

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

**IDENTIFICATION D'UN FACTEUR CELLULAIRE INTERAGISSANT
AVEC LA PROTÉINE UL24 DU VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX 1**

Par

Miharisoa Mirana Rakotomanga

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Patrick Labonté
INRS - Institut Armand-Frappier

Examineur externe

James G. Omichinski
Département de biochimie
Faculté de médecine
Université de Montréal

Directeur de recherche

Angela Pearson, PhD
INRS - Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de recherche, Angela Pearson, pour sa confiance dans la réalisation de ce projet de maîtrise. Merci d'avoir fait preuve de patience à mon égard pendant ces deux années d'apprentissage.

Je remercie aussi mes collègues de laboratoire, présents et passés, ainsi que les personnes de l'INRS Institut Armand-Frappier que j'ai côtoyées. Malgré les journées parfois pénibles, merci d'avoir rendu ces deux ans agréables.

J'adresse spécialement mes remerciements à Jessy Tremblay pour son aide en microscopie confocale et à Ginette Denis pour son travail et sa gentillesse durant ma première année de maîtrise.

Je souhaite également remercier mes proches. D'abord, mes parents qui m'ont laissée partir loin à un jeune âge pour me permettre de réaliser mes rêves. Merci également à mon frère et ma sœur ainsi que tous mes amis qui m'ont toujours soutenue. Je remercie également Christophe qui m'a soutenue et m'a fait preuve de son amour tous les jours sans exception malgré la distance. Merci infiniment!

Finalement, bien que je croie fortement en la science, je ne peux m'empêcher de croire qu'il y a un Dieu qui m'a permis de me rendre là où je suis aujourd'hui. Je lui en suis reconnaissante.

RÉSUMÉ

Le gène *ul24* du virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) est conservé parmi les membres de la famille des *Herpesviridae*. La protéine multifonctionnelle UL24 est importante pour la réplication en culture cellulaire et *in vivo* dans un modèle murin d'infection oculaire. Un virus déficient en UL24 démontre des plages de lyse syncytiales où les membranes des cellules infectées fusionnent de manière aberrante. D'une part, le domaine N-terminal de la protéine est hautement conservé parmi les orthologues d'UL24. Lorsque ce domaine est exprimé seul, il se localise au noyau et il a été démontré qu'il était suffisant pour induire des modifications au nucléole causées par le VHS-1. D'autre part, le domaine C-terminal, faiblement conservé, se localise dans le cytoplasme et dans l'appareil de Golgi lorsqu'il est exprimé seul. Dans cette étude, notre hypothèse est que la partie C-terminale de la protéine UL24 interagirait avec des protéines cellulaires qui interviendraient dans le rôle de la protéine dans le cytoplasme. Afin de tester cette hypothèse, un criblage double hybride chez la levure a été effectué. Pour cela, la partie C-terminale d'UL24 (aa 190-269) a été utilisée comme appât pour cribler une librairie de protéines provenant de cellules HeLa S3. Sur 9×10^7 clones criblés, quatre clones remplissaient tous les critères d'interaction. Les séquences de ces clones correspondaient toutes, en partie ou en totalité, à la séquence codante de la forme mature de la protéine C1QBP. C1QBP est une protéine multifonctionnelle qui se localise dans le cytoplasme et dans le noyau et qui joue plusieurs rôles dans différentes infections virales. L'interaction de la forme mature de C1QBP avec la forme entière de la protéine UL24 a été confirmée dans le système double hybride. Par la suite, des essais de co-immunoprécipitation dans des cellules HeLa infectées avec le virus ont montré que C1QBP est présente lorsqu'on précipite UL24. Des essais d'immunofluorescence indirecte et microscopie confocale ont par ailleurs montré que les deux protéines colocalisent dans le cytoplasme des cellules HeLa et des cellules HFF. On a voulu ensuite déterminer l'importance de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1. Pour cela, une réduction de l'expression de C1QBP par une approche d'interférence ARN a été réalisée. La diminution de l'expression de C1QBP ne semblait pas affecter ni la réplication ni la dissémination du virus en culture cellulaire. Des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser l'interaction entre UL24 et C1QBP et comprendre son rôle lors de l'infection par le VHS-1 *in vitro* et *in vivo*.

ABSTRACT

The herpes simplex virus (HSV-1) gene *ul24* is conserved among all *Herpesviridae* family members. The multifunctional UL24 protein is important for viral replication *in vitro* as well as for pathogenesis in a mouse model of ocular infection. Mutations in the *ul24* gene also lead to syncytial plaques in infected cells. The N-terminal domain of UL24 is highly conserved among orthologs of the protein. This domain is located in the nucleus when expressed alone, and is sufficient to induce nucleolar modifications. Little is known about the role of the C-terminal domain of UL24, which is poorly conserved. When expressed alone, this part of the protein is found in the cytoplasm and the Golgi apparatus. In this study, we hypothesized that the C-terminal domain of UL24 can interact with cellular factors involved in cytoplasmic functions of the protein. To test this hypothesis we performed a yeast two-hybrid screen using the C-terminal domain of UL24 (aa190-269) as bait to screen a HeLa S3 cell library fused to the GAL4 activation domain. From a total of 9×10^7 transformants screened, four clones fulfilled the criteria for interaction of gene products. The gene sequences of these clones all corresponded to the coding sequence of the mature form of C1QBP. C1QBP is a multifunctional protein located in the cytoplasm and nucleus and has been shown to play a role in different viral infections. We confirmed the interaction between the full length UL24 protein with the mature form of C1QBP in the yeast two-hybrid system. Co-immunoprecipitation assays showed that the two proteins interact in infected HeLa cells. Indirect immunofluorescence studies also demonstrated the colocalization of UL24 and C1QBP in the cytoplasm of infected HeLa and HFF cells. Next, we wanted to test the importance of C1QBP in HSV-1 infection. By an siRNA approach, we reduced the level of C1QBP expression in HeLa cells. We infected these cells with the strain KOS at low and high multiplicities of infection. We observed that the knock-down of C1QBP reduced neither viral replication nor dissemination in cell culture. Further studies are needed to characterize the UL24-C1QBP interaction and to investigate its role in HSV-1 infection both *in vitro* and *in vivo*.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	iii
Résumé	v
Abstract	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
1 INTRODUCTION	15
1.1 LES VIRUS HERPES HUMAINS.....	15
1.2 STRUCTURE DU VIRUS HERPES SIMPLEX 1	16
1.3 PATHOGENESE DU VIRUS HERPES SIMPLEX 1	17
1.4 CYCLE DE REPLICATION DU VIRUS HERPES SIMPLEX 1	19
1.4.1 <i>Entrée du virus</i>	20
1.4.2 <i>Expression séquentielle des gènes viraux et réplication du génome</i>	21
1.4.3 <i>Sortie du noyau vers le cytoplasme</i>	23
1.4.4 <i>Étapes tardives dans le cytoplasme</i>	24
1.5 LATENCE ET REACTIVATION	26
1.6 LA PROTEINE UL24	27
1.6.1 <i>Généralités sur la protéine UL24</i>	27
1.6.2 <i>Importance en culture cellulaire</i>	28
1.6.3 <i>Importance in vivo</i>	29
1.6.4 <i>Les orthologues d'UL24 et leurs rôles</i>	29
1.7 UL24 ET LES MODIFICATIONS AU NOYAU	31
1.8 UL24 DANS LE CYTOPLASME	32
1.8.1 <i>Modifications au Golgi</i>	32
1.8.2 <i>Impact sur la redistribution des glycoprotéines virales</i>	33
1.9 LES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES	33
1.9.1 <i>L'identification d'une interaction entre protéines connues</i>	34
1.9.2 <i>La recherche de partenaires d'interaction d'une protéine d'intérêt</i>	35
1.9.3 <i>Le système double hybride chez la levure</i>	36
1.10 PROBLEMATIQUE	39
1.11 HYPOTHESE	39

1.12	OBJECTIFS	39
2	MATERIELS ET METHODES	40
2.1	LE CRIBLAGE DOUBLE HYBRIDE CHEZ LA LEVURE	40
2.1.1	<i>Construction des vecteurs d'expression</i>	<i>40</i>
2.1.2	<i>Souches de levures, librairie et gènes rapporteurs utilisés.....</i>	<i>42</i>
2.1.3	<i>Levures compétentes et transformations.....</i>	<i>44</i>
2.1.4	<i>Extraction de protéines de levure</i>	<i>46</i>
2.1.5	<i>Criblage</i>	<i>47</i>
2.1.6	<i>Test d'interaction directe avec UL24 pleine longueur</i>	<i>49</i>
2.2	CELLULES ET VIRUS	49
2.2.2	PRODUCTION DES STOCKS DE VIRUS	50
2.2.3	DETERMINATION DES TITRES VIRAUX	50
2.3	CO-IMMUNOPRECIPITATION.....	51
2.3.1	<i>Infection de cellules HeLa</i>	<i>51</i>
2.3.2	<i>Lyse des cellules HeLa.....</i>	<i>51</i>
2.3.3	<i>Immunoprécipitation.....</i>	<i>52</i>
2.3.4	<i>Anticorps.....</i>	<i>52</i>
2.4	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	53
2.5	IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	54
2.6	PETITS ARNS INTERFERENTS (SIRNAS)	55
2.6.1	<i>Séquences et transfection.....</i>	<i>55</i>
2.6.2	<i>Extraction de protéines cellulaires</i>	<i>56</i>
2.6.3	<i>Détermination de la cytotoxicité</i>	<i>57</i>
2.6.4	<i>Infection des cellules transfectées et récolte des virus.....</i>	<i>57</i>
3	RESULTATS.....	58
3.1	CRIBLAGE DOUBLE HYBRIDE AVEC LA PARTIE C-TERMINALE D'UL24 COMME APPAT	58
3.1.1	<i>Contrôles de faisabilité du criblage.....</i>	<i>58</i>
3.1.2	<i>Paramètres et bilan du criblage</i>	<i>59</i>
3.2	CONFIRMATION DE L'INTERACTION AVEC UL24 PLEINE LONGUEUR EN DOUBLE HYBRIDE.....	61
3.3	CO-IMMUNOPRECIPITATION D'UL24 ET C1QBP EN INFECTION	62
3.4	COLOCALISATION INTRACELLULAIRE D'UL24 ET C1QBP EN INFECTION.....	64
3.5	EXPRESSION DE C1QBP LORS DE L'INFECTION PAR LE VHS-1 DES CELLULES HELa.....	67
3.6	DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE C1QBP PAR LES SIRNAS	67
3.7	VIABILITE CELLULAIRE LORS DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE C1QBP.....	68
3.8	REPLICATION ET DISSEMINATION DU VHS-1 LORS DU SILENÇAGE DE C1QBP	69
4	DISCUSSION	71

4.1	LA PROTEINE P32/C1QBP/HABPI	71
4.2	INTERACTION DE C1QBP AVEC LA PROTEINE UL24	74
4.3	EXPRESSION DE C1QBP LORS DE L'INFECTION PAR LE VHS-1	75
4.4	IMPORTANCE DE C1QBP POUR LA REPLICATION DU VHS-1	76
4.5	IMPLICATION DE C1QBP DANS LES ETAPES TARDIVES DU CYCLE DU VHS-1	77
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	79
6	REFERENCES.....	81

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 - Représentation d'un monomère génomique du VHS-1
- Figure 2 - Structure du VHS-1
- Figure 3 - Pathogenèse du VHS-1
- Figure 4 - Cycle de réplication du VHS-1
- Figure 5 - Séquence primaire en acides aminés de la protéine UL24 de la souche KOS du VHS-1
- Figure 6 - Principe du système double hybride
- Figure 7 - Description du vecteur pGBKT7
- Figure 8 - Description du vecteur pGADT7
- Figure 9 - Représentation du gène de C1QBP et localisation des siRNAs
- Figure 10 - Contrôles de faisabilité du criblage double hybride avec la partie C-terminale d'UL24 comme appât
- Figure 11 - Bilan des deux criblages double hybride avec la partie C-terminale d'UL24 comme appât
- Figure 12 - Interaction de la protéine UL24 du VHS-1 avec la forme mature de C1QBP dans le système double hybride
- Figure 13 - Co-immunoprécipitation de C1QBP avec la protéine HA-UL24
- Figure 14 - Colocalisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 avec la protéine cellulaire C1QBP dans les cellules HeLa
- Figure 15 - Colocalisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 avec la protéine cellulaire C1QBP dans les cellules HFF
- Figure 16 - Expression de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1 dans les cellules HeLa
- Figure 17 - Diminution de l'expression de C1QBP par les siRNAs
- Figure 18 - Viabilité des cellules transfectées avec les siRNAs contre C1QBP
- Figure 19 - Réplication du VHS-1 dans les cellules transfectées avec les siRNAs contre C1QBP

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A/T	Adénine/Thymidine
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF	Alexa Fluor
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
BRET	"bioluminescence resonance energy transfer"
BIFC	"bimolecular fluorescence complementation"
C1QBP	"C1q binding protein"
cfu	unité formatrice de colonies
CTD	domaine carboxy-terminal
DDO	"double dropout"
DDO/X	"double dropout" + X- α -galactopyranoside
DDO/X/A	"double dropout" + X- α -galactopyranoside + aureobasidine A
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DO ₆₀₀	densité optique à 600nm
EBV	virus de l'Epstein-Barr
FBS	sérum foetal bovin
FCS	"fluorescence correlation spectroscopy"
FRET	"Förster resonance energy transfer"
GAL4 AD	"GAL4 activation domain"
GAL4 DNA-BD	"GAL4 DNA-binding domain"
HABP1	"Hyaluronan binding protein 1"
HCMV	cytomegalovirus humain
HFF	"human foreskin fibroblast"
HHV	herpès virus humain
HMV-68	gammaherpès virus murin 68
HVEM	"Herpes Virus Entry Mediator"
IP	immunoprécipitation

LAT	"Latency Associated Transcripts"
MAVS	signalisation antivirale mitochondriale
MLS	signal de localisation mitochondriale
MOI	multiplicité d'infection
MVB	corps multivésiculaires
NCS	sérum de veau nouveau-né
NEC	"nuclear egress complex"
NLS	signal de localisation nucléaire
NMIIA	"non-muscular myosin II A"
NT siRNA	"non targeting siRNA"
PCR	réaction de polymérase en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
pfu	unité formatrice de plaques
PKC	protéine kinase C
PKD	protéine kinase D
PRC 1/2	protéine régulatrice de la cytokinèse
P/S	pénicilline et streptomycine
QDO/X/A	"quadruple dropout" + X- α -galactopyranoside + aureobasidine A
RE	réticulum endoplasmique
SD/-Leu	milieu sans leucine
SD/-Trp	milieu sans tryptophane
siRNA	petit ARN interférent
TNF	"tumor necrosis factor"
TGN	réseau trans-golgien
VHE-1	virus herpès équin 1
VHS	"virion host shutoff"
VHS-1/2	virus de l'herpès simplex 1/2
VSV	virus de la stomatite vésiculaire
VZV	virus de la varicelle
α	gènes immédiats précoces
β	gènes précoces
γ_1	gènes "leaky late"
γ_2	gènes "true late"

1 INTRODUCTION

1.1 Les virus herpès humains

Les virus herpès sont des virus ubiquitaires et font partie de l'histoire humaine depuis bien longtemps. En effet, des analyses phylogénétiques et de recombinaison du génome du virus herpès simplex 1 (VHS-1) ont démontré que ces virus ont coévolué avec leurs hôtes humains et reflètent le patron de migrations anciennes des populations humaines (Kolb *et al.*, 2013). Les herpès virus appartiennent à l'ordre des *Herpesvirales* qui comprend trois familles. Les *Herpesviridae* infectent les mammifères, reptiles et oiseaux ; les *Alloherpesviridae* infectent les poissons et amphibiens ; les *Malacoherpesviridae* infectent les bivalves (Davison *et al.*, 2009). Huit espèces de la famille des *Herpesviridae* sont connues pour infecter l'humain. Ces virus herpès humains sont classés en trois sous-familles selon leurs séquences en nucléotides ainsi que leur propriétés biologiques: les *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comprend les virus herpès simplex 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2) ainsi que le virus de la varicelle (VZV). Les membres de cette sous-famille induisent une lyse cellulaire importante et se caractérisent par une latence dans les ganglions sensitifs. La sous-famille des *Betaherpesvirinae* comprend le cytomégalovirus humain (HCMV) et les Roseolovirus (HHV-6 et HHV-7). Finalement, la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* comprend le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus herpès humain 8 (HHV-8) qui ont un tropisme lymphoblastoïde et sont oncogéniques (Cann, 2012).

1.2 Structure du virus herpès simplex 1

Le VHS-1 est un virus dont le génome à ADN double brin linéaire de 152 kb code pour plus de 84 protéines (Roizman *et al.*, 2007). Son génome possède deux régions de séquences uniques: le segment long (U_L) et le segment court (U_S) bordées de séquences répétées inversées. Des séquences appelées a et b bordent le segment unique long et a' et c bordent le segment court (figure 1) (Perry *et al.*, 1988). La position de ces régions répétées permet la recombinaison du génome du VHS-1 lors de sa réplication menant à quatre isomères génomiques différents (Hayward *et al.*, 1975).

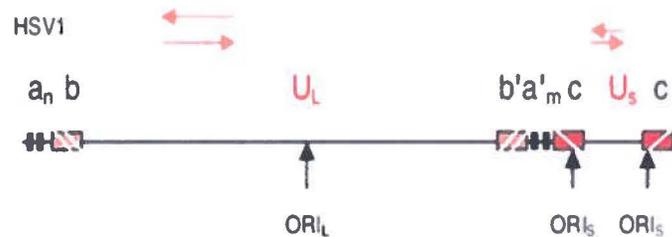


Figure 1 - Représentation d'un monomère génomique du VHS-1. Les régions uniques longue (U_L) et courte (U_S) sont bordées et séparées par des régions répétées (a , b en amont de U_L ; a' , b' entre U_L et U_S ; et c) qui permettent l'inversion de l'orientation des séquences, donnant ainsi quatre isomères génomiques différents (combinaison des quatre flèches rouges). Les flèches noires montrent les origines de réplication du génome (ORI). Image tirée et modifiée de <http://www.jle.com/e-docs/00/03/FD/DB/article.phtml?fichier=images.htm>

Une copie de ce génome est contenue dans une capside icosaédrique composée de 162 capsomères. La coque de la capside est composée de quatre protéines virales: une protéine majeure VP5 ainsi que VP19C, VP23 et VP26 qui sont moins abondantes. Une protéine d'échafaudage, UL26, est reliée à cette coque dans la face interne de la capside (Sheaffer *et al.*, 2000). Une couche protéique additionnelle, le tégment, vient par-dessus la capside. Une étude protéomique a démontré que le tégment est composé de 23 protéines virales et que des protéines cellulaires de l'hôte sont aussi présentes (Loret *et al.*, 2008). La protéine virale la plus abondante est VP22 qui joue un rôle dans la distribution efficace de plusieurs protéines virales et cellulaires dans le cytoplasme. Elle a aussi été identifiée comme un facteur de neurovirulence du

VHS-1 *in vivo* (Tanaka *et al.*, 2012). Finalement, le tégment est surmonté d'une membrane bilipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines virales (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gL, gM et gN) qui sont importantes pour l'infection par le virus (Stannard *et al.*, 1987). Une étude par spectrométrie de masse a cependant montré que les glycoprotéines gJ et gN ne sont pas présentes dans le virion (Loret *et al.*, 2008). La figure 2 ci-après illustre ces différentes composantes du VHS-1.

