons in all three reading frames within sequence between the first and second *UL24* homology domain (Jacobson et al., 1998). These viruses were shown to retain TK activity, thus the observed effect on nucleolin distribution we have seen with UL24XB and UL24XG can be attributed to the mutation in *UL24*. It remains to be determined whether the dispersal of nucleolin is a secondary consequence due to an effect of *UL24* on rDNA transcription, or alternatively, via a direct or indirect effect of *UL24* on nucleolin. Finally, we did not observe a dramatic effect of *UL24* on fibrillarin redistribution, implying a dissociation between the spatial regulation of fibrillarin and nucleolin during infection.

It is not evident how nucleolar localized *UL24* would have an impact on fusion at the plasma membrane. One possible explanation is that different sub-cellular pools of *UL24* may have different functions, and that only the cytoplasmic pool of *UL24* is involved in membrane fusion events, while nucleolar *UL24* would affect ribosome biogenesis for example. Consistent with this hypothesis would be that these multiple functions segregate with different domains of the protein. A detailed structure-function analysis of *UL24* will be required to elucidate how this apparently multi-functional protein affects both sub-nucleolar and plasma membrane events. Further questions to be addressed concern the molecular mechanisms underlying the role of *UL24* in nucleolar modifications during infection, in addition to the functional consequences of these viral induced changes.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cells. The HSV-1 strains KOS, *tk*LTRZ-1 (Davar et al., 1994), UL24XB, and UL24XG (Jacobson et al., 1998) were obtained from Donald M. Coen (Harvard Medical School). All viruses were propagated on Vero cells (African green monkey kidney cells) grown in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) containing 4500 mg/L of glucose and supplemented with 5% newborn calf serum and the antibiotics penicillin and streptomycin. Cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C unless indicated otherwise.

Recombinant virus construction. To construct the transfer vector pKOSHA-UL24 two PCR products were generated such that their ligation resulted in an in-frame insertion of sequence encoding an HA tag at the 5' end of UL24. The 5' HA-UL24 fragment was generated using the primers 5' phos-gtt cca gat tac gct gcc gcg aga acg cgc a and 5' tgc tgg cgg tgt ccc cg (Integrated DNA Technologies), and was then digested with *Sac*I. The 3' HA-UL24 fragment was generated using the primers 5' phos-atc gta tgg gta cat agc aac cga cgt acg g and 5' gag ggc ggc gat ggg atg gc, and was then digested with *Bgl*II. In each case the template used was pKOS17B2, which consists of the KOS *Bam*HI "P" fragment subcloned into pBR325 (Weller et al., 1983), and the thermophilic polymerase used was Pfu turbo (Stratagene). To construct pKOSHA-UL24, a triple ligation was carried out between 1) pKOS17B2 digested with *Sac*I and *Bgl*II; 2) the *Sac*I-digested 5'HA-UL24 fragment; and 3) the *Bgl*II-digested 3'HA-UL24 fragment. After sequencing confirmed the correct product, the transfer vector was co-transfected with infectious *tk*LTRZ-1 DNA (Coen et al., 1989; Leib et al., 1989) into Vero cells using Effectene (Qiagen) transfection reagent following the manufacturer's instructions. Screening for recombinant virus was done based on the formation of white plaques and confirmed by sequencing. Recombinant virus was purified by limiting dilution three times as described previously (Griffiths and Coen, 2003).

Acyclovir sensitivity assays. Sensitivity of viruses to acyclovir was assessed by plaque reduction assay, essentially as described previously (Coen et al., 1985).

Antibodies. The rat antiserum raised against UL24 has been described previously (Pearson and Coen, 2002). For Western blotting of HA-tagged protein, anti-HA monoclonal antibodies from Covance were used. The remaining primary antibodies were as follows: rat monoclonal anti-HA high specificity (Roche), mouse monoclonal anti-gB (Fitzgerald Intl.), mouse monoclonal anti-ICP8 (Chemicon), rabbit monoclonal anti-coilin (Sigma), mouse monoclonal anti-C23 (nucleolin) (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-fibrillarin (Covance), mouse monoclonal anti-histone H1 (Upstate), rabbit polyclonal anti- β actin (Biolegend). Secondary antibodies used were as follows: ECL anti-rat IgG horseradish peroxidase conjugate (HRP) (GE), anti-mouse IgG HRP (Calbiochem), anti-rabbit IgG HRP (Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Rat IgG, Alexa Fluor[®] 568 Goat Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor[®] 568 Goat Anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-mouse IgG (Invitrogen).

Immunostaining and fluorescence microscopy. Vero cells were grown on coverslips and infected at an MOI of 10 with KOS, vHA-UL24, UL24XB or UL24XG. At the indicated hpi, cells were fixed and stained essentially as described previously (Chi and Wilson, 2000). Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 2% paraformaldehyde for 10 minutes (min). Fixed cells were stored at 4°C overnight in PBS. Cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 diluted in PBS for 10 min, washed twice with PBS, and then blocked with NATS (20% NCS and 0.5% Tween 20 in PBS) for 30 min. Incubation with the appropriate primary antibody was carried out in a humidified chamber at 37°C for 1 hour. Cells were washed 4 x 5 min in PBS, and incubated with the secondary antibody for 1 hour. Coverslips were washed as described above, and, where indicated, nuclei were then stained with 2 μ M Draq5 (Biostatus limited) for 3 min at 37°C. After rinsing 1 x in PBS, coverslips were mounted on microscope slides using Prolong[®] or ProlongGold[®] antifade reagent (Invitrogen). For the confocal images, cells were visualized using the BioRad Radiance 2000 confocal with an Argon-Krypton laser at 488 and 568 nm (diode 638) mounted onto the Nikon E800

microscope (100× objective, N.A. 1.4). Figures based on the TIF files of images were assembled using Adobe Photoshop.

Western blotting. Western blot analyses were carried out essentially as described previously (Pearson and Coen, 2002). Proteins were transferred to PVDF membrane. Detection was by Enhanced chemiluminescence plus (GE) according to the manufacturer's instructions.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Marcel Desrosiers of the INRS-Institut Armand-Frappier Cytometry and Fluorescence Microscopy facility for technical assistance with the confocal microscopy experiments. We would also like to thank Donald M. Coen (Harvard Medical School) for providing the HSV-1 strains, KOS, *tk*LTRZ-1, UL24XB, and UL24XG. We acknowledge financial support for the initial stages of this work from grant R01 AI26126 of the National Institutes of Health to Donald M. Coen, M.H.L. was awarded a scholarship from the Armand-Frappier Foundation. This work was supported by grants from the Fondation de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), the Canadian Foundation for Innovation, and the National Science and Engineering Research Council of Canada to A.P. A.P. was the recipient of an FRSQ Research Scholar award.

References

- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**(1), 1-11.
- Avitabile, E., Ward, P. L., Di Lazzaro, C., Torrissi, M. R., Roizman, B., and Campadelli-Fiume, G. (1994). The herpes simplex virus UL20 protein compensates for the differential disruption of exocytosis of virions and viral membrane glycoproteins associated with fragmentation of the Golgi apparatus. *J. Virol.* **68**(11), 7397-7405.
- Besse, S., and Puvion-Dutilleul, F. (1996). Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1), 119-29.
- Cai, W. H., Gu, B., and Person, S. (1988). Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol* **62**(8), 2596-604.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**(6), E107-12.
- Chi, J. H., and Wilson, D. W. (2000). ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J Virol* **74**(3), 1468-76.
- Ching, R. W., Dellaire, G., Eskiw, C. H., and Bazett-Jones, D. P. (2005). PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* **118**(Pt 5), 847-54.
- Coen, D. M., Fleming, H. E., Jr., Leslie, L. K., and Retondo, M. J. (1985). Sensitivity of arabinosyladenine-resistant mutants of herpes simplex virus to other antiviral drugs and mapping of drug hypersensitivity mutations to the DNA polymerase locus. *J. Virol.* **53**(2), 477-488.
- Coen, D. M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L., and Knipe, D. M. (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., and Schaffer, P. A. (1980). Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4), 2265-9.
- Davar, G., Kramer, M. F., Garber, D., Roca, A. L., Andersen, J. K., Bebrin, W., Coen, D. M., Kosz-Vnenchak, M., Knipe, D. M., Breakefield, X. O., and 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.
- de Bruyn Kops, A., and Knipe, D. M. (1988). Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein. *Cell* **55**(5), 857-68.
- de Bruyn Kops, A., Uprichard, S. L., Chen, M., and Knipe, D. M. (1998). Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology* **252**(1), 162-78.
- Foster, T. P., and Kousoulas, K. G. (1999). Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J. Virol.* **73**(10), 8457-8468.
- Gall, J. G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett* **498**(2-3), 164-7.

- Griffiths, A., and Coen, D. M. (2003). High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J Virol* **77**(3), 2282-6.
- Hong-Yan, Z., Murata, T., Goshima, F., Takakuwa, H., Koshizuka, T., Yamauchi, Y., and Nishiyama, Y. (2001). Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **22**(3), 321-327.
- Hutchinson, L., and Johnson, D. C. (1995). Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J. Virol.* **69**(9), 5401-5413.
- Jacobson, J. G., Chen, S. H., Cook, W. J., Kramer, M. F., and Coen, D. M. (1998). Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**(1), 161-9.
- Jacobson, J. G., Martin, S. L., and Coen, D. M. (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.
- Johnson, D. C., Frame, M. C., Ligas, M. W., Cross, A. M., and Stow, N. D. (1988). Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* **62**(4), 1347-54.
- Kashuba, E., Mattsson, K., Klein, G., and Szekely, L. (2003). p14ARF induces the relocation of HDM2 and p53 to extranucleolar sites that are targeted by PML bodies and proteasomes. *Mol Cancer* **2**, 18.
- Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N. V., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2006). Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**(5), 2575-7.
- Lam, Y. W., Lyon, C. E., and Lamond, A. I. (2002). Large-scale isolation of Cajal bodies from HeLa cells. *Mol Biol Cell* **13**(7), 2461-73.
- Lamberti, C., and Weller, S. K. (1998). The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol* **72**(3), 2463-73.
- Lamond, A. I., and Sleeman, J. E. (2003). Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol* **13**(21), R825-8.
- Leib, D. A., Bogard, C. L., Kosz-Vnenchak, M., Hicks, K. A., Coen, D. M., Knipe, D. M., and Schaffer, P. A. (1989). A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. *J Virol* **63**(7), 2893-900.
- Leopardi, R., Ward, P. L., Ogle, W. O., and Roizman, B. (1997). Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *J Virol* **71**(2), 1133-9.
- Lopez-Iglesias, C., Puvion-Dutilleul, F., Cebrian, J., and Christensen, M. E. (1988). Herpes simplex virus type 1-induced modifications in the distribution of nucleolar B-36 protein. *Eur J Cell Biol* **46**(2), 259-69.
- MacLean, C. A., Rixon, F. J., and Marsden, H. S. (1987). The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells. *J Gen Virol* **68** (Pt 7), 1921-37.
- Matera, A. G. (2003). Cajal bodies. *Curr Biol* **13**(13), R503.

- Maul, G. G., Guldner, H. H., and Spivack, J. G. (1993). Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2679-90.
- Maul, G. G., Ishov, A. M., and Everett, R. D. (1996). Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**(1), 67-75.
- Monier, K., Armas, J. C., Etteldorf, S., Ghazal, P., and Sullivan, K. F. (2000). Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**(9), 661-5.
- Morency, E., Coute, Y., Thomas, J., Texier, P., and Lomonte, P. (2005). The protein ICP0 of herpes simplex virus type 1 is targeted to nucleoli of infected cells. *Arch Virol* **150**(11), 2387-95.
- Olson, M. O., Dundr, M., and Szebeni, A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* **10**(5), 189-96.
- Pearson, A., and Coen, D. M. (2002). Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **76**(21), 10821-10828.
- Phelan, A., Dunlop, J., Patel, A. H., Stow, N. D., and Clements, J. B. (1997). Nuclear sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication and transcription colocalize at early times postinfection and are largely distinct from RNA processing factors. *J Virol* **71**(2), 1124-32.
- Puvion-Dutilleul, F. (1987). Localization of viral-specific 21 kDa protein in nucleoli of herpes simplex infected cells. *Eur J Cell Biol* **43**(3), 487-98.
- Rice, S. A., and Knipe, D. M. (1990). Genetic evidence for two distinct transactivation functions of the herpes simplex virus alpha protein ICP27. *J. Virol.* **64**(4), 1704-1715.
- Rice, S. A., Long, M. C., Lam, V., and Spencer, C. A. (1994). RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following herpes simplex virus infection. *J Virol* **68**(2), 988-1001.
- Roizman, B., and Knipe, D. M. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. 4th ed. In "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2399-2459. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Sanders, P. G., Wilkie, N. M., and Davison, A. J. (1982). Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **63**(2), 277-295.
- Scott, E. S., and O'Hare, P. (2001). Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**(18), 8818-30.
- Simpson-Holley, M., Baines, J., Roller, R., and Knipe, D. M. (2004). Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol* **78**(11), 5591-600.
- Spear, P. G. (1993). Membrane fusion induced by herpes simplex virus. In "Viral fusion mechanisms" (J. Bentz, Ed.), pp. 201-232. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Srivastava, M., and Pollard, H. B. (1999). Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J* **13**(14), 1911-22.
- Stenberg, R. M., and Pizer, L. I. (1982). Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**(2), 474-87.

- Taus, N. S., Salmon, B., and Baines, J. D. (1998). The herpes simplex virus 1 UL 17 gene is required for localization of capsids and major and minor capsid proteins to intranuclear sites where viral DNA is cleaved and packaged. *Virology* **252**(1), 115-25.
- Taylor, T. J., McNamee, E. E., Day, C., and Knipe, D. M. (2003). Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments. *Virology* **309**(2), 232-47.
- Tognon, M., Guandalini, R., Romanelli, M. G., Manservigi, R., and Trevisani, B. (1991). Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res.* **18**(2-3), 135-150.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72**(3), 443-57.
- Turner, A., Bruun, B., Minson, T., and Browne, H. (1998). Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* **72**(1), 873-5.
- Tuteja, R., and Tuteja, N. (1998). Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**(6), 407-36.
- Uprichard, S. L., and Knipe, D. M. (1997). Assembly of herpes simplex virus replication proteins at two distinct intranuclear sites. *Virology* **229**(1), 113-25.
- Wagner, E. K., and Roizman, B. (1969). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**(1), 36-46.
- Wang, S. K., Duh, C. Y., and Chang, T. T. (2000). Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**(Pt 10), 2407-16.
- Wang, S. K., Duh, C. Y., and Wu, C. W. (2004). Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J Virol* **78**(18), 9750-62.
- Ward, P. L., Campadelli-Fiume, G., Avitabile, E., and Roizman, B. (1994). Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **68**(11), 7406-7417.
- Weller, S. K., Aschman, D. P., Sacks, W. R., Coen, D. M., and Schaffer, P. A. (1983). Genetic analysis of temperature-sensitive mutants of HSV-1: the combined use of complementation and physical mapping for cistron assignment. *Virology* **130**(2), 290-305.

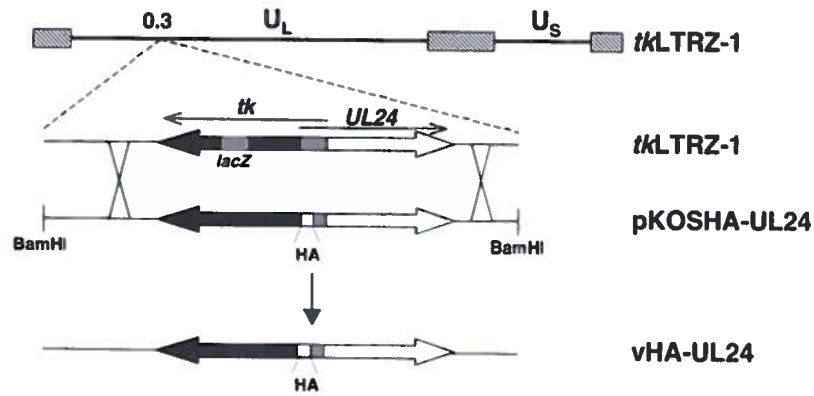


Fig. 1 Construction of vHA-UL24. Diagram representing the construction of vHA-UL24. The top line corresponds to the HSV-1 genome with the unique long (U_L) and short (U_S) regions defined, and the repeated regions denoted by hatched boxes. Below, is the UL24 locus of the starting virus *tkLTRZ-1*, where the thick arrows represent the *tk* (*UL23*) and *UL24* genes with the region of overlap between them indicated by a checkered box. The thin arrows immediately above denote the *tk* and *UL24* open reading frames. The *lacZ* gene insertion in *tk* of *tkLTRZ-1* is indicated by vertical lines. Recombination between *tkLTRZ-1* and the transfer plasmid pKOSHA-UL24 which contains an HA insertion (open box), results in the recombinant virus vHA-UL24. Figure is not to scale.

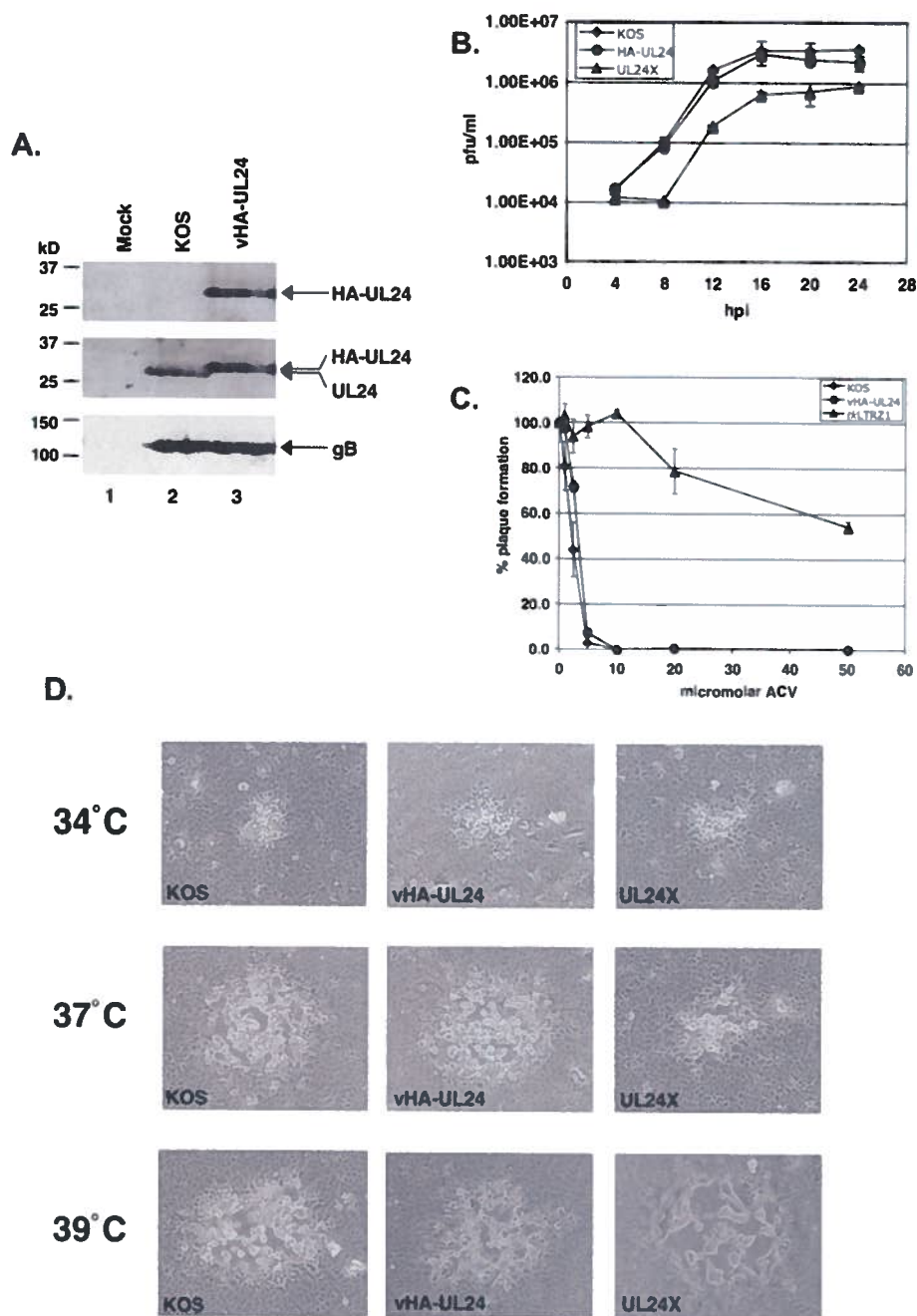


Fig. 2 Characterization of vHA-UL24. (A) Western blot analysis of vHA-UL24-infected cells. Lysates from mock-infected cells or cells infected with either KOS or vHA-UL24 were subjected to Western blotting with an antibody directed against the HA epitope (top panel). The blot was subsequently stripped and incubated with antiserum raised against recombinant UL24 (middle panel). As a loading control, the blot was stripped and incubated with an antibody against gB (bottom panel). The positions of molecular mass makers are indicated to the left of the panels. Arrows indicate the positions of HA-UL24, UL24, or gB. (B) Viral yield assay. Vero cells were infected in

duplicate with either KOS, vHA-UL24 or UL24XB at an MOI of 5. At the indicated hpi, total virus (supernatant and cell-associated) was harvested. Titers of harvested virus are presented in pfu per ml. Error bars represent standard error of the means. (C) ACV sensitivity plaque reduction assay. Monolayers of Vero cells were infected in triplicate with either KOS, vHA-UL24, or *tk*LTRZ1, and overlayed with DMEM containing methylcellulose and varying concentrations of ACV. Percent of plaques formed as compared to the number of plaques obtained in the no drug control wells are indicated. Error bars represent standard deviations. (D) Plaque morphology of vHA-UL24. Shown are photographs of Vero cells infected with KOS, vHA-UL24, or UL24XB, grown at 34°C (top panels), 37°C (middle panels) or 39°C (bottom panels).

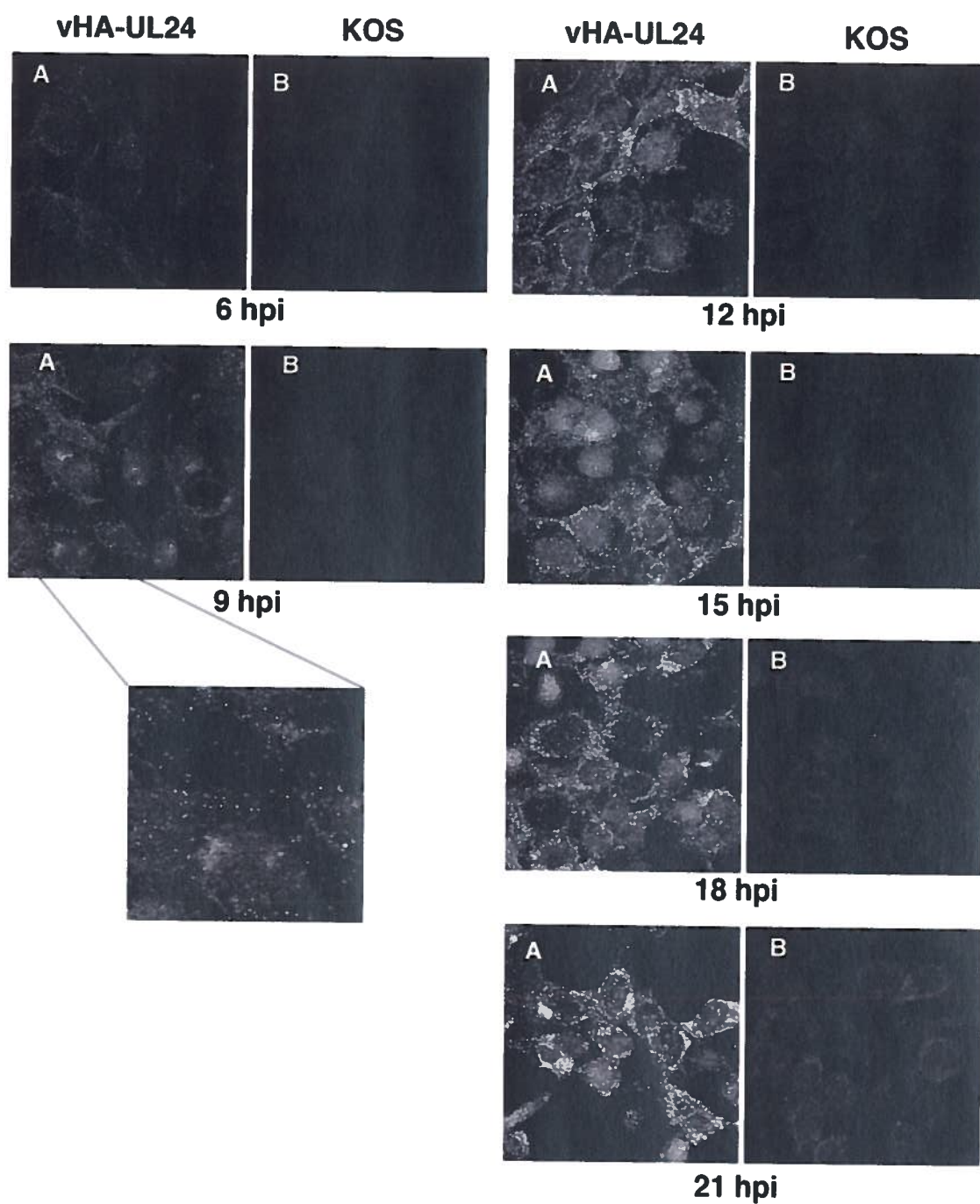


Fig. 3 Time course of HA-UL24 localization in infected cells. Vero cells were infected with either vHA-UL24 (A panels) or KOS (B panels) at an MOI of 10. Cells were fixed at the indicated times post-infection, and processed for IF using a monoclonal antibody directed against HA and a secondary antibody conjugated to Alexa 488. A close up of the staining at 9 hpi is included below the corresponding panel.