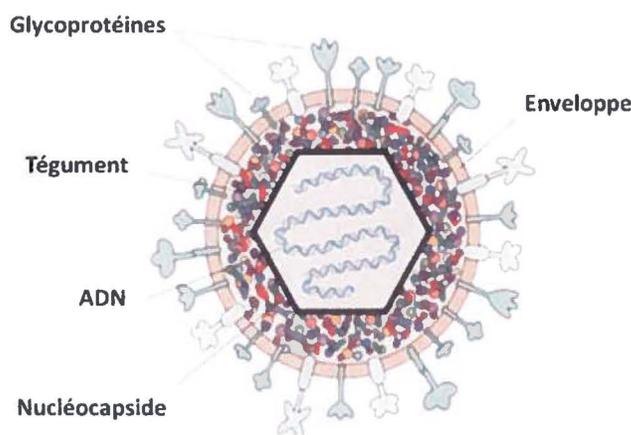


Figure 2 - Structure du VHS-1. Le monomère génomique se trouve dans une capsidie icosaédrique surmontée du tégment et le tout enveloppé d'une membrane bilipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines. Image tirée et modifiée de <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/assets/bio307/jehodge/page01.html>

1.3 Pathogenèse du virus herpès simplex 1

Le VHS-1 est un virus qui affecte la majorité de la population humaine de manière bénigne. Sa pathogenèse se caractérise par une primo-infection, une neuropathogenèse, une latence et une réactivation. Étant un virus enveloppé, la fragilité de l'enveloppe membranaire du virion fait que la transmission entre hôtes se fait par des contacts étroits. Le site de primo-infection du VHS-1 est la muqueuse oro-labiale où le cycle de réplication du virus entraîne la lyse des cellules épithéliales infectées. Cette affection se manifeste par les lésions buccales que l'on appelle communément: feu sauvage. Il s'agit du cycle lytique du virus. Le virus infecte par la

suite les terminaisons axonales des nerfs sensitifs environnants. Il est transporté de façon antérograde le long de l'axone jusqu'au corps neuronal (Cook *et al.*, 1973) où il peut à nouveau se répliquer ou établir une latence dans les neurones du ganglion trigéminal. Lors de cette phase latente, le virus est capable de limiter l'expression de ses gènes et est ainsi à l'abri du système immunitaire. Suite à divers stress de nature physique ou émotionnelle, le virus peut sortir de la latence. Le virus peut donc se répliquer et produire de nouveaux virions qui sont transportés de manière rétrograde le long de l'axone pour retourner au site de primo-infection (Hill *et al.*, 1983) et être à nouveau transmissibles (Knipe *et al.*, 2008). C'est cette réactivation du virus qui est à l'origine des lésions récurrentes au niveau de la muqueuse oro-labiale (figure 3).

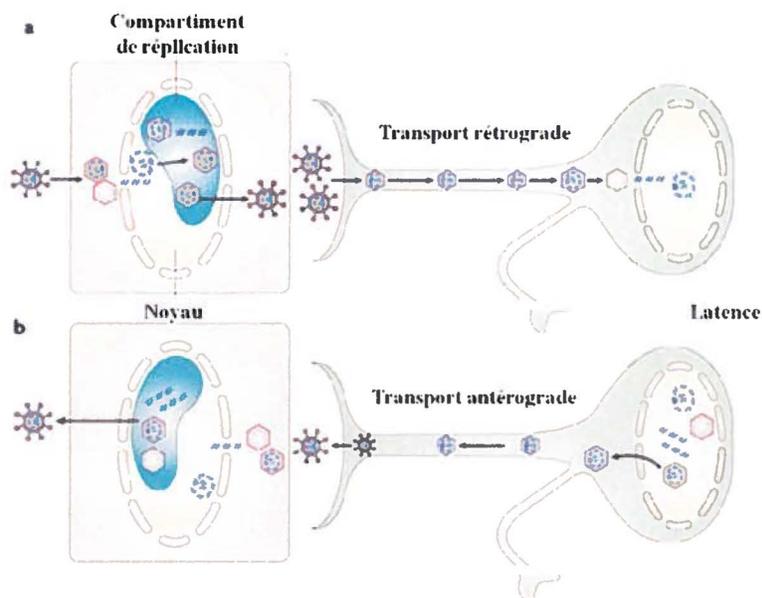


Figure 3 - Pathogenèse du VHS-1. La primo-infection (a) s'effectue au niveau des cellules épithéliales où il y a réplication du virus. Les virions sont ensuite transportés de manière rétrograde au corps neuronal où le virus entre en latence. Suite à divers stress, le virus peut se réactiver. Il y a alors réplication virale dans le corps neuronal et les virions vont retourner au niveau des cellules épithéliales par transport antérograde (b). Image adaptée de la revue de (Knipe *et al.*, 2008).

L'infection par le VHS-1 est, dans la plupart des cas, bénigne. Cependant, les infections herpétiques récurrentes chroniques touchent près de 30% de la population (Liesegang, 2001). De plus, le virus peut se disséminer vers le système nerveux central et causer une encéphalite ou une méningite. De plus, chez des personnes dont le système immunitaire est affaibli telles que les nouveau-nés, les personnes atteintes du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ou les

personnes qui suivent un traitement immunosuppresseur, des complications plus sévères peuvent survenir. L'infection peut également se disséminer dans tout l'organisme et se manifester par une extension des plaques herpétiques (Mann *et al.*, 1984, Rand *et al.*, 1977). Finalement, le virus peut causer une kératite virale et les infections oculaires récurrentes peuvent causer des lésions menant à la cécité. Les infections herpétiques constituent la première cause de cécité due à un agent pathogène dans les pays développés (Streilein *et al.*, 1997).

1.4 Cycle de réplication du virus herpès simplex 1

Le cycle de réplication du VHS-1 est complexe. La figure suivante résume les différentes étapes décrites ci-après (figure 4).

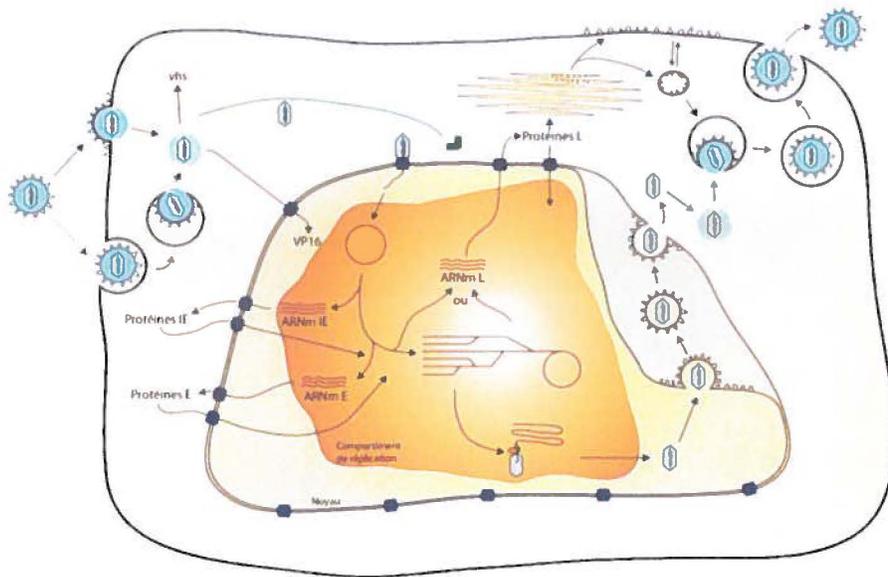


Figure 4 - Cycle de réplication du VHS-1. L'entrée du virus se fait par fusion membranaire ou par endocytose. Par la suite, la protéine du tégment vhs permet l'arrêt de la synthèse protéique de l'hôte et la capsidie est transportée vers le noyau via les microtubules. Le génome entre au noyau par les pores nucléaires. La protéine virale VP16 interagit avec des facteurs cellulaires pour activer la transcription des gènes immédiats précoces (IE) qui permettent l'expression des gènes précoces (E) et la réplication du génome en cercle roulant. Par la suite les gènes tardifs (L) qui codent entre autres pour les protéines structurales sont exprimés. L'assemblage des nucléocapsides se fait dans le noyau et ceux-ci sortent dans le cytoplasme par un enveloppement et désenveloppement à travers les deux feuillets de la membrane nucléaire. La capsidie acquiert le tégment principalement dans le cytoplasme et les glycoprotéines dans des vésicules endocytiques ou issues du TGN. Les virions sortent de la cellule par exocytose. Image tirée de Bertrand, 2011.

1.4.1 Entrée du virus

Dans la littérature, trois voies différentes possibles ont été décrites pour l'entrée du virus: par fusion membranaire ou par endocytose dépendante ou indépendante du pH selon le type cellulaire (Koyama *et al.*, 1987, Nicola *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2003). Dans chacun de ces trois cas, l'entrée du VHS-1 dans la cellule hôte requiert au moins les quatre glycoprotéines nécessaires pour la fusion: gB, gD, l'hétérodimère gH/gL; et un récepteur cellulaire de gD. La première étape est l'attachement du virion à la surface cellulaire qui se fait par l'interaction de gB ou de gC avec une héparine sulfate. Les héparines sulfates forment une famille de polysaccharides qui sont impliqués dans l'attachement de différents pathogènes. Des protrusions membranaires de la cellule facilitant cet attachement du VHS-1 ont été observées (Akhtar *et al.*, 2009). Des évidences suggèrent également que des récepteurs différents de l'héparine sulfate seraient impliqués dans l'attachement (Bender *et al.*, 2005). Entre autres, un récepteur nommé PILR- α interagit avec gB à cette fin. Aussi, les protéines B5 et intégrines $\alpha\beta 3$ semblent aussi agir comme récepteurs d'entrée du VHS-1 par leur interaction avec gH (Akhtar *et al.*, 2009). Par la suite, gD se lie à un des différents récepteurs cellulaires suivants: "Herpes Virus Entry Mediator" (HVEM), nectin-1 ou l'héparine sulfate 3-O sulfatée. La protéine HVEM est une protéine de type récepteur du TNF tandis que nectin-1 fait partie de la superfamille des immunoglobulines (Reske *et al.*, 2007). Cette liaison entraîne par la suite un changement de conformation de gD, ce qui recrute les autres glycoprotéines gB, gH/gL à former un complexe multiprotéique de fusion. Les membranes cellulaire/vésiculaire et virale sont amenées à proximité et il y a mélange des lipides des membranes. Il s'en suit un mélange du cytoplasme avec le contenu viral (Eisenberg *et al.*, 2012).

Une étude a identifié la protéine cellulaire NMIIA comme un récepteur d'entrée du VHS-1 en interagissant avec la glycoprotéine gB. En effet, la réduction de l'expression de NMIIA dans la cellule inhibe l'infection par le VHS-1 ainsi que la fusion intercellulaire causée par la co-expression des quatre glycoprotéines impliquées dans la fusion (Arii *et al.*, 2010). La glycoprotéine gB appartient au groupe des protéines de fusion de classe III et active la fusion membranaire en apportant l'énergie nécessaire à ce processus par changement de conformation

(Hannah *et al.*, 2007, Heldwein *et al.*, 2006). Par ailleurs, gB est hautement conservée chez les *Herpesviridae* et présente des homologies de structure avec les protéines de fusion d'autres familles de virus telles que la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Roche *et al.*, 2006) et la protéine gp64 du baculovirus (Kadlec *et al.*, 2008). Ainsi, gB semble être la glycoprotéine de fusion du VHS-1.

Lorsque la particule virale a atteint le cytoplasme de la cellule hôte, les protéines du tégment sont relâchées et interviennent dans différents processus précédant l'expression génique. Entre autres, la protéine du tégment VHS ("virion host shutoff") qui est le produit du gène *ul41* intervient pour dégrader les ARNm cellulaires et viraux. Lors de l'infection lytique, la protéine VHS interagit avec une autre protéine du tégment VP16. Cette protéine est un activateur de la transcription des gènes immédiats précoces et son interaction avec VHS diminue l'activité de celle-ci (Matis *et al.*, 2001). La nucléocapside est transportée jusqu'au noyau le long des microtubules via les dynéines et le génome est relâché au niveau des pores nucléaires (Sodeik *et al.*, 1997).

1.4.2 Expression séquentielle des gènes viraux et réplication du génome

Une fois que le génome arrive dans le noyau, il se circularise et l'expression séquentielle des gènes viraux a lieu. La protéine du tégment VP16 interagit avec deux protéines cellulaires: un facteur de transcription Oct-1 et un facteur de prolifération cellulaire HCF-1 pour former un complexe permettant l'activation de la transcription de la première série de gènes viraux (Campbell *et al.*, 1984, Post *et al.*, 1981, Wysocka *et al.*, 2003). La transcription est effectuée par l'ARN polymérase II cellulaire (Preston *et al.*, 1976).

Tout d'abord, les gènes immédiats précoces ou gènes α sont exprimés. Les protéines codées par ces gènes sont des facteurs de transcription nécessaires pour l'expression des autres gènes viraux. Les gènes précoces ou gènes β sont ensuite transcrits. Les produits de ces gènes

sont impliqués dans la réplication du génome viral ainsi que l'expression du groupe de gènes suivants. La réplication du génome nécessite au moins sept protéines virales. Tout d'abord, la protéine UL9 qui peut se lier aux trois origines de réplication du génome (figure 1) cause la distorsion au niveau des régions riches en A/T de l'origine de réplication et ensuite la séparation des deux brins d'ADN par sa fonction d'hélicase. Elle interagit avec une autre protéine virale ICP8 qui stimule cette activité hélicase ainsi que les activités polymérase (complexe UL30/UL42) et hélicase/primase (complexe UL5/UL8/UL52) subséquentes. La réplication du génome du VHS-1 se fait par un modèle de cercle roulant et donne de longs concatémères formés de copies du génome en tandem (Boehmer *et al.*, 1997, Jones *et al.*, 1979). Finalement, les gènes tardifs ou gènes γ sont transcrits. Ils codent pour les protéines structurales ainsi que les protéines nécessaires à la formation du virion. Les gènes tardifs se divisent en deux groupes: les gènes "leaky late" ou γ_1 qui sont faiblement exprimés en absence de réplication du génome viral et les gènes "true late" ou γ_2 dont l'expression est entièrement dépendante de la réplication (Holland *et al.*, 1980, Jones *et al.*, 1979).

L'entrée du génome viral dans le noyau de la cellule hôte entraîne une réorganisation de celui-ci. En effet, plusieurs protéines nucléaires sont relocalisées pour former des compartiments de réplication virale où ont lieu la transcription des gènes viraux, la réplication de l'ADN, le clivage des concatémères et l'encapsidation (de Bruyn Kops *et al.*, 1994, Lamberti *et al.*, 1996, Lamberti *et al.*, 1998, Quinlan *et al.*, 1984). Suite à un cycle de réplication, il y a l'encapsidation des nouveaux génomes. Les protéines structurales formant la capsidie (VP5, VP19, VP23 et VP26) synthétisées dans le cytoplasme sont importées au noyau. Une seule copie du génome est encapsidée. Pour cela, les protéines virales UL15 et UL28 semblent être impliquées dans le clivage de l'ADN concatémérique. Ces protéines sont également présentes dans les formes primaires de capsides, les procapsides, suggérant qu'elles sont impliquées dans l'empaquetage de l'ADN et que c'est lors de l'insertion de celui-ci dans la procapsidie que le clivage se fait. D'autres protéines virales telles que UL25 semblent être importantes pour la stabilité de la nucléocapsidie assemblée. La protéine virale UL25 se retrouve à la surface externe de la capsidie (Newcomb *et al.*, 2006). Cette protéine est impliquée dans les étapes tardives de l'encapsidation du génome (Stow, 2001). Un modèle propose qu'UL25 stabilise la capsidie face à la pression générée par

l'insertion du génome et évite ainsi le clivage prématuré des monomères (Cockrell *et al.*, 2009 ; Preston *et al.*, 2008). Elle est aussi requise pour le maintien de la stabilité de la capsidie par son interaction avec la protéine du tégument UL36 (Coller *et al.*, 2007).

1.4.3 Sortie du noyau vers le cytoplasme

Différentes hypothèses ont été émises sur la sortie des virus herpès du noyau vers le cytoplasme. Une de ces hypothèses soutient que les particules virales seraient transportées de l'espace périnucléaire à travers le Golgi jusqu'à la surface cellulaire dans des vésicules d'exocytose (Epstein, 1962). Une autre hypothèse veut que les nucléocapsides passent à travers les pores nucléaires qui deviendraient plus larges (Wild *et al.*, 2005). Cependant, l'hypothèse la plus acceptée est celle d'un enveloppement primaire au niveau de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire suivi d'un désenveloppement par fusion avec la membrane externe de celle-ci (Mettenleiter, 2002). Pour que l'enveloppement primaire puisse se faire, la lamina formant la structure du noyau doit être modifiée (Simpson-Holley *et al.*, 2005). Pour cela, des protéines kinases C (PKC) sont recrutées à la membrane pour phosphoryler la lamine B et l'émerine afin de défaire la structure de la lamina nucléaire (Leach *et al.*, 2010). Le complexe de protéines virales UL34 et UL31 semblerait être impliqué dans ce recrutement de PKC à la membrane nucléaire (Park *et al.*, 2006). Suite à ce désassemblage de la lamina, l'enveloppement primaire des virions peut avoir lieu grâce à l'interaction des protéines de la nucléocapsidie avec les glycoprotéines gB, gD et gM ancrées dans la membrane nucléaire interne (Skepper *et al.*, 2001). Par la suite, le désenveloppement se fait par fusion avec la membrane nucléaire externe et cette fusion semble impliquer les glycoprotéines gB et gD qui agissent de manière redondante pour cette fonction (Farnsworth *et al.*, 2007).

1.4.4 Étapes tardives dans le cytoplasme

Une fois sorties dans le cytoplasme, les nucléocapsides doivent acquérir le tégument ainsi que leur enveloppe membranaire finale avec les glycoprotéines. Plusieurs protéines virales et cellulaires interviennent dans ces étapes tardives de la morphogénèse des virions. Les mécanismes précis de l'enveloppement secondaire ne sont pas encore bien décrits mais deux principales voies sont acceptées dans la littérature.