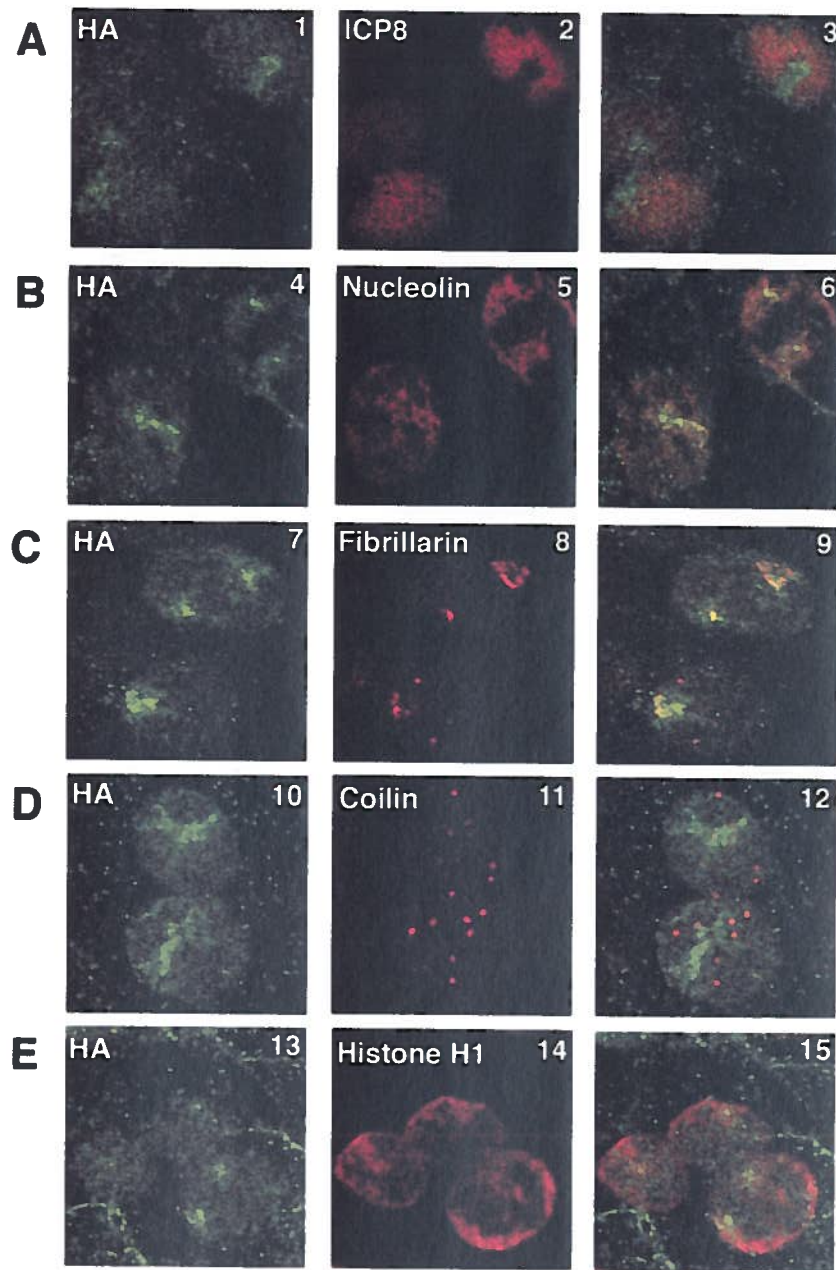


Fig. 4 HA-UL24 localizes to nucleoli of infected cells. Vero cells were infected with vHA-UL24 at an MOI of 10, processed for IF at 9 hpi, and visualized by confocal microscopy. Infected cells were co-stained for HA (staining shown in panels 1, 4, 7, 10, 13) and for one of the following nuclear compartment markers: ICP8 (A, panel 2), nucleolin (B, panel 5), fibrillarin (C, panel 8), coilin (D, panel 11), and histone H1 (E, panel 14). Merged images are shown in the right-hand panels (3, 6, 9, 12, 15). Alexa 488- and Alexa 568-conjugated secondary antibodies were used for the HA staining, and staining of the various nuclear compartments respectively.

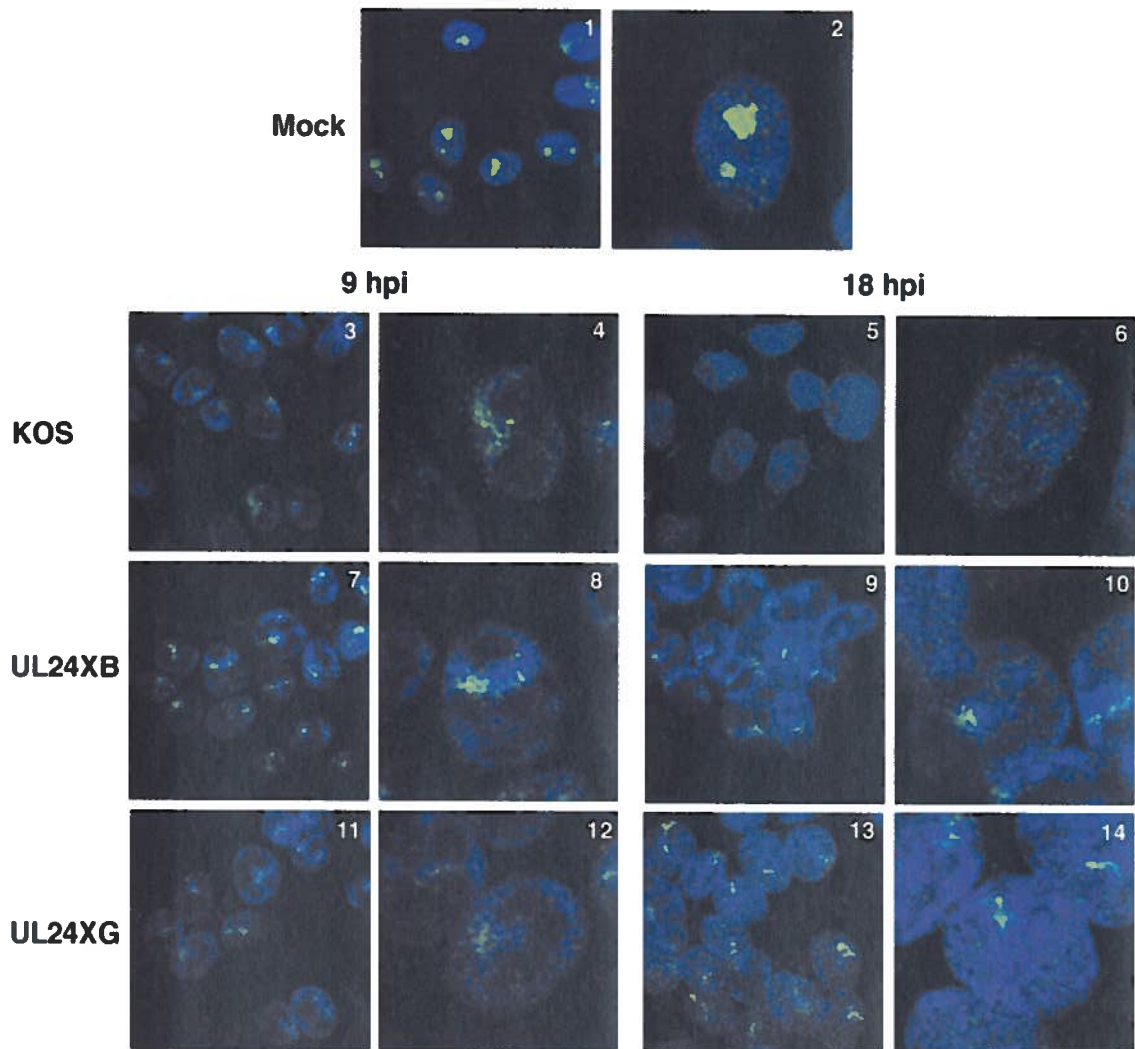


Fig. 5 Effect of HSV-1 infection on the sub-nuclear distribution of nucleolin. Vero cells were mock-infected (panels 1 and 2) or infected at an MOI of 10 with either KOS (panels 3-6), UL24XB (panels 7-10), or UL24XG (panels 11-14). Cells were processed for IF at 9 and 18 hpi, and were visualized by confocal microscopy. Cells were stained with a monoclonal antibody directed against nucleolin and an Alexa 488-coupled secondary antibody. Nuclei were stained with Draq5. The right-hand image of each pair of panels is a close up of nuclei from the corresponding panel to the left.

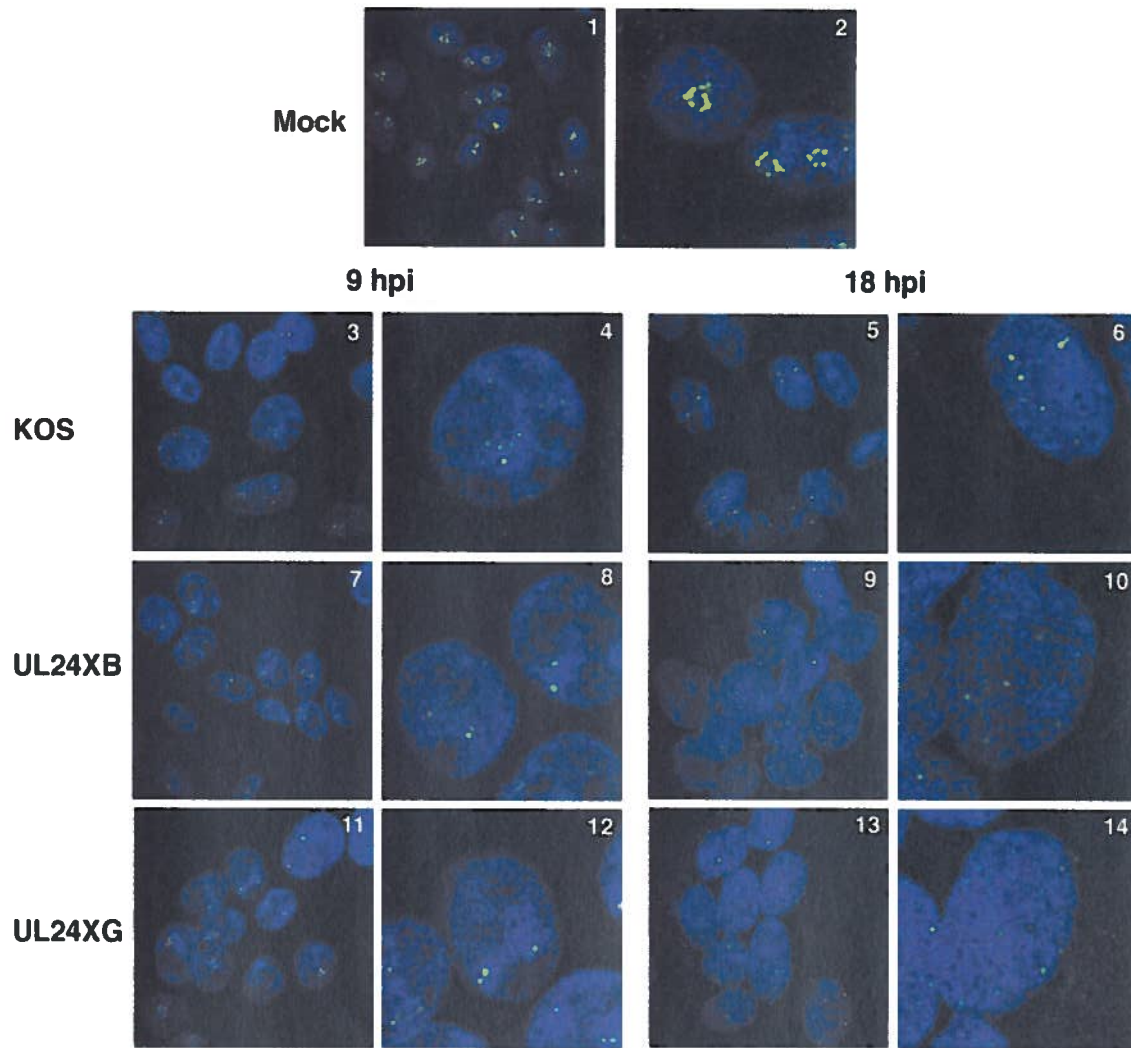


Fig. 6. Effect of HSV-1 infection on the sub-nuclear distribution of fibrillarin. Vero cells were mock infected (panels 1 and 2) or infected at an MOI of 10 with either KOS (panels 3-6), UL24XB (panels 7-10), or UL24XG (panels 11-14). Cells were processed for IF at 9 and 18 hpi, and were visualized by confocal microscopy. Cells were stained with a monoclonal antibody directed against fibrillarin and an Alexa 488-coupled secondary antibody. Nuclei were stained with Draq5. The right-hand image of each pair of panels is a close up of nuclei from the corresponding panel to the left.

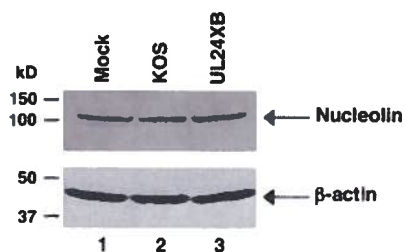


Fig. 7. Steady-state levels of nucleolin in HSV-1-infected cells. Vero cells were infected with either KOS or UL24XB and harvested at 18 hpi. Lysates from mock-infected cells or cells infected with either KOS or UL24XB were subjected to Western blotting with an antibody directed against nucleolin (top panel). As a loading control, the blot was stripped and incubated with an antibody against β -actin (bottom panel). The positions of molecular mass makers are indicated to the left of the panels. Arrows indicate the positions of nucleolin or β -actin.

CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION

Relocalization of Upstream Binding Factor to viral replication compartments is UL24-independent, and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis.
Maria H. Lymberopoulos and Angela Pearson. Journal of Virology. 2010.
84(9):4810-4815.

Résumé de la deuxième publication

Titre : La relocalisation UL24-indépendante de «upstream binding factor» dans les compartiments de réplication viraux survient suite au début de la synthèse de l'ADN viral.

L'infection par le virus herpès simplex 1 (VHS-1) induit la relocalisation de plusieurs protéines nucléolaires. Dans une étude précédente, nous avons déterminé que la nucléoline était dispersée de manière UL24-dépendante lors de l'infection, tandis que la redistribution de la fibrillarine était indépendante de UL24. Dans cette étude, nous avons trouvé que la redistribution de deux composantes de la machinerie cellulaire pour la transcription par l'ARN polymérase I (ARNpolI), upstream binding factor (UBF) et RPA194, sont redistribués de manière UL24-indépendante pendant l'infection. Toutefois, la cinétique et les sites de redistribution de la fibrillarine et de UBF diffèrent, ce qui suggère l'implication de différents mécanismes dans ces deux processus. Par contre, UBF demeure associé à RPA194 pendant leur redistribution. Bien que UBF est redistribué dans les compartiments de réplication viraux pendant l'infection, nous n'avons pas détecté de points de UBF tôt dans l'infection aux sites de synthèse de l'ADN viral. Ceci suggère qu'à ce temps, UBF pourrait ne pas être impliqué directement dans la réplication de l'ADN viral.

Contribution des auteurs

Maria H. Lymberopoulos : Expériences pour toutes les figures et génération des figures.
Contribution à la rédaction du manuscrit.

Angela Pearson : Contribution à la rédaction du manuscrit.

**Relocalization of Upstream Binding Factor to viral
replication compartments is UL24-independent, and
follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA
synthesis**

Maria H. Lymberopoulos and Angela Pearson*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec CANADA

UL24-independent relocalization of UBF and RNAPol I (45 characters)

Abstract: 102 words

Text: 1983 words

*Corresponding author
Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531 boul. des Prairies
Laval, Quebec CANADA
Phone: 450-687-5010
FAX: 450-686-5501
angela.pearson@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) induces relocalization of several nucleolar proteins. We have found that as for fibrillarin, the HSV-1-induced redistribution of two RNA polymerase I components, Upstream Binding Factor (UBF) and RPA194, was independent of the viral protein UL24, which affects nucleolin localization. Nevertheless, the kinetics and sites of redistribution for fibrillarin and UBF differed. Interestingly, UBF remained associated with RPA194 during infection. Although UBF is redistributed to viral replication compartments during infection, we did not detect foci of UBF at early sites of viral DNA synthesis suggesting that it may not be directly involved in this process at early times.

Viruses often usurp host cell functions to promote their own replication, and several have been shown to recruit nucleolar proteins (reviewed in 11, 12). Examples include the interaction of nucleolin with the internal ribosome entry site (IRES) of poliovirus where it stimulates IRES-dependent translation (13), or the recruitment of Upstream Binding Factor (UBF) to adenovirus replication centers where it enhances viral DNA replication (19). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection induces changes to the morphology and composition of nucleoli; they become elongated (5) and multiple nucleolar proteins are redistributed. Nucleolin is dispersed in a manner dependent on the viral protein UL24 (4, 21, 22), and mutations in the putative endonuclease motif identified in UL24 (17) are important for the dispersal of nucleolin (3). Cells in which nucleolin expression has been knocked down by siRNA treatment for five days produced viral yields that were reduced 23-fold and 10-fold at 16hpi and 24 hpi, respectively in a multistep replication assay (8). UL24 is expressed with leaky-late kinetics (29), is important for optimal viral yields (14, 15)—especially in neurons—and transiently localizes to nucleoli during infection (22). In addition, ectopic expression of UL24 and several of its homologs induce a G2-M cell cycle block (26, 27). Fibrillarin and B23 are also redistributed during HSV-1 infection, redistribution of the former having been shown to be independent of UL24 (8, 22, 25). Nucleolin, B23 and fibrillarin contribute to the formation of mature rRNA (reviewed in 6, 9). During infection, fibrillarin is redistributed as small spots within nuclei (22), some of which localize to centromeres (25). The RNAPII transcription factor UBF stimulates the formation of the RNAPII pre-initiation complex at the rDNA promoter (2), and also binds throughout rDNA (28) to modulate chromatin structure (30). During HSV-1 infection, foci of UBF accumulate in viral replication compartments (VRCs) and UBF has been proposed to be involved in viral DNA replication (32).

The redistribution of nucleolar proteins in HSV-1 infected cells can be grouped into UL24-dependent and UL24-independent events. Because the redistribution pattern of UBF is similar to that of fibrillarin—small spots distributed throughout the nucleus—we hypothesized that it also falls in the UL24-independent category. In this study, we

tested this hypothesis and further investigated the subnuclear distribution of UBF during infection, and the kinetics of its relocalization to sites of viral DNA synthesis.

UBF and fibrillarin are redistributed independently during HSV-1 infection.

Because the redistribution patterns of UBF and fibrillarin are similar in HSV-1-infected cells (22, 32), we asked if they were relocalized together using a time course experiment to compare their spatial and temporal distribution during infection. For all immunostaining in this report, Vero cells were infected at a multiplicity of infection of 10 and processed as described previously (22) using secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 568, unless indicated otherwise. Images were acquired by confocal microscopy, and laser intensities were kept constant within a given experiment. Vero cells grown on coverslips were either mock-infected or infected with the wild type virus KOS. At 3, 6, 12 and 18 hours post infection (hpi), cells were fixed, blocked with human serum (Sigma), and immunostained using antibodies against fibrillarin (Covance) and UBF (Santa Cruz). Cells were visualized by confocal microscopy. As expected, in mock-infected cells both UBF and fibrillarin localized to nucleoli in one or two foci within nuclei (Fig. 1). As early as 3 hpi, we observed small spots of UBF redistributed from nucleoli. As infection progressed, both UBF and fibrillarin were relocalized as spots throughout the nucleoplasm but mainly remained separate. Thus, the localization and kinetics of fibrillarin and UBF redistribution differed during HSV-1 infection, suggesting that different mechanisms are involved in their relocalization.

Redistribution of UBF and a catalytic subunit of RNAPII is UL24-independent.

Previously, we found that HSV-1-induced nucleolar modifications could be classified according to their dependence on the viral protein UL24 (22). Here we asked whether the relocalization of UBF was dependent on UL24, and how the association of UBF with a catalytic subunit of RNAPI, RPA194, was affected during infection. Cells were either mock-infected, or infected with KOS or the UL24-deficient virus UL24X (14), fixed at 18 hpi and stained for UBF or RPA194 (Santa Cruz). In mock-infected cells, UBF and RPA194 were found in foci corresponding to nucleoli (Fig. 2A, left hand panels). We found that, as for UBF, HSV-1 caused the redistribution of RPA194 into small spots

throughout the nucleus (Fig. 2A, middle panels). Similar staining patterns were observed for both proteins in UL24X-infected cells indicating that UL24 is not required for these effects (Fig. 2A, right hand panels). To determine if the redistribution of UBF and RPA194 was dependent on viral DNA replication, cells were infected in the presence of 300 µg/mL phosphonoacetic acid (PAA) (Sigma). We continued to detect some redistribution of UBF in the presence of PAA (Fig. 2B), suggesting that the trigger for the relocalization of these factors occurs independently of viral DNA replication.

UBF associates with the RNAPII transcription initiation machinery through interactions with RNAPII associated factor 53 (PAF53) (10) and SL1 subunits (1, 18). We next investigated whether UBF remained associated with RNAPII during infection. KOS-infected cells were fixed at either 9 or 18 hpi, then blocked with human serum and co-stained for UBF and the largest subunit of RNAPII, RPA194 (Santa Cruz). As expected, they co-localized within nucleoli in mock-infected cells (Fig. 2C, left panels). Interestingly, in contrast to what we observed for fibrillarin, UBF and RPA194 remained co-localized during HSV-1 infection (Fig. 2C, middle and right panels). This is also in contrast to what was seen by Stow *et al.* (32); however, their RNAPII antibody likely recognized the RPA43 subunit (23), while we have looked at the largest RNAPII subunit, which also forms part of the catalytic site of the enzyme.

Because much of the UBF and RNAPII appeared to be released from nucleoli during HSV-1 infection, we investigated whether UBF could still be detected bound to ribosomal genes in infected cells. We performed chromatin immunoprecipitations (ChIP) on mock- and KOS-infected cells harvested at 10 hpi. ChIPs were performed using the Magna ChIP™ G kit (Millipore) and antibodies against either UBF or ERp57 (Santa Cruz), a negative control for rDNA binding. Immunoprecipitated DNA was amplified by PCR using primers that detect rDNA promoter sequences. As expected, in mock-infected cells we detected UBF bound to rDNA (Fig. 2D). Similarly, even though it appeared that large amounts of RNAPII-associated UBF were no longer in nucleoli, we found that following HSV-1 infection, some UBF remained bound to rDNA. This result is consistent with findings suggesting that despite a decrease in mature rRNA synthesis following HSV-1 infection, rDNA continues to be transcribed (31, 33).

Subnuclear distribution of UBF during infection. To investigate the early kinetics of UBF relocalization to VRCs, infected cells were fixed at 4, 5, 6, and 9 hpi, blocked with human serum and co-stained using antibodies against UBF and ICP8 (Santa Cruz), a marker for VRCs. At 4 hpi, negligible amounts of UBF co-localized with early replication compartments (Fig. 3A). At 5 hpi, we began to detect spots of UBF co-localizing with ICP8. As infection progressed and VRCs coalesced, increasing amounts of UBF appeared to be relocalized to these compartments. At both 6 and 9 hpi, most UBF was detected in spots within VRCs (Fig. 3A), while a portion of UBF staining remained outside of VRCs, which is similar to what has been reported previously (32). The UBF outside of VRCs likely represents the portion that remains associated with rDNA promoters (Fig. 2D), and continues to function in rRNA synthesis. VRCs are not homogeneous structures, and several sub-compartments have been identified such as splicing speckles and virus-induced chaperone-enriched (VICE) domains (7, 20). To determine whether UBF was recruited to either of these sub-compartments, fixed cells were blocked using human serum and co-stained for UBF, and either SC35 (Abcam) or hsc70 (Stressgen) respectively. For the most part, UBF did not co-localize with either splicing speckles or VICE domains (Fig. 3B) in infected cells, and thus appeared to represent a distinct sub-compartment found in VRCs; however, we cannot rule out the possibility that the presence of UBF in VRCs is an indirect consequence of the large space occupied by these compartments in the infected cell nucleus.

Absence of UBF from sites of HSV-1 DNA replication at early times in infection. It has been proposed that UBF recruited to VRCs is involved in HSV-1 DNA replication (32); however, we did not detect spots of UBF in early VRCs (Fig. 3A). To determine if relocalized spots of UBF were present at sites of HSV-1 DNA replication at these early times, cells were stained with Click-iT® EdU (Invitrogen), which marks active sites of DNA synthesis. Cells were incubated with EdU for 30 min prior to fixation at either 4 or 5 hpi, and co-stained for EdU and UBF, using secondary antibodies coupled to Alexa 647 and Alexa 488, respectively. Z-stack analyses were performed using a confocal microscope; EdU staining is shown in red to facilitate visualization (Fig. 4). At 4 hpi, we observed many sites of viral DNA synthesis in which we were unable to detect any spots

of UBF, while by 5 hpi, UBF began to associate with the growing VRCs. A 3D video of the Z-stack image at 4 hpi is included as supplemental material. Therefore, we found that early viral DNA synthesis occurred in the apparent absence of UBF.

Impact of HSV-1 infection on the RNAPII transcription machinery. Our results suggest that UL24-independent nucleolar modifications can be subdivided into at least two classes—those represented by the redistribution of fibrillarin, and those comprising the redistribution of UBF and RPA194. The redistribution of spots of UBF to VRCs has led to the hypothesis that this factor functions in viral DNA replication. This possibility was supported by the observation of Stow *et al.* that in a co-transfection assay, expression of UBF-EGFP fusion proteins inhibited origin-dependent HSV DNA replication (32). Our results showing that the redistribution UBF to VRCs follows the onset of viral DNA replication suggest that UBF may not be required for viral DNA synthesis, at least at early times in infection; however, we cannot rule out a possible indirect role for UBF in this process. Nucleoli form around Nucleolar Organizing Regions (NORs), which are clusters of domains on chromosomes that contain the rDNA repeats (16, 24). The virus-induced structures containing UBF and RNAPII that we have observed are reminiscent of pseudo-NORs (23). Pseudo-NORs are RNAPII transcription complexes that assemble on arrays of ribosomal genes introduced at ectopic sites within the human genome. Pseudo-NORs are transcriptionally silent and, unlike nucleoli, do not appear to contain nucleolin, B23 or fibrillarin. Although we recognize that this is an artificial system, the formation of these structures in infected cells suggests that they may serve a particular function in this context. Because the formation of pseudo-NORs is based on the interaction of UBF with a specific DNA target, it suggests that the UBF/RNAPII complexes also form on specific DNA sequences within VRCs; however, to date we have not detected any specific interaction between UBF and viral promoter DNA in infected cells. Given the role of UBF in altering the chromatin structure of rDNA, one possible function of the UBF/RNAPII complexes in VRCs may be to modulate the structure of particular loci in the viral genome to promote a particular stage in viral replication.

We thank D. M. Coen (Harvard Medical School) for viral strains, and plasmids. We also thank Anthony Griffiths for comments on the manuscript. M.H.L. was supported by graduate scholarships from the National Science and Engineering Research Council of Canada and the Fondation de la Recherche en Santé du Québec. This research was funded through an infrastructure grant from the Canada Foundation for Innovation (#9991) and an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82924) to A.P.

References

1. **Beckmann, H., J. L. Chen, T. O'Brien, and R. Tjian.** 1995. Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science* **270**:1506-9.
2. **Bell, S. P., R. M. Learned, H. M. Jantzen, and R. Tjian.** 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**:1192-7.
3. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**:109-18.
4. **Bertrand, L., and 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**:1142 - 1151.
5. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1):119-29.
6. **Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A. I. Lamond.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:574-85.
7. **Burch, A. D., and S. K. Weller.** 2004. Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**:7175-85.
8. **Calle, A., I. Ugrinova, A. L. Epstein, P. Bouvet, J. J. Diaz, and A. Greco.** 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **82**:4762-73.
9. **Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet.** 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112** (Pt 6):761-72.
10. **Hanada, K., C. Z. Song, K. Yamamoto, K. Yano, Y. Maeda, K. Yamaguchi, and M. Muramatsu.** 1996. RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J* **15**:2217-26.
11. **Hiscox, J. A.** 2002. The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* **147**:1077-89.
12. **Hiscox, J. A.** 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**:119-27.
13. **Izumi, R. E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta.** 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* **76**:17-29.
14. **Jacobson, J. G., S.-H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the Herpes Simplex Virus *UL24* Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* **242**:161-169.
15. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and 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**:1839-1843.
16. **Jimenez-Garcia, L. F., L. I. Rothblum, H. Busch, and R. L. Ochs.** 1989. Nucleologenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and

- immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol Cell* **65**:239-46.
17. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human Herpesvirus 1 *UL24* Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease. *J Virol* **80**:2575-2577.
 18. **Kwon, H., and M. R. Green.** 1994. The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor, interacts directly with the TATA box-binding protein. *J Biol Chem* **269**:30140-6.
 19. **Lawrence, F. J., B. McStay, and D. A. Matthews.** 2006. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *J Cell Sci* **119**:2621-31.
 20. **Li, L., L. A. Johnson, J. Q. Dai-Ju, and R. M. Sandri-Goldin.** 2008. Hsc70 focus formation at the periphery of HSV-1 transcription sites requires ICP27. *PLoS One* **3**:e1491.
 21. **Lopez, M. R., E. F. Schlegel, S. Wintersteller, and J. A. Blaho.** 2008. The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* **136**:175-88.
 22. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
 23. **Mais, C., J. E. Wright, J. L. Prieto, S. L. Raggett, and B. McStay.** 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* **19**:50-64.
 24. **Morcillo, G., De la Torre, C.** 1979. Mapping nucleologenesis in relation to transcription. *Biol Cell* **36**:1-6.
 25. **Morency, E., M. Sabra, F. Catez, P. Texier, and P. Lomonte.** 2007. A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *J Cell Biol* **177**:757-68.
 26. **Nascimento, R., J. D. Dias, and R. M. Parkhouse.** 2009. The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch Virol* **154**:1143-9.
 27. **Nascimento, R., and 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**:1446-53.
 28. **O'Sullivan, A. C., G. J. Sullivan, and B. McStay.** 2002. UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* **22**:657-68.
 29. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* **76**:10821-10828.
 30. **Stefanovsky, V. Y., F. Langlois, D. Bazett-Jones, G. Pelletier, and T. Moss.** 2006. ERK modulates DNA bending and enhances some structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* **45**:3626-34.

31. **Stenberg, R. M., and L. I. Pizer.** 1982. Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**:474-87.
32. **Stow, N. D., V. C. Evans, and D. A. Matthews.** 2009. Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* **90**:69-73.
33. **Wagner, E. K., and B. Roizman.** 1969. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**:36-46.

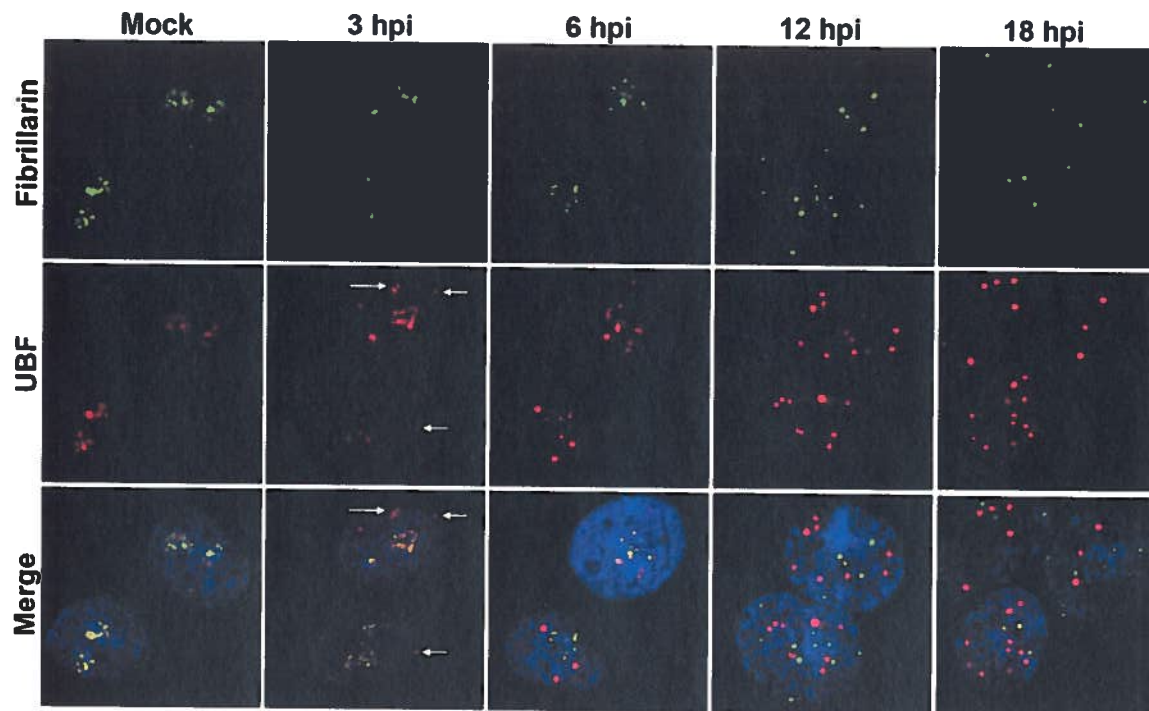


Fig. 1. UBF and fibrillarin are redistributed separately during HSV-1 infection. Confocal images showing a time course of fibrillarin (green) and UBF (red) redistribution during infection. Arrows indicate relocalized spots of UBF prior to the redistribution of fibrillarin. Merged images are shown in the bottom panels. Nuclei were stained with Draq 5 (blue, Biostatus Limited).

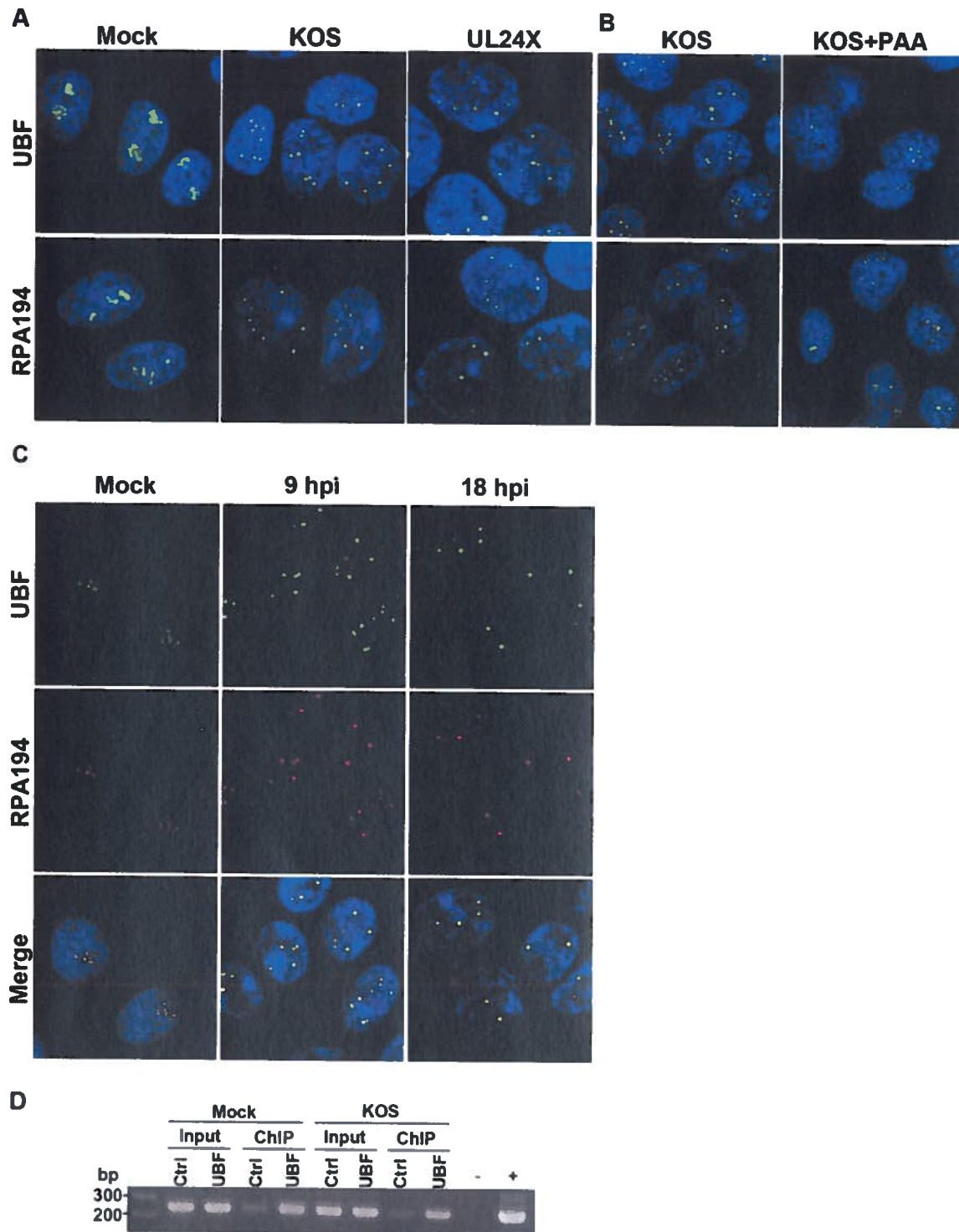


Fig. 2. UL24-independent relocalization of components of the RNAPII machinery upon infection with HSV-1. (A) Confocal images of mock-, KOS- and UL24X-infected cells stained for either UBF (top panels) or RPA194 (bottom panels) at 18 hpi. (B) Shown are KOS-infected cells that remained untreated (left-hand panels) or that were

treated with PAA (right-hand panels), and stained for either UBF or RPA194 at 18 hpi. Nuclei were stained with Draq 5 (blue). (C) Mock- or KOS-infected cells were co-stained for UBF (green) and RPA194 (red). Merged confocal images are shown in the bottom panels. Nuclei were stained with Draq 5 (blue). (D) ChIP assays on lysates from mock- or KOS-infected cells at 10 hpi using UBF or control antibodies. Input represents 1/100 of sample analyzed in ChIPs. Shown is an agarose gel of the PCR products obtained using primers detecting rDNA promoter sequences. Minus and plus signs represent negative (water) and positive (Vero cell DNA) PCR controls respectively.

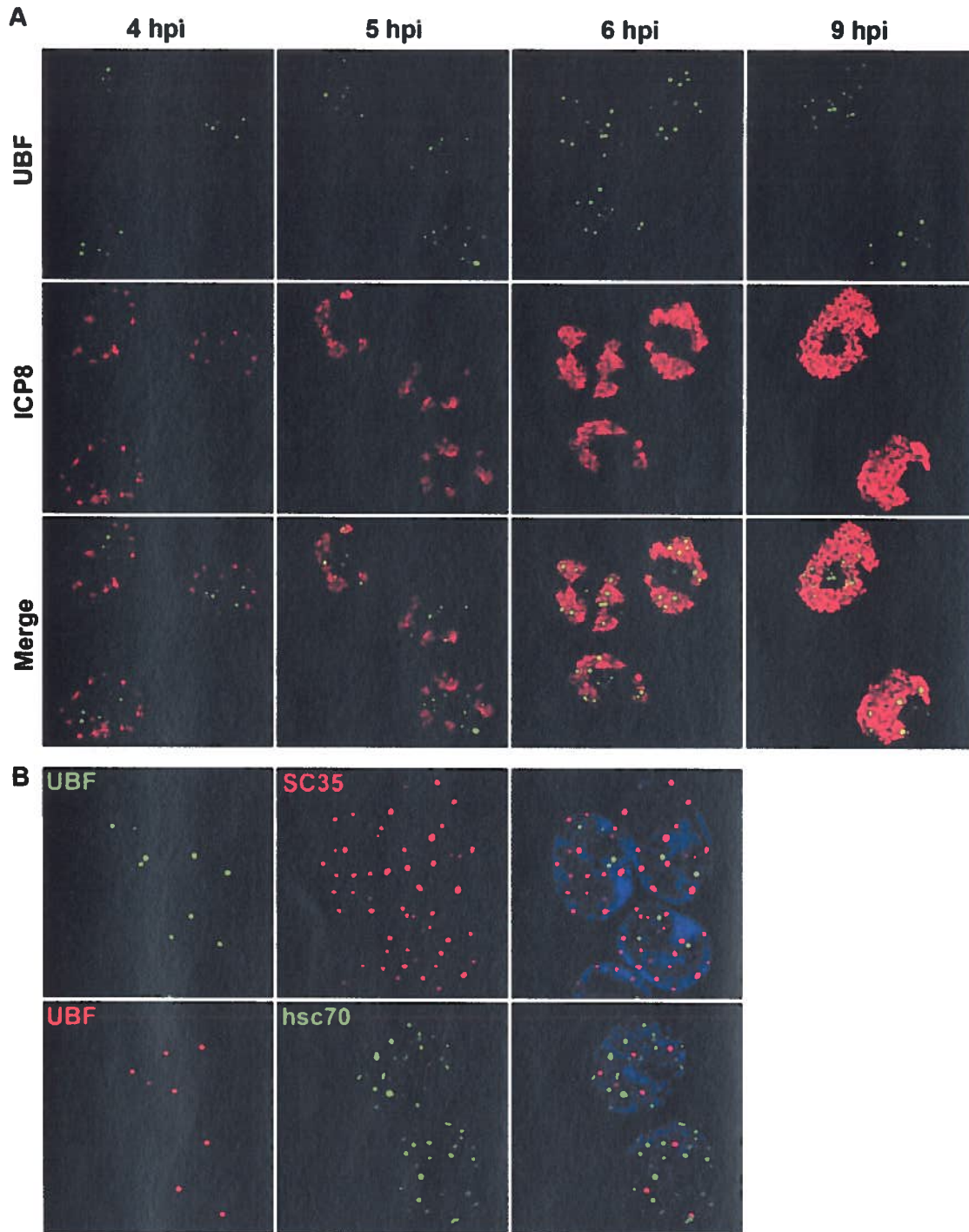


Fig. 3. Sub-nuclear localization of UBF in HSV-1 infected cells. (A) Time course of UBF relocation to VRCs. Infected cells were co-stained for UBF (green) and ICP8 (red). Merged confocal images are presented in the bottom panels. (B) Vero cells were co-stained at 18 hpi for either UBF (green) and SC35, a marker for nuclear speckles (red) (top panels), or UBF (red) and hsc70, a marker for VICE domains (green) (bottom panels). Merged confocal images are shown in the right-hand panels. Nuclei were stained with Draq 5 (blue).

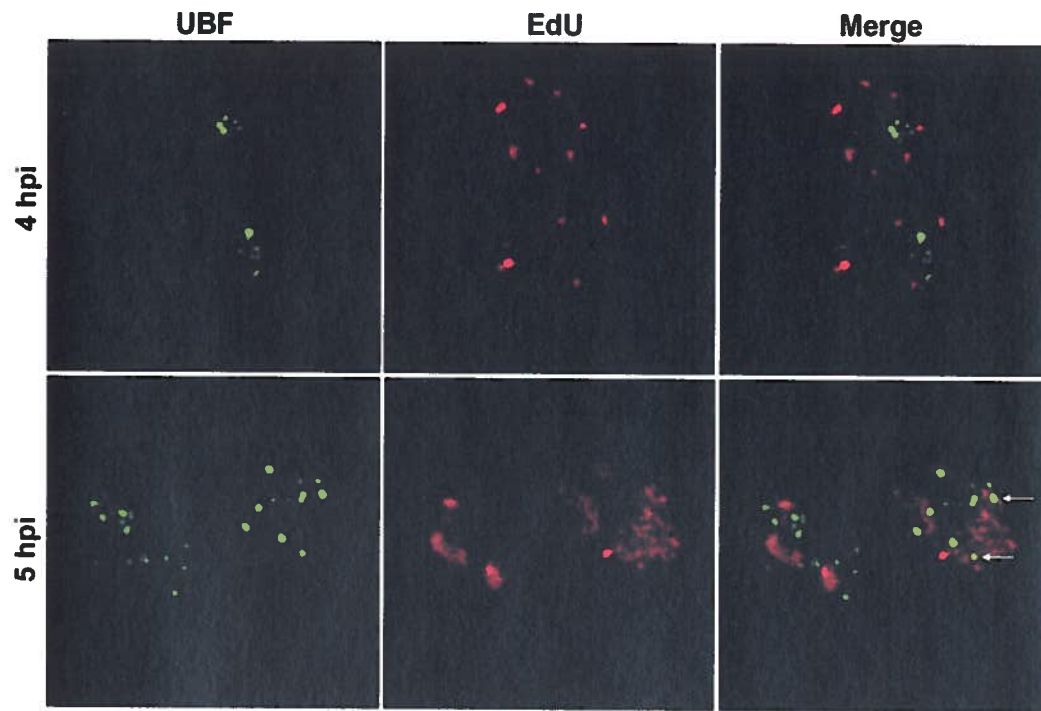


Fig. 4. HSV-1 DNA synthesis begins prior to the relocation of UBF to VRCs. Vero cells were infected for 4 (top panels) or 5 hours (bottom panels), and co-stained for UBF (green) and EdU, a marker for active DNA synthesis (red). Images are Z-stacks taken using a confocal microscope. Merged images are shown in the right-hand panels. Arrows indicate co-localization of redistributed spots of UBF and sites of DNA synthesis at 5 hpi. A video of the Z-stack at 4 hpi is provided in the supplemental material.

CHAPITRE 4 : TROISIÈME PUBLICATION

Involvement of UL24 in herpes simplex virus-1 induced dispersal of B23 and in nuclear egress. Maria H. Lymberopoulos, Amélie Bourget, Nawel Ben Abdeljelil, and Angela Pearson.

Résumé de la troisième publication

Titre : Implication de UL24 dans la dispersion de B23 induite par le virus herpès simplex 1 et dans la sortie des nucléocapsides du noyau.