Dans une première hypothèse, l'enveloppement final s'effectuerait dans des compartiments trans-golgiens (TGN). Cette conclusion découle des études basées sur la colocalisation des nucléocapsides avec divers marqueurs du TGN (Granzow *et al.*, 2001, Komuro *et al.*, 1989). De plus, les glycoprotéines virales et des protéines du tégument ont également été localisées dans ce compartiment un peu avant les capsides (Turcotte *et al.*, 2005). Ainsi, après l'acquisition des protéines du tégument dans le cytoplasme, les virions se rendraient dans ces vésicules issues du TGN contenant les glycoprotéines (figure 4). Il a été démontré que la protéine du tégument VP22 du VHS-1 interagit avec le moteur moléculaire NMIIA qui est recruté au cytosquelette d'actine et impliqué dans plusieurs processus du trafic intracellulaire (H. van Leeuwen *et al.*, 2002). Le transport des nucléocapsides impliquent aussi d'autres facteurs cellulaires tels que la dystonine, une protéine associée au cytosquelette qui interagit avec la protéine du tégument UL37 (Paseloup *et al.*, 2013). Par la suite, les vésicules contenant les virions entièrement formés se rendent à la membrane cellulaire d'une manière dépendante de la protéine kinase D (PKD) cellulaire (Remillard-Labrosse *et al.*, 2009) et de la myosine Va (Roberts *et al.*, 2010).

Une autre voie postulée pour l'acquisition de l'enveloppe membranaire par les virions est le bourgeonnement dans des vésicules d'endocytose contenant les glycoprotéines (Radsak *et al.*, 1996). En effet, des particules de HSV-1 ont été co-purifiées avec des marqueurs d'endosomes telles que Rab5 (Harley *et al.*, 2001) ou un marqueur d'endosome précoce EEA1 (Turcotte *et al.*, 2005). De plus, plusieurs études ont observé le recyclage des glycoprotéines virales déjà

exprimées à la membrane plasmique vers le TGN dans des vésicules endosomales (Beitia Ortiz de Zarate *et al.*, 2004, Brideau *et al.*, 2000, Tirabassi *et al.*, 1998). Le transport des glycoprotéines vers la surface cellulaire semble aussi dépendre de la myosine Va (Roberts *et al.*, 2010). Par ailleurs, quelques observations suggèrent que d'autres compartiments seraient impliqués dans l'enveloppement secondaire. En effet, cette étape est affectée lorsque la biogenèse de corps multivésiculaires (MVB) est affectée (Calistri *et al.*, 2007, Crump *et al.*, 2007). Les MVB sont des compartiments issus de l'invagination des membranes des endosomes précoces qui permettent de trier les protéines destinées à la dégradation lysosomale (Piper *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les glycoprotéines gM et gE/gI, lorsqu'elles sont simultanément inhibées, diminuent fortement la réplication virale et causent une accumulation des nucléocapsides dans le cytoplasme (Brack *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que les glycoprotéines gE/gI jouent un rôle dans la sortie directionnelle des virions dans les cellules polarisées et les neurones (McMillan *et al.*, 2001, Tirabassi *et al.*, 1997). Ainsi, il a été proposé que ces glycoprotéines sont impliquées dans le transport directionnel des virions vers la membrane cellulaire et/ou vers les jonctions cellulaires (Dingwell *et al.*, 1994, Dingwell *et al.*, 1998, Johnson *et al.*, 2001).

Finalement, il a été démontré que plusieurs protéines de la famille des Rab GTPases sont impliquées dans l'enveloppement secondaire du VHS-1. En effet, il a été démontré que la protéine Rab6 est nécessaire pour le transport des glycoprotéines virales vers la membrane plasmique (Johns *et al.*, 2014) et par la suite, Rab5 interviendrait dans l'internalisation de celles-ci dans des vésicules d'endocytose à l'intérieur desquelles les virions bourgeonneront (Hollinshead *et al.*, 2012). Une autre étude a démontré que la déplétion de la protéine Rab1a/b empêche le transport des glycoprotéines du RE vers les compartiments d'enveloppement et que la déplétion de Rab43 entraîne une fragmentation du TGN associée à une diminution de l'enveloppement secondaire des virions (Zenner *et al.*, 2011). L'assemblage du tégument et l'enveloppement secondaire sont deux processus qui ne requièrent pas nécessairement la présence de capsides dans le cytoplasme. Ainsi, des particules dépourvues de nucléocapsides

peuvent donc se retrouver dans le milieu extracellulaire en plus des virions complets. Ce sont les particules L ou "light particles" (Rixon *et al.*, 1992).

1.5 Latence et réactivation

Une des caractéristiques communes de tous les virus herpès α humains est la capacité de rester en latence dans les neurones sensitifs de l'hôte. Le virus infecte les neurones sensitifs innervant le site de primo-infection et s'y établit en latence (Efstathiou *et al.*, 2005). Les mécanismes de la latence sont peu connus. L'entrée en latence semble être due à une incapacité du virus à exprimer les gènes immédiats précoces. L'incapacité de la protéine virale VP16 à se localiser dans le noyau des neurones empêche la transcription de ces gènes (Steiner *et al.*, 1990, Wysocka *et al.*, 2003). De plus, la protéine cellulaire HCF-1 nécessaire pour l'expression des gènes lytiques semble s'accumuler dans le cytoplasme et n'est relocalisée au noyau qu'en réponse à un stress. Durant cette phase, le génome viral se retrouve sous forme circulaire appelé: épisode (Efstathiou *et al.*, 1986). Contrairement à certains virus de la sous-famille des *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*, la méthylation de l'ADN ne semble pas jouer un rôle dans le contrôle de la transcription des gènes lors de la latence du VHS-1 (Kubat *et al.*, 2004, Quina *et al.*, 2006). L'état de latence est maintenu par la modification des histones, les protéines qui permettent la compaction de l'ADN. Des protéines cellulaires de la famille des PRC2 semblent intervenir dans la désacétylation et la triméthylation des histones au niveau des promoteurs des gènes lytiques lors de la latence (Bloom *et al.*, 2010). Ces modifications permettraient à l'ADN de passer du stade euchromatine (relâché) au stade hétérochromatine (compact). Par la suite, des protéines cellulaires de la famille des PRC1 interviennent pour maintenir l'état compact de l'ADN (Bloom *et al.*, 2010). Seul un transcrit de 8.3 kb appelé "latency-associated transcript" (LAT) est exprimé en abondance (Deatly *et al.*, 1987, Stevens *et al.*, 1987). Ce transcrit est un précurseur de microARNs viraux qui bloquent l'expression des gènes permettant l'activation du cycle lytique du virus (Umbach *et al.*, 2008). Par ailleurs, des facteurs cellulaires interviennent aussi dans le maintien de la latence. En effet, une étude a démontré que miR-138, un microARN spécifique

aux neurones, inhibe l'expression d'ICP0, une protéine virale impliquée dans la transcription des gènes lytiques (Pan *et al.*, 2014).

Suite à divers stress physiques (fièvre, exposition aux UV, menstruations) ou émotionnels (stress), le virus peut sortir de sa latence et réactiver son infection lytique (Roizman *et al.*, 2013). Lors de cette réactivation, des modifications dans la chromatine ont lieu : on observe la désacétylation des histones au niveau des amplificateurs de l'expression des LATs, tandis que les histones sont acétylées au niveau des gènes impliqués dans l'infection lytique (Amelio *et al.*, 2006, Neuman *et al.*, 2007). Ainsi, l'accès au promoteur des gènes viraux est facilité (Efstathiou *et al.*, 2005). La réactivation est associée à un relâchement de la répression de l'expression des gènes lytiques corrélé à une diminution des microARNs viraux (Roizman *et al.*, 2013).

1.6 La protéine UL24

1.6.1 Généralités sur la protéine UL24

Dans ce travail, nous nous intéressons particulièrement à la protéine UL24 du VHS-1. Le gène *ul24* est le 24ème cadre de lecture ouvert dans la région unique longue du génome du virus (Perry *et al.*, 1988). La protéine UL24 est conservée au sein de la famille des *Herpesviridae* (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Il s'agit d'une protéine fortement basique à cinétique tardive de 269 acides aminés et d'une taille de 29.5 kDa (Pearson *et al.*, 2002). La structure tridimensionnelle de la protéine n'a pas encore été caractérisée à ce jour mais la structure primaire en acides aminés montre la présence de cinq domaines d'homologie (figure 5) dans la partie N-terminale (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Selon les prédictions, cette partie N-terminale d'UL24 serait formée d'une succession d'hélices α et de feuillets β tandis que la partie C-terminale serait une chaîne polypeptidique sans structure particulière (Knizewski *et al.*, 2006). En culture cellulaire, la protéine est détectable vers 9 h post-infection où on la retrouve en petits foyers principalement nucléolaires dans le noyau. Sa quantité augmente plus tardivement et on la retrouve dans le

noyau mais aussi dans le cytoplasme en contexte d'infection (Lymberopoulos *et al.*, 2007, Pearson *et al.*, 2002). En contexte de transfection transitoire, la protéine se retrouve aussi dans le noyau en colocalisant avec le nucléole mais également dans le cytoplasme et dans l'appareil de Golgi (Bertrand *et al.*, 2008). Les deux domaines de la protéine UL24 semblent être fonctionnellement distincts. En effet, lorsqu'exprimées seules, les parties N-terminale et C-terminale de la protéine sont détectées respectivement dans le noyau et dans le cytoplasme exclusivement (Bertrand *et al.*, 2008). La partie N-terminale est hautement conservée parmi les orthologues d'UL24, contrairement à la partie C-terminale qui est faiblement conservée (J. G. Jacobson *et al.*, 1989).

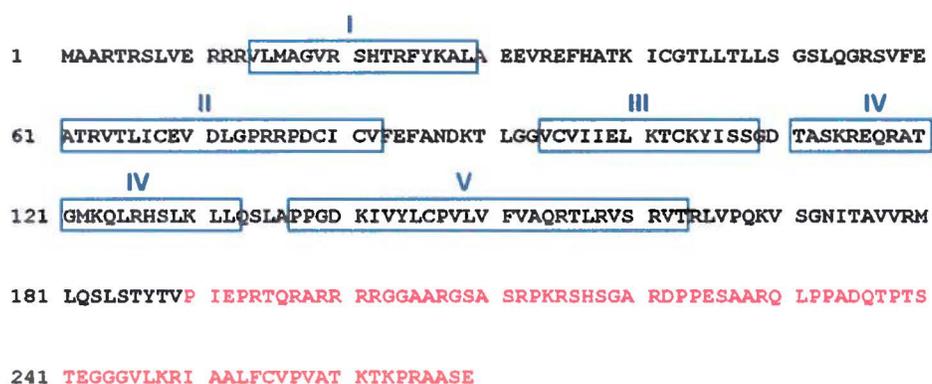


Figure 5 - Séquence primaire en acides aminés de la protéine UL24 de la souche KOS du VHS-1. Elle est constituée de 269 acides aminés et possède cinq domaines d'homologie hautement conservés dans la partie N-terminale (encadrés I à V). La partie C-terminale de la protéine (aa 190-269) est illustrée en rouge.

1.6.2 Importance en culture cellulaire

Des études antérieures ont démontré que des modifications dans la protéine UL24 sont associées à un phénotype de plages syncytiales où les membranes plasmiques des cellules infectées fusionnent de manière aberrante pour aboutir à de grosses cellules multinucléées. Ce phénotype est visible à 37°C et est plus pénétrant à 39°C (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Ce phénotype de plages syncytiales est similaire à ce qu'on observe lorsque les gènes *gB*, *gK* et *ul20* (Baines *et al.*, 1991) sont mutés. La glycoprotéine *gB* est impliquée dans les événements de

fusion lors de l'entrée du virus (Reske *et al.*, 2007) ainsi que dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane nucléaire externe lors de la sortie (Farnsworth *et al.*, 2007). Il a aussi été démontré que lorsqu'on co-exprime gK avec les glycoprotéines impliquées dans la fusion cellule-cellule (gB, gD, gH et gL) en contexte de transfection transitoire, la fusion aberrante des cellules causées par celles-ci est inhibée (Avitabile *et al.*, 2003). Cela démontre que gK a une activité anti-fusogénique même hors du contexte d'infection. D'autre part, des mutations dans le gène *ul24* sont également associées à de légères diminutions des titres viraux ainsi que des plages de lyse de tailles plus petites (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Ces phénotypes démontrent l'importance d'UL24 pour la réplication du VHS-1 *in vitro*.

1.6.3 Importance *in vivo*

Une étude dans un modèle murin d'infection oculaire a démontré que l'absence de la protéine UL24 réduisait la réplication virale ainsi que la réactivation du virus. En effet, une réduction des titres d'environ 1 log₁₀ a été observée dans les larmes et d'environ 4 log₁₀ dans les neurones des ganglions trigéminaux des souris infectées avec le virus déficient en UL24 par rapport au virus de type sauvage. Le virus déficient en UL24 était capable d'entrer en latence mais les quantités de transcrits LAT et d'ADN viral étaient faibles et un défaut de réactivation virale y a été associé (Jacobson *et al.*, 1998). De plus, un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK identifié chez UL24 (Knizewski *et al.*, 2006) semble être important pour la réplication du virus dans les yeux et dans les ganglions trigéminaux ainsi que pour la réactivation du VHS-1 (Leiva-Torres *et al.*, 2010).

1.6.4 Les orthologues d'UL24 et leurs rôles

Une étude portant sur la famille des protéines UL24 de divers herpès virus a démontré que les protéines ORF20 du gammaherpès virus murin 68 (HVM68) et du HHV-8, UL76 du HCMV ainsi que UL24 du VHS-1 induisent un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules

transfectées en inactivant le complexe mitotique cycline B/cdc2 (Nascimento *et al.*, 2009, Nascimento *et al.*, 2007).

Chez le virus herpès simplex 2 (VHS-2), un mutant de la protéine UL24 démontre aussi un phénotype de plages syncytiales dans trois types cellulaires différents (Vero, HFF et SK), ainsi qu'une diminution significative de la virulence du virus mutant dans un modèle murin d'infection vaginale, malgré l'absence d'un impact sur la réplication en culture cellulaire (Blakeney *et al.*, 2005). Ainsi, un modèle de vaccin vivant atténué contre le VHS-2 a été développé en utilisant la souche dans laquelle UL24 a été mutée. Cette vaccination a été testée et s'est avérée offrir une immunité protectrice anti-VHS-2 chez les souris et les cochons d'Inde (Visalli *et al.*, 2014).

Une étude *in vivo* dans un modèle murin d'inoculation intranasale a démontré que la protéine UL24 du virus herpès équin 1 (VHE-1) est requise pour la neuropathogénèse du virus. De plus, malgré le fait que la protéine n'est pas indispensable pour la réplication du virus dans les cellules épithéliales, elle est requise pour sa réplication dans des cellules neuronales issues du cortex cérébral (Kasem *et al.*, 2010).

La protéine UL76 du HCMV a été identifiée comme étant un facteur de régulation positive ou négative de l'expression génique. Cependant, à la différence de la protéine UL24 du VHS-1, UL76 est retrouvée dès les temps précoces de l'infection et se localise exclusivement au noyau des cellules infectées (S. K. Wang *et al.*, 2000). En outre, la purification des particules virales du HCMV a révélé la présence de la protéine UL76 dans celles-ci. La régulation de l'expression génique associée à UL76 est reliée à une inhibition de la réplication virale, ce qui suppose une implication de la protéine dans l'entrée en latence du HCMV (S. K. Wang *et al.*, 2004). Par ailleurs, une étude récente a montré que UL76 forme des agrégomes nucléaires en se liant à S5a, une composante du système ubiquitine-protéasome qui est un récepteur des protéines mal repliées polyubiquitinées (Lin *et al.*, 2013).

De même, chez le gammaherpès virus murin 68 (HMV-68), l'orthologue de la protéine UL24 a été identifiée par des analyses en spectrométrie de masse comme faisant partie du virion, lui suggérant une fonction lors des étapes précoces de l'infection ou dans les étapes d'assemblage et de sortie du virion (Bortz *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été démontré que cette protéine n'est pas essentielle pour la réplication du HMV-68 dans un modèle d'inoculation intranasale mais que l'élimination du virus dans les poumons est retardée de quatre jours lorsque la protéine est absente (Nascimento *et al.*, 2011).

En résumé, ces études ont mis en évidence l'importance et la multifonctionnalité de la protéine UL24 et de ses orthologues lors de l'infection par les divers herpès virus: importance pour la neuropathogénèse, pour la réplication virale, pour la régulation de l'expression génique et pour le contrôle de la fusion cellulaire. Cependant, contrairement à certains de ces orthologues, chez le VHS-1, une étude de caractérisation du virion extracellulaire a démontré l'absence de la protéine UL24 dans celui-ci (Loret *et al.*, 2008).

1.7 UL24 et les modifications au noyau

Comme mentionné auparavant, UL24 possède deux domaines ayant des localisations intracellulaires distinctes (Bertrand *et al.*, 2008). Un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK a été identifié dans la partie N-terminale de la protéine UL24 (Knizewski *et al.*, 2006). Le haut niveau de conservation des acides aminés formant le site catalytique de ce motif suggère que celui-ci exerce une fonction importante. Des études antérieures ont caractérisé le rôle de la protéine UL24 sur la redistribution de la nucléoline par le VHS-1. En effet, lors de l'infection, la nucléoline, une protéine du nucléole, se retrouve dispersée dans le noyau et cette dispersion est dépendante d'UL24 (Lymeropoulos *et al.*, 2007). De plus, des expériences en transfection ont démontré que la partie N-terminale était nécessaire et suffisante pour induire cette dispersion (Bertrand *et al.*, 2008). Des mutations (E99A/K101A) ciblant les résidus conservés du site catalytique du motif d'endonucléase précédemment mentionné ont révélé que ce motif était important pour la dispersion de la nucléoline. D'autre part, ces mêmes mutations ont causé une

diminution de la réplication virale en culture cellulaire ainsi qu'un phénotype de plages syncytiales. Ces résultats montrent l'importance du motif d'endonucléase de la protéine UL24 pour l'infection par le VHS-1. Par ailleurs, les substitutions dans le motif d'endonucléase n'ont pas affecté la localisation de la protéine HA-UL24 au Golgi en contexte de transfection transitoire. Cela appuie l'hypothèse que les parties N-terminale et C-terminale d'UL24 ont des fonctions distinctes (Bertrand *et al.*, 2010).

En plus de la nucléoline, les résidus hautement conservés du motif d'endonucléase d'UL24 semblent être essentiels pour la redistribution de B23, une autre protéine nucléolaire (LyMBERopoulos *et al.*, 2011). Cela suggère que la protéine UL24 est impliquée dans un mécanisme viral impliquant le nucléole. Une étude a montré que, lorsque l'expression de la nucléoline est diminuée, il y a moins de nucléocapsides atteignant le cytoplasme, suggérant que la nucléoline est impliquée dans la sortie du virus du noyau vers le cytoplasme (Sagou *et al.*, 2010). Une comparaison des ratios de particules virales dans le noyau et dans le cytoplasme a aussi révélé qu'en absence d'UL24, les particules virales semblent être en plus grande proportion retenues dans le noyau par rapport au virus de type sauvage. Ainsi, les modifications au nucléole induites par UL24 joueraient probablement un rôle dans les étapes de sortie des nucléocapsides du noyau vers le cytoplasme (LyMBERopoulos *et al.*, 2011).