UL24 du virus herpès simplex 1 est conservé dans la famille des *Herpesviridae* et est important pour la réplication efficace du virus. De plus, *UL24* est impliqué dans la dispersion de la nucléoline pendant l'infection. Nous avons démontré précédemment que des résidus conservés dans la protéine *UL24*, incluant des résidus dans le motif d'endonucléase, sont importants pour la redistribution de la nucléoline. Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que *UL24* est aussi impliqué dans la dispersion de la protéine nucléolaire B23. Nous avons trouvé que dans les cellules infectées par le VHS-1, la dispersion de B23 est *UL24*-dépendante. Par la suite, nous avons démontré que *UL24* est suffisant pour induire la redistribution de B23 dans des essais de transfection transitoire, et que cette fonction est contenue dans le domaine N-terminal, qui est la portion conservée de *UL24*. Des analyses mutationnelles ont révélé que comme pour la dispersion de la nucléoline, le motif d'endonucléase de *UL24* est aussi important pour la dispersion de B23 dans des cellules infectées et transfectées. La relocalisation de protéines du nucléole lors de l'infection par le VHS-1 est similaire dans une lignée cellulaire non-transformée, tant pour la redistribution des protéines que pour la dépendance sur l'expression de *UL24*. L'analyse par microscopie électronique de cellules infectées a révélé une réduction dans le ratio de particules dans le noyau versus le cytoplasme dans les cellules infectées avec le virus déficient en *UL24*, par rapport au virus sauvage. Nos résultats suggèrent que les modifications induites au nucléole par *UL24* pourraient promouvoir la sortie des nucléocapsides du noyau lors de l'infection.

* Ce manuscrit est en préparation.

Contribution des auteurs

Maria H. Lymberopoulos : Expériences et génération des figures 1, 3, 5 et du tableau 1.
Rédaction et révision du manuscrit.

Amélie Bourget : Expériences et génération de la figure 2.

Nawel Ben Abdeljalil : Expériences et génération de la figure 4.

Angela Pearson : Révision du manuscrit.

Involvement of the UL24 in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress

Running title: UL24 involvement in B23 dispersal

Maria H. Lymberopoulos, Amélie Bourget, Nawel Ben Abdeljelil,
and Angela Pearson*

*INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec
531 boul. des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7
CANADA*

Abstract : 215 words

Text : 4731 words

angela.pearson@iaf.inrs.ca

* Corresponding author
INRS-Institut Armand-Frappier
531 boul. des Prairies
Laval, Quebec H7V 1B7 CANADA
Phone: 1 (450) 687-5010
FAX: 1 (450) 686-5501
angela.pearson@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

UL24 of herpes simplex virus 1 (HSV-1), widely conserved within the *Herpesviridae* family, is important for efficient viral replication and is involved in the dispersal of nucleolin during infection. We previously demonstrated that several conserved residues in the UL24 protein, including residues within the endonuclease motif, are important for the redistribution of nucleolin. In this study, we tested the hypothesis that UL24 is also involved in the dispersal of the nucleolar protein B23. We found that in HSV-1-infected cells, the dispersal of B23 is dependant on *UL24*. We further showed that UL24 is sufficient to induce the redistribution of B23 in transient transfection assays, and that this function is contained within the conserved N-terminal portion of UL24. Mutational analysis revealed that similar to our previous results for nucleolin, the endonuclease motif of UL24 was important for B23 dispersal in transfected and in infected cells. Nucleolar protein relocalization during HSV-1 infection was similar in a non-transformed cell line, with regards to the redistribution and the dependency on UL24 expression. Analysis of infected cells by electron microscopy revealed a decrease in the ratio of cytoplasmic versus nuclear viral particles in cells infected with a UL24-deficient strain as compared to KOS-infected cells. Our results suggest that UL24-induced nucleolar modifications may promote nuclear egress of nucleocapsids during HSV-1 infection.

INTRODUCTION

Many viruses recruit host nucleolar proteins to enhance their replication thereby modifying the composition of nucleoli. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection induces multiple changes to nucleoli, both morphological and functional. During infection, nucleoli are elongated and marginalized to the edges of nuclei, and rRNA is retained within nucleoli (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996b). The synthesis of mature rRNA is reduced during HSV-1 infection (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996a; Silverstein and Engelhardt, 1979; Stenberg and Pizer, 1982; Wagner and Roizman, 1969). Furthermore, an altered pathway of rRNA maturation was detected in HSV-1 infected cells (Belin et al., 2010).

Several nucleolar proteins have been shown to be relocalized during HSV-1 infection. Nucleolin, B23 and fibrillarin are multifunctional proteins that contribute to the formation of mature rRNA and ribosome biogenesis (Boisvert et al., 2007; Mongelard and Bouvet, 2007). Late in HSV-1 infection, nucleolin is dispersed throughout the nucleus (Lopez et al., 2008; Lymberopoulos and Pearson, 2007) in a manner dependant on UL24 (Lymberopoulos and Pearson, 2007). Cells in which nucleolin expression is reduced by siRNA treatment produce reduced viral yields (Calle et al., 2008). Recently, nucleolin was reported to interact with UL12, an HSV-1 alkaline nuclease involved in viral DNA packaging, and was shown to be important for efficient nuclear egress of nucleocapsid particles (Sagou, Uema, and Kawaguchi, 2010). In contrast to nucleolin, fibrillarin is redistributed in spots throughout the nucleus during infection, some of which localize to centromeres (Morency et al., 2007), and in a manner independent of UL24 (Lymberopoulos and Pearson, 2007). Like nucleolin, B23 is also dispersed throughout the nucleus during HSV-1 infection (Calle et al., 2008); however, it is not known what viral functions are responsible for this modification or the impact on viral replication.

Components of the basal RNA polymerase I (RNAPolI) transcription machinery are also affected by HSV-1. The RNAPolI transcription factor, UBF, is redistributed to puncta within viral replication compartments (Lymberopoulos and Pearson, 2010; Stow, Evans, and Matthews, 2009). RNAPolI subunits are also relocalized during infection;

however, the impact of infection appears to differ depending on the subunit studied. RPA194, the largest catalytic subunit remains associated with UBF during infection and its redistribution is also independent of UL24 (Lymberopoulos and Pearson, 2010). Although there is evidence supporting a role for UBF in HSV-1 replication, viral DNA synthesis can be detected prior to the redistribution of UBF foci to viral replication compartments (Lymberopoulos and Pearson, 2010; Stow, Evans, and Matthews, 2009).

The *UL24* gene is conserved throughout the *Herpesviridae* family. UL24 of HSV-1 is expressed with leaky-late kinetics (Pearson and Coen, 2002) and is important for high viral titers, especially in neurons of infected mice (Jacobson et al., 1998; Jacobson, Martin, and Coen, 1989). UL24 of HSV-1 is a 269 aa protein that contains five homology domains (HD), which consist of stretches of amino acids that are conserved between orthologous proteins in different herpesviruses (Jacobson, Martin, and Coen, 1989). UL24 is detected in the nucleus and cytoplasm of infected cells (Pearson and Coen, 2002), and transiently localizes to nucleoli (Lymberopoulos and Pearson, 2007). In the context of transient transfection, the N-terminal portion of UL24 is sufficient to induce the dispersal of nucleolin in the absence of other viral proteins (Bertrand and Pearson, 2008). Furthermore, conserved residues in UL24 within the first HD and within the PD-(D/E)XK endonuclease motif, have been shown to be important for the redistribution of nucleolin (Bertrand et al., 2010).

Thus, there appear to be at least two categories of HSV-1 induced nucleolar modifications; UL24-dependent and UL24-independent events. Although fibrillarin and UBF are redistributed independently of UL24 expression (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos and Pearson, 2010), different mechanisms appear to be involved since the kinetics and their patterns of relocalization differ (Lymberopoulos and Pearson, 2010). In contrast, we have shown that the redistribution of nucleolin is a UL24-dependent event. Interestingly, the redistribution of B23 occurs at later times post-infection (Calle et al., 2008; Stow, Evans, and Matthews, 2009), and in a diffuse pattern, which is similar to the dispersal nucleolin. This observation led us to hypothesize that B23 redistribution is functionally related to that of nucleolin. In addition, based on the recent report that nucleolin is required for efficient nuclear egress of HSV-1 (Sagou,

Uema, and Kawaguchi, 2010), we further hypothesized that UL24 is involved in nuclear egress.

In this study, we tested the involvement of UL24 in the dispersal of B23 and investigated a possible link between UL24 and the role of nucleolin in efficient nuclear egress of viral particles.

RESULTS

The N-terminal domain of UL24 is sufficient for B23 dispersal

HSV-1-induced nucleolar modifications can be categorized as either UL24-independent or UL24-dependent events. B23 was shown to be dispersed during infection but the viral factors responsible have yet to be determined (Calle et al., 2008). We tested whether UL24 was involved in the redistribution of B23 during infection. Vero cells were either mock-infected or infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 with either the wild-type virus KOS or a UL24-deficient strain, UL24X (Jacobson et al., 1998). At 18 hpi, cells were fixed and immunostained for B23. Cells were visualized by confocal microscopy. In mock-infected cells, B23 staining was present as one or two intense foci corresponding to nucleoli with some very faint diffuse nucleoplasmic staining (Fig 1). As observed previously, B23 staining was dispersed throughout the nucleus in the majority of KOS-infected cells. While in a minority of these cells, the foci of B23 persisted. In contrast, in the majority of UL24X-infected cells foci of B23 staining persisted. Similar to what we observed for nucleolin (Lymberopoulos and Pearson, 2007), the morphology of B23 foci in UL24X-infected cells appeared somewhat distorted as compared to those in mock-infected cells. This is likely an indirect effect of the extensive morphological modifications to nucleoli and to nuclei observed during infection (Besse and Puvion-Dutilleul, 1996a; Besse and Puvion-Dutilleul, 1996b; Roizman and Knipe, 2001; Silverstein and Engelhardt, 1979; Stenberg and Pizer, 1982; Wagner and Roizman, 1969). Therefore, we identified a second UL24-dependent nucleolar modification induced during HSV-1 infection.

We previously showed that UL24 was not only necessary but was sufficient to induce the dispersal of nucleolin. To determine if UL24 was sufficient to disperse B23 in the absence of other viral proteins, we tested the effect on B23 localization of transiently expressed UL24. COS-7 cells were transfected with pLBPF1- HA-UL24, which expresses UL24 with an N-terminal hemagglutinin (HA) tag (Bertrand and Pearson, 2008). At 48 hrs post-transfection, cells were fixed and immunostained for HA and B23. In contrast to what is seen in untransfected cells, the majority of cells expressing HA-UL24 exhibited a dispersed pattern of B23 staining throughout the nucleus (Fig 2A). Therefore, in addition

to the dispersal of nucleolin, UL24 is also sufficient to disperse B23. In our previous studies, the N-terminal domain of UL24, contained within the first 192 aa of the protein, was found to be sufficient for nucleolin dispersal (Bertrand and Pearson, 2008), while in cells transfected with the C-terminal portion of UL24 (amino acids 190 to 269) foci of nucleolin were intact. We conducted a similar study to test the effect of the C- or N-terminal portion of UL24 on the dispersal B23. Very few cells transfected with a vector expressing the N-terminal domain of UL24 retained B23 (Fig 2A). In contrast, most cells transfected with the C-terminal domain retained B23 foci (Fig 2A). Therefore, the N-terminal domain of UL24 was also sufficient to induce the relocalization of B23.

UL24 endonuclease motif is important for B23 dispersal

We previously showed that amino acid substitutions within the first HD of UL24, and overlapping or near the PD-(D/E)XK endonuclease motif, caused the most drastic reduction in the ability of UL24 to disperse nucleolin (Bertrand et al., 2010). We therefore sought to determine if the same domains of UL24 were involved in the dispersal of B23. COS-7 cells were transiently transfected with plasmids for expression of HA-tagged wild-type UL24 or versions containing single or double amino acid substitutions (Bertrand et al., 2010). At 48 hrs post-transfection, cells were fixed and immunostained for HA and B23. The number of cells expressing HA-UL24 that retained nuclear foci of B23 staining were scored and the data represents an average of three experiments where more than 100 cells were counted per transfection (Fig. 2B). For wild-type UL24, less than 5% of cells expressing HA-UL24 exhibited the characteristic punctuate nucleolar staining for B23. Similarly, the N-terminal portion of UL24 caused B23 dispersal in more than 93% of the cells counted. In contrast, 93% of cells transfected with the C-terminal portion retained B23 foci. The effect on B23 caused by the different substitutions could be separated in three categories. The mutations that most severely affected the ability of UL24 to modify B23 distribution, where greater than 50% of cells retained nucleolar foci, included Y26A, E69A/V70A, I97A/I98A and E99A/K101A. Mutations with a moderate effect, where only 34 to 47% of cells retained B23 foci, included H22L, R75A/D78A, G121A, Q124A/L125A and Q154A. The Q117 mutation had little effect on the ability of UL24 to disperse B23, in that less than 9% of transfected cells retained B23 foci. Thus,

we found that highly conserved residues in UL24 were of differing importance for the ability of UL24 to disperse B23.

We sought to determine the effect of substitution mutations in UL24 on B23 dispersal during infection. Vero cells were either mock-infected or infected with KOS, UL24X, vUL24-E99A/K101A, or vUL24-G121A (Bertrand et al., 2010). At 18 hpi, cells were fixed and immunostained for B23 (green), and nuclei were stained with Draq5 (blue) (Fig. 3A). In addition, the effect of each virus on B23 localization was quantified, and cells that retained nuclear foci of B23 staining were scored (Fig. 3B). The data represents an average of three experiments where more than 90 cells were counted per infection. Less than 4% of cells infected with the wild-type virus KOS retained B23 foci, whereas more than 73% of cells infected with UL24X retained strong foci. Cells infected with either independent isolate of vUL24-E99A/K101A had a similar phenotype to those infected with UL24X, in that more than 73% of cells retained B23 foci. Cells infected with either independent isolate of vUL24-G121A exhibited an intermediate staining pattern for B23 between those associated with KOS and with UL24X – less than 21% of cells retained strong nucleolar foci. Most cells infected with vUL24-G121A had showed diffuse nuclear staining for B23 and some had a slightly brighter area in the nucleus, which differed from the strong foci observed in either UL24X- or vUL24-E99A/K101A-infected cells. The ability of these mutant viruses to disperse B23 was in keeping with the effect observed of the substitutions in the context of transfection. Thus, highly conserved residues in the endonuclease motif of UL24 are important for the dispersal of B23 in infected cells.

Involvement of UL24 in the dispersal of nucleolin and B23 in non-immortalized cells

Previous studies describing nucleolar modifications induced by HSV-1 infection have looked at immortalized cell lines. In order to determine whether the distribution of nucleolin and B23 is affected during infection of non-immortalized cells, and to verify if UL24 is involved in their redistribution in these cells, we studied their localization in HSV-1 infected HFF (Human foreskin fibroblast) cells. HFF cells were grown on coverslips and were either mock-infected or infected with KOS or UL24X at an MOI of 10. At 18 hpi, cells were fixed and immunostained for either B23, nucleolin or UBF (Fig.

4). In mock-infected cells, B23 was found as multiple bright foci within nuclei with diffuse nucleoplasmic staining. However, in KOS-infected cells, B23 was mostly detected as diffuse nucleoplasmic staining. In contrast, in UL24X-infected cells, discrete foci of B23 remained. A similar result was obtained for nucleolin in HFFs (Fig. 4). In mock-infected HFFs, nucleolin was present as multiple spots within nuclei, with very light staining in the nucleoplasm. In contrast, in KOS-infected HFFs, the majority of cells had bright nucleolin staining that was diffuse throughout the nucleus. We also observed a few KOS-infected cells with both bright diffuse staining in the nucleoplasm and some spots within nuclei that were still detectable. In contrast, in UL24X-infected HFFs, nucleolin was present as discrete spots within nuclei with light nucleoplasmic staining. Therefore, in HFF cells, HSV-1 infection caused the UL24-dependant redistribution of both B23 and nucleolin from nucleoli throughout the nucleoplasm, as seen in immortalized cell lines. Therefore, our results show that both B23 and nucleolin are redistributed during HSV-1 infection of non-immortalized cells in a manner dependent on UL24.

In contrast to nucleolin and B23, the redistribution of UBF during HSV-1 infection is UL24-independent in immortalized cell lines (Lymberopoulos and Pearson, 2010). We tested whether this was also true in HFF cells (Fig. 4). In mock-infected cells UBF was present as one or multiple large spots within nuclei. In HSV-1 infected cells, UBF was redistributed throughout nuclei as multiple smaller spots. A similar pattern was observed in UL24X-infected cells suggesting that the redistribution of UBF in HFF cells induced by HSV-1 infection was UL24-independent as we have shown previously in Vero and HeLa cells. Therefore, the effect of HSV-1 infection on nucleolar proteins, and whether the effects are dependent on UL24 expression, are similar in immortalized cell lines and in the non-immortalized HFF cells. Thus, the contribution of UL24 to nucleolar modifications during infection is not dependent on changes related to the immortalized nature of the previous cell lines tested.

UL24 affects nuclear egress of viral capsids

It was recently demonstrated that nucleolin is required for efficient nuclear egress of HSV-1 nucleocapsids (Sagou, Uema, and Kawaguchi, 2010). Because UL24 can

induce the dispersal of both B23 and nucleolin within host cell nuclei, we hypothesized that through its effect on nucleoli, UL24 is involved in HSV-1 nuclear egress. To test this hypothesis, we quantified viral particles in the nucleus and cytoplasm of infected cells by electron microscopy. Vero cells were infected with KOS or UL24X at an MOI of 10, and at 12 hpi were fixed and processed for electron microscopy. We observed nucleocapsids in the cytoplasm and nuclei of both KOS- and UL24X-infected cells (Fig. 5); however, fewer viral particles were detected in the cytoplasm of UL24X-infected cells than in those infected with KOS. Nuclear capsids and cytoplasmic particles were quantified in randomly selected cells from three separate infections per virus. At least 29 nuclei in total were counted for each virus (Table 1). For UL24X-infected cells, the cytoplasm corresponding to each nucleus was determined by equally dividing the space between two nuclei within a syncytium. The average numbers of nuclear and cytoplasmic particles as well as their ratios are indicated for each of the three experiments. The ratio of nuclear to cytoplasmic particles in KOS-infected cells was less than 3.9 in all three experiments. However, in UL24X-infected cells, due to the lower number of cytoplasmic particles, the ratio was above 6.0 or greater for each experiment. Similar ratios of particles were obtained for single UL24X-infected cells that were not part of syncytia and for those that were in syncytia. On average, the ratio of nuclear to cytoplasmic particles was 2.7 in KOS-infected cells and 6.9 in UL24X-infected cells which constituted a statistically significant difference ($P=0.0089$, double sided t -test, $\alpha=0.05$). Thus, the ratio of nuclear to cytoplasmic particles was 2.5-fold higher in UL24X-infected cells when compared to KOS-infected cells, which would be consistent with a defect in nuclear egress.

DISCUSSION

We have previously demonstrated that there are at least two categories of HSV-1 induced nucleolar modifications; UL24-independent and UL24-dependent events (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos and Pearson, 2010). In this study we investigated the involvement of UL24 in the dispersal of B23 and tested the hypothesis that UL24 is involved in nuclear egress of viral particles.

Involvement of UL24 in the dispersal of B23 during infection

Along with the effect of UL24 on nucleolin that we have shown previously (Lymberopoulos and Pearson, 2007), our finding that UL24 is involved in the dispersal of B23, brings to two the number of UL24-dependent nucleolar modifications induced by HSV-1 infection. Interestingly, both nucleolin and B23 are redistributed throughout the nucleus in the context of HSV-1 infection, and upon ectopic expression of UL24. This suggests that the UL24-induced dispersal of these two nucleolar proteins may involve a similar mechanism.

Infection with the wild-type strain of HSV-1 also induced the dispersal of B23 and nucleolin in non-immortalized HFF cells. Since the dynamics of these nucleolar modifications are maintained among different cell types, this supports the notion that these changes to the host cell are biologically significant. Supporting this hypothesis is our previous finding that the endonuclease motif of UL24, which is important for both nucleolin and B23 dispersal, is also important for efficient viral replication in cell culture (Bertrand et al., 2010) and in a mouse model of infection (Leiva-Torres, Rochette, and Pearson, 2010). The mechanism involved in these nucleolar modifications, either in cultured cell lines or *in vivo*, remains to be established.

Importance of highly conserved residues and the PD-(D/E)XK motif of UL24 for B23 dispersal

The N-terminal conserved domain of UL24 contains a PD-(D/E)XK endonuclease motif. Although to date no nuclease activity has been attributed to UL24, conserved

residues corresponding to the catalytic domain in other members of this family were shown to be important for the ability of HSV-1 UL24 to induce the dispersal of nucleolin (Bertrand et al., 2010). We found that viruses harbouring the E99A/K101A and I97A/I98A substitutions in UL24, which target or are directly adjacent to the putative catalytic domain, were deficient in their capacity to disperse B23. The Y26A and H22L substitutions, which are proposed to be important for substrate specificity, were also important for this dispersal, although H22L had a less dramatic effect. The E69A/V70A substitutions, which are highly conserved residues, also had a dramatic effect on B23 dispersal. Similarly to nucleolin, the Q117A, G121A, Q124A/L125A and Q154A substitutions had little impact for the dispersal of B23. Therefore, substitutions in the highly conserved amino acids that are part of the endonuclease motif or that play a role in substrate specificity had a similar, although not identical, effect on the capacity of UL24 to disperse both nucleolin and B23. For the most part, substitutions in other highly conserved residues of UL24 also had a similar effect on nucleolin and B23 dispersal.

The importance of the endonuclease motif for B23 dispersal was also true in the context of infection. The vUL24-E99A/K101A mutation caused a similar decrease in B23 dispersal to that observed for UL24X. However, vUL24-G121A only had a moderate impact, where different dispersal phenotypes are observed. Therefore, the E99 and K101 residues of UL24 are important for the ability of HSV-1 to disperse B23 in addition to nucleolin. This mutation has been shown to cause a decrease in viral titers and be important for the role of UL24 *in vivo* (Bertrand et al., 2010; Leiva-Torres, Rochette, and Pearson, 2010), which suggests that the impact of UL24 on nucleoli affects viral pathogenesis.

Importance of UL24 for efficient nuclear egress

In cell culture, a defect in UL24 expression results in a fivefold decrease in viral yield in a single cycle of infection (Jacobson et al., 1998). We found that the ratio of nuclear to cytoplasmic particles was almost 4-fold higher in UL24X-infected cells compared to KOS-infected cells. This difference was mainly due to a reduction in the number of cytoplasmic particles observed in UL24X-infected cells. Several aspects of viral replication are important for efficient HSV nuclear egress, such as the state of the

packaged DNA, intranuclear movements, and effects on the nuclear lamina (Martinez et al., 1996; Scott and O'Hare, 2001; Shao, Rapp, and Weller, 1993; Vlazny, Kwong, and Frenkel, 1982). HSV-1 alkaline nuclease UL12 mutant viruses replicate poorly in cell culture, and despite the nearly wild type levels of DNA synthesis and processing, they are deficient in nuclear egress of nucleocapsids (Martinez et al., 1996; Shao, Rapp, and Weller, 1993). The absence of UL12 appears to result in the generation of more complex replicative intermediates of concatemeric DNA, with an increased frequency of branches, and also in structural abnormalities in the genomes of progeny virions (Martinez et al., 1996; Porter and Stow, 2004). Given these observations, it has been suggested that UL12 plays a role in the resolution of recombination intermediates prior to DNA packaging. The mechanism involved in the reduction of nuclear egress in cells infected with the UL24-deficient virus remains to be determined. It is unlikely that UL12 and UL24 have redundant functions, at least in the same type of cells, since the absence of UL12 has a more dramatic effect on replication. However, UL24 may play a more important role in nuclear egress in other cell lines. A deficiency in UL24 expression has a dramatic effect *in vivo*, where it is important for high viral titers in neurons and for reactivation (Jacobson et al., 1998). Therefore, it is possible that its role in nuclear egress may be even more apparent in neurons than it is in fibroblasts.