1.8 UL24 dans le cytoplasme

1.8.1 Modifications au Golgi

L'infection par le VHS-1 entraîne une fragmentation du Golgi ainsi que la formation de compartiments cytoplasmiques à partir de membranes issus du réseau transgolgien (TGN) (Avitabile *et al.*, 1995). Une étude récente sur l'impact de l'absence de la protéine UL24 sur le système sécrétoire dans les cellules HFF a démontré qu'il n'y avait pas de modification dans la distribution de la calnexine, une protéine membranaire du réticulum endoplasmique en absence

d'UL24. Cependant, dans les cellules infectées avec le virus déficient en UL24, le patron démontré par les marqueurs du Golgi était différent de celui des cellules mock-infectées mais également différent de celui des cellules avec le virus de type sauvage. Cette différence a été observée à 37°C mais à 39°C, lorsque le phénotype syncytial était le plus pénétrant, la distribution du Golgi était la même dans les cellules infectées par les deux virus. Cela suppose que les modifications au Golgi observées à 37°C sont une conséquence indirecte de la formation de syncytia et non associées à la formation de ces derniers (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013).

1.8.2 Impact sur la redistribution des glycoprotéines virales

Une étude a démontré que la protéine UL24 joue un rôle dans la redistribution des glycoprotéines virales impliquées dans la fusion membranaire (gB, gD, gH et gL) (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). À partir de 12 h post-infection, on observe une distribution linéaire des glycoprotéines dans les cellules infectées avec le virus déficient en UL24, contrairement à une distribution plus ponctuelle et uniforme avec le virus de type sauvage. De plus, en absence d'UL24, ces glycoprotéines montraient une colocalisation plus faible avec les microfilaments d'actine. Ainsi, UL24 serait donc impliquée dans la distribution de ces glycoprotéines en association avec le cytosquelette. Le marquage de la protéine de la capsid était différente de celui des glycoprotéines, ce qui démontre que le patron linéaire observé en absence d'UL24 ne correspond pas aux virions nouvellement formés mais uniquement aux glycoprotéines (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013).

1.9 Les interactions entre protéines

Lorsqu'il est question d'identifier la ou les fonction(s) d'une protéine, la connaissance de ces partenaires d'interaction est essentielle. En effet, une protéine n'agit pas seule mais forme souvent des complexes protéiques, transitoires ou permanents, qui sont importants dans les

divers mécanismes cellulaires. Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier des interactions protéiques. Quelques-unes d'entre elles sont décrites ci-après.

1.9.1 L'identification d'une interaction entre protéines connues

Pour identifier des interactions entre protéines connues soupçonnées d'interagir ensemble, une méthode fréquemment utilisée est la co-immunoprécipitation. Les protéines d'intérêt peuvent être exprimées dans une cellule *in vivo* ou par un système de transcription et de traduction *in vitro*. On peut également procéder à un "cross-linking" des complexes protéiques avant de faire l'immunoprécipitation pour permettre de détecter les interactions transitoires (Vasilescu *et al.*, 2004). La protéine appât est précipitée à l'aide d'un anticorps contre cette protéine ou contre une étiquette fusionnée à celle-ci. Une analyse par immunobuvardage de type western permet de voir si la protéine proie a aussi été précipitée. Cette technique s'effectue généralement en conditions non-dénaturantes, ce qui rend la technique très sensible à la détection d'interactions protéiques. De plus, elle permet de détecter les interactions directes et indirectes (Tang *et al.*, 2009).

D'autres techniques impliquant la microscopie permettent également de démontrer une interaction entre deux protéines. Le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) est souvent utilisé. Dans cette technique, une protéine est fusionnée à un fluorophore donneur et une autre fusionnée à un fluorophore accepteur. S'il y a une interaction entre les deux protéines, il y a un transfert d'énergie entre les deux fluorophores qui se traduit par une émission de fluorescence. Cette technique permet de détecter une proximité physique dans une distance de 1 à 10 nm entre deux molécules (Förster, 1948). Une variante du FRET est le BRET ("Bioluminescence Resonance Energy Transfer") qui consiste à remplacer le fluorophore donneur par la luciférase et permet de diminuer le bruit de fond (Deriziotis *et al.*, 2014). Une technique relativement similaire au FRET/BRET est la complémentarité de fluorescence bimoléculaire (BiFC). Elle consiste à fusionner les protéines d'intérêt avec une partie d'un fluorophore respectivement. Ainsi, s'il y a une interaction entre les deux protéines, le fluorophore est reconstitué et il y a une émission de fluorescence. Ces techniques présentent l'avantage de permettre l'observation *in vivo*

de la dynamique des interactions protéiques. Cependant, les molécules fusionnées aux fluorophores sont exprimées de manière ectopique et ne représentent pas nécessairement les protéines endogènes (Meng *et al.*, 2005). Ces techniques nécessitent généralement l'existence d'anticorps contre les protéines d'intérêt ou la production de versions étiquetées des protéines afin de pouvoir les détecter. De plus, ces techniques permettent d'étudier l'interaction d'une protéine avec une autre mais ne permettent pas un criblage. Ainsi, elles sont généralement utilisées pour confirmer une interaction identifiée par d'autres méthodes.

1.9.2 La recherche de partenaires d'interaction d'une protéine d'intérêt

Pour des recherches de partenaires d'interaction, d'autres approches peuvent être utilisées. La purification par affinité couplée à la spectrométrie de masse est une technique largement utilisée à cette fin. Une protéine d'intérêt est retenue sur une colonne (chromatographie d'affinité) ou bien immunoprécipitée. Par la suite, les protéines qui interagissent avec cette protéine d'intérêt sont éluées et identifiées par spectrométrie de masse. Cette technique est efficace mais requiert une purification de la protéine et de bons contrôles négatifs afin d'éliminer les fausses interactions positives (Bauer *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il y a aussi la technique du "phage display", une technique qui a été décrite par (Smith, 1985). Elle permet le criblage d'une banque de protéines qui sont fusionnées à une protéine de surface d'un phage. Ainsi, les protéines sont exprimées à la surface du phage lorsqu'elles se multiplient dans les bactéries. Elles sont exposées ensuite à la protéine appât et les protéines qui interagissent avec celle-ci sont retenues. Le bactériophage le plus fréquemment utilisé pour cette technique est le phage filamenteux M13. Cette technique permet de cribler des banques de grande taille car la manipulation du génome est relativement simple et la multiplication du phage est efficace. Cependant, la représentativité des banques utilisées peut être biaisée, à cause d'un taux d'expression différent des protéines ou d'une sélection des gènes qui présentent un avantage pour les bactéries (Rodi *et al.*, 2002). De plus, les protéines sont

exprimées dans un système procaryote et peuvent donc ne pas subir les modifications post-traductionnelles nécessaires.

Finalement, une technique couramment utilisée est le criblage double hybride. Des versions du système existent chez la bactérie, chez la levure et chez les mammifères. Le principe de ce système repose sur la reconstitution d'une molécule divisée en deux sous-unités qui se traduit par l'expression de gènes rapporteurs dont le phénotype est facilement observable (Fields *et al.*, 1989). Chez la bactérie, des versions de la technique reposant sur la reconstitution d'une voie de signalisation (Battesti *et al.*, 2012, Karimova *et al.*, 1998) et sur la reconstitution d'un transactivateur (Dove *et al.*, 2004) existent. Cette technique diminue la fréquence des artéfacts possibles lorsque les protéines d'intérêt sont d'origine eucaryote puisque les homologies sont moindres. Toutefois, les modifications post-traductionnelles n'ayant pas lieu, le double hybride en bactérie peut aboutir à de nombreux faux positifs (Karimova *et al.*, 1998). Le système double hybride en cellules de mammifères est plus proche du contexte physiologique humain. Il consiste à fusionner la protéine appât avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (GAL4 DNA-BD) et fusionner les protéines proies avec le domaine transactivateur de la protéine VP16 du VHS-1. Les vecteurs d'expression de ces deux protéines sont co-transfectés en cellules de mammifères avec un vecteur portant le gène rapporteur. Cependant, les manipulations sont plus difficiles à réaliser et cette technique n'est donc pas utilisée pour effectuer un criblage à haut débit comme dans le cas du double hybride chez la levure (Luo *et al.*, 1997).

1.9.3 Le système double hybride chez la levure

Le principe du système double hybride chez la levure repose sur la reconstitution d'un facteur de transcription qui peut être divisé en deux sous-unités (Fields *et al.*, 1989). Pour cela, le facteur de transcription GAL4 est largement utilisé. Il possède deux domaines distincts: le domaine de liaison à l'ADN (GAL4 DNA-BD) et le domaine de transactivation (GAL4 AD). Lorsqu'ils sont séparés, la fonction d'activation de la transcription de GAL4 ne peut pas s'exercer.

Dans le système double hybride chez la levure, une protéine appât est exprimée en fusion avec GAL4 DNA-BD et une protéine proie est fusionnée avec GAL4 AD. Ainsi, si l'appât et la proie interagissent, les deux sous-unités de GAL4 sont physiquement rapprochées et la fonction transactivatrice est rétablie (Fields *et al.*, 1989). GAL4 se lie donc au promoteur GAL qui est en amont de gènes rapporteurs dont les phénotypes associés à leur expression permettent d'attester une interaction positive (figure 6).

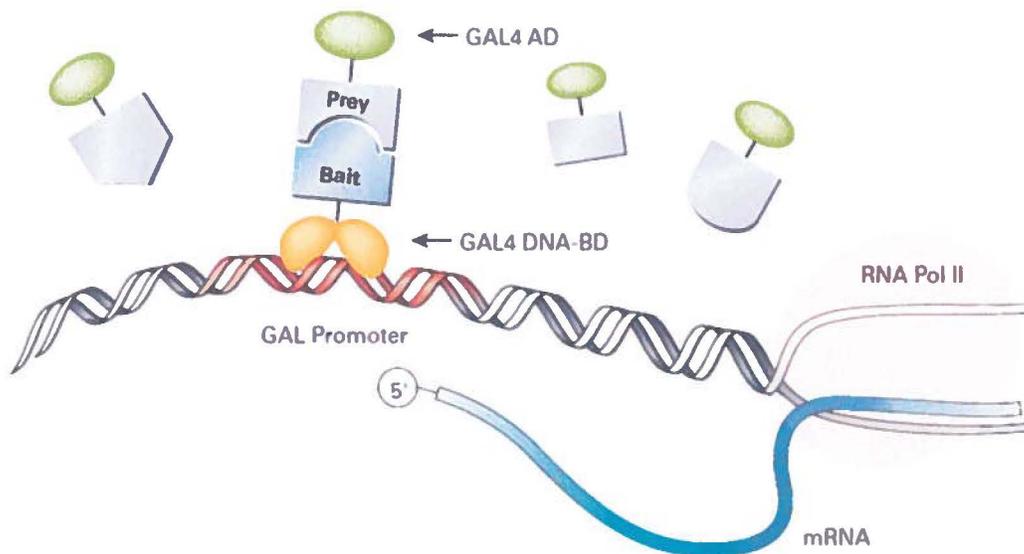


Figure 6 - Principe du système double hybride. Une protéine appât ("bait") est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription (GAL4 DNA-BD) et une protéine proie ("prey") avec le domaine transactivateur (GAL4 AD). L'interaction entre les deux protéines d'intérêt mène au rétablissement de la fonction transactivatrice de GAL4, ce qui permet l'expression des gènes rapporteurs observable grâce aux phénotypes lors de la croissance sur des milieux sélectifs. Image tirée de www.clontech.com

Le système double hybride permet de tester l'interaction entre deux protéines connues en co-exprimant les deux protéines de fusion dans la même cellule. D'autre part, le système permet aussi le criblage d'une librairie entière de protéines en utilisant une protéine d'intérêt comme appât. Dans ce cas, la protéine de fusion avec l'appât est exprimée dans une souche de type sexuel *Mat a* tandis que les protéines de la librairie sont exprimées dans une souche de type sexuel *Mat α*. Les propriétés biologiques de la levure permettent que lorsqu'elles sont incubées ensemble, ces deux souches de type sexuel opposées fusionnent pour donner naissance à des

diploïdes exprimant les gènes des deux cellules parentales, les plasmides y compris. Ainsi, les diploïdes démontrant un phénotype d'interaction positive sont facilement identifiables sur les milieux sélectifs.

Le principal avantage de cette technique est qu'il s'agit d'un système *in vivo* eucaryote donc sert d'un bon modèle intracellulaire des organismes supérieurs. Contrairement aux systèmes procaryotes ou aux techniques *in vitro*, les protéines exprimées dans les levures subissent les modifications post-traductionnelles similaires à celles des cellules de mammifères. De plus, les protéines de fusion étant surexprimées, le système permet aussi la détection des interactions transitoires ou de faible affinité. Par ailleurs, le système double hybride est une technique relativement simple pour effectuer le criblage d'une banque de protéines. Cette technique ne nécessite pas la production en grande quantité de la protéine appât, ni sa purification, ni l'utilisation d'anticorps. Cependant, des faux-positifs peuvent être détectés à cause d'artéfacts probables liés à l'activation de la transcription des gènes rapporteurs ou à la surexpression des protéines. Ce criblage n'est également pas exhaustif puisque certaines protéines de la banque seront moins exprimées par les levures à cause de leur toxicité ou bien certaines protéines peuvent ne pas se localiser correctement au noyau. Il est donc essentiel de vérifier les interactions identifiées par cette technique à l'aide d'autres approches. Par ailleurs, elle permet de détecter principalement les interactions directes (Koegl *et al.*, 2007, Uetz *et al.*, 2000, Van Criekinge *et al.*, 1999).

1.10 Problématique

La protéine UL24 se retrouve dans le noyau et dans le cytoplasme lors des étapes tardives de la réplication virale. La partie N-terminale semble être suffisante pour induire les modifications au noyau associées à UL24 dans ce compartiment. La partie C-terminale d'UL24, quant à elle, lorsqu'elle est exprimée seule en contexte de transfection transitoire, se localise dans le cytoplasme et dans le Golgi. La partie C-terminale pourrait donc être importante pour les fonctions d'UL24 dans le cytoplasme, à savoir la distribution des glycoprotéines virales et la fusion intercellulaire, dont les mécanismes restent inconnus.

1.11 Hypothèse

Dans ce travail, on suppose que la partie C-terminale d'UL24 interagit avec des protéines cellulaires qui interviennent dans les fonctions de celle-ci dans le cytoplasme. Ces interactions pourraient jouer un rôle dans les étapes tardives du cycle de réplication du VHS-1.

1.12 Objectifs

Afin de tester cette hypothèse, nous avons effectué un criblage double hybride chez la levure en utilisant la partie C-terminale d'UL24 comme appât pour identifier une (ou des) protéine(s) cellulaire(s) interagissant avec celle-ci. L'interaction identifiée a été confirmée en cellules de mammifères. Par la suite, nous avons déterminé l'importance de ce partenaire d'interaction lors de l'infection par le VHS-1 par une approche d'interférence ARN.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Le criblage double hybride chez la levure

2.1.1 Construction des vecteurs d'expression

Le vecteur d'expression pGBKT7, illustré ci-dessous (figure 7), a été utilisé pour exprimer les protéines de fusion de la partie C-terminale ou de la forme entière de la protéine UL24 avec GAL4 DNA-BD. Ce vecteur peut être exprimé chez les levures grâce au promoteur ADH1 et *in vitro* grâce au promoteur T7.

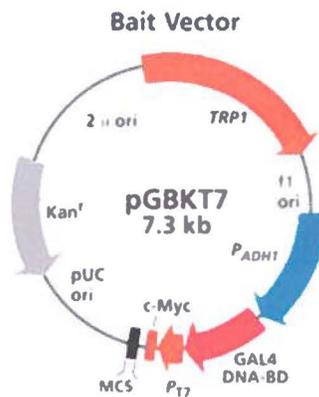


Figure 7 - Description du vecteur pGBKT7 utilisé pour le criblage double hybride. La partie C-terminale d'UL24 a été insérée au sein du site de clonage multiple (MCS), ce qui permet de l'exprimer en fusion avec GAL4 DNA-BD. La protéine de fusion est exprimée en grande quantité grâce au promoteur ADH1. Une étiquette c-myc permet de faciliter le marquage de la protéine de fusion. Le plasmide possède également un gène qui code pour une enzyme permettant la biosynthèse de tryptophane (TRP1) ainsi qu'un gène qui code pour une protéine permettant la résistance à la kanamycine (Kan^r). Image tirée de www.clontech.com

Pour créer le vecteur pGBKT7-CtermUL24, un fragment d'ADN correspondant à la partie C-terminale d'UL24 (aa 190-269) a été amplifiée par PCR à l'aide d'une paire d'amorces insérant le site de restriction BamHI en 5' et 3'. Le plasmide pAG5 contenant les gènes *UL22*, *UL23* et *UL24* dans un squelette pSK+ (Stratagene) a été utilisé comme matrice (Griffiths *et al.*, 2003).

Pour la PCR, on a utilisé 2.5 µL de DMSO, 1 µL de polymérase Pfu à 5 unités/µL (Bio Basic), 5 µL de tampon 10X pour la polymérase, 1 µL de dNTP à 10 mM, 2.5 µL d'amorces sens et antisens respectivement, 20 ng de pAG5 et de l'eau jusqu'à un volume total de 50 µL. Les amorces PCR utilisées pour amplifier le fragment d'ADN correspondant à la partie C-terminale d'UL24 sont les suivantes:

Sens (S2H/C-UL24F): 5'- CCC GGA TCC CCA TGG AGC CTA GGA C -3'

Antisens (S2H/C-UL24R): 5'- CCC GGA TCC TCA TTC GGA GGC AGC TC -3'

La taille du produit amplifié a ensuite été vérifiée sur un gel d'agarose 1.5%. Ce fragment a d'abord été sous-cloné avec la T4 DNA Ligase (New England Biolabs) dans un vecteur pSK+ à bouts francs digéré au préalable avec l'enzyme SmaI (New England Biolabs). Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries *E. coli* DH5-α compétentes par choc thermique à 42°C. Les colonies transformantes ont été sélectionnées sur un milieu LB avec ampicilline (concentration finale de 100 µg/mL) sur lequel on a étalé au préalable l'IPTG (40 µL d'une solution de 100 mM par pétri) et le substrat chromagénique X-Gal (30 µL d'une solution de 20 mg/mL par pétri). Des cultures ont été effectuées pour récupérer les plasmides à partir des colonies blanches par la technique de mini-prep (Feldan). Le vecteur pSK-CtermUL24 a donc été produit.

Le vecteur pSK-CtermUL24 a par la suite été digéré avec l'enzyme de restriction BamHI (New England Biolabs). L'insert, portant maintenant les sites de restriction à bouts cohésifs, a été purifié sur gel d'agarose 1.5%. Le vecteur pGBKT7 a aussi été digéré avec BamHI et les plasmides linéarisés ont été purifiés à partir d'un gel d'agarose 1%. Le vecteur digéré a ensuite été soumis à une étape de déphosphorylation des extrémités en 5' avec l'enzyme Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) pour éviter sa recircularisation. Une ligation a par la suite été réalisée avec le vecteur linéarisé et l'insert digéré grâce à l'enzyme T4 DNA Ligase (New England Biolabs) à température pièce durant la nuit. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries *E. coli* DH5-α compétentes par choc thermique à 42°C. Les bactéries contenant le clone voulu ont été sélectionnées sur pétri LB avec une concentration finale de 50 µg/mL de

kanamycine. La présence du fragment d'ADN correspondant à la partie C-terminale d'UL24 dans le plasmide a d'abord été vérifiée par une digestion diagnostique avec l'enzyme de restriction SmaI (New England Biolabs) qui coupe l'insert en deux parties inégales. Cette digestion a permis d'identifier si celui-ci a été inséré dans le bon sens. Par la suite, l'absence de mutations dans l'insert a été vérifiée par séquençage (Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal) à l'aide des amorces qui ont servi pour l'amplifier. Le plasmide pGBKT7-CtermUL24 a ensuite été amplifié à l'aide de cultures midi-preps. Ce vecteur a été utilisé pour le criblage et les différents tests d'interaction de la partie C-terminale d'UL24 dans le système double hybride.