Recently, it has been shown that siRNA-mediated knockdown of nucleolin in HSV-1-infected cells results in a reduction in capsid accumulation and nuclease resistant viral DNA in the cytoplasm (Sagou, Uema, and Kawaguchi, 2010); however, this knockdown had little effect on capsids and viral DNA in the nucleus, suggesting impairment of nuclear egress of HSV-1 nucleocapsids. Sagou *et al.* observed a four-fold decrease of cytoplasmic particles in nucleolin-depleted cells that were infected with the wild type virus. In our study, we observed a similar decrease in cytoplasmic particles in cells infected with the UL24-deficient strain. Because UL24 is implicated in the redistribution of B23 and of nucleolin, it is possible that UL24 plays a role in nuclear egress through its effect on nucleoli. The mechanism by which nucleolin affects HSV-1 nuclear egress remains unknown. Since nucleolin was shown to interact with UL12 in infected cells, it was proposed that this nucleolar protein might modify the ability of UL12 to process viral DNA (Sagou, Uema, and Kawaguchi, 2010). Another model that

was proposed was that during infection, redistributed nucleolin promotes nuclear egress by modifying the nuclear lamina, allowing access to the nucleocapsids. We have not yet detected a direct interaction between nucleolin and UL24, and the link between UL24 and UL12, if any, remains to be determined.

In conclusion, our study has shown that UL24 is involved in the dispersal of B23 in HSV-1 infected cells. The similarities between the effect of UL24 on nucleolin and B23 suggest that these nucleolar proteins may be involved in some of the same processes during infection, although a link between B23 and nuclear egress remain to be determined. As for nucleolin, we found that the endonuclease motif of UL24 was important for the relocalization of B23 during infection. Because mutations targeting this motif have been shown to affect the efficiency of viral replication, our results suggest that the dispersal of B23 during infection is biologically significant. Further studies are required to determine whether there is a connection between the putative endonuclease activity of UL24 and its effect on nuclear egress.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cells

The HSV-1 strains KOS, UL24XG (Jacobson et al., 1998) were obtained from Donald M. Coen (Harvard Medical School). vUL24-E99A/K101A isolates a and b and vUL24-G121A isolates a and b are described elsewhere (Bertrand et al., 2010). All viruses were propagated on Vero cells (African green monkey kidney cells) grown in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) containing 4500 mg/L of glucose and supplemented with 5% newborn calf serum and the antibiotics penicillin and streptomycin. COS-7 cells were grown in the same media as Vero cells. HFF cells, non-immortalized human foreskin fibroblasts, were also grown in the same media but containing 10% foetal bovine serum. Cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C.

Antibodies

The primary antibodies used were as follows: rat monoclonal anti-HA (Roche), mouse monoclonal anti-B23, mouse monoclonal anti-nucleolin, and mouse monoclonal anti-UBF (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies used at a concentration of 1:500 were as follows: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 and goat anti-rat IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

Immunostaining and fluorescence microscopy

Vero cells or HFF cells were grown on coverslips and infected at an MOI of 10 with either KOS, UL24XG, vUL24-E99A/K101A, or vUL24-G121A. At the indicated hpi, cells were fixed and stained essentially as described previously (Lymberopoulos and Pearson, 2007). Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min. Fixed cells were stored at 4 °C overnight in PBS. Cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X-100 diluted in PBS for 10 min, washed twice with PBS, and then blocked with NATS (20% NCS and 0.5% Tween 20 in

PBS) for 30 min. Incubation with the appropriate primary antibody was carried out in a humidified chamber at 37 °C for 1 h. Cells were washed 4×5 min in PBS and incubated with the secondary antibody and Draq5 (Biostatus limited) diluted at 1:250 (to stain nuclei) for 1 h. Coverslips were washed as described above and were mounted on microscope slides using ProlongGold antifade reagent (Invitrogen). For the confocal images, cells were visualized using the BioRad Radiance 2000 confocal with an argon–krypton laser at 488 and 568 nm (diode 638) mounted onto the Nikon E800 microscope (100× objective, N.A. 1.4). Figures based on the TIF files of images were assembled using Adobe Photoshop.

Transfections

Transient transfection of COS-7 cells were carried out essentially as described previously (Bertrand et al., 2010). Essentially, 1×10^5 cells were seeded per well in six-well plates and were transfected the following day using 0.2 µg of pLBPfl-HA-UL24 or a mutant version using Lipofectamine transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two days post-transfection, cells were fixed and stained as described above.

Electron microscopy of infected cells

Vero cells were infected with either KOS or UL24XG at an MOI of 10. At 12 hpi cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 30 min, harvested and washed with cacodylate buffer containing 3% sucrose. A second fixation was performed in 1.3% osmium tetroxide. Samples were dehydrated by sequential passages in 25, 50, 75 and 95% acetone. Samples were then submersed in Spurr resin:acetone and followed by a submersion in SPURR only. Samples were then heated at 65°C for 30 hrs to allow polymerization of the resin. Thin sections of the samples were obtained using an ultramicrotome. Sections were placed on formvar-carbon coated grids. Samples were visualized using a Hitachi 7100 transmission electron microscope. Three grids were

analyzed for KOS and 4 grids for UL24X. Electron microscopy was carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier electron microscopy facility.

Acknowledgements

We thank D. M. Coen (Harvard Medical School) for viral strains KOS and UL24X. M.H.L. was supported by graduate scholarships from the National Science and Engineering Research Council of Canada and the Fondation de la Recherche en Santé du Québec. A.B. was supported by a graduate scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (C.I.H.R.) This research was funded through an infrastructure grant from the Canada Foundation for Innovation (#9991) and an operating grant from the C.I.H.R. (MOP 82924) to A.P.

REFERENCES

- Belin, S., Kindbeiter, K., Hacot, S., Albaret, M. A., Roca-Martinez, J. X., Therizols, G., Grosso, O., and Diaz, J. J. (2010). Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* **16**(1), 131-40.
- Bertrand, L., Leiva-Torres, G. A., Hyjazie, H., and Pearson, A. (2010). Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**(1), 109-18.
- Bertrand, L., and Pearson, A. (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.
- Besse, S., and Puvion-Dutilleul, F. (1996a). Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* **71**(1), 33-44.
- Besse, S., and Puvion-Dutilleul, F. (1996b). Intracellular retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1), 119-29.
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7), 574-85.
- Calle, A., Ugrinova, I., Epstein, A. L., Bouvet, P., Diaz, J. J., and Greco, A. (2008). Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **82**(10), 4762-73.
- Jacobson, J. G., Chen, S.-H., Cook, W. J., Kramer, M. F., and Coen, D. M. (1998). Importance of the Herpes Simplex Virus *UL24* Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* **242**(1), 161-169.
- Jacobson, J. G., Martin, S. L., and Coen, D. M. (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.
- Leiva-Torres, G. A., Rochette, P. A., and Pearson, A. (2010). Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* **91**(Pt 5), 1109-16.
- Lopez, M. R., Schlegel, E. F., Wintersteller, S., and Blaho, J. A. (2008). The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* **136**(1-2), 175-88.
- Lymberopoulos, M. H., and Pearson, A. (2007). Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**(2), 397-409.
- Lymberopoulos, M. H., and Pearson, A. (2010). Relocalization of Upstream Binding Factor to viral replication compartments is UL24-independent, and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis. *J Virol.*
- Martinez, R., Sarisky, R. T., Weber, P. C., and Weller, S. K. (1996). Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J Virol* **70**(4), 2075-85.
- Mongelard, F., and Bouvet, P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* **17**(2), 80-6.

- Morency, E., Sabra, M., Catez, F., Texier, P., and Lomonte, P. (2007). A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *J Cell Biol* **177**(5), 757-68.
- Pearson, A., and Coen, D. M. (2002). Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* **76**(21), 10821-10828.
- Porter, I. M., and Stow, N. D. (2004). Virus particles produced by the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12 contain abnormal genomes. *J Gen Virol* **85**(Pt 3), 583-91.
- Roizman, B., and Knipe, D. M. (2001). Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 3280-2vols. Lippincott Williams & Wilkins.
- Sagou, K., Uema, M., and Kawaguchi, Y. (2010). Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J Virol* **84**(4), 2110-21.
- Scott, E. S., and O'Hare, P. (2001). Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**(18), 8818-30.
- Shao, L., Rapp, L. M., and Weller, S. K. (1993). Herpes simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus. *Virology* **196**(1), 146-62.
- Silverstein, S., and Engelhardt, D. L. (1979). Alterations in the protein synthetic apparatus of cells infected with herpes simplex virus. *Virology* **95**(2), 334-42.
- Stenberg, R. M., and Pizer, L. I. (1982). Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**(2), 474-87.
- Stow, N. D., Evans, V. C., and Matthews, D. A. (2009). Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* **90**(Pt 1), 69-73.
- Vlazny, D. A., Kwong, A., and Frenkel, N. (1982). Site-specific cleavage/packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full-length viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(5), 1423-7.
- Wagner, E. K., and Roizman, B. (1969). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**(1), 36-46.

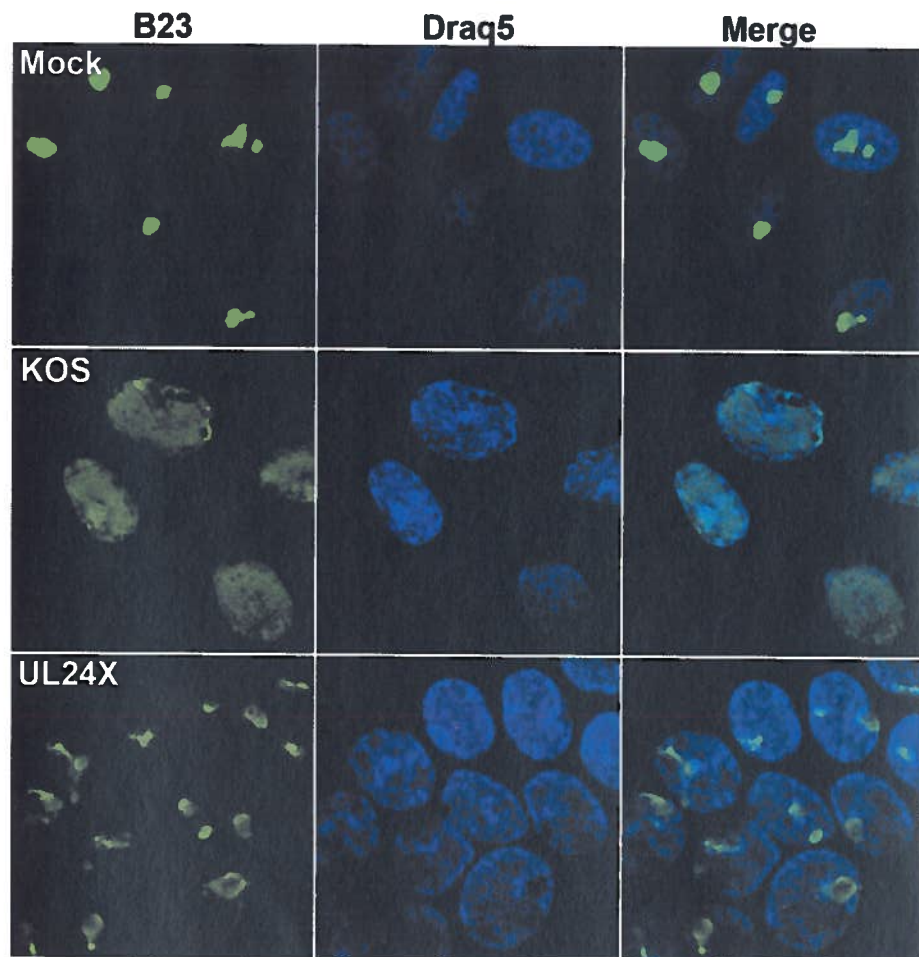


Fig. 1. Effect of UL24 on B23 dispersal. (A) Confocal images of Vero cells either mock-infected or infected with the indicated virus. Cells were immunostained at 18 hpi for B23 (green) and nuclei were stained with Draq5 (blue). In each set of three panels, the left, middle and right-hand panels correspond to B23, Draq5 and the merge image respectively.

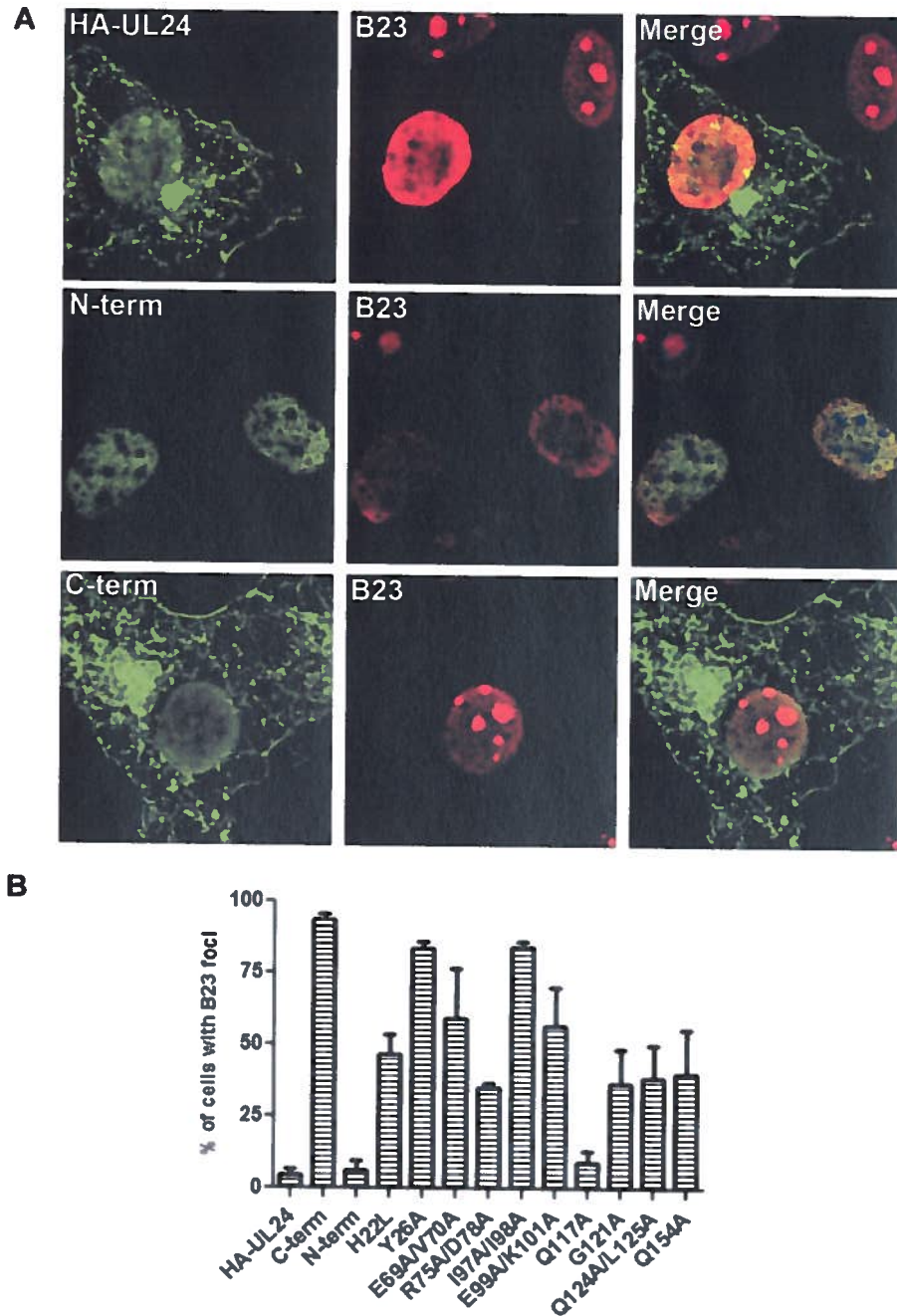


Fig. 2. Impact of UL24 mutations on B23 distribution patterns. (A) Confocal images of COS-7 cells transiently transfected with HA-UL24 or the N- and C-terminal portions of UL24 fused to an HA tag. Cells were immunostained for HA (green) and B23 (red). (B) Quantification of B23 distribution patterns in COS-7 cells transiently expressing different forms of HA-UL24 carrying the indicated amino acid substitutions. Two days post-transfection, cells were immunostained for HA and B23. Error bars represent standard error of the mean.

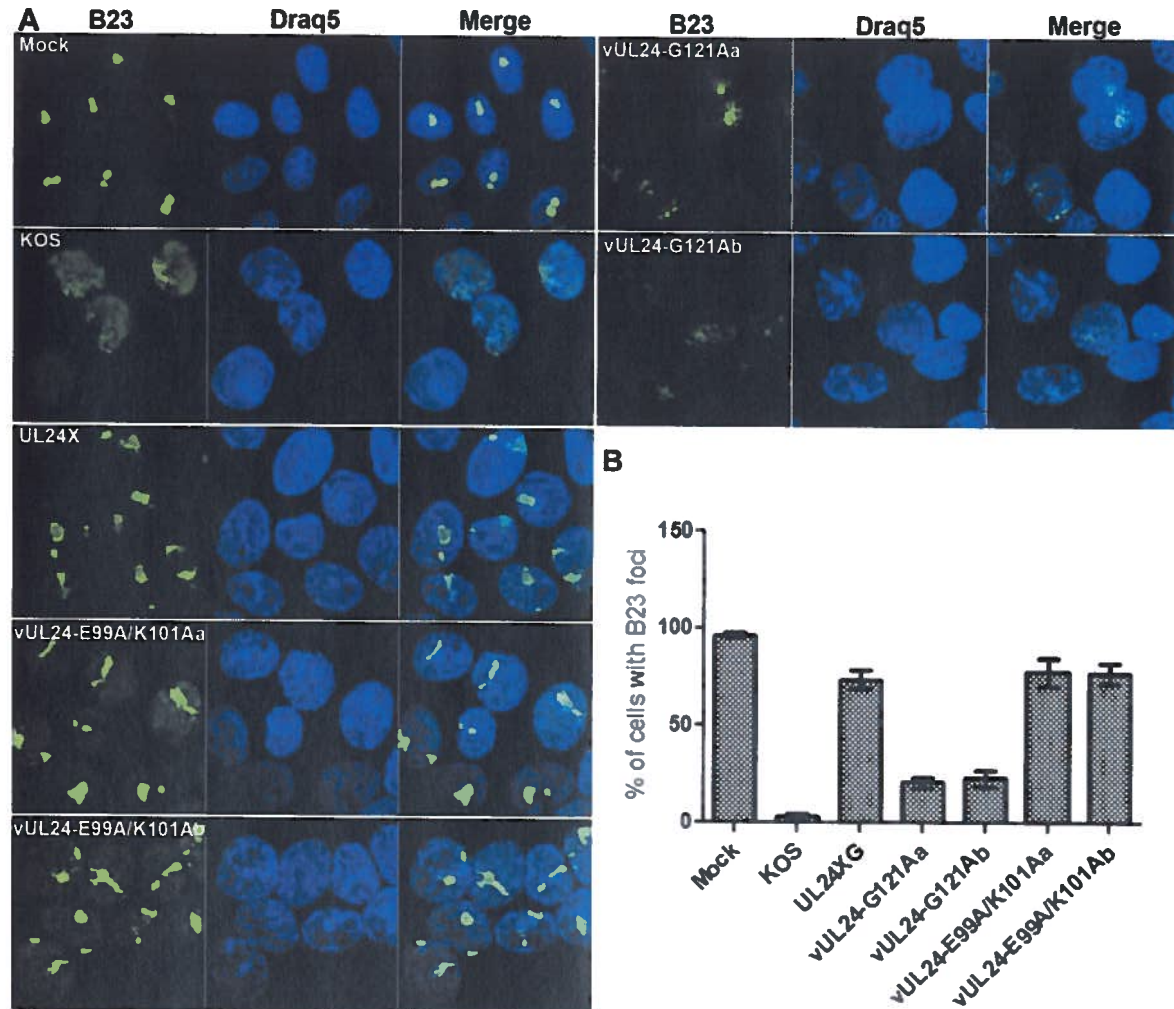


Fig. 3. Impact of UL24 mutant viruses on B23 distribution. (A) Confocal images of Vero cells either mock-infected or infected with the indicated virus at an MOI of 10. Cells were immunostained at 18 hpi for B23 (green) and nuclei were stained with Draq5 (blue). Left-hand panels show B23 localization, center panels show Draq5 staining, and right-hand panels show the merged image. (B) Quantification of B23 distribution patterns in Vero cells either mock-infected or infected with the indicated virus at an MOI of 10. Error bars represent standard error of the mean.

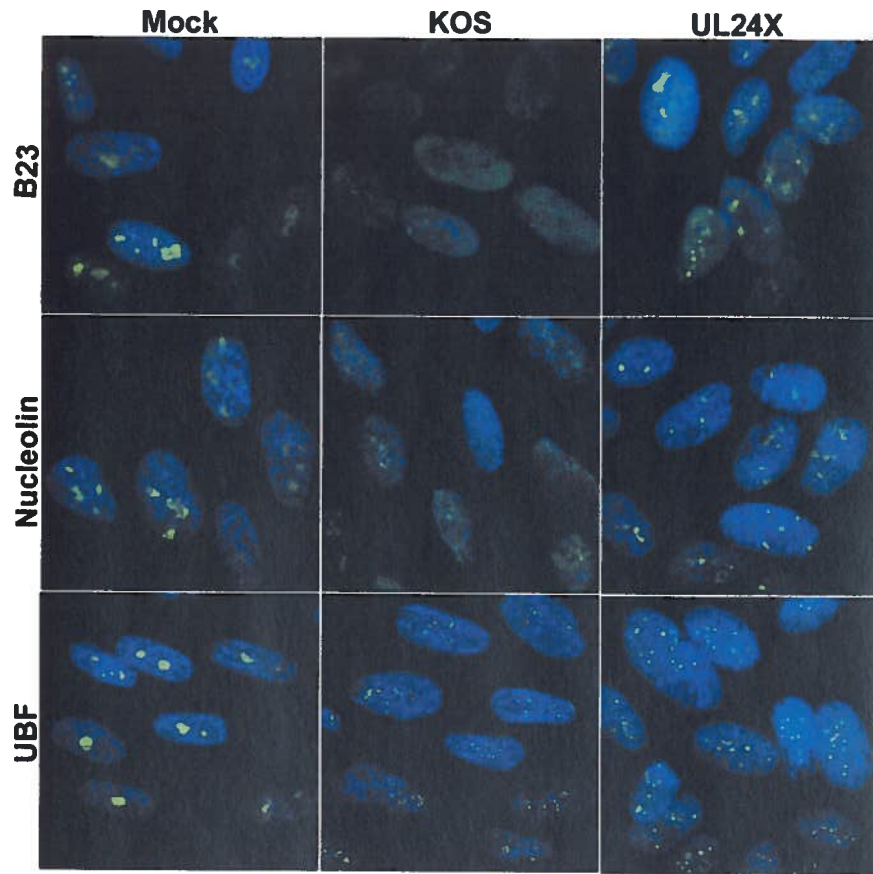


Fig. 4. Redistribution of nucleolar proteins in HSV-1-infected HFF cells. Confocal images of HFF cells either mock-infected or infected with the indicated virus at an MOI of 10. Cells were immunostained at 18 hpi for nucleolin (top panels), B23 (middle panels), or UBF (bottom panels) (green). Nuclei were stained with Draq5 (blue).