Le vecteur pGBKT7 exprimant la protéine UL24 pleine longueur fusionnée avec GAL4 DNA-BD a été produit de la même façon que décrite ci-dessus mais en utilisant les sites de restriction NdeI et BamHI en 5' et 3' respectivement pour l'insertion dans le vecteur. Ainsi, le vecteur pGBKT7 digéré n'a pas été traité avec la phosphatase puisque le vecteur ne peut pas se recirculariser. Le vecteur pGBKT7-UL24 a été ainsi produit. Les amorces PCR utilisées pour amplifier UL24 sont les suivantes:

Sens (S2H-UL24F-NdeI): 5'- CAT ATG CGT ACG TCG GTT GCT AT -3'

Antisens (S2H-UL24R): 5'- GGA TCC TCA TTC GGA GGC AGC TC -3'

2.1.2 Souches de levures, librairie et gènes rapporteurs utilisés

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* Y2HGold (type sexuel *Mat a*) et Y187 (type sexuel *Mat α*) fournies par la compagnie Clontech ont été utilisées pour le criblage double hybride. Le vecteur pGBKT7-CtermUL24 a été transformé dans Y2HGold. La librairie d'ADNc utilisée, "HeLa S3 Normalized", provenait aussi de Clontech. Cette librairie a été normalisée par la compagnie grâce à un traitement à la Duplex Specific Nuclease qui est une enzyme permettant d'égaliser la représentation des transcrits de la librairie. La librairie a été fournie sous forme de levures Y187 transformées avec les vecteurs d'expressions (en levure et en bactérie) pGADT7 au sein desquels a été insérée la collection d'ADNc (figure 8).

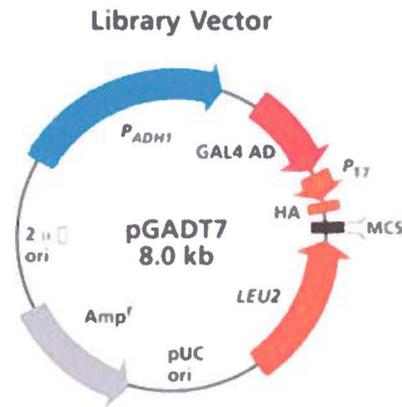


Figure 8 - Description du vecteur pGADT7 dans lequel sont insérés les ADNc de la librairie utilisée pour le criblage double hybride. Les protéines sont exprimées en fusion avec GAL4 AD. Les protéines de fusion sont exprimées sous le contrôle du promoteur ADH1 et le SV40 NLS leur permet de se localiser au noyau. Le plasmide possède également un gène qui code pour une enzyme permettant la biosynthèse de leucine (LEU2) ainsi qu'un gène qui code pour une protéine permettant la résistance à l'ampicilline (Amp^r). Image tirée de www.clontech.com

Pour les expériences en double hybride effectuées lors de ce travail, quatre gènes rapporteurs ont été utilisés afin d'attester l'existence d'une interaction: *AURI-C* permettant la résistance à l'aureobasidine A, une drogue fortement toxique pour la levure; *HIS3* permettant la croissance sur un milieu dépourvu d'histidine; *ADE2* permettant la croissance sur un milieu dépourvu d'adénine et *MEL1* permettant la dégradation du substrat chromagénique X- α -Gal donnant des colonies bleues en présence de ce substrat dans le milieu de croissance. Différentes abréviations ont été utilisées afin de faciliter l'identification des différents milieux de croissance:

- SD/-Trp: milieu complet sans tryptophane permettant de sélectionner les levures contenant pGBKT7;
- SD/-Leu: milieu complet sans leucine permettant de sélectionner les levures contenant pGADT7;
- DDO: milieu complet sans tryptophane ni leucine permettant de sélectionner les levures co-transformées avec les deux plasmides;
- DDO/X: DDO + X- α -Gal (concentration finale de 40 μ g/mL) permettant de distinguer les levures co-transformées qui activent l'expression d'un gène rapporteur;

- DDO/X/A: DDO + X- α -Gal (concentration finale de 40 $\mu\text{g/mL}$) + Aureobasidine A (concentration finale de 125 ng/mL) permettant de distinguer les levures co-transformées qui activent l'expression de deux gènes rapporteurs;
- QDO/X/A: DDO sans histidine ni adénine + X- α -Gal (concentration finale de 40 $\mu\text{g/mL}$) + Aureobasidine A (concentration finale de 125 ng/mL) permettant de distinguer les levures co-transformées qui activent l'expression de quatre gènes rapporteurs.

Pour optimiser le système double hybride avant d'effectuer le criblage et pour tester à chaque expérience que les milieux étaient adéquats, les contrôles suivants ont été utilisés. Le contrôle positif utilisé était la souche Y2HGold co-transformée avec pGBKT7 contenant la séquence codant pour p53 et pGADT7 contenant la séquence codant pour l'antigène T du SV40, sachant que ces deux protéines interagissent fortement pour donner au virus simien sa capacité carcinogène (Crawford *et al.*, 1980, Deppert *et al.*, 1989). Le contrôle négatif était Y2HGold co-transformée avec pGBKT7 contenant la séquence codant pour la lamine nucléaire et pGADT7 contenant la séquence codant pour l'antigène T du SV40.

2.1.3 Levures compétentes et transformations

Les levures ont été rendues compétentes et transformées selon le protocole fourni dans le "Yeast Protocols Handbook" de Clontech. Une colonie fraîche (sur pétri datant de moins d'une semaine) de Y2HGold a été inoculée dans 3 mL de milieu Yeast extract/Peptone/Dextrose supplémenté en Adénine (YPDA). Cette culture a été incubée à 30°C, sous agitation à 250 rpm pendant 8 h. Ensuite, 5 μL de cette culture ont été inoculés dans 50 mL de YPDA et la culture a été à nouveau incubée à 30°C, sous agitation à 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0.2 (environ 18 h). La totalité de la culture a été centrifugée à 700 x g, 5 min à température pièce. Le culot a été resuspendu dans 100 mL de YPDA et a été incubé à 30°C, sous agitation à 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0.4 (environ 5h). La culture a été par la suite divisée dans deux tubes et centrifugée à 700 x g, 5 min à température pièce. Chaque culot a été resuspendu dans 30

mL d'eau stérile et centrifugé à 700 x g pendant 5 min. Les levures compétentes ont ensuite été resuspendues dans 1.5 mL par culot d'une solution de tampon TE et d'acétate de lithium à 1.1X fraîchement préparée (550 µL de Buffer TE 10X, 550 µL de LiAc 1 M, 3.9 mL de ddH₂O). Ces levures ont été transférées dans deux tubes de 1.5 mL, centrifugées à 13000 rpm dans une microcentrifugeuse pendant 15 sec et resuspendues dans un total de 600 µL de 1.1X TE/LiAc. Ces levures compétentes ont été utilisées immédiatement ou gardées à 4°C pour au maximum une semaine.

Pour chaque transformation, 50 µL de ces levures compétentes ont été combinés à 200 ng d'ADN plasmidique (deux fois 100 ng pour les co-transformations), 50 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 500 µL d'une solution de Polyéthylène Glycol (PEG) et d'acétate de lithium (800 µL de PEG 50%, 100 µL de tampon TE 10X, 100 µL de LiAc 1 M) permettant de perméabiliser la paroi des levures. Le tout a été incubé à 30°C pendant 30 min en brassant le tube toutes les 10 min. 20 µL de DMSO ont ensuite été ajoutés avant de mettre le tube pour un choc thermique dans un bain à 42°C pendant 15 min en mélangeant par vortex toutes les 5 min. Les levures transformées ont ensuite été récupérées par centrifugation à 13000 rpm dans une microcentrifugeuse pendant 15 sec et resuspendues dans 1 mL de milieu YPDA. Finalement, elles ont été à nouveau centrifugées 15 sec à grande vitesse dans une microcentrifugeuse et resuspendues dans 1 mL de NaCl 0.9%. 100 µL du produit de transformation ont été étalés sur les milieux sélectifs appropriés (SD/-Trp pour pGBKT7, SD/-Leu pour pGADT7 et DDO pour les co-transformations).

La croissance des levures sur les pétris sélectifs a été effectuée dans une chambre à 30°C pendant 3 à 5 jours dans des sacs en plastique légèrement ouverts afin d'assurer l'oxygénation sans assécher les milieux.

2.1.4 Extraction de protéines de levure

Pour extraire les protéines totales des levures, une colonie isolée a été inoculée dans 5 mL de milieu liquide approprié, mélangée par vortex et incubée à 30°C, sous agitation à 250 rpm pendant 18 h. Par la suite, la culture a été inoculée dans 50 mL de YPD, incubée de nouveau à 30°C, 250 rpm jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0.4 à 0.6 (environ 8 h). La culture a ensuite été versée dans un tube à centrifuger pré-refroidi rempli à moitié avec de la glace stérile et centrifugée à 4°C, 700 x g pendant 5 min. Le culot a été resuspendu dans 50 mL de ddH₂O stérile froide, centrifugé à 4°C, 700 x g pendant 5 min. Le culot a été récupéré et refroidi sur la glace sèche. Le "cracking buffer" (8 M urée, 5% w/v SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4 mg/mL bleu de bromophenol, 10% β-mercaptoethanol, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete Mini de Roche) a été utilisé comme tampon de lyse. Ce tampon a été préchauffé à 60°C pour resuspendre le culot précédent à raison de 100 µL par 7.5 unités de DO₆₀₀. Le nombre d'unités de densité optique correspond à la valeur de DO₆₀₀ à laquelle les levures ont été récoltées multipliée par le volume total de culture (donc 50 mL). La suspension a été transférée dans des tubes vissables de 1.5 mL contenant 80 µL de billes de verre (425-600 µm, Sigma) par 7.5 unités de DO₆₀₀. Le tout a été chauffé à 70°C pendant 10 min et mélangé par vortex pendant 1 min. Le mélange a ensuite été centrifugé à 13000 rpm dans une microcentrifugeuse pendant 5 min pour enlever les débris et les cellules non brisées. Le surnageant a été transféré dans un tube neuf et placé sur glace. Le culot a été placé dans de l'eau bouillante pendant 5 min, mélangé par vortex pendant 1 min et à nouveau centrifugé à 13000 rpm dans une microcentrifugeuse pendant 5 min. Le surnageant a été récupéré et mélangé au précédent. Les extraits protéiques récupérés ont été bouillis pendant 3 min et immédiatement chargés sur gel ou gardés à -80°C.

2.1.5 Criblage

Le criblage a été effectué selon le manuel de l'utilisateur accompagnant le kit Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System de Clontech. Il consiste en six étapes décrites ci-après: pré-culture, hybridation, étalement, extraction des plasmides, tests d'auto-activation et de reproductibilité des clones positifs et séquençage.

Une colonie fraîche de Y2HGold transformée avec pGBKT7-Cterminal UL24 a été cultivée dans 50 mL de milieu SD/-Trp liquide jusqu'à atteinte d'une DO_{600} de 0.8 (environ 22 h). Cette pré-culture a ensuite été centrifugée à 700 x g pendant 5 min et le culot a été resuspendu dans du milieu SD/-Trp jusqu'à obtenir une densité d'environ 10^8 cellules par mL (3 à 5 mL).

Cette resuspension a été combinée avec 1 mL de librairie et 45 mL de milieu riche YPDA 2X dans un erlenmeyer de 2 L pour favoriser l'oxygénation. Le tout a été incubé à 30°C sous agitation à 40 rpm pendant 24 h. La présence de zygote dans le milieu a été vérifiée par observation au microscope à contraste de phase (40X). Les colonies ont ensuite été récupérées par centrifugation à 700 x g pendant 10 min et resuspendues avec 50 mL de milieu YPDA 0.5X, à nouveau centrifugées à 700 x g pendant 10 min et resuspendues dans 10 mL de NaCl 0.9%.

À partir de la solution d'hybridation, 100 μ L d'une série de dilutions ont été étalés sur pétris SD/-Trp, SD/-Leu et DDO afin de déterminer les viabilités respectives des Y2HGold, Y187 et des diploïdes et de calculer par la suite l'efficacité d'hybridation ((viabilité des diploïdes/viabilité du partenaire limitant) x 100). Le reste de la solution a été étalé sur les milieux DDO/X/A (150 μ L par pétri de 150 mm de diamètre) et ceux-ci ont été incubés dans un incubateur à 30°C dans des sacs en plastique légèrement ouverts. La première observation de colonies positives a été réalisée à 3 jours post-étalement et effectuée tous les deux jours pendant deux semaines.

Les colonies bleues ont été repiquées en petits carrés (1 cm x 1 cm) sur des pétris de 100 mm QDO/X/A. Les colonies positives sur ces dernières ont été ensuite striées trois fois successivement sur pétris DDO/X en striant une colonie bleue à chaque fois afin d'isoler les plasmides qui interagissent réellement avec l'appât (car la colonie de départ peut contenir plus qu'un plasmide pGADT7).

Après la dernière striation, des carrés d'extraction (1 cm x 1cm) ont été faits sur des pétris QDO/X/A et incubés pendant 3 jours. La moitié de ces carrés a ensuite été inoculée dans 500 µL d'EDTA 10 mM et centrifugée à 13000 rpm dans une microcentrifugeuse pour 1 min. Le culot a été resuspendu dans 200 µL de ZYM Buffer (Clontech) et 20 µL de Zymolyase (Clontech), une enzyme permettant de dégrader la paroi de levures, ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 1 h. Les sphéroplastes ont été récupérés par centrifugation à 5000 rpm dans une microcentrifugeuse pendant 10 min. Ensuite, l'ADN a été extrait avec le kit Yeast Plasmid Isolation Kit de Clontech, transformé dans des bactéries DH5α et le produit de transformation a été étalé sur milieu LB avec ampicilline (concentration finale de 100 µg/mL) afin d'isoler les bactéries contenant les plasmides pGADT7-clone. Ces plasmides ont ensuite été extraits à partir de cultures mini-preps pour être soumis aux tests d'auto-activation et de reproductibilité. Pour ces tests, les clones positifs ont été co-transformés dans Y2HGold avec pGBKT7 vide et pGBKT7-CtermUL24 respectivement. Les produits de transformation ont été étalés sur pétris DDO, laissés pousser pour ensuite être repiqués sur DDO/X et QDO/X/A.

Finalement, les clones ayant passé ces tests ont été séquencés à l'aide des amorces T7 Sequencing Primer et 3'AD Sequencing Primer (Clontech) qui se trouvent respectivement en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur pGADT7. Les séquences de ces amorces sont les suivantes:

Sens (T7 Sequencing Primer): 5'- T AAT ACG ACT CAC TAT AGG GC -3'

Antisens (3'AD Sequencing Primer): 5'- TCT ACC ACG TGC TAC GTG T -3'

2.1.6 Test d'interaction directe avec UL24 pleine longueur

Afin de confirmer l'interaction du clone positif avec la protéine UL24 pleine longueur, les plasmides pGBKT7-UL24 et pGADT7-C1QBP (le clone contenant la version la plus longue de C1QBP qui code pour la forme mature de la protéine) ont été co-transformés dans la souche Y2HGold. Les levures transformantes ont été étalées sur pétris DDO, laissées pousser pour ensuite être repiquées sur des pétris DDO/X (un gène rapporteur) et QDO/X/A (quatre gènes rapporteurs).

2.2 Cellules et virus

2.2.1 Lignées cellulaires

Des cellules Vero qui sont des cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique ont été utilisées lors de cette étude. Elles ont été maintenues en culture dans du milieu Dubelcco's Modified Eagle's Medium additionné de 5% de sérum de veau nouveau-né, 50 unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (DMEM + 5% NCS + P/S). Des cellules HeLa qui sont des cellules épithéliales provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus humain et des HFF qui sont des fibroblastes non immortalisés de prépuce humain ont également été utilisées. Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM + 8% de sérum foetal bovin (FBS) + P/S. À une confluence d'environ 95%, les cellules ont été décollées à l'aide de la trypsine pendant 5 min à 37°C, 5% CO₂. La trypsine a ensuite été neutralisée en rajoutant du milieu avec sérum et P/S au double de son volume. Les cellules ont été typiquement passées au sixième de leur nombre. Des tests ont été effectués une fois tous les deux mois pour vérifier l'absence de mycoplasmes dans les cultures cellulaires.

2.2.2 Production des stocks de virus

Les souches du VHS-1 KOS (type sauvage) et UL24X (déficient en UL24) (Jacobson *et al.*, 1998) ont été fournies par Donald M. Coen de Harvard Medical School à Boston. Le virus vHA-UL24 (souche KOS avec UL24 portant l'étiquette hémagglutinine) a déjà été décrit. Ce virus démontre une efficacité de réplication et des morphologies de plaque similaires au virus de type sauvage KOS (Lymberopoulos *et al.*, 2007).

La production des stocks viraux à partir des "submaster stocks" du laboratoire a été réalisée de la manière suivante: 1.5×10^7 cellules Vero ont été cultivées dans un flacon de 175 cm² (T175) et incubées avec du DMEM + 5% NCS + P/S à 37°C et 5% CO₂ pendant la nuit. Le lendemain, ces cellules ont été infectées avec le virus à une MOI de 0.01 dans 5 mL de DMEM + 2% NCS + P/S. L'infection a été réalisée à 37°C, 5% CO₂ pendant une heure en agitant le flacon toutes les 15 min. Un volume de 20 mL de DMEM + 5% NCS + P/S a été ajouté au flacon et le tout a été incubé à nouveau jusqu'à ce que 80% environ des cellules soient détachées ou arrondies (environ 3 jours). Les cellules ont été centrifugées à 240 x g pendant 10 min. Le culot a été resuspendu avec 2 mL de DMEM+2% NCS+P/S. Les cellules ont été brisées grâce à une série de trois congélations/décongélations suivie d'une sonication (amplitude 50%, 0.5 sec "on", 0.5 sec "off") avec l'appareil Digital Sonifier de Branson pendant 30 sec. Le tube a ensuite été centrifugé à 240 x g pendant 10 min à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Le surnageant a finalement été aliquoté par 100 µL dans des cryotubes de 1.5 mL et les virus ont été gardés à -80°C.