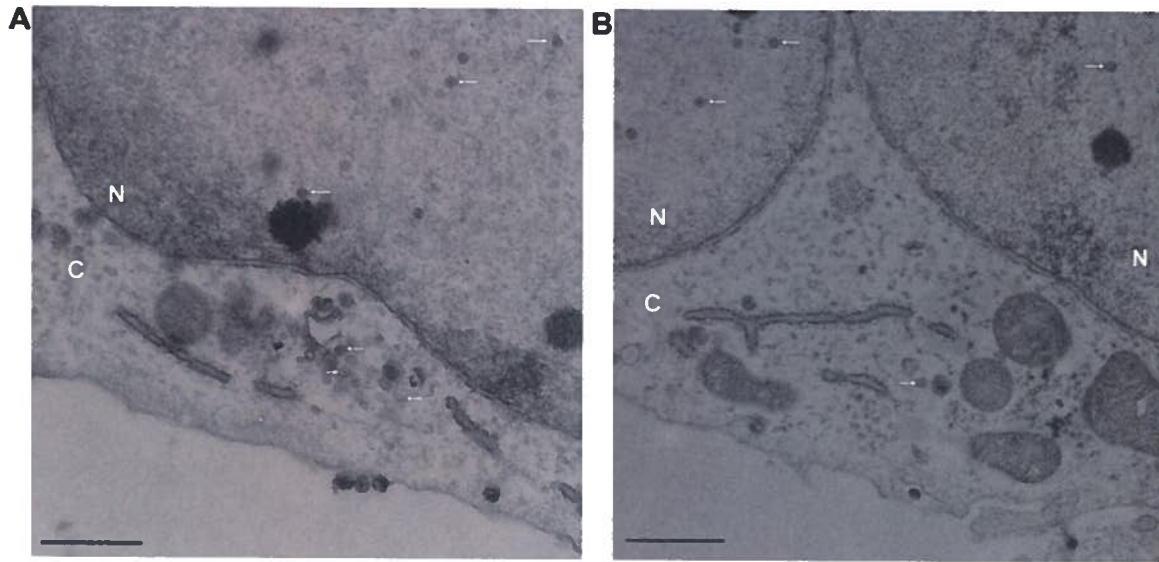


Fig. 5. Electron micrographs of HSV-1 infected cells. Electron microscopy of a KOS-infected cell (A) and UL24X-infected cells (B). Arrows indicate some of the particles within the nucleus (N) and the cytoplasm (C). Scale bar: 1 μ m.

TABLE 1. Quantitation of nuclear capsids and cytoplasmic particles in KOS- and UL24X-infected cells

Virus	Experiment no.	No. of nuclei counted	No. of capsids per nucleus ^a	No. of cytoplasmic particles per nucleus ^a	No. of particles in nucleus/cytoplasm
KOS	1	10	38.2	22.3	1.7
KOS	2	10	48.9	19.6	2.5
KOS	3	10	77.2	19.6	3.9
UL24XG	1	12	32.5	4.9	6.6
UL24XG	2	7	60.6	7.6	8.0
UL24XG	3	10	35.2	5.9	6.0

^aNumbers represent average capsids or particles counted per nucleus within one experiment. For UL24X-infected cells, the cytoplasm of each nucleus was determined by equally dividing the space between two nuclei within a syncytium.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5. Discussion

Le but de cette étude a été de déterminer l'impact de l'infection par le VHS-1 sur le nucléole et de déterminer le rôle de UL24 dans ces modifications. Pour ce faire, le virus HA-UL24 a été utilisé pour déterminer la localisation de UL24 dans les cellules infectées. L'effet du VHS-1 sur diverses protéines du nucléole a été étudié par immunofluorescence sur des cellules infectées. La contribution de UL24 dans les modifications au nucléole a été déterminée en utilisant le virus UL24X, qui est déficient en UL24, en comparaison avec le virus sauvage KOS. Afin de déterminer l'importance des acides aminés hautement conservés de UL24 et de son motif d'endonucléase sur les modifications au nucléole, des plasmides d'expression contenant des mutations dans UL24 ainsi que des virus mutants ont respectivement été testés en contexte de transfection ou d'infection. En plus, l'effet de UL24 sur la sortie des nucléocapsides du noyau a été déterminé.

5.1 Localisation de UL24 en contexte d'infection

La génération du virus recombinant vHA-UL24 nous a permis de visualiser la localisation de UL24 pendant l'infection par immunofluorescence indirecte (168). Ce virus se réplique de manière similaire au virus sauvage, ne forme pas de syncytia, et la protéine HA-UL24 est exprimée à des niveaux similaires que UL24 dans le virus sauvage. De plus, l'insertion de l'épitope HA n'a pas empêché l'activité de la TK virale, dont le gène chevauche celui de *UL24*.

En effectuant une cinétique d'infection, nous avons détecté UL24 à partir de 6 hpi. Dans l'étude de Pearson *et al.*, UL24 a été détectée seulement à 9 hpi par immunobuvardage de type Western (219). Cette différence est probablement due à une meilleure sensibilité de l'essai d'immunofluorescence ainsi qu'à une meilleure affinité de l'anticorps commercial utilisé contre l'épitope HA. Dans nos essais, nous avons déterminé qu'à 9 hpi, UL24 se localise en foyer dans le noyau et en petits points dans le cytoplasme. En effectuant des co-marquages, nous avons déterminé que ce marquage dans le noyau représente en fait le nucléole. À ce temps, UL24 co-localise, au moins partiellement, avec deux marqueurs nucléolaires, la nucléoline et la fibrillarine. La

localisation exacte de UL24 à l'intérieur du nucléole est difficile à évaluer puisque l'infection par le VHS-1 modifie sa morphologie et en plus, on sait maintenant que la composition du nucléole est aussi affectée. Par exemple, dans des cellules non-infectées en interphase, la fibrillarine est localisée principalement aux DFC et la nucléoline aux DFC et GC, mais on ne sait pas si à 9 hpi, ces deux marqueurs se retrouvent toujours dans ces sous-structures du nucléole.

Notre équipe a aussi détecté UL24 dans le nucléole en contexte de transfection transitoire, dans une minorité de cellules (17). Cette étude a démontré qu'un fragment correspondant aux 60 premiers acides aminés de UL24, qui se retrouvent dans son extrémité N-terminale, peuvent médier la localisation d'une protéine hétérologue au nucléole. Il n'est pas connu si UL24 se rend au nucléole seul ou via son interaction avec une autre protéine, soit cellulaire ou virale. Par la suite, Salsman *et al.* ont aussi observé une localisation similaire de UL24 en contexte de transfection transitoire (252). Les homologues de UL24 du VHS-2 et du HCMV, nommés UL24 et UL76 respectivement, ont aussi été détectés au nucléole en contexte de transfection (113, 313).

Les autres protéines du VHS-1 qui ont été détectées au nucléole sont US11, UL12, ICP27, ICP0, ICP4, VP22, UL27.5 et ICP34.5 (44, 151, 166, 171, 195, 230, 240, 246, 251, 252). Ces protéines virales ont des rôles variés pendant l'infection et il n'est pas encore connu s'il y a un lien entre une de ces protéines et UL24. Toutefois, US11, ICP27, ICP4 et ICP0 jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux, ce qui pourrait suggérer que UL24 a une fonction régulatrice. UL76 du HCMV, l'homologue de UL24, module l'expression de certains gènes rapporteurs en essais de transfection transitoire (313). Il est intéressant de noter que UL12, une alcaline nucléase virale, contient un motif d'endonucléase du même type que celui identifié dans UL24 (136). UL12 est important pour la réplication et l'encapsidation de l'ADN viral (224). Puisque UL24 possède un motif d'endonucléase, il pourrait partager des fonctions avec UL12. Ces possibilités seront discutées plus loin (section 5.5).

La localisation de UL24 au nucléole est transitoire puisqu'à 12 hpi très peu de foyers de UL24 au noyau sont détectés (168). Entre 9 et 15 hpi, l'intensité globale du signal de UL24 augmente et le marquage se retrouve au noyau ainsi qu'au cytoplasme. Cette distribution au noyau et au cytoplasme est similaire à celle démontrée

précédemment par fractionnement où 50 à 70% de UL24 était associé au noyau entre 9 et 15 hpi (219). Par la suite, à 18 hpi, UL24 se retrouve surtout en périphérie du noyau (168). Ces observations concordent avec ce qui a été observé en contexte de transfection, où dans la majorité des cellules, UL24 se retrouve de manière diffuse dans le noyau ainsi que dans le *trans*-Golgi (17). Nous n'avons pas observé de co-localisation entre UL24 et le *trans*-Golgi dans les cellules Vero infectées (données non-publiées), mais le Golgi est fragmenté par l'infection dans ces cellules (7, 36). Donc, il se peut que UL24 en contexte d'infection se retrouve dans une autre structure cytoplasmique ou dans des vésicules reliées au Golgi qui ont été modifiées par le virus. Ces données concordent aussi avec les observations que les homologues de UL24 du VZV (gp35) et du gammaherpèsvirus murin 68 (ORF20) ont été détectés de manière diffuse dans le noyau (118, 201).

Une souche virale qui est déficiente en UL24 produit un phénotype plaques syncytiales (*syn*). Ce phénotype suggère que UL24 est impliquée dans des événements de fusion lors de l'infection. En fait, UL24 semble inhiber la fusion aberrante des cellules lors de l'infection. D'autres gènes du VHS-1 dont on peut trouver des mutations associées à un phénotype *syn* sont *gB*, *gK* et *UL20* (134). *gB* est impliqué dans l'entrée et dans la sortie des virions de la cellule, tandis que *UL20* et *gK* sont impliqués dans l'enveloppement secondaire des virions (8, 34, 83, 116, 124, 329). Le marquage périnucléaire de UL24 tard dans l'infection est similaire au patron de distribution de *UL20* et *gK* (116, 315). Ceci suggère que UL24 pourrait jouer un rôle dans une des étapes de la maturation des virions dans le cytoplasme (219). À ce jour, une co-localisation entre une des autres protéines *syn* et UL24 n'a pas encore été déterminée.

5.2 Effet du VHS-1 et la contribution de UL24 dans la relocalisation des protéines du nucléole

Il est connu que l'infection par le VHS-1 affecte la morphologie et la fonction du nucléole. Avant le début de cette étude, peu était publié sur les modifications induites aux protéines nucléolaires par le VHS-1. Depuis le début de cette étude, on a observé une croissance accrue dans l'intérêt du rôle du nucléole lors de l'infection par le VHS-1. Une discussion des résultats de cette thèse en contexte des articles publiés dans les dernières années seront discutés ci-bas.

Nous avons démontré que la nucléoline est dispersée pendant l'infection et que cette modification dépend de l'expression de UL24 (168). On a observé une légère altération de la nucléoline à 9 hpi, tandis qu'à 18 hpi, cette protéine nucléolaire était dispersée à travers le noyau. Suite à notre article, cet effet a aussi été décrit par López *et al.* et Sagou *et al.*, qui ont remarqué la dispersion de la nucléoline à des heures tardives de l'infection (166, 251). Callé *et al.* (35) ont proposé que ICP4 est responsable de la redistribution de la nucléoline pendant l'infection. ICP4 est une protéine immédiat-précoce qui agit en tant que transactivateur et joue un rôle important dans l'expression des protéines précoces et tardives (244). Il serait donc attendu qu'en absence de ICP4, l'expression de UL24 serait affectée et donc ne pourrait pas agir au niveau de la redistribution de la nucléoline. Le rôle de ICP4 sur la nucléoline serait donc un effet indirect dû à sa fonction régulatrice.

Nous avons aussi observé une redistribution de B23 similaire à celle de la nucléoline lors de l'infection (chapitre 4). Ce résultat concorde avec celui déjà décrit sur B23 tardivement dans l'infection, où cette protéine est redistribuée à travers le noyau (35, 289). Nous avons démontré que UL24 intervient aussi dans la relocalisation de cette protéine dans la cellule infectée. La nucléoline et B23 partagent plusieurs fonctions. Les deux interagissent avec des acide nucléiques (70, 92), ils font la navette entre le noyau et le cytoplasme (26), ils sont impliqués dans plusieurs aspects de la biogenèse des ribosomes (278) et ils sont impliqués dans la régulation de la chromatine (6, 213). De plus, il a été démontré par co-immunoprécipitation que la nucléoline interagit avec B23 (156). L'interaction entre ces deux protéines pourrait expliquer les similarités de leur redistribution par UL24 lors de l'infection par le VHS-1.

Il a été suggéré par Callé *et al.* que la nucléoline est redistribuée au cytoplasme pendant l'infection. Nous n'avons pas observé une relocalisation cytoplasmique de la nucléoline dans nos expériences. Leurs résultats s'expliquent probablement par un marquage non-spécifique dû à l'expression de récepteurs Fc, qui sont codés par les gènes viraux *gI* et *gE* (126). Lors de l'infection par le VHS-1, il y a accumulation extensive de *gE/gI* au *trans*-Golgi et aux jonctions cellulaires (2, 66, 181, 327). Ce marquage non-spécifique est souvent plus prononcé quand on utilise des anticorps polyclonaux. Lorsqu'il était nécessaire d'utiliser des anticorps polyclonaux dans nos études

d'immunofluorescence (chapitre 3), nous avons pallié à ce problème en utilisant un sérum humain dans la solution de blocage, qui avait comme effet de diminuer ce signal non-spécifique. Des anticorps monoclonaux contre la nucléoline ont été utilisés dans notre étude ainsi que dans celle de López *et al* (166, 168).

Stow *et al.* et Callé *et al.* (35, 289) ont utilisé des cellules HeLa dans leurs études et ont observé une redistribution de B23 similaire à celle que nous avons obtenue dans les cellules Vero. Les résultats décrivant l'impact du VHS-1 sur la composition nucléaire et la localisation de diverses autres protéines du nucléole ont aussi tous impliqué des lignées immortalisées. Cependant, l'immortalisation des cellules pourrait en soi avoir un effet sur les modifications nucléolaires induites par le VHS-1. Nos résultats dans les cellules HFFs (chapitre 4), qui ne sont pas immortalisées, démontrent que cet effet du virus sur la cellule hôte n'est pas dû à l'immortalisation de celle-ci. Ceci supporte l'idée que ces modifications ont une signification biologique.

Notre laboratoire a démontré que UL24 est suffisant pour induire la dispersion de la nucléoline et de B23 en contexte de transfection (17 et chapitre 4). Donc, en absence d'autres protéines virales, UL24 affecte la distribution de ces deux protéines du nucléole. Le mécanisme par lequel UL24 peut induire cette dispersion, et si cet effet est dû à l'interaction entre UL24 et une ou des protéines cellulaires, n'est pas encore connu. La biogenèse des ribosomes, et surtout la maturation de l'ARNr, est réduite lors de l'infection par le VHS-1 (14, 287, 310). B23, par son activité de ribonucléase, a été impliquée dans la maturation des pré-ARNr (257). La nucléoline a aussi été impliquée dans le clivage des pré-ARNr (91). Une hypothèse serait que UL24, en induisant la dispersion de ces deux protéines nucléolaires, pourrait être responsable de la réduction en ARNr mature observé pendant l'infection. Par contre, la cinétique entre l'effet du VHS-1 sur la biogenèse des ribosomes, et de la redistribution de la nucléoline et de B23, ne coïncide pas. Belin *et al.* (14) ont démontré qu'à 3 hpi la biogenèse des ribosomes était réduite de 70%, tandis que nous avons démontré que la nucléoline se retrouve toujours au nucléole autour de 9 hpi (168). En plus, nous avons seulement commencé à détecter UL24 vers 6 hpi par immunofluorescence (168). Il est donc peu probable que UL24 soit responsable de la diminution des ARNr matures pendant l'infection.

UL24 et certains de ses homologues affectent le cycle cellulaire en induisant un arrêt au stade G₂/M (200, 201). Ces essais ont été effectués en contexte de transfection et donc le rôle de UL24 sur le cycle cellulaire en contexte d'infection n'est pas encore connu. Il a été décrit que pendant la mitose, lorsqu'il y a perte de certaines sous-unités de l'ARNpoll du nucléole, des composantes de maturation, tel que la fibrillarine et B23 se dissocient du nucléole (154). Par contre, dans nos essais, en absence de UL24, les composantes de l'ARNpoll, UBF et RPA194, sont redistribuées tandis que la nucléoline et B23 ne le sont pas. Ceci suggère donc l'implication d'un mécanisme différent pendant l'infection de celui qui survient lors de la division cellulaire.

5.3 Modifications au nucléole indépendantes de UL24

Nous avons déterminé que la redistribution de la fibrillarine pendant l'infection est indépendante de l'expression de UL24 (168). La redistribution de la fibrillarine en points dans le noyau concorde avec ceux de Morency *et al.* (196). Cette équipe a trouvé que certains de ces points se localisent dans les centromères. Cette localisation suggère que la fibrillarine pourrait jouer un rôle au niveau des dommages causés aux centromères pendant l'infection par le VHS-1 (196). Par immunomarquage à l'or, il a été observé auparavant que l'intensité du marquage pour la fibrillarine augmente pendant l'infection dans des fibroblastes de lapins et qu'elle se localise dans les corps denses viraux en plus du nucléole (165). Dans nos essais, nous n'avons pas observé une augmentation du signal pour cette protéine. Cette différence ne peut pas être attribuée à la souche utilisée puisque KOS a été utilisée dans les deux études. Il se peut que la différence soit plutôt due à la lignée cellulaire utilisée.

Nous avons démontré dans la deuxième publication de cette thèse que deux composantes de la machinerie de l'ARNpoll, UBF et RPA194, sont redistribuées pendant l'infection par le VHS-1 (169). Nos résultats concordent avec ceux de Stow *et al.* (289) sur la redistribution de UBF aux CRs viraux. De plus, nous avons démontré que UBF et RPA194 demeurent associés pendant leur redistribution. Ceci est en contraste avec les données de Stow *et al.* qui décrivent une relocalisation séparée de l'ARNpoll, ciblant possiblement la sous-unité RPA43, et de UBF. Par contre, nous avons utilisé des anticorps contre RPA194, qui est la plus grosse sous-unité de l'ARNpoll en plus d'être

une sous-unité catalytique. Il se peut donc que le VHS-1 induit une dissociation de certaines sous-unités de l'ARNpoll, qui se relocalisent séparément pendant l'infection.

Comme pour la fibrillarine, nous avons trouvé que la redistribution de UBF et de RPA194 est indépendante de l'expression de UL24 (169). Même si la morphologie de la redistribution de la fibrillarine et de UBF est similaire, leur cinétique et leur localisation suite à l'infection diffère. On observe la redistribution de UBF à partir de 3 hpi, tandis que celle de la fibrillarine survient un peu plus tard. Il semble donc y avoir différents mécanismes impliqués dans leur relocalisation. À date, nous avons trouvé que la redistribution de UBF et de RPA194 semble débiter avant la réplication de l'ADN viral. Le mécanisme impliqué dans cette redistribution ainsi que le ou les facteurs viraux impliqués restent à être déterminés.

Par essais d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons démontré qu'une partie de UBF reste associée à l'ADNr suite à l'infection, malgré la redistribution d'une grande partie de la protéine aux compartiments de réplication viraux (169). Ces données concordent avec le fait que même s'il y a une réduction dans la synthèse des ARNr matures suite à l'infection par le VHS-1, l'ADNr continue d'être transcrit (14, 287, 289).

On a détecté UBF dans les CRs, en co-localisation avec ICP8, à partir de 5 hpi. Plus l'infection progresse et que les CRs fusionnent, plus nous avons détecté de UBF dans ces compartiments. Stow *et al.* ont proposé que la partie de UBF qui est recrutée aux CRs est impliquée dans la réplication de l'ADN viral (289). Par contre, nous n'avons pas détecté de UBF dans les sites de réplication de l'ADN viral à 4 hpi (169). Donc, la synthèse de l'ADN viral tôt dans l'infection survient en absence apparente de UBF. UBF pourrait, par contre, être impliqué dans ce processus viral soit plus tard dans l'infection, soit de manière indirecte. Les structures induites par le VHS-1 contenant UBF et l'ARNpoll font penser aux pseudo-NORs, qui sont des complexes formés sur l'ADNr à des sites ectopiques du génome humain (172). La formation des pseudo-NORs est dépendante de l'interaction entre UBF et l'ADNr. Puisque UBF peut altérer la structure de la chromatine (284), UBF qui se retrouve dans les CRs pourrait moduler la structure du génome viral afin de favoriser un stade particulier de la réplication du virus.

5.4 Le motif d'endonucléase de UL24 et son importance dans les modifications nucléolaires

Notre laboratoire a démontré qu'en contexte de transfection, les résidus hautement conservés qui sont impliqués dans le motif d'endonucléase de UL24 sont importants pour la capacité de cette protéine virale de disperser la nucléoline et B23 (16 et chapitre 4). Similairement à ce qui avait été démontré pour la nucléoline, des substitutions dans les résidus qui ciblent le domaine catalytique (E99A/K101A) ou qui sont directement adjacents (I97A/I98A), ainsi que ceux qui sont proposés d'être importants pour la spécificité du substrat (H22L, Y26A et E69A/V70A), ont un effet prononcé. Ceci supporte la notion que le motif d'endonucléase est particulièrement important pour l'effet de UL24 sur le nucléole. L'importance d'autres résidus hautement conservés dans UL24 pour sa capacité de disperser B23 était variable, comme pour la nucléoline.

En contexte d'infection, comme en transfection, les résidus E99/K101 se sont avérés importants pour la dispersion de B23 (chapitre 4). Par contre, l'effet du résidu G121 était moins dramatique. Ces résultats sont similaires à ceux observés pour la nucléoline (16). Donc, le motif d'endonucléase de UL24 semble être important pour la redistribution de ces deux protéines du nucléole lors de l'infection par le VHS-1. Par contre, plus de mutations dans ce motif doivent être testées et l'activité d'endonucléase de UL24 reste à être démontrée.

La réplication du virus portant la substitution E99A/K101A était réduite à un taux similaire à celui de UL24X, tandis que celle du virus portant la substitution dans le résidu G121A était similaire à KOS, le virus de type sauvage (16). Ces données suggèrent que l'effet de UL24 au niveau du nucléole joue un rôle dans la réplication efficace du virus. Il est donc possible que la nucléoline et/ou B23, ou d'autres protéines cellulaires affectées par UL24 pas encore identifiées, soient importantes pour la réplication du VHS-1. En fait, la nucléoline a été démontré comme étant importante pour la réplication efficace du VHS-1 (35), ainsi que dans la sortie des nucléocapsides du noyau (251). L'importance de B23 dans le cycle de vie du VHS-1 n'est pas encore connue. Ces deux protéines nucléolaires ont été impliquées dans la réplication d'autres virus. Par exemple, B23 stimule la réplication de l'adénovirus (212) tandis que la nucléoline pourrait être

impliquée dans la réplication du poliovirus car cette protéine interagit avec la région 3' non-traduite de son génome (309). Donc, l'impact de UL24 sur la nucléoline et B23 pourrait avoir un lien avec l'importance de UL24 pour la réplication efficace du VHS-1.

5.5 Effet de UL24 sur la sortie des nucléocapsides du noyau

Des comptes de particules virales par microscopie électronique de cellules infectées ont démontré que UL24 est importante pour la sortie efficace des nucléocapsides du noyau (chapitre 4). UL12, une alcaline nucléase du VHS-1, est aussi importante pour la sortie des nucléocapsides du noyau (173, 266). UL12 joue un rôle dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison avant l'empaquetage de l'ADN viral. UL24 pourrait aussi jouer un rôle dans un aspect de la réplication ou de l'empaquetage de l'ADN viral puisque cette protéine a un point isoélectrique de 10.87, ce qui concorderait avec une activité de liaison à l'ADN. Il a été démontré que UL12 se localise aux nucléoles, et peut interagir avec la nucléoline lors de l'infection (251). Puisque la nucléoline peut interagir et réguler une variété d'enzymes cellulaires et viraux (58, 132, 263, 271), il a été suggéré qu'elle peut interagir avec UL12 et modifier sa capacité de traiter l'ADN viral (251). La nucléoline pourrait donc aussi modifier la fonction putative d'endonucléase de UL24. Un autre modèle qui a été proposé est que la nucléoline redistribuée pendant l'infection promouvoit la sortie des nucléocapsides en modifiant la lamina nucléaire, leur facilitant ainsi l'accès à la membrane nucléaire (251). Le mécanisme par lequel UL24 pourrait affecter la sortie des nucléocapsides du noyau, et s'il y a un lien entre UL24 et UL12, reste à être déterminé.

5.6 Modèle des modifications nucléolaires induites par le VHS-1 et le rôle de UL24 dans l'infection

À ce jour, il semble y avoir au moins deux catégories de modifications nucléolaires induites par le VHS-1; UL24-indépendantes et UL24-dépendantes. UBF et RPA194 sont relocalisés indépendamment de UL24 et restent associés pendant cette redistribution. UBF et RPA194 commencent à se relocaliser vers 3 hpi, et vers 5 hpi, UBF peut être détecté aux CRs viraux. UBF semble jouer un rôle dans le cycle de vie viral, mais le mécanisme par lequel il agit reste à être élucidé. Peu après, la fibrillarine est

redistribuée à travers le noyau où une partie de celle-ci se retrouve co-localisée avec les centromères.