2.2.3 Détermination des titres viraux

La détermination des titres des différents virus a été effectuée par des dénombrements de plages de lyse. Des dilutions en séries ont été effectuées en duplicata dans 1 mL de DMEM + 2% NCS + P/S. 100 µL de chaque dilution ont ensuite été utilisés pour infecter un puits d'une plaque de douze puits contenant un tapis confluent de cellules Vero (3×10^5 cellules par puits préparées

la veille). Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant une heure et brassées toutes les 15 min. Par la suite, 1 mL de DMEM + 2% NCS + P/S + 0.4% méthylcellulose a été ajouté à chaque puits avant d'être à nouveau incubé à 37°C, 5% CO₂. Trois jours post-infection, les puits ont été fixés avec une solution d'acide acétique glacial et de méthanol (1:3) pour 1 h. Ils ont ensuite été colorés avec un fond de crystal violet pour une autre heure. Les puits ont finalement été lavés et séchés et le comptage des plages de lyse a été réalisé sous une loupe binoculaire. Les titres viraux ont ainsi été exprimés en unité formatrice de plaque par unité de volume (pfu/mL).

2.3 Co-immunoprécipitation

2.3.1 Infection de cellules HeLa

Pour les expériences de co-immunoprécipitation, 1.5×10^7 cellules HeLa (dans un contenant T175) ont été préparées la veille dans 25 mL de DMEM + 8% FBS + P/S. Le lendemain, le tapis de cellules a été infecté avec le virus vHA-UL24 à une multiplicité d'infection (MOI) de 100, dans 5 mL de DMEM + 2% NCS + P/S. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant une heure en brassant toutes les 15 min. Par la suite, 20 mL de DMEM + 8% FBS + P/S ont été ajoutés aux cellules avant de retourner dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂.

2.3.2 Lyse des cellules HeLa

Environ 18 h post-infection, le milieu a été enlevé et les cellules ont été incubées 10 min dans du PBS sur glace. Ensuite, elles ont été lysées avec 1 mL de tampon de lyse non dénaturant (50 mM TrisHCl pH 8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases Mini Complete de Roche) sur glace pendant 30 min. Par la suite, les cellules ont été grattées et récoltées dans un eppendorf pour être à nouveau incubées sur glace pendant 15 minutes. Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 13000 rpm, 4°C dans une microcentrifugeuse pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été récupéré et 100 µL ont été gardés

pour être chargés sur gel comme lysat total. Le reste a été divisé de manière égale (300 µL par tube) dans 3 tubes.

2.3.3 Immunoprécipitation

Les lysats obtenus précédemment ont été incubés pendant 3 h en rotation à 4°C avec les anticorps primaires mentionnés ci-après. Pendant ce temps, des billes d'agarose couplées à la protéine G (Roche) ont été lavées trois fois avec 1 mL de tampon de lyse. À la fin du troisième lavage, les billes ont été resuspendues avec le même volume de tampon de lyse pour avoir un mélange moitié billes moitié tampon. 50 µL de ce mélange ont été ajoutés aux tubes de lysat avec anticorps. Ces mélanges ont été incubés pendant 2 h en rotation à 4°C. Par la suite, les billes ont été récupérées par centrifugation à 5000 rpm, 4°C dans une microcentrifugeuse pendant 7 min. Elles ont ensuite été lavées avec 1 mL de tampon de lyse pendant 15 min en rotation à 4°C. Après ce lavage, les billes ont été récupérées par centrifugation à 5000 rpm, 4°C pendant 7 min. Ensuite, elles ont été resuspendues avec 1 mL de tampon de lyse et recentrifugées. Cette resuspension a été effectuée trois fois en s'assurant de bien retirer le surnageant après chaque centrifugation. À la fin de la dernière centrifugation, les billes ont été éluées avec 50 µL de Loading Dye 2X avec 10% de β-mercaptoethanol, bouillies pendant 3 min et à nouveau centrifugées à 5000 rpm, 4°C dans une microcentrifugeuse pendant 7 min. Un volume de 35 µL de surnageant a été déposé sur gel et un immunobuvardage de type western a été effectué.

2.3.4 Anticorps

Pour immunoprécipiter la protéine HA-UL24, un anticorps monoclonal de souris anti-HA de Covance a été utilisée à une concentration de 2 µg d'anticorps pour 300 µL de lysat. Comme témoin négatif pour l'immunoprécipitation, un anticorps ne ciblant aucune protéine spécifique (normal mouse IgG) de Santa Cruz Biotechnology a été utilisée à cette même concentration. Pour immunoprécipiter la protéine CIQBP, un anticorps monoclonal de souris de la compagnie Abcam a été utilisé à une concentration de 1 µg d'anticorps pour 300 µL de lysat.

2.4 Immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques ont été chargés sur gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE) à 12.5% et migrés par électrophorèse dans un tampon de migration (3 g Tris, 14.4 g glycine, 0.1% SDS dans 1 L de ddH₂O) à 100 volts pendant environ 2 h. Le transfert de protéines sur une membrane de PVDF (Millipore) a été effectué par un transfert humide dans un tampon de transfert (3 g Tris, 14.4 g glycine, 20% méthanol dans 1 L de ddH₂O). Afin de bloquer les sites non spécifiques à l'anticorps primaire, la membrane a été incubée pendant au moins 1 h dans une solution de TTBS (2.422 g Tris, 29.2 g NaCl, 0.05% Tween-20 dans 1 L de ddH₂O, pH 7.5) à 5% de lait (BioShop). La membrane a ensuite été lavée deux fois avec du TTBS avant d'être incubée dans la solution d'anticorps primaire (dilué dans du TTBS, 0.5% de gélatine) pendant 3 h. Après une série de quatre lavages au TTBS, la membrane a été incubée dans la solution d'anticorps secondaire approprié (dilué dans du TTBS, 5% de lait) pendant 1 h. La membrane a été lavée à nouveau quatre fois avec du TTBS et ensuite révélée grâce au kit ECL Plus (GE HealthCare) et aux films Biomax XAR (Kodak).

Pour vérifier l'expression des protéines de fusion avec le GAL4 DNA-BD dans le système double hybride, un anticorps monoclonal de souris anti-c-myc de la compagnie Clontech a été utilisé comme anticorps primaire à une dilution de 1:500. Un anticorps de chèvre dirigé contre les Ig de souris couplé à la peroxydase (Sigma) a été utilisé comme anticorps secondaire à une dilution de 1:7500.

Afin de marquer HA-UL24 en immunobuvardage de type western dans les cellules infectées avec le virus vHA-UL24, l'anticorps monoclonal de rat anti-HA de la compagnie Roche a été utilisé comme anticorps primaire à une dilution de 1:500. Un anticorps de chèvre dirigé contre les Ig de rat couplé à la peroxydase (Calbiochem) a été utilisé comme anticorps secondaire à une dilution de 1:5000. Afin de marquer la protéine C1QBP en immunobuvardage de type

western, l'anticorps monoclonal de lapin anti-C1QBP de la compagnie Abcam a été utilisé comme anticorps primaire à une dilution de 1:2500. Un anticorps de chèvre dirigé contre les Ig de lapin couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) a été utilisé comme anticorps secondaire à une dilution de 1:4000.

Comme témoin de chargement pour les lysats de levure, un anticorps monoclonal de souris anti-GAPDH de la compagnie Médimabs a été utilisé à une dilution de 1:1000, avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les Ig de souris (Sigma) à une dilution de 1:5000. Pour les lysats de cellules de mammifères, l'anticorps monoclonal de lapin anti-tubuline α a été utilisé à une dilution de 1:1000, avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les Ig de lapin (Jackson ImmunoResearch) à une dilution de 1:5000.

2.5 Immunofluorescence indirecte

Dans des plaques de 24 puits, 10^5 cellules HeLa ou HFF ont été mises sur des lamelles et ont été laissées croître toute la nuit. Le lendemain, elles ont été infectées à une MOI de 50 pour les HeLa et une MOI de 10 pour les HFF avec le virus vHA-UL24. À 18 h post-infection, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 2% dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) pendant 10 min à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées deux fois 5 min avec du PBS avant d'être perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0.3% dans du PBS pendant 10 min sous agitation. Les cellules ont été à nouveau lavées pour ensuite être incubées 30 min avec le tampon de blocage NATS (20% NCS, 0.5% Tween-20 dans du PBS). L'incubation aux anticorps primaires a été effectuée dans une chambre humide à 37°C pendant 2 h. Par la suite, une série de quatre lavages de 5 min a été réalisée avant d'incuber les cellules aux anticorps secondaires et au marqueur nucléaire (Hoechst 33342) dans une chambre humide à 37°C pendant 1 h. Les lamelles ont été à nouveau lavées quatre fois et montées sur des lamelles de microscope en utilisant le "ProlongGold Antifade reagent" (Life Technologies).

L'anticorps monoclonal de rat anti-HA de Roche a été utilisée à une dilution de 1:50 pour localiser la protéine HA-UL24. Pour localiser la protéine C1QBP, un anticorps monoclonal de souris anti-C1QBP (Abcam) a été utilisé à une dilution de 1:100. Les anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescence sont: chèvre contre Ig de rat couplé à AlexaFluor 488 et chèvre contre Ig de souris couplé à AlexaFluor 568 à des dilutions de 1:500 pour chacun. Ces anticorps proviennent de la compagnie Life Technologies. Le marqueur Hoechst 33342 de cette même compagnie a été utilisée pour colorer les noyaux cellulaires.

Les images de microscopie confocale ont été acquises grâce à un microscope Zeiss Axio Observer ZI (objectif 63X, N.A.1.4) avec diode laser 405 nm, laser argon multi-ligne 458/488/514nm, laser DPSS 561nm, Laser HeNe 633 nm. Les images acquises en format TIF ont été traitées avec le logiciel Adobe Photoshop. Les coefficients de colocalisation (Manders *et al.*, 1993) et les "profile view" ont été obtenus grâce aux options "colocalization" et "profile" du logiciel ZEN 2012. Des champs d'images contenant quatre à cinq cellules HeLa par champ ont été délimités pour obtenir les coefficients de Manders M1 et M2. La moyenne de 22 champs a été calculée à partir de ces derniers.

2.6 Petits ARNs interférents (siRNAs)

2.6.1 Séquences et transfection

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des plaques de 12 puits avec 1.5×10^5 cellules par puits. Le lendemain, lorsque les cellules ont atteint 50% de confluence environ, elles ont été transfectées selon le protocole du manufacturier (Thermo Scientific) avec 2 μ l de réactif DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Thermo Scientific) et 8 μ l de siRNA menant à une concentration finale de 40 nM, dans un volume total de 1 mL de DMEM + 8% FBS par puits. Les siRNAs utilisés proviennent de la compagnie Thermo Scientific. Il s'agit du SMART pool siGENOME C1QBP siRNA qui est un mélange de quatre séquences différentes ciblant le

peptide mature de la forme humaine de la protéine (figure 9). Un alignement de séquences de chaque siRNA avec le génome du virus KOS a été effectué afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'interférence avec l'expression des gènes viraux. Comme témoin négatif, des siRNAs "non targeting" (NT siRNA) de Thermo Scientific ont été utilisés à la même concentration que les C1QBP siRNAs.

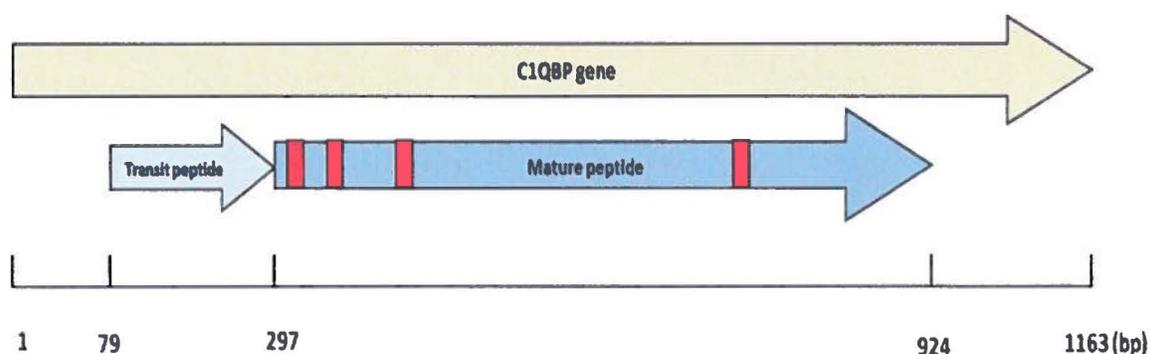


Figure 9 - Représentation du gène de C1QBP et localisation des siRNAs. Le gène de C1QBP possède 1163 paires de bases (NCBI Reference Sequence: NM_001212.3). La séquence codante de la protéine (les deux flèches bleues) est constituée du peptide de transit contenant le signal de localisation mitochondriale et de la séquence qui code pour la protéine mature au sein de laquelle se retrouve les séquences des quatre siRNAs (Thermo Scientific) utilisées dans cette étude (en rouge).

2.6.2 Extraction de protéines cellulaires

Les cellules ont été transfectées avec les siRNAs de la manière décrite précédemment. Afin de déterminer à quel temps post-transfection une diminution de l'expression de C1QBP est observée, les cellules ont été lysées sur glace pendant 15 min avec du tampon RIPA (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) à 24 h, 48 h et 72 h post-transfection. Par la suite, les cellules ont été grattées et transférées dans des tubes et incubées à nouveau sur glace pendant 15 min. Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation à 13000 rpm, 4°C dans une microcentrifugeuse pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été récupéré, resuspendu dans du Loading Dye 6X avec 10% de β -mercaptoethanol et un volume de 5 μ l par puits a été chargé sur gel pour un immunobuvardage de type Western.

2.6.3 Détermination de la cytotoxicité

Pour l'analyse de la toxicité des siRNAs contre CIQBP, des cellules HeLa ont été transfectées de la manière décrite précédemment. 48 h post-transfection, les cellules ont été incubées cinq minutes dans 200 μ L de trypsine à 37°C, 5% CO₂. Par la suite, la trypsine a été neutralisée avec 300 μ L de milieu complet et 200 μ L de ce mélange ont été transférés dans un nouveau tube. 200 μ L d'une solution de bleu de trypan 0.4% (Sigma) ont été ajoutés. Les quantités de cellules viables (claires) et de cellules non viables (bleues) ont par la suite été comptées à l'hémacytomètre et le pourcentage de viabilité a été calculé pour les différentes transfections.

2.6.4 Infection des cellules transfectées et récolte des virus

Les cellules HeLa, 48 h après la transfection avec les siRNAs, ont été infectées avec le virus KOS à une MOI de 20 pour l'analyse de la réplication virale et à une MOI de 0.001 pour l'analyse de la dissémination dans 300 μ L de milieu avec 2% NCS pendant 1 h à 37°C, 5% CO₂ en agitant toutes les 15 minutes. Le milieu a ensuite été enlevé et remplacé par 1 mL de DMEM + 5%NCS + P/S. Pour les expériences à forte et à faible MOI, les cellules ont été grattées et récupérées avec le milieu 18 h et 48 h respectivement après l'infection. Suite à trois cycles de congélation/décongélation, on a procédé à une sonication des tubes (amplitude 50%, 0.5 sec "on", 0.5 sec "off" pendant 30 sec). Les virus ont ensuite été récoltés en centrifugeant les tubes à 2000 rpm, 4°C dans une microcentrifugeuse pendant 10 min et en récupérant le surnageant. La quantité de virus a par la suite été titrée comme décrit précédemment. Les différences entre les titres viraux obtenus ont été analysées statistiquement grâce au logiciel GraphPad Prism 5.

3 RÉSULTATS

3.1 Criblage double hybride avec la partie C-terminale d'UL24 comme appât

3.1.1 Contrôles de faisabilité du criblage

Afin de pouvoir utiliser la partie C-terminale de la protéine UL24 comme appât pour un criblage double hybride, trois paramètres devaient être vérifiés: l'expression, l'absence d'auto-activation des gènes rapporteurs et la non toxicité de la protéine chez les levures. Afin de vérifier l'expression de la protéine de fusion de la partie C-terminale d'UL24 avec GAL4 DNA-BD, le plasmide pGBKT7-CtermUL24 a été transformé dans la souche Y2HGold. Les protéines totales ont ensuite été extraites des levures. Comme l'indique la figure 10a, la partie C-terminale a bien été exprimée. Par la suite, il a été vérifié que la partie C-terminale d'UL24 n'activait pas, à elle-seule, la transcription des gènes rapporteurs. Pour cela, la levure Y2HGold a été co-transformée avec le vecteur pGBKT7-CtermUL24 et le vecteur pGADT7 vide et étalée par la suite sur des milieux sélectifs (figure 10b). Finalement, il a été vérifié que la partie C-terminale d'UL24 n'est pas toxique pour les levures car cela diminuerait l'efficacité du criblage. Pour cela, la taille des colonies transformées avec pGBKT7-CtermUL24 a été comparée à celle des colonies transformées avec pGBKT7 vide sur pétris SD/-Trp (figure 10c).

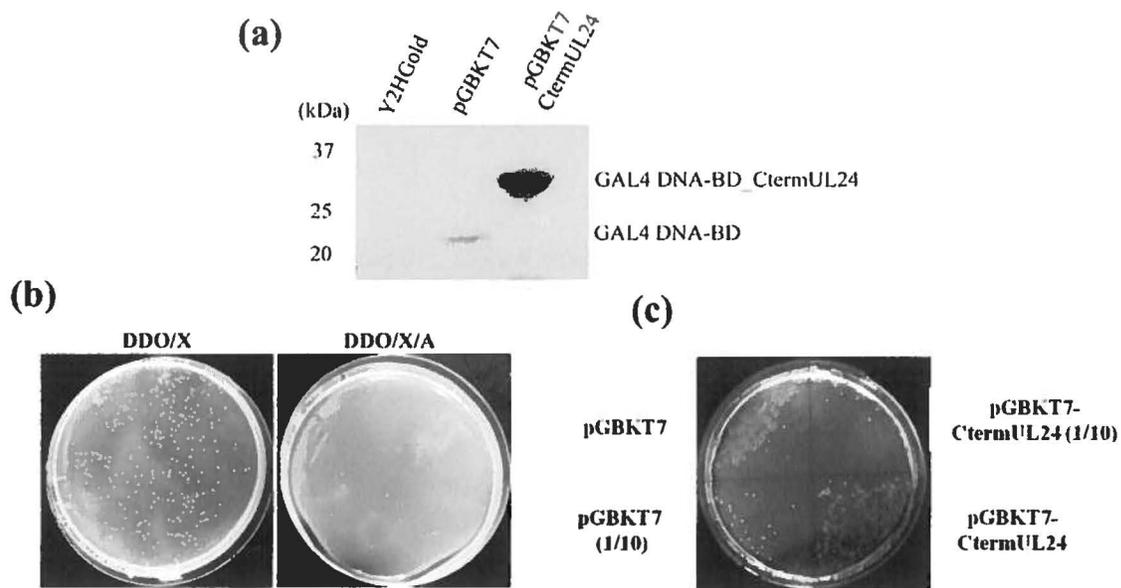


Figure 10 - Contrôles de faisabilité du criblage double hybride avec la partie C-terminale d'UL24 comme appât. (a) Expression de la protéine de fusion de la partie C-terminale d'UL24 avec GAL4 DNA-BD. Un anticorps contre c-myc a été utilisé pour détecter GAL4 DNA-BD dans les lysats de levures. Un lysat de levures non transformées (Y2HGold) a été chargé comme contrôle négatif. (b) Test d'auto-activation. Le plasmide pGBKT7-CtermUL24 a été co-transformé avec le plasmide pGADT7 vide et étalé sur les milieux DDO/X et DDO/X/A. (c) Test de toxicité. La taille des colonies transformées avec pGBKT7-CtermUL24 a été comparée à celle des colonies transformées avec pGBKT7 vide.

3.1.2 Paramètres et bilan du criblage

La partie C-terminale d'UL24 a donc été utilisée comme appât pour cribler une librairie d'ADNc provenant de cellules HeLa S3 fusionnés avec GAL4 AD. Le criblage a été réalisé deux fois séparément. Un volume de 10 μ L de la librairie a été utilisé pour titrer le nombre de colonies transformantes dans la librairie. Un seuil de 10^7 clones a été déterminé par le manufacturier comme minimum requis pour que la librairie soit représentative des cellules desquelles les ADNc ont été extraits. Ce seuil a bien été dépassé dans les deux cas: 7×10^7 cfu pour le premier criblage et 2×10^8 cfu pour le deuxième. Après hybridation, la viabilité des diploïdes ainsi que la viabilité du partenaire limitant ont été déterminées afin de calculer l'efficacité d'hybridation [(viabilité des diploïdes/viabilité du partenaire limitant) \times 100]. Cette efficacité s'élevait à 10.3%

lors du premier criblage et à 7.7% lors du second, ce qui est largement supérieur au seuil de 2% établi par le manufacturier.

La figure ci-après résume les différentes étapes des deux criblages effectués (figure 11). Les clones ayant rempli tous les critères d'interaction ont été séquencés et les séquences ont été identifiées grâce au module BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI, dans la base de données "Human genomic + transcript". Les séquences correspondaient toutes à des fragments de la protéine CIQBP. La plus longue d'entre elles couvrait les nucléotides 274-924 de la séquence codante de CIQBP sachant que la forme mature de cette protéine est codée par les nucléotides 298-924.

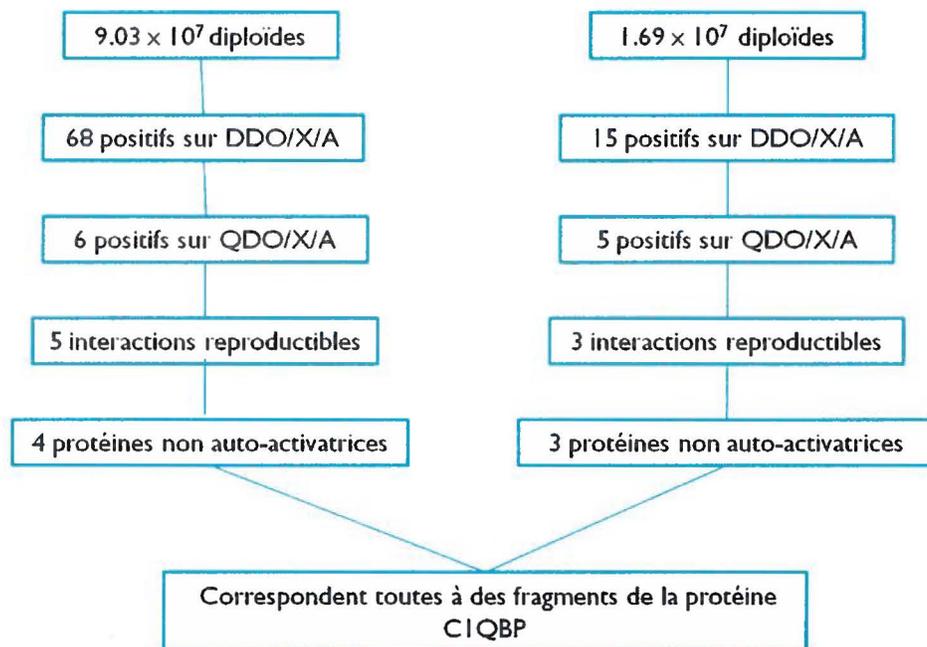


Figure 11 - Bilan des deux criblages double hybride avec la partie C-terminale d'UL24 comme appât. Le nombre de diploïdes criblés a été estimé en étalant les levures après hybridation sur milieu DDO. Les clones positifs sur DDO/X/A ont été repiqués sur QDO/X/A. La reproductibilité des interactions positives sur QDO/X/A a été testée en co-transformant les levures compétentes avec pGBKT7-CtermUL24 et le clone positif. L'auto-activation a été testée en co-transformant les levures compétentes avec le clone positif et le vecteur pGBKT7. Le criblage a été effectué deux fois en donnant le même résultat final.

3.2 Confirmation de l'interaction avec UL24 pleine longueur en double hybride

Après avoir effectué le criblage, on a voulu tester si la protéine CIQBP interagit avec la protéine UL24 pleine longueur dans le système double hybride. Pour cela, la forme complète d'UL24 a été clonée dans le vecteur d'expression pGBKT7 et son expression a été vérifiée par immunobuvardage de type western (figure 12a). On a également vérifié l'auto-activation de la protéine UL24 pleine longueur en co-transformant le vecteur pGBKT7-UL24 avec le vecteur pGADT7 vide. Comme l'indique la figure 12c, celle-ci n'était pas capable à elle-seule d'activer la transcription des quatre gènes rapporteurs utilisés. Par ailleurs, on a également comparé la croissance des levures transformées avec pGBKT7-Cterminal UL24 et pGBKT7-UL24 et on a observé que la protéine UL24 pleine longueur n'est pas toxique pour les levures. Cependant, comme l'indique la figure 12a, GAL4 DNA-BD_UL24 est exprimée par les levures mais en quantité beaucoup plus faible que GAL4 DNA-BD_Cterminal UL24. Ainsi, lorsqu'on a co-transformé pGBKT7-UL24 avec pGADT7-CIQBP, on observait un phénotype d'interaction moins évident (coloration bleue et densité des colonies plus faibles) qu'avec la partie C-terminale seule (figures 12b et 12c).

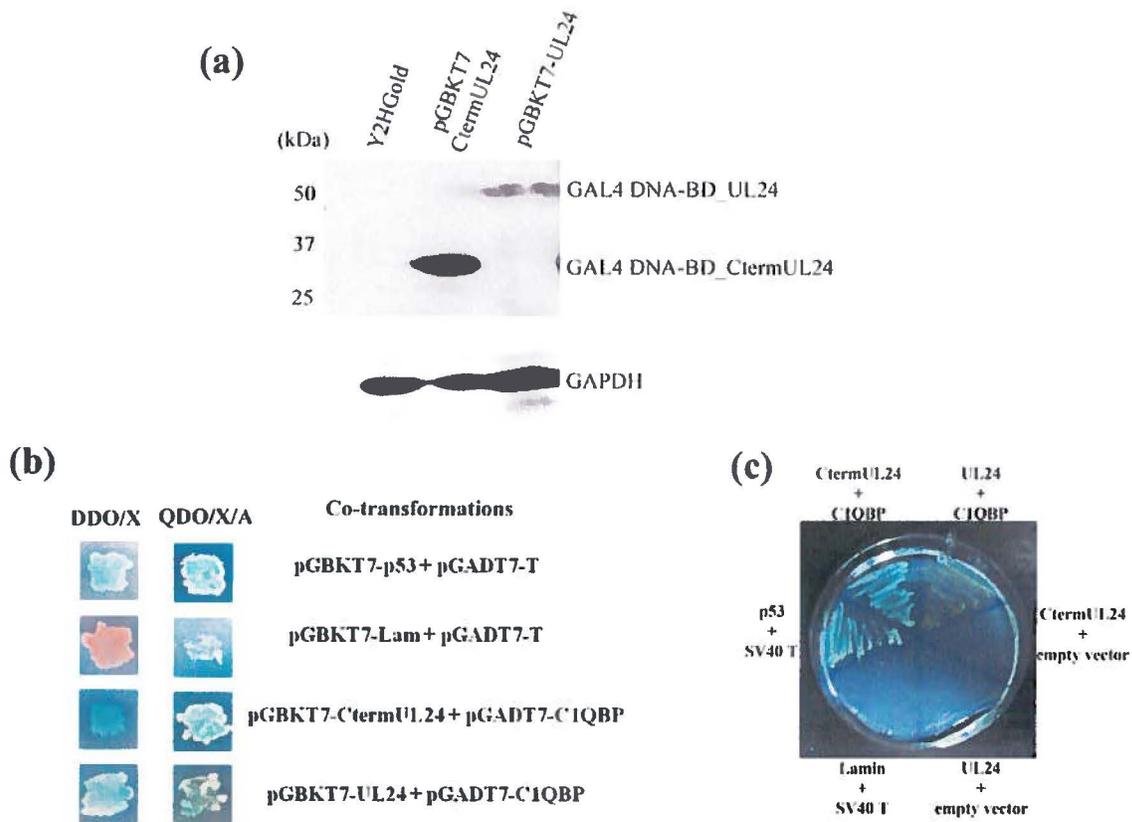


Figure 12 - Interaction de la protéine UL24 du VHS-1 avec la forme mature de C1QBP dans le système double hybride. (a) Expression des protéines de fusion de GAL4 DNA-BD avec CtermUL24 (31 kDa) et UL24 (51 kDa). Un marquage contre GAPDH a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines totales chargées. Un lysat de levures non transformées (Y2HGold) a été chargé comme contrôle négatif. (b) et (c) Les interactions ont été testées sur milieux avec un gène sélectif (DDO/X en b) et avec quatre gènes sélectifs (QDO/X/A en b et en c). L'interaction entre la lamine et l'antigène T de SV40 a été utilisée comme contrôle négatif et l'interaction entre p53 et l'antigène T comme contrôle positif. Les co-transformations de la partie C-terminale et la forme complète d'UL24 avec le vecteur pGADT7 montrent qu'elles ne sont pas auto-activatrices (c).

3.3 Co-immunoprécipitation d'UL24 et C1QBP en infection

Une fois que l'interaction entre C1QBP et UL24 a été identifiée par le système double hybride chez la levure, on a voulu vérifier si les deux protéines interagissent dans un contexte de cellules cibles de l'infection par le VHS-1. Pour cela, on a effectué des expériences de co-immunoprécipitations dans des cellules humaines HeLa infectées à une forte MOI et récoltées

18h après l'infection. Lorsqu'on tire la protéine HA-UL24 avec un anticorps contre l'étiquette HA, on observe une bonne précipitation de celle-ci et également une co-précipitation de CIQBP (figure 13, rangée 1). À l'inverse, lorsqu'on tire la protéine CIQBP avec un anticorps contre celle-ci, on ne retrouve pas HA-UL24 dans le précipité lorsqu'on analyse par immunobuvardage de type western. Sachant que les deux anticorps utilisés pour les immunoprécipitations sont des IgG de souris, on a effectué une immunoprécipitation avec un IgG normal de souris qui ne cible aucun antigène spécifique dans les mêmes conditions comme contrôle négatif. Les résultats montrent une présence d'une faible quantité de CIQBP dans le précipité du contrôle négatif. CIQBP est très abondante dans les cellules HeLa, ce qui justifie pourquoi on n'arrivait pas à se débarrasser de ce "background" dans les immunoprécipitations. Cependant, les expériences d'immunoprécipitation ont été répétées et chaque expérience montrait que le marquage de CIQBP retrouvé dans le contrôle négatif est beaucoup plus faible que dans les deux autres immunoprécipitations (figure 13).

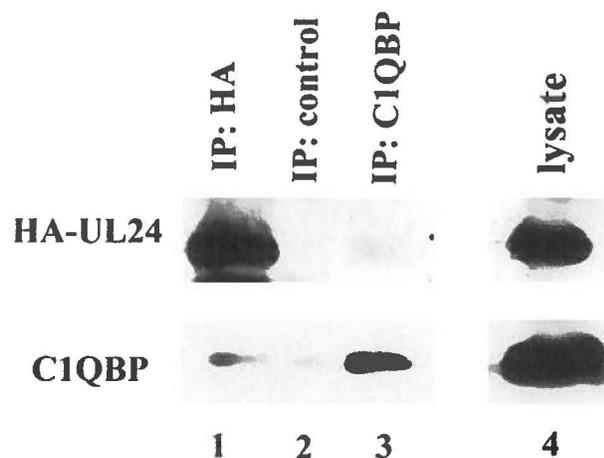


Figure 13 - Co-immunoprécipitation de CIQBP avec la protéine HA-UL24. Les cellules HeLa ont été infectées avec le virus vHA-UL24 et lysées 18 h après l'infection. Des immunoprécipitations avec les anticorps anti-HA, anti-CIQBP et anti-IgG de souris (IP: control) ont été effectuées. L'analyse des précipités par immunobavardage de type western démontre la présence de CIQBP lorsque HA-UL24 a été précipitée tandis que l'inverse n'a pas été observée. Un échantillon de lysat total (1/40) a été chargé sur gel comme témoin positif de la présence des protéines d'intérêt dans le lysat initial.

3.4 Colocalisation intracellulaire d'UL24 et C1QBP en infection

Suite aux expériences démontrant l'interaction de la protéine UL24 avec la protéine C1QBP, on a observé leur localisation intracellulaire par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale (figure 14). Tel que rapporté précédemment, l'infection par le VHS-1 induit une redistribution de C1QBP dans le cytoplasme et induit sa relocalisation partielle vers le noyau (Bryant *et al.*, 2000). Nous avons observé que HA-UL24 et C1QBP colocalisent dans le cytoplasme des cellules HeLa à 18 h post-infection. Dans de rares cas, la colocalisation semblait être nucléaire mais la majorité des cellules démontrait une colocalisation clairement cytoplasmique. Le coefficient de Manders M1 (0.38) indiquant la proportion de HA-UL24 colocalisant avec C1QBP démontrait qu'une partie seulement de HA-UL24 colocalise avec C1QBP. De même, le coefficient M2 (0.16) démontrait que seulement une petite partie de C1QBP colocalise avec HA-UL24 (figure 14).

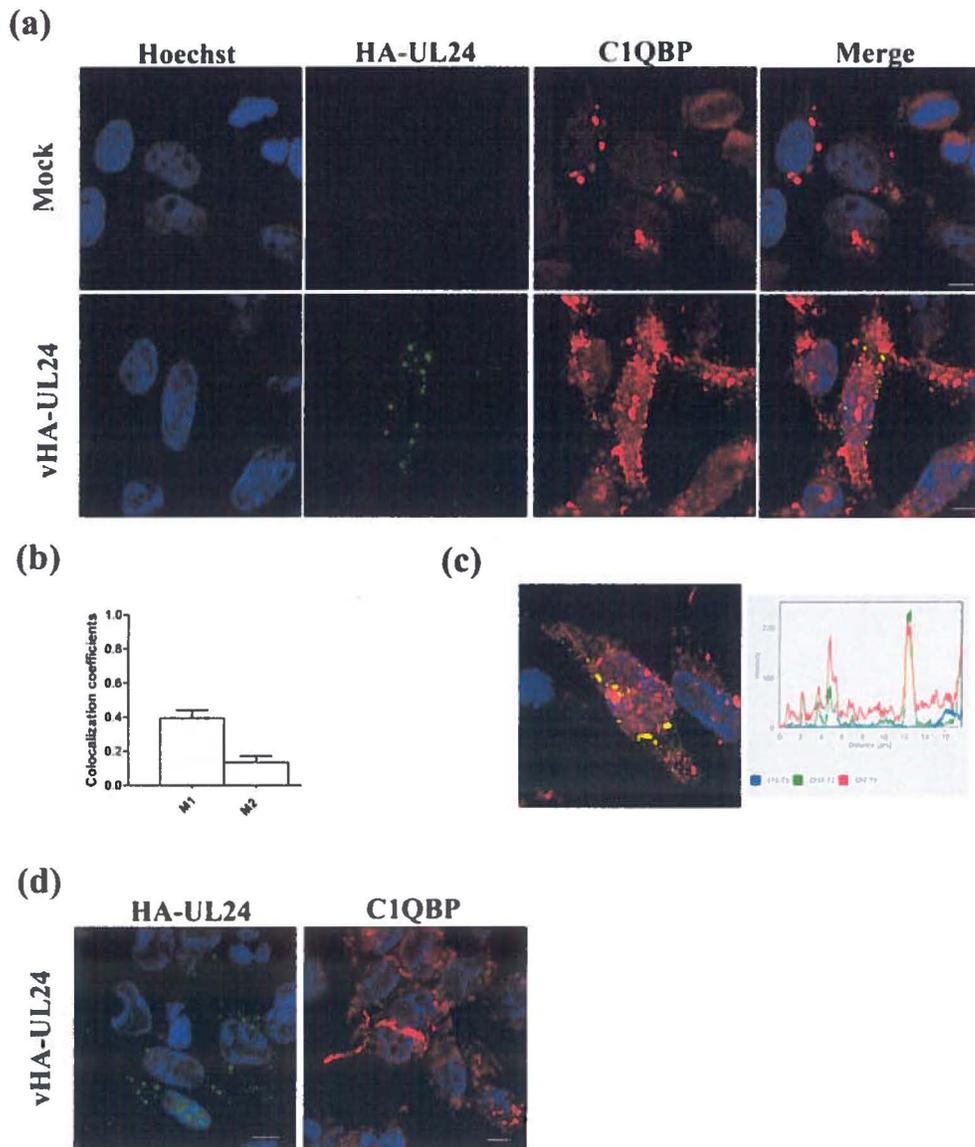


Figure 14 - Colocalisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 avec la protéine cellulaire C1QBP dans les cellules HeLa. Les cellules ont été infectées avec le virus vHA-UL24 à une MOI de 50 et fixées 18 h après l'infection. Les protéines d'intérêt ont été marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux et d'anticorps secondaires couplés à AlexaFluor 488 (pour HA-UL24) et AlexaFluor 568 (pour C1QBP). Le Hoechst 33342 a été utilisé pour marquer le noyau. La barre d'échelle représente 10 μm . (a) Une colocalisation de HA-UL24 (vert) et C1QBP (rouge) a été observée dans le cytoplasme des cellules infectées. (b) Les coefficients de colocalisation de Manders (M1: HA-UL24 colocalisant avec C1QBP et M2: C1QBP colocalisant avec HA-UL24) ont été estimés dans un total de 22 champs pour une totalité d'environ 100 cellules. Les moyennes des 22 champs sont illustrées sur la figure. (c) Une flèche a été tracée dans une cellule représentative afin de voir le profil des intensités des deux couleurs (rouge pour C1QBP et verte pour HA-UL24). (d) Des marquages simples de HA-UL24 et C1QBP ont été effectués séparément dans des cellules infectées. Les distributions des deux protéines étaient similaires à leurs distributions dans les expériences de co-marquage.

Afin de vérifier que la colocalisation observée ne résulte pas d'une réaction croisée entre les anticorps utilisés ni d'un phénomène d'émission spectrale croisée entre les anticorps secondaires, des marquages individuels de HA-UL24 et de C1QBP montrant les distributions des deux protéines similaires à celles des co-marquages (figure 14d), des marquages avec les anticorps secondaires seuls montrant une absence de marquage ainsi que des marquages avec les fluorochromes inversés chez les anticorps secondaires (images non présentées) ont été effectués comme contrôles négatifs.