Nos résultats concordent avec l'hypothèse que UL24 est une protéine multifonctionnelle et semble avoir deux fonctions distinctes lors de l'infection par le VHS-1. Sa localisation au nucléole ainsi qu'au cytoplasme concorde avec cette hypothèse (17, 168, 219). En premier lieu, UL24 se localise au nucléole de manière transitoire pendant l'infection, et participe au remodelage de cette organelle, dont la dispersion de la nucléoline et de B23 (16, 17, 168 et chapitre 4). Le motif d'endonucléase de UL24 est important pour cette modification et pourrait donc affecter soit directement ou indirectement la localisation de la nucléoline et B23. Ce motif est aussi important pour la réplication efficace du virus *in vitro* et *in vivo* (16, 150). Donc, l'effet de UL24 au niveau du nucléole jouerait un rôle dans la réplication du VHS-1, possiblement en relâchant des facteurs cellulaires qui participent au cycle de vie viral. Nos résultats supportent l'hypothèse que UL24 est importante pour la sortie efficace des nucléocapsides du noyau, possiblement via son impact sur la nucléoline et peut-être aussi B23. Le deuxième rôle de UL24 serait au cytoplasme où cette protéine est importante pour éviter la fusion aberrante des cellules. UL24 pourrait affecter la localisation ou l'expression de protéines virales qui sont impliquées dans des événements de fusion qui surviennent lors de l'infection. De plus, en contexte de transfection transitoire UL24 se localise dans des vésicules reliées au golgi, ce qui suggère que cette protéine virale pourrait aussi jouer un rôle au niveau de la maturation des particules virales.

Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons identifié deux catégories de modifications nucléolaires induites par le VHS-1; UL24-dépendantes et UL24-indépendantes. Les protéines nucléolaires qui sont redistribuées indépendamment de l'expression de UL24, UBF, RPA194 et la fibrillarine, pourraient jouer un rôle dans le cycle de vie du virus tôt dans l'infection. Les facteurs viraux impliqués dans leur redistribution restent à être élucidés. Puisque les structures induites par le VHS-1 contenant UBF et l'ARNpoll font penser aux pseudo-NORs, et que la formation de ceux-ci est dépendante de l'interaction entre UBF et l'ADNr, il serait intéressant de déterminer la localisation de l'ADNr dans les cellules infectées.

Dans la catégorie de modifications nucléolaires dépendantes UL24, on retrouve à ce jour la nucléoline et B23. Il a été démontré que la nucléoline semble jouer un rôle dans la réplication du VHS-1, plus spécifiquement au niveau de la sortie des nucléocapsides du noyau. Nous avons déterminé que UL24 est aussi importante pour cette étape de la réplication virale et que cet effet pourrait être dû à son effet sur la nucléoline pendant l'infection. Le mécanisme par lequel la nucléoline affecte la réplication virale ainsi que l'importance de B23 pour le VHS-1, reste à être déterminé.

La localisation de UL24 change au cours de l'infection. Sa localisation transitoire au nucléole semble induire plusieurs changements au niveau de ce sous-compartiment. Le motif d'endonuclease de UL24 est important pour induire ces changements et semble aussi être important pour la réplication efficace du VHS-1. Le mécanisme par lequel UL24 peut modifier la localisation de protéines du nucléole doit être élucidé. La localisation de UL24 en périphérie du noyau tard dans l'infection concorde avec l'hypothèse que cette protéine semble être impliquée dans des événements de fusion qui surviennent lors de l'infection par le VHS-1. Il serait intéressant de déterminer si UL24 joue un rôle dans la maturation des particules virales.

Puisque UL24 est surtout importante pour la réplication dans les neurones et pour la réactivation *in vivo*, il serait important de déterminer l'effet de l'infection, et de UL24, sur ce type cellulaire. Finalement, puisque la réplication neuronale et la réactivation du

VHS-1 sont fortement réduites lors de la mutation de UL24, cette protéine pourrait servir de nouvelle cible thérapeutique à combiner avec les traitements courants.

Références

1. **Ahmad, Y., F. M. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley, and A. I. Lamond.** 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* **37**:D181-4.
2. **Alconada, A., U. Bauer, B. Sodeik, and B. Hoflack.** 1999. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol* **73**:377-87.
3. **Alwine, J. C., W. L. Steinhart, and C. W. Hill.** 1974. Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology* **60**:302-7.
4. **Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond, and M. Mann.** 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**:77-83.
5. **Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann, and A. I. Lamond.** 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**:1-11.
6. **Angelov, D., V. A. Bondarenko, S. Almagro, H. Menoni, F. Mongelard, F. Hans, F. Miettton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, S. Dimitrov, and P. Bouvet.** 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J* **25**:1669-79.
7. **Avitabile, E., S. Di Gaeta, M. R. Torrisi, P. L. Ward, B. Roizman, and G. Campadelli-Fiume.** 1995. Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol* **69**:7472-82.
8. **Baines, J. D., P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-24.
9. **Baldick, C. J., Jr., and T. Shenk.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* **70**:6097-105.
10. **Banerjee, R., M. K. Weidman, S. Navarro, L. Comai, and A. Dasgupta.** 2005. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J Gen Virol* **86**:2315-22.
11. **Batterson, W., D. Furlong, and 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**:397-407.
12. **Bazett-Jones, D. P., B. Leblanc, M. Herfort, and T. Moss.** 1994. Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**:1134-7.
13. **Bechtel, J. T., R. C. Winant, and D. Ganem.** 2005. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:4952-64.
14. **Belin, S., K. Kindbeiter, S. Hacot, M. A. Albaret, J. X. Roca-Martinez, G. Therizols, O. Grosso, and J. J. Diaz.** 2010. Uncoupling ribosome biogenesis

- regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* **16**:131-40.
15. **Benavente, R., G. Reimer, K. M. Rose, B. Hugle-Dorr, and U. Scheer.** 1988. Nucleolar changes after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into the nucleus of mammalian cells. *Chromosoma* **97**:115-23.
 16. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**:109-18.
 17. **Bertrand, L., and 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** 1142 - 1151.
 18. **Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C. J. Sherr.** 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* **24**:985-96.
 19. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* **71**:33-44.
 20. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1):119-29.
 21. **Besser, J., M. Ikoma, K. Fabel, M. H. Sommer, L. Zerboni, C. Grose, and A. M. Arvin.** 2004. Differential requirement for cell fusion and virion formation in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection in skin and T cells. *J Virol* **78**:13293-305.
 22. **Blakeney, S., J. Kowalski, D. Tummolo, J. DeStefano, D. Cooper, M. Guo, S. Gangolli, D. Long, T. Zamb, R. J. Natuk, and 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**:10498-10506.
 23. **Bloom, D. C.** 2004. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol* **23**:187-98.
 24. **Bohmann, K., J. Ferreira, N. Santama, K. Weis, and A. I. Lamond.** 1995. Molecular analysis of the coiled body. *J Cell Sci Suppl* **19**:107-13.
 25. **Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A. I. Lamond.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:574-85.
 26. **Borer, R. A., C. F. Lehner, H. M. Eppenberger, and E. A. Nigg.** 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* **56**:379-90.
 27. **Bortz, E., J. P. Whitelegge, Q. Jia, Z. H. Zhou, J. P. Stewart, T. T. Wu, and R. Sun.** 2003. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol* **77**:13425-32.
 28. **Boutell, C., A. Orr, and R. D. Everett.** 2003. PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J Virol* **77**:8686-94.
 29. **Boutell, C., S. Sadis, and R. D. Everett.** 2002. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J Virol* **76**:841-50.

30. **Bugler, B., M. Caizergues-Ferrer, G. Bouche, H. Bourbon, and F. Amalric.** 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem* **128**:475-80.
31. **Bujnicki, J. M., and 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**:219-30.
32. **Burch, A. D., and S. K. Weller.** 2005. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase requires the mammalian chaperone hsp90 for proper localization to the nucleus. *J Virol* **79**:10740-9.
33. **Burch, A. D., and S. K. Weller.** 2004. Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**:7175-85.
34. **Calistri, A., P. Sette, C. Salata, E. Cancellotti, C. Forghieri, A. Comin, H. Gottlinger, G. Campadelli-Fiume, G. Palu, and C. Parolin.** 2007. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol* **81**:11468-78.
35. **Calle, A., I. Ugrinova, A. L. Epstein, P. Bouvet, J. J. Diaz, and A. Greco.** 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **82**:4762-73.
36. **Campadelli, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrisi.** 1993. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2798-802.
37. **Cannavo, G., M. Paiardini, D. Galati, B. Cervasi, M. Montroni, G. De Vico, D. Guetard, M. L. Bocchino, I. Picerno, M. Magnani, G. Silvestri, and G. Piedimonte.** 2001. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. *Blood* **97**:1756-64.
38. **Carvalho, T., J. S. Seeler, K. Ohman, P. Jordan, U. Pettersson, G. Akusjarvi, M. Carmo-Fonseca, and A. Dejean.** 1995. Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* **131**:45-56.
39. **Castiglia, C. L., and S. J. Flint.** 1983. Effects of adenovirus infection on rRNA synthesis and maturation in HeLa cells. *Mol Cell Biol* **3**:662-71.
40. **Challberg, M. D.** 1986. A method for identifying the viral genes required for herpesvirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9094-8.
41. **Chang, J. H., and M. O. Olson.** 1989. A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA. *J Biol Chem* **264**:11732-7.
42. **Chelbi-Alix, M. K., and H. de The.** 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* **18**:935-41.
43. **Chen, M., and A. von Mikecz.** 2000. Specific inhibition of rRNA transcription and dynamic relocation of fibrillarin induced by mercury. *Exp Cell Res* **259**:225-38.

44. **Cheng, G., M. E. Brett, and B. He.** 2002. Signals that dictate nuclear, nucleolar, and cytoplasmic shuttling of the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:9434-45.
45. **Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen.** 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* **64**:881-5.
46. **Coen, D. M., S. P. Weinheimer, and S. L. McKnight.** 1986. A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* **234**:53-9.
47. **Cohen, J. I., S. E. Straus, and A. M. Arvin.** 2007. Varicella-Zoster Virus, p. 2773-2818. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Field's Virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
48. **Cole, N. L., and C. Grose.** 2003. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev Med Virol* **13**:207-22.
49. **Comai, L., N. Tanese, and R. Tjian.** 1992. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* **68**:965-76.
50. **Conley, A. J., D. M. Knipe, P. C. Jones, and B. Roizman.** 1981. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J Virol* **37**:191-206.
51. **Cook, W. J., and D. M. Coen.** 1996. Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1 UL24 mRNA Expression via Differential Polyadenylation. *Virology* **218**:204-213.
52. **Cook, W. J., K. K. Wobbe, J. Boni, and D. M. Coen.** 1996. Regulation of Neighboring Gene Expression by the Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene. *Virology* **218**:193-203.
53. **Copenhaver, G. P., C. D. Putnam, M. L. Denton, and C. S. Pikaard.** 1994. The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **22**:2651-7.
54. **Costanzo, F., G. Campadelli-Fiume, L. Foa-Tomasi, and E. Cassai.** 1977. Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol* **21**:996-1001.
55. **Cuchet, D., R. Ferrera, P. Lomonte, and A. L. Epstein.** 2005. Characterization of antiproliferative and cytotoxic properties of the HSV-1 immediate-early ICPO protein. *J Gene Med* **7**:1187-99.
56. **Daniels, M. J., A. Marson, and A. R. Venkitaraman.** 2004. PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1114-21.
57. **Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**:171-7.
58. **De, A., S. L. Donahue, A. Tabah, N. E. Castro, N. Mraz, J. L. Cruise, and C. Campbell.** 2006. A novel interaction [corrected] of nucleolin with Rad51. *Biochem Biophys Res Commun* **344**:206-13.

59. **de Bruyn Kops, A., and D. M. Knipe.** 1988. Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein. *Cell* **55**:857-68.
60. **de Bruyn Kops, A., S. L. Uprichard, M. Chen, and D. M. Knipe.** 1998. Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology* **252**:162-78.
61. **Deiss, L. P., and N. Frenkel.** 1986. Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J Virol* **57**:933-41.
62. **Delius, H., and J. B. Clements.** 1976. A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: evidence for inversions of the unique DNA regions. *J Gen Virol* **33**:125-33.
63. **Derenzini, M., V. Sirri, A. Pession, D. Trere, P. Roussel, R. L. Ochs, and D. Hernandez-Verdun.** 1995. Quantitative changes of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23, related to stimulation of rDNA transcription. *Exp Cell Res* **219**:276-82.
64. **Di Bacco, A., J. Ouyang, H. Y. Lee, A. Catic, H. Ploegh, and G. Gill.** 2006. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* **26**:4489-98.
65. **Dilanni, C. L., D. A. Drier, I. C. Deckman, P. J. McCann, 3rd, F. Liu, B. Roizman, R. J. Colonno, and M. G. Cordingley.** 1993. Identification of the herpes simplex virus-1 protease cleavage sites by direct sequence analysis of autoproteolytic cleavage products. *J Biol Chem* **268**:2048-51.
66. **Dingwell, K. S., and D. C. Johnson.** 1998. The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J Virol* **72**:8933-42.
67. **Dollery, S. J., M. G. Delboy, and A. V. Nicola.** 2010. Low pH-induced conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* **84**:3759-66.
68. **Doucas, V., A. M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M. D. Weitzman, R. M. Evans, and G. G. Maul.** 1996. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* **10**:196-207.
69. **Dry, I., D. M. Haig, N. F. Inglis, L. Imrie, J. P. Stewart, and G. C. Russell.** 2008. Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* **82**:5390-7.
70. **Dumbar, T. S., G. A. Gentry, and M. O. Olson.** 1989. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* **28**:9495-501.
71. **Dundr, M., G. H. Leno, M. L. Hammariskjold, D. Rekosh, C. Helga-Maria, and M. O. Olson.** 1995. The roles of nucleolar structure and function in the subcellular location of the HIV-1 Rev protein. *J Cell Sci* **108 (Pt 8)**:2811-23.
72. **Dundr, M., T. Misteli, and M. O. Olson.** 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* **150**:433-46.
73. **Epstein, M. A.** 1962. Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* **12**:589-97.

74. **Everett, R. D., W. C. Earnshaw, J. Findlay, and P. Lomonte.** 1999. Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J* **18**:1526-38.
75. **Everett, R. D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, M. Kathoria, and J. Parkinson.** 1998. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* **72**:6581-91.
76. **Everett, R. D., and G. G. Maul.** 1994. HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J* **13**:5062-9.
77. **Everett, R. D., A. Orr, and C. M. Preston.** 1998. A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **17**:7161-9.
78. **Everett, R. D., and A. Zafiropoulos.** 2004. Visualization by live-cell microscopy of disruption of ND10 during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**:11411-5.
79. **Fankhauser, C., E. Izaurralde, Y. Adachi, P. Wingfield, and U. K. Laemmli.** 1991. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* **11**:2567-75.
80. **Fatica, A., and D. Tollervey.** 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**:313-8.
81. **Feuerstein, N., J. J. Mond, P. R. Kinchington, R. Hickey, M. L. Karjalainen Lindsberg, I. Hay, and W. T. Ruyechan.** 1990. Evidence for DNA binding activity of numatrin (B23), a cell cycle-regulated nuclear matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **1087**:127-36.
82. **Forrester, A., H. Farrell, G. Wilkinson, J. Kaye, N. Davis-Poynter, and T. Minson.** 1992. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* **66**:341-8.
83. **Foster, T. P., and K. G. Kousoulas.** 1999. Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J Virol* **73**:8457-68.
84. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 2007. HIVs and their replication, p. 2107-2186. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields's virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
85. **Galati, D., M. Paiardini, B. Cervasi, H. Albrecht, M. Bocchino, A. Costantini, M. Montroni, M. Magnani, G. Piedimonte, and G. Silvestri.** 2003. Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **188**:1483-91.
86. **Gao, M., J. Bouchey, K. Curtin, and D. M. Knipe.** 1988. Genetic identification of a portion of the herpes simplex virus ICP8 protein required for DNA-binding. *Virology* **163**:319-29.
87. **Gao, M., and D. M. Knipe.** 1991. Potential role for herpes simplex virus ICP8 DNA replication protein in stimulation of late gene expression. *J Virol* **65**:2666-75.
88. **Garber, D. A., S. M. Beverley, and D. M. Coen.** 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**:459-62.

89. **Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and P. G. Spear.** 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-20.
90. **Gibson, W., and B. Roizman.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol* **10**:1044-52.
91. **Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet.** 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* **17**:1476-86.
92. **Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet.** 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112 (Pt 6)**:761-72.
93. **Godowski, P. J., and D. M. Knipe.** 1985. Identification of a herpes simplex virus function that represses late gene expression from parental viral genomes. *J Virol* **55**:357-65.
94. **Godowski, P. J., and D. M. Knipe.** 1983. Mutations in the major DNA-binding protein gene of herpes simplex virus type 1 result in increased levels of viral gene expression. *J Virol* **47**:478-86.
95. **Godowski, P. J., and D. M. Knipe.** 1986. Transcriptional control of herpesvirus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:256-60.
96. **Goldstein, J. N., and 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**:8772-81.
97. **Gong, L., and E. T. Yeh.** 2006. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* **281**:15869-77.
98. **Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, and M. Cohen.** 2000. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* **129**:313-23.
99. **Grummt, I.** 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**:1691-702.
100. **Handwerger, K. E., and J. G. Gall.** 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* **16**:19-26.
101. **Hann, L. E., W. J. Cook, S. L. Uprichard, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 1998. The role of herpes simplex virus ICP27 in the regulation of UL24 gene expression by differential polyadenylation. *J Virol* **72**:7709-14.
102. **Hayward, G. S., R. J. Jacob, S. C. Wadsworth, and 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**:4243-7.
103. **Heine, M. A., M. L. Rankin, and P. J. DiMario.** 1993. The Gly/Arg-rich (GAR) domain of *Xenopus* nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization. *Mol Biol Cell* **4**:1189-204.
104. **Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T. M. Michaelidis, and I. Grummt.** 1998. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* **17**:7373-81.

105. **Hernandez-Verdun, D., P. Roussel, and J. Gebrane-Younes.** 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* **115**:2265-70.
106. **Herrera, J. E., R. Savkur, and M. O. Olson.** 1995. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res* **23**:3974-9.
107. **Heymann, J. B., N. Cheng, W. W. Newcomb, B. L. Trus, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* **10**:334-41.
108. **Hindley, C. E., A. D. Davidson, and D. A. Matthews.** 2007. Relationship between adenovirus DNA replication proteins and nucleolar proteins B23.1 and B23.2. *J Gen Virol* **88**:3244-8.
109. **Hiscox, J. A.** 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* **5**:119-27.
110. **Hoffmann, P. J., and Y. C. Cheng.** 1979. DNase induced after infection of KB cells by herpes simplex virus type 1 or type 2. II. Characterization of an associated endonuclease activity. *J Virol* **32**:449-57.
111. **Homa, F. L., and J. C. Brown.** 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**:107-122.
112. **Honess, R. W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**:8-19.
113. **Hong-Yan, Z., T. Murata, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, and Y. Nishiyama.** 2001. Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **22**:321-7.
114. **Huang, C., D. Morse, B. Slater, M. Anand, E. Tobin, P. Smith, M. Dupuis, R. Hull, R. Ferrera, B. Rosen, and L. Grady.** 2004. Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses. *Clin Infect Dis* **39**:630-5.
115. **Huang, S.** 2002. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* **157**:739-41.
116. **Hutchinson, L., and D. C. Johnson.** 1995. Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J Virol* **69**:5401-13.
117. **Ishov, A. M., and G. G. Maul.** 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134**:815-26.
118. **Ito, H., M. H. Sommer, L. Zerboni, A. Baiker, B. Sato, R. Liang, J. Hay, W. Ruyechan, and 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**:4819-27.
119. **Izumi, R. E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta.** 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* **76**:17-29.
120. **Jacob, R. J., L. S. Morse, and B. Roizman.** 1979. Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J Virol* **29**:448-57.

121. **Jacob, R. J., and B. Roizman.** 1977. Anatomy of herpes simplex virus DNA VIII. Properties of the replicating DNA. *J Virol* **23**:394-411.
122. **Jacobson, J. G., S.-H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the Herpes Simplex Virus *UL24* Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* **242**:161-169.
123. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and 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**:1839-1843.
124. **Jayachandra, S., A. Baghian, and K. G. Kousoulas.** 1997. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *J Virol* **71**:5012-24.
125. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16286-91.
126. **Johnson, D. C., M. C. Frame, M. W. Ligas, A. M. Cross, and N. D. Stow.** 1988. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* **62**:1347-54.
127. **Jongeneel, C. V., and S. L. Bachenheimer.** 1981. Structure of replicating herpes simplex virus DNA. *J Virol* **39**:656-60.
128. **Kahrs, R. F.** 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J Am Vet Med Assoc* **171**:1055-64.
129. **Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* **78**:11187-97.
130. **Kelly, C., R. Van Driel, and G. W. Wilkinson.** 1995. Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **76** (Pt 11):2887-93.
131. **Kent, J. R., W. Kang, C. G. Miller, and N. W. Fraser.** 2003. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol* **9**:285-90.
132. **Khurts, S., K. Masutomi, L. Delgermaa, K. Arai, N. Oishi, H. Mizuno, N. Hayashi, W. C. Hahn, and S. Murakami.** 2004. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem* **279**:51508-15.
133. **Knipe, D. M., and A. Cliffe.** 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* **6**:211-21.
134. **Knipe, D. M., P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, and M.A. Martin. (ed.).** 2007. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
135. **Knipe, D. M., D. Senechek, S. A. Rice, and J. L. Smith.** 1987. Stages in the nuclear association of the herpes simplex virus transcriptional activator protein ICP4. *J Virol* **61**:276-84.
136. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human Herpesvirus 1 *UL24* Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease. *J Virol* **80**:2575-2577.

137. **Kuhn, A., and I. Grummt.** 1992. Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: trans-activator and antirepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7340-4.
138. **Kuhn, A., V. Stefanovsky, and I. Grummt.** 1993. The nucleolar transcription activator UBF relieves Ku antigen-mediated repression of mouse ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res* **21**:2057-63.
139. **Kurki, S., K. Peltonen, and M. Laiho.** 2004. Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle* **3**:976-9.
140. **Kurki, S., K. Peltonen, L. Latonen, T. M. Kiviharju, P. M. Ojala, D. Meek, and M. Laiho.** 2004. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* **5**:465-75.
141. **Lam, Y. W., L. Trinkle-Mulcahy, and A. I. Lamond.** 2005. The nucleolus. *J Cell Sci* **118**:1335-7.
142. **Lamberti, C., and S. K. Weller.** 1998. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol* **72**:2463-73.
143. **Lamond, A. I., and W. C. Earnshaw.** 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* **280**:547-53.
144. **Lamond, A. I., and J. E. Sleeman.** 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol* **13**:R825-8.
145. **Lamond, A. I., and D. L. Spector.** 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:605-12.
146. **Lawrence, F. J., B. McStay, and D. A. Matthews.** 2006. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *J Cell Sci* **119**:2621-31.
147. **Lazdins, I. B., M. Delannoy, and B. Sollner-Webb.** 1997. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* **105**:481-95.
148. **Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, and et al.** 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**:155-65.
149. **Leib, D. A., D. M. Coen, C. L. Bogard, K. A. Hicks, D. R. Yager, D. M. Knipe, K. L. Tyler, and 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**:759-68.
150. **Leiva-Torres, G. A., P. A. Rochette, and A. Pearson.** 2010. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* **91**:1109-16.
151. **Leopardi, R., and B. Roizman.** 1996. Functional interaction and colocalization of the herpes simplex virus 1 major regulatory protein ICP4 with EAP, a nucleolar-ribosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4572-6.
152. **Leopardi, R., P. L. Ward, W. O. Ogle, and B. Roizman.** 1997. Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes

- containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *J Virol* **71**:1133-9.
153. **Lerner, E. A., M. R. Lerner, C. A. Janeway, Jr., and J. A. Steitz.** 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:2737-41.
154. **Leung, A. K., D. Gerlich, G. Miller, C. Lyon, Y. W. Lam, D. Lleres, N. Daigle, J. Zomerdijs, J. Ellenberg, and A. I. Lamond.** 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* **166**:787-800.
155. **Li, L., L. A. Johnson, J. Q. Dai-Ju, and R. M. Sandri-Goldin.** 2008. Hsc70 focus formation at the periphery of HSV-1 transcription sites requires ICP27. *PLoS One* **3**:e1491.
156. **Li, Y. P., R. K. Busch, B. C. Valdez, and H. Busch.** 1996. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* **237**:153-8.
157. **Ligas, M. W., and D. C. Johnson.** 1988. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* **62**:1486-94.
158. **Liu, F., and B. Roizman.** 1993. Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J Virol* **67**:1300-9.
159. **Liu, Q., and G. Dreyfuss.** 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* **15**:3555-65.
160. **Livingston, C. M., N. A. DeLuca, D. E. Wilkinson, and S. K. Weller.** 2008. Oligomerization of ICP4 and rearrangement of heat shock proteins may be important for herpes simplex virus type 1 prereplicative site formation. *J Virol* **82**:6324-36.
161. **Livingston, C. M., M. F. Ifrim, A. E. Cowan, and S. K. Weller.** 2009. Virus-Induced Chaperone-Enriched (VICE) domains function as nuclear protein quality control centers during HSV-1 infection. *PLoS Pathog* **5**:e1000619.
162. **Lomonte, P., and R. D. Everett.** 1999. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 inhibits progression of cells through mitosis and from G(1) into S phase of the cell cycle. *J Virol* **73**:9456-67.
163. **Lomonte, P., and E. Morency.** 2007. Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS Lett* **581**:658-62.
164. **Lomonte, P., K. F. Sullivan, and R. D. Everett.** 2001. Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J Biol Chem* **276**:5829-35.
165. **Lopez-Iglesias, C., F. Puvion-Dutilleul, J. Cebrian, and M. E. Christensen.** 1988. Herpes simplex virus type 1-induced modifications in the distribution of nucleolar B-36 protein. *Eur J Cell Biol* **46**:259-69.
166. **Lopez, M. R., E. F. Schlegel, S. Wintersteller, and J. A. Blaho.** 2008. The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* **136**:175-88.

167. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.
168. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
169. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2010. Relocalization of upstream binding factor to viral replication compartments is UL24 independent and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis. *J Virol* **84**:4810-5.
170. **Macara, I. G.** 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:570-94.
171. **MacLean, C. A., F. J. Rixon, and H. S. Marsden.** 1987. The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells. *J Gen Virol* **68** (Pt 7):1921-37.
172. **Mais, C., J. E. Wright, J. L. Prieto, S. L. Raggett, and B. McStay.** 2005. UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* **19**:50-64.
173. **Martinez, R., R. T. Sarisky, P. C. Weber, and S. K. Weller.** 1996. Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J Virol* **70**:2075-85.
174. **Matthews, D. A.** 2001. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J Virol* **75**:1031-8.
175. **Maul, G. G., H. H. Guldner, and J. G. Spivack.** 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* **74** (Pt 12):2679-90.
176. **Mayer, C., H. Bierhoff, and I. Grummt.** 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-1A and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**:933-41.
177. **Mayer, C., and I. Grummt.** 2005. Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* **4**:1036-8.
178. **McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson, and E. A. Telford.** 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**:443-58.
179. **McGeoch, D. J., C. Cunningham, G. McIntyre, and A. Dolan.** 1991. Comparative sequence analysis of the long repeat regions and adjoining parts of the long unique regions in the genomes of herpes simplex viruses types 1 and 2. *J Gen Virol* **72** (Pt 12):3057-75.
180. **McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame, D. McNab, L. J. Perry, J. E. Scott, and 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.
181. **McMillan, T. N., and D. C. Johnson.** 2001. Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *J Virol* **75**:1928-40.
182. **McVoy, M. A., and D. Ramnarain.** 2000. Machinery to support genome segment inversion exists in a herpesvirus which does not naturally contain invertible elements. *J Virol* **74**:4882-7.

183. **Meignier, B., R. Longnecker, and B. Roizman.** 1988. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis* **158**:602-14.
184. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**:1537-47.
185. **Miller, O. L., Jr., and B. R. Beatty.** 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**:955-7.
186. **Miyazaki, Y., T. Nosaka, and M. Hatanaka.** 1996. The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Biochimie* **78**:1081-6.
187. **Miyazaki, Y., T. Takamatsu, T. Nosaka, S. Fujita, T. E. Martin, and M. Hatanaka.** 1995. The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Exp Cell Res* **219**:93-101.
188. **Moffat, J., H. Ito, M. Sommer, S. Taylor, and A. M. Arvin.** 2002. Glycoprotein I of varicella-zoster virus is required for viral replication in skin and T cells. *J Virol* **76**:8468-71.
189. **Moffat, J. F., L. Zerboni, P. R. Kinchington, C. Grose, H. Kaneshima, and A. M. Arvin.** 1998. Attenuation of the vaccine Oka strain of varicella-zoster virus and role of glycoprotein C in alphaherpesvirus virulence demonstrated in the SCID-hu mouse. *J Virol* **72**:965-74.
190. **Moffat, J. F., L. Zerboni, M. H. Sommer, T. C. Heineman, J. I. Cohen, H. Kaneshima, and A. M. Arvin.** 1998. The ORF47 and ORF66 putative protein kinases of varicella-zoster virus determine tropism for human T cells and skin in the SCID-hu mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11969-74.
191. **Mongelard, F., and P. Bouvet.** 2007. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* **17**:80-6.
192. **Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K. F. Sullivan.** 2000. Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**:661-5.
193. **Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-36.
194. **Moore, P. B., and T. A. Steitz.** 2002. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**:229-35.
195. **Morency, E., Y. Coute, J. Thomas, P. Texier, and P. Lomonte.** 2005. The protein ICP0 of herpes simplex virus type 1 is targeted to nucleoli of infected cells. Brief report. *Arch Virol* **150**:2387-95.
196. **Morency, E., M. Sabra, F. Catez, P. Texier, and P. Lomonte.** 2007. A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *J Cell Biol* **177**:757-68.
197. **Moss, T.** 2004. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* **14**:210-7.
198. **Moss, T., and V. Y. Stefanovsky.** 2002. At the center of eukaryotic life. *Cell* **109**:545-8.

199. **Muller, S., M. J. Matunis, and A. Dejean.** 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* **17**:61-70.
200. **Nascimento, R., J. D. Dias, and R. M. Parkhouse.** 2009. The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch Virol* **154**:1143-9.
201. **Nascimento, R., and 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**:1446-53.
202. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, F. P. Booy, B. L. Trus, A. C. Steven, J. V. Spencer, and J. C. Brown.** 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J Mol Biol* **263**:432-46.
203. **Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller, and J. C. Brown.** 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **75**:10923-32.
204. **Newcomb, W. W., B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, J. S. Wall, and J. C. Brown.** 1993. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol* **232**:499-511.
205. **Nicola, A. V., J. Hou, E. O. Major, and S. E. Straus.** 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol* **79**:7609-16.
206. **Nicola, A. V., A. M. McEvoy, and S. E. Straus.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **77**:5324-32.
207. **Nigg, E. A.** 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**:779-87.
208. **Nimonkar, A. V., and P. E. Boehmer.** 2003. Reconstitution of recombination-dependent DNA synthesis in herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10201-6.
209. **O'Connor, C. M., and D. H. Kedes.** 2006. Mass spectrometric analyses of purified rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins. *J Virol* **80**:1574-83.
210. **O'Sullivan, A. C., G. J. Sullivan, and B. McStay.** 2002. UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* **22**:657-68.
211. **Okuda, M., H. F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A. G. Smulian, P. K. Chan, E. S. Knudsen, I. A. Hofmann, J. D. Snyder, K. E. Bove, and K. Fukasawa.** 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**:127-40.
212. **Okuwaki, M., A. Iwamatsu, M. Tsujimoto, and K. Nagata.** 2001. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J Mol Biol* **311**:41-55.

213. **Okuwaki, M., K. Matsumoto, M. Tsujimoto, and K. Nagata.** 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* **506**:272-6.
214. **Okuwaki, M., M. Tsujimoto, and K. Nagata.** 2002. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell* **13**:2016-30.
215. **Olson, M. O.** 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* **2004**:pe10.
216. **Ossareh-Nazari, B., C. Gwizdek, and C. Dargemont.** 2001. Protein export from the nucleus. *Traffic* **2**:684-9.
217. **Padula, M. E., M. L. Sydnor, and D. W. Wilson.** 2009. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol* **83**:4757-65.
218. **Panov, K. I., J. K. Friedrich, and J. C. Zomerdijk.** 2001. A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **21**:2641-9.
219. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* **76**:10821-10828.
220. **Pearson, A., D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2004. ICP27 Selectively Regulates the Cytoplasmic Localization of a Subset of Viral Transcripts in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells. *J. Virol.* **78**:23-32.
221. **Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**:256-63.
222. **Phelan, A., J. Dunlop, A. H. Patel, N. D. Stow, and J. B. Clements.** 1997. Nuclear sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication and transcription colocalize at early times postinfection and are largely distinct from RNA processing factors. *J Virol* **71**:1124-32.
223. **Poffenberger, K. L., and B. Roizman.** 1985. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* **53**:587-95.
224. **Porter, I. M., and N. D. Stow.** 2004. Virus particles produced by the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12 contain abnormal genomes. *J Gen Virol* **85**:583-91.
225. **Prestayko, A. W., G. R. Klomp, D. J. Schmoll, and H. Busch.** 1974. Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particles from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **13**:1945-51.
226. **Preston, V. G., F. J. Rixon, I. M. McDougall, M. McGregor, and M. F. al Kobaisi.** 1992. Processing of the herpes simplex virus assembly protein ICP35 near its carboxy terminal end requires the product of the whole of the UL26 reading frame. *Virology* **186**:87-98.

227. **Prieto, J. L., and B. McStay.** 2005. Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochem Soc Trans* **33**:1441-3.
228. **Prives, C.** 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* **95**:5-8.
229. **Przewloka, M. R., and D. M. Glover.** 2009. The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* **43**:439-65.
230. **Puvion-Dutilleul, F.** 1987. Localization of viral-specific 21 kDa protein in nucleoli of herpes simplex infected cells. *Eur J Cell Biol* **43**:487-98.
231. **Puvion-Dutilleul, F., and M. E. Christensen.** 1993. Alterations of fibrillarin distribution and nucleolar ultrastructure induced by adenovirus infection. *Eur J Cell Biol* **61**:168-76.
232. **Quinlan, M. P., L. B. Chen, and D. M. Knipe.** 1984. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* **36**:857-68.
233. **Randall, R. E., and N. Dinwoodie.** 1986. Intranuclear localization of herpes simplex virus immediate-early and delayed-early proteins: evidence that ICP 4 is associated with progeny virus DNA. *J Gen Virol* **67 (Pt 10)**:2163-77.
234. **Raska, I.** 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* **13**:517-25.
235. **Raska, I., P. J. Shaw, and D. Cmarko.** 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* **18**:325-34.
236. **Reboud, J. P., A. M. Reboud, J. J. Madjar, and M. Buisson.** 1974. Study of protein reactivity in rat liver ribosomes. Effect of RNA addition to autodigested ribosomes. *Acta Biol Med Ger* **33**:661-6.
237. **Reichow, S. L., T. Hamma, A. R. Ferre-D'Amare, and G. Varani.** 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res* **35**:1452-64.
238. **Reuven, N. B., A. E. Staire, R. S. Myers, and S. K. Weller.** 2003. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease and single-stranded DNA binding protein mediate strand exchange in vitro. *J Virol* **77**:7425-33.
239. **Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**:5564-75.
240. **Rice, S. A., and D. M. Knipe.** 1990. Genetic evidence for two distinct transactivation functions of the herpes simplex virus alpha protein ICP27. *J Virol* **64**:1704-15.
241. **Rice, S. A., M. C. Long, V. Lam, and C. A. Spencer.** 1994. RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following herpes simplex virus infection. *J Virol* **68**:988-1001.
242. **Rickards, B., S. J. Flint, M. D. Cole, and G. LeRoy.** 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol* **27**:937-48.
243. **Roizman, B., and D. Furlong.** 1974. The replication of herpesviruses, p. 229-403. *In* H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner (ed.), *Comprehensive virology*. Plenum Press, New York, N.Y.
244. **Roizman, B., D. M. Knipe, and R. J. Whitley.** 2007 Herpes Simplex Viruses, p. 2502-2601. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.

245. **Roizman, B., and P. E. Pellett.** 2007. The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction, p. 2479-2499. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
246. **Roller, R. J., L. L. Monk, D. Stuart, and B. Roizman.** 1996. Structure and function in the herpes simplex virus 1 RNA-binding protein U(s)11: mapping of the domain required for ribosomal and nucleolar association and RNA binding in vitro. *J Virol* **70**:2842-51.
247. **Roussel, P., and D. Hernandez-Verdun.** 1994. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* **214**:465-72.
248. **Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* **63**:1-8.
249. **Russell, J., and J. C. Zomerdijk.** 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**:87-96.
250. **Ruyechan, W. T., L. S. Morse, D. M. Knipe, and B. Roizman.** 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* **29**:677-97.
251. **Sagou, K., M. Uema, and Y. Kawaguchi.** 2010. Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J Virol* **84**:2110-21.
252. **Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala, and L. Frappier.** 2008. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* **4**:e1000100.
253. **Sanders, P. G., N. M. Wilkie, and A. J. Davison.** 1982. Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **63**:277-95.
254. **Sarisky, R. T., and P. C. Weber.** 1994. Requirement for double-strand breaks but not for specific DNA sequences in herpes simplex virus type 1 genome isomerization events. *J Virol* **68**:34-47.
255. **Sarmiento, M., M. Haffey, and P. G. Spear.** 1979. Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoprotein VP7(B2) in virion infectivity. *J Virol* **29**:1149-58.
256. **Savino, T. M., J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J. B. Sibarita, and D. Hernandez-Verdun.** 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* **153**:1097-110.
257. **Savkur, R. S., and M. O. Olson.** 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* **26**:4508-15.
258. **Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J. C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser, and J. J. Diaz.** 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* **13**:4100-9.
259. **Schmidt-Zachmann, M. S., C. Dargemont, L. C. Kuhn, and E. A. Nigg.** 1993. Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention. *Cell* **74**:493-504.
260. **Schmidt-Zachmann, M. S., B. Hugle-Dorr, and W. W. Franke.** 1987. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J* **6**:1881-90.

261. **Schwartz, J., and B. Roizman.** 1969. Similarities and Differences in the Development of Laboratory Strains and Freshly Isolated Strains of Herpes Simplex Virus in HEp-2 Cells: Electron Microscopy. *J Virol* **4**:879-889.
262. **Scott, E. S., and P. O'Hare.** 2001. Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**:8818-30.
263. **Seinsoth, S., H. Uhlmann-Schiffler, and H. Stahl.** 2003. Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I. *EMBO Rep* **4**:263-8.
264. **Seither, P., J. F. Coy, A. Pouska, and I. Grummt.** 1997. Molecular cloning and characterization of the cDNA encoding the largest subunit of mouse RNA polymerase I. *Mol Gen Genet* **255**:180-6.
265. **Severini, A., D. G. Scraba, and D. L. Tyrrell.** 1996. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**:3169-75.
266. **Shao, L., L. M. Rapp, and S. K. Weller.** 1993. Herpes simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus. *Virology* **196**:146-62.
267. **Shaw, P., and J. Doonan.** 2005. The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle* **4**:102-5.
268. **Shaw, P. J., and E. G. Jordan.** 1995. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:93-121.
269. **Sherman, G., and S. L. Bachenheimer.** 1988. Characterization of intranuclear capsids made by ts morphogenic mutants of HSV-1. *Virology* **163**:471-80.
270. **Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear.** 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**:1273-81.
271. **Shimakami, T., M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, and S. Murakami.** 2006. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* **80**:3332-40.
272. **Shukla, D., J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, and P. G. Spear.** 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**:13-22.
273. **Silverstein, S., and D. L. Engelhardt.** 1979. Alterations in the protein synthetic apparatus of cells infected with herpes simplex virus. *Virology* **95**:334-42.
274. **Simonin, D., J. J. Diaz, T. Masse, and J. J. Madjar.** 1997. Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78** (Pt 2):435-43.
275. **Simpson-Holley, M., J. Baines, R. Roller, and D. M. Knipe.** 2004. Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol* **78**:5591-600.
276. **Sinclair, J., and P. Sissons.** 1996. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* **39**:293-301.
277. **Sirri, V., D. Hernandez-Verdun, and P. Roussel.** 2002. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol* **156**:969-81.

278. **Sirri, V., S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun.** 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* **129**:13-31.
279. **Smith, C. M., and J. A. Steitz.** 1997. Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. *Cell* **89**:669-72.
280. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
281. **Spector, D. L., W. H. Schrier, and H. Busch.** 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell* **49**:1-10.
282. **Stackpole, C. W.** 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol* **4**:75-93.
283. **Stanberry, L. R., S. L. Spruance, A. L. Cunningham, D. I. Bernstein, A. Mindel, S. Sacks, S. Tyring, F. Y. Aoki, M. Slaoui, M. Denis, P. Vandepapeliere, and G. Dubin.** 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347**:1652-61.
284. **Stefanovsky, V. Y., F. Langlois, D. Bazett-Jones, G. Pelletier, and T. Moss.** 2006. ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* **45**:3626-34.
285. **Stefanovsky, V. Y., G. Pelletier, R. Hannan, T. Gagnon-Kugler, L. I. Rothblum, and T. Moss.** 2001. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**:1063-73.
286. **Stenberg, R. M.** 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* **39**:343-9.
287. **Stenberg, R. M., and L. I. Pizer.** 1982. Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**:474-87.
288. **Sternsdorf, T., K. Jensen, and H. Will.** 1997. Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* **139**:1621-34.
289. **Stow, N. D., V. C. Evans, and D. A. Matthews.** 2009. Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* **90**:69-73.
290. **Subramanian, R. P., and R. J. Geraghty.** 2007. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2903-8.
291. **Szebeni, A., J. E. Herrera, and M. O. Olson.** 1995. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* **34**:8037-42.
292. **Szebeni, A., B. Mehrotra, A. Baumann, S. A. Adam, P. T. Wingfield, and M. O. Olson.** 1997. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* **36**:3941-9.
293. **Szebeni, A., and M. O. Olson.** 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* **8**:905-12.

294. **Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de The.** 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* **23**:2819-24.
295. **Taylor, T. J., and D. M. Knipe.** 2004. Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* **78**:5856-66.
296. **Taylor, T. J., E. E. McNamee, C. Day, and D. M. Knipe.** 2003. Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments. *Virology* **309**:232-47.
297. **Thiry, E., F. Meurens, B. Muylkens, M. McVoy, S. Gogev, J. Thiry, A. Vanderplasschen, A. Epstein, G. Keil, and F. Schynts.** 2005. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol* **15**:89-103.
298. **Thiry, M., and D. L. Lafontaine.** 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* **15**:194-9.
299. **Tognon, M., R. Guandalini, M. G. Romanelli, R. Manservigi, and B. Trevisani.** 1991. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res* **18**:135-50.
300. **Tokuyama, Y., H. F. Horn, K. Kawamura, P. Tarapore, and K. Fukasawa.** 2001. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* **276**:21529-37.
301. **Tollervey, D., H. Lehtonen, R. Jansen, H. Kern, and E. C. Hurt.** 1993. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72**:443-57.
302. **Trus, B. L., F. P. Booy, W. W. Newcomb, J. C. Brown, F. L. Homa, D. R. Thomsen, and A. C. Steven.** 1996. The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. *J Mol Biol* **263**:447-62.
303. **Trus, B. L., N. Cheng, W. W. Newcomb, F. L. Homa, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2004. Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **78**:12668-71.
304. **Ugrinova, I., K. Monier, C. Ivaldi, M. Thiry, S. Storck, F. Mongelard, and P. Bouvet.** 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* **8**:66.
305. **Uprichard, S. L., and D. M. Knipe.** 1996. Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. *J Virol* **70**:1969-80.
306. **Varmuza, S. L., and J. R. Smiley.** 1985. Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell* **41**:793-802.
307. **Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, 2nd, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**:10960-6.

308. **Vousden, K. H., and C. Prives.** 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**:413-31.
309. **Waggoner, S., and P. Sarnow.** 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* **72**:6699-709.
310. **Wagner, E. K., and B. Roizman.** 1969. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**:36-46.
311. **Wang, D., A. Baumann, A. Szebeni, and M. O. Olson.** 1994. The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem* **269**:30994-8.
312. **Wang, D., H. Umekawa, and M. O. Olson.** 1993. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* **39**:33-42.
313. **Wang, S. K., C. Y. Duh, and T. T. Chang.** 2000. Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**:2407-16.
314. **Wang, S. K., C. Y. Duh, and C. W. Wu.** 2004. Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J Virol* **78**:9750-62.
315. **Ward, P. L., G. Campadelli-Fiume, E. Avitabile, and B. Roizman.** 1994. Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **68**:7406-17.
316. **Ward, P. L., W. O. Ogle, and B. Roizman.** 1996. Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1. *J Virol* **70**:4623-31.
317. **Warner, M. S., R. J. Geraghty, W. M. Martinez, R. I. Montgomery, J. C. Whitbeck, R. Xu, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and P. G. Spear.** 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246**:179-89.
318. **Weidman, M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta.** 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res* **95**:75-85.
319. **Weinheimer, S. P., P. J. McCann, 3rd, D. R. O'Boyle, 2nd, J. T. Stevens, B. A. Boyd, D. A. Drier, G. A. Yamanaka, C. L. Dilanni, I. C. Deckman, and M. G. Cordingley.** 1993. Autoproteolysis of herpes simplex virus type 1 protease releases an active catalytic domain found in intermediate capsid particles. *J Virol* **67**:5813-22.
320. **Welfle, H., B. Henkel, and H. Bielka.** 1976. Ionic interactions in eukaryotic ribosomes: splitting of the subunits of rat liver ribosomes by treatment with monovalent cations. *Acta Biol Med Ger* **35**:401-11.
321. **Whitbeck, J. C., W. C. Lawrence, and L. J. Bello.** 1994. Characterization of the Bovine Herpesvirus 1 Homolog of the Herpes Simplex Virus 1 UL24 Open Reading Frame. *Virology* **200**:263-270.

322. **Wilcock, D., and D. P. Lane.** 1991. Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* **349**:429-31.
323. **Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther.** 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**:1071-83.
324. **Wilkinson, D. E., and S. K. Weller.** 2006. Herpes simplex virus type 1 disrupts the ATR-dependent DNA-damage response during lytic infection. *J Cell Sci* **119**:2695-703.
325. **Wilkinson, D. E., and S. K. Weller.** 2003. The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life* **55**:451-8.
326. **Wilson, S. S., E. Fakioglu, and B. C. Herold.** 2009. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**:559-68.
327. **Wisner, T. W., and D. C. Johnson.** 2004. Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol* **78**:11519-35.
328. **Wong, J. M., L. Kusdra, and K. Collins.** 2002. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* **4**:731-6.
329. **Wright, C. C., T. W. Wisner, B. P. Hannah, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and D. C. Johnson.** 2009. Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB. *J Virol* **83**:11847-56.
330. **Wsierska-Gadek, J., and M. Horky.** 2003. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci* **1010**:266-72.
331. **WuDunn, D., and P. G. Spear.** 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* **63**:52-8.
332. **Xue, Z., and T. Melese.** 1994. Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? *Trends Cell Biol* **4**:414-7.
333. **Yu, D., and S. K. Weller.** 1998. Genetic analysis of the UL 15 gene locus for the putative terminase of herpes simplex virus type 1. *Virology* **243**:32-44.
334. **Zhu, F. X., J. M. Chong, L. Wu, and Y. Yuan.** 2005. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:800-11.