Étant donné que l'implication d'UL24 dans la redistribution des glycoprotéines virales a été démontrée dans la lignée cellulaire HFF qui sont des cellules non transformées et non immortalisées (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013), on a effectué les expériences de colocalisation de HA-UL24 et C1QBP dans ces cellules à 18 h post-infection avec le virus vHA-UL24. Comme le démontre la figure 15, les deux protéines colocalisent également dans ce type cellulaire. Cette colocalisation est principalement cytoplasmique.

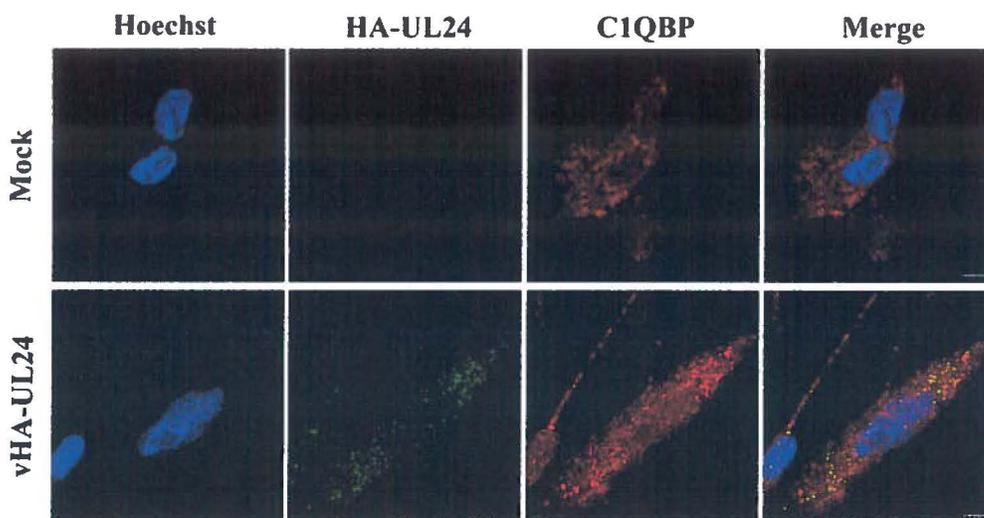


Figure 15 - Colocalisation intracellulaire de la protéine HA-UL24 avec la protéine cellulaire C1QBP dans les cellules non immortalisées HFF. Les cellules ont été infectées avec le virus vHA-UL24 à une MOI de 10 et fixées après 18 h. Les protéines d'intérêt ont été marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux et d'anticorps secondaires couplés à AlexaFluor 488 (pour HA-UL24) et AlexaFluor 568 (pour C1QBP). Le Hoechst 33342 a été utilisé pour marquer le noyau. La barre d'échelle représente 10 µm.

3.5 Expression de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1 des cellules HeLa

Une étude effectuée chez un autre virus herpès, le HCMV, a démontré que la protéine C1QBP est surexprimée lorsque des cellules HFF étaient infectées par le virus (Du *et al.*, 2013). Nous avons donc voulu vérifier si l'expression de C1QBP était également affectée par le VHS-1. La figure 16 démontre que le niveau d'expression de la protéine ne semblait pas être affectée ni par l'infection avec le virus de type sauvage KOS ni par l'absence de la protéine UL24. Cependant, cette expérience a été réalisée dans des cellules HeLa et non des HFF. De plus, la comparaison n'a pas été réalisée de manière quantitative.

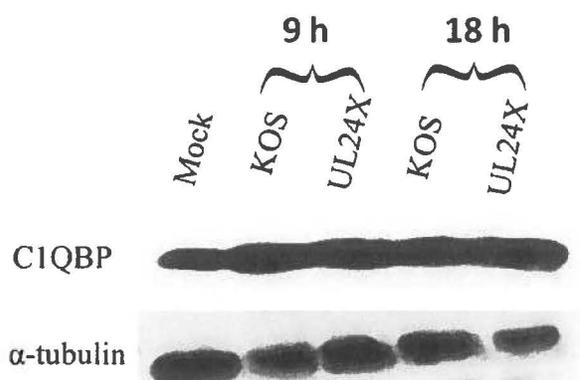


Figure 16 - Expression de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1 dans les cellules HeLa. L'analyse des lysats cellulaires par immunobuvardage de type western montre que l'expression de C1QBP dans les cellules HeLa infectées avec les virus KOS et UL24X (MOI=100), à 9 h et 18 h post-infection respectivement, est similaire à son niveau dans les cellules mock infectées. Un marquage contre la protéine α-tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines totales chargées dans chaque puits.

3.6 Diminution de l'expression de C1QBP par les siRNAs

On a voulu par la suite déterminer le rôle de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1. En plus de cette étude, une autre étude a déjà identifié une interaction entre C1QBP et la protéine

immédiate précoce ICP27 du VHS-1 lors de l'infection de cellules HeLa (Bryant *et al.*, 2000). Cependant, le rôle que C1QBP joue lors de l'infection par ce virus n'a jamais été caractérisé. On a donc opté pour une stratégie de diminution de l'expression de la protéine par des siRNAs. Après optimisation de l'expérience, on a observé que la transfection de cellules HeLa avec les siRNAs ciblant C1QBP à une concentration finale de 40 nM démontre une diminution de l'expression de la protéine à 48 h et 72 h post-transfection, comme illustré sur la figure 17 ci-après. Les quantités de C1QBP dans les différentes conditions n'ont cependant pas été quantifiées, ce qui ne nous permet pas d'évaluer la quantité restante dans les cellules suite au « knock-down ».

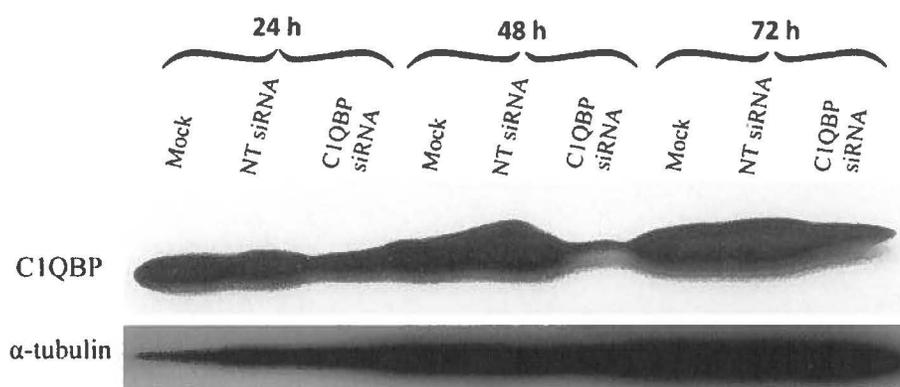


Figure 17 - Diminution de l'expression de C1QBP par les siRNAs. Les cellules HeLa ont été mock-transfectées ou transfectées avec les siRNAs contre C1QBP ou avec les siRNAs non spécifiques (NT siRNA) à une concentration finale de 40 nM et ont été lysées à 24 h, 48 h et 72 h post-transfection. Les quantités de C1QBP dans les lysats ont été comparées par immunobuvardage de type western. Un marquage contre la protéine α-tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines totales chargées par puits.

3.7 Viabilité cellulaire lors de la diminution de l'expression de C1QBP

Puisqu'il a été démontré que la protéine C1QBP est impliquée dans plusieurs voies du métabolisme cellulaire (Hu *et al.*, 2013, McGee *et al.*, 2011, Muta, 1997), nous avons voulu vérifier si le silençage du gène aurait un impact important sur la viabilité des cellules. Pour cela,

on a transfecté des cellules HeLa avec 40 nM de siRNA et 2 µL d'agent transfectant et on a dénombré les cellules viables et non viables 48 h après la transfection grâce à une coloration au bleu de trypan. Les résultats de deux expériences indépendantes ont montré qu'il y a une hausse d'environ 3% de la mortalité cellulaire lorsqu'on transfecte avec les siRNAs contre C1QBP par rapport aux siRNAs non spécifiques (NT siRNA). Toutefois, la viabilité cellulaire était supérieure à 80% dans tous les cas (figure 18).

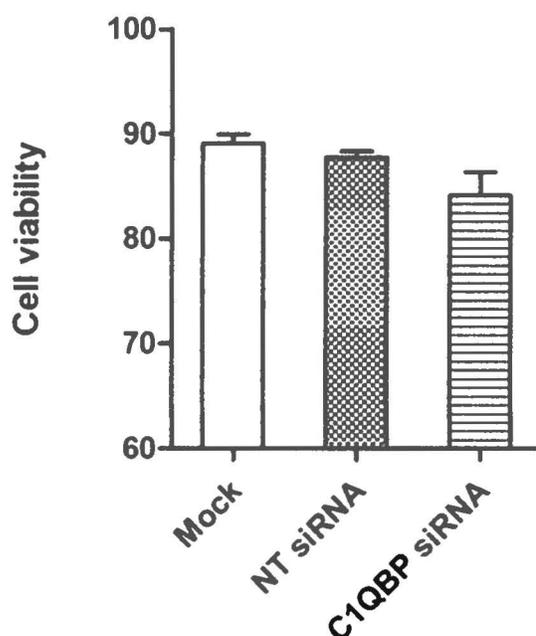


Figure 18 - Viabilité des cellules transfectées avec les siRNAs contre C1QBP. Les cellules HeLa ont été mock transfectées ou transfectées avec les siRNAs contre C1QBP ou les siRNAs non spécifiques (NT siRNA). 48 h après la transfection, le nombre de cellules mortes a été évalué pour chaque traitement à l'aide d'une coloration au bleu de Trypan. La moyenne des pourcentages de cellules vivantes de deux expériences est illustrée sur le graphique. Les barres d'erreur représentent les erreurs-types des moyennes.

3.8 Réplication et dissémination du VHS-1 lors du silençage de C1QBP

Les cellules chez lesquelles l'expression de C1QBP a été diminuée (48 h post-transfection) ont été infectées à une forte multiplicité d'infection afin d'évaluer l'importance de

CIQBP en un seul cycle de réplication. Pour cela, la totalité de particules virales produites a été récoltée 18 h après l'infection. Comme l'indique la figure 19a, la diminution de la protéine, dans nos conditions, n'affecte pas la réplication du VHS-1 dans les cellules HeLa. De même, les cellules ont été infectées à une faible multiplicité d'infection afin d'évaluer l'importance de CIQBP en plusieurs cycles de réplication et d'infection des cellules avoisinantes. Pour cela, les particules virales totales ont été récoltées 48 h post-infection. Comme l'indique la figure 19b, CIQBP ne semble pas non plus être essentielle pour la dissémination du VHS-1 dans les cellules HeLa.

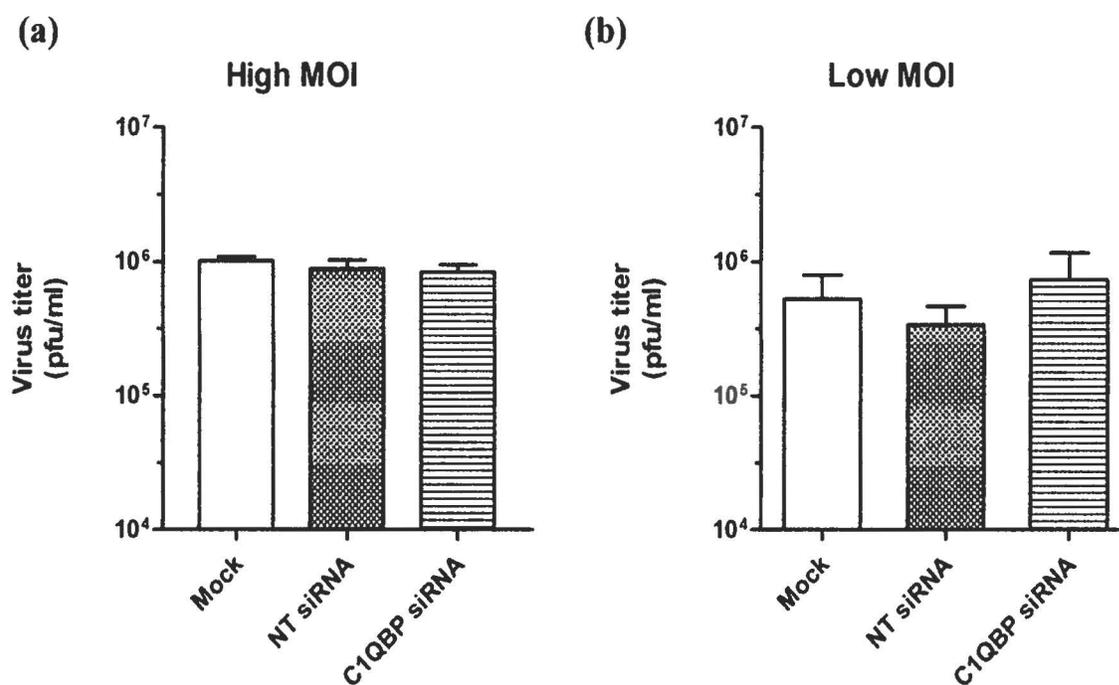


Figure 19 - Réplication du VHS-1 dans les cellules transfectées avec les siRNAs contre CIQBP. Les cellules HeLa ont été mock transfectées ou transfectées avec les siRNAs non spécifiques (NT siRNA) ou avec les siRNAs contre CIQBP. (a) Effet de la diminution de l'expression de CIQBP sur la réplication du VHS-1 en un seul cycle de réplication. 48 h après la transfection, les cellules ont été infectées à une MOI de 20 avec le virus KOS. Les particules virales ont été récoltées 18 h post-infection et les titres viraux ont été déterminés en unités formatrices de plages par mL. Une ANOVA à un facteur a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois moyennes de titres viraux. L'expérience a été effectuée deux fois de manière indépendante (n=2) avec chaque condition en duplicata pour chaque expérience. (b) Effet de la diminution de l'expression de CIQBP sur la dissémination du VHS-1. 48 h après la transfection, les cellules ont été infectées à une MOI de 0.001 avec le virus KOS. Les particules virales ont été récoltées 48 h post-infection et les titres viraux ont été déterminés en unités formatrices de plages par mL. Une ANOVA à un facteur a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois moyennes de titres viraux. L'expérience a été effectuée trois fois de manière indépendante (n=3) avec chaque condition en duplicata pour chaque expérience. (a) et (b) Les barres d'erreur représentent les erreurs-types des moyennes.

4 DISCUSSION

Dans ce travail, notre hypothèse de départ était que la partie C-terminale de la protéine UL24 du VHS-1 interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans la fonction d'UL24 dans le cytoplasme. Le criblage double hybride utilisant la partie C-terminale d'UL24 comme appât a révélé une interaction de celle-ci avec la protéine multifonctionnelle C1QBP. L'interaction de la forme entière d'UL24 avec C1QBP a également été confirmée en double hybride ainsi que par co-immunoprécipitation. Conformément à l'hypothèse de départ, UL24 et C1QBP semblent colocaliser dans le cytoplasme des cellules HeLa et HFF lors de l'infection par le VHS-1.

4.1 La protéine p32/C1QBP/HABP1

La protéine C1QBP a été pour la première fois identifiée comme une protéine de 32 kDa copurifiée avec le facteur d'épissage SF2 dans des cellules HeLa (Krainer *et al.*, 1991). Suite à l'identification de rôles différents qui lui ont été attribués, la protéine a également été nommée C1QBP ou gC1qR car elle se lie à la composante C1q du système du complément (Ghebrehiwet *et al.*, 1994) et HABP1 car elle se lie aussi à l'acide hyaluronique (Deb *et al.*, 1996). Il s'agit d'une protéine hautement conservée chez les eucaryotes. Sa séquence primaire est constituée de 282 acides aminés dont les 73 premiers acides aminés en N-terminal forment le signal de localisation mitochondriale (MLS) qui est clivé de manière post-traductionnelle. Le peptide mature restant (32 kDa) forme un homotrimère dont la structure est unique. L'homotrimère est fortement acide et la distribution des charges à sa surface est asymétrique (Jiang *et al.*, 1999). Malgré la présence du MLS, la protéine C1QBP se retrouve dans différents compartiments cellulaires. Elle se retrouve dans la matrice mitochondriale (Jiang *et al.*, 1999, Muta, 1997) et dans le noyau (Brokstad *et al.*, 2001). Elle a également été observée dans le réticulum endoplasmique et à la surface cellulaire (Soltys *et al.*, 2000), dans le Golgi des cellules COS-1 (Sengupta *et al.*, 2005) ainsi que dans le cytoplasme en périphérie du noyau (Meenakshi *et al.*,

2003). D'autre part, elle a été observée dans des compartiments cytoplasmiques colocalisant avec la calréticuline (H. C. van Leeuwen *et al.*, 2001, Watthanasurorot *et al.*, 2013).

La multicompartimentalité de C1QBP reflète la large gamme de protéines avec lesquelles elle interagit. Une étude a démontré qu'elle se lie de manière générale aux protéines kinases C (PKC) et est capable de réguler l'activité de celles-ci (Robles-Flores *et al.*, 2002, Storz *et al.*, 2000). De même, C1QBP a été caractérisée comme étant un substrat de l'activité kinase de ERK et fait donc partie de la voie MAPK dans des fibroblastes de rat ainsi que des cellules HeLa (Majumdar *et al.*, 2002).

C1QBP est un partenaire d'interaction de plusieurs protéines virales impliquées dans la régulation de la transcription ou dans l'épissage des ARNm. Ainsi, lors de l'infection par divers virus, C1QBP est en partie relocalisée des mitochondries vers le noyau (Du *et al.*, 2013, Ohrmalm *et al.*, 2006, Y. Wang *et al.*, 1997). Entre autres, lors d'une infection par l'Adénovirus, une étude a montré que la surexpression de C1QBP entraîne un blocage de la synthèse des protéines de l'unité de transcrits tardifs ("Major Late Transcript Unit"). C1QBP semble inhiber l'élongation de la transcription de ce groupe de gènes viraux en causant l'hyperphosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN Polymerase II. Ce blocage transcriptionnel est dépendant du motif CAAT en amont du promoteur de ces gènes cibles, suggérant que C1QBP interagirait avec le facteur de transcription qui reconnaît ce motif (Ohrmalm *et al.*, 2006).

Par ailleurs, lors d'une infection par le HCMV, C1QBP se lie au récepteur de la lamine B (LBR) et permet ainsi de recruter la kinase virale UL97 à la membrane nucléaire. Cette kinase phosphoryle C1QBP ainsi que les protéines de la lamina nucléaire (Marschall *et al.*, 2005). C1QBP interagit avec d'autres protéines virales nécessaires à la sortie des nucléocapsides du noyau vers le cytoplasme et recrute aussi des PKC à la membrane nucléaire. Lorsque C1QBP était surexprimée, une plus grande quantité de particules virales a été observée dans le cytoplasme par rapport au noyau. Ainsi, les auteurs proposent un modèle de complexe de sortie nucléaire ("Nuclear Egress Complex" ou NEC) impliquant au moins six protéines virales et

cellulaires et dans lequel CIQBP jouerait le rôle d'adaptateur central qui permet de recruter les autres composantes du complexe (Milbradt *et al.*, 2007, Milbradt *et al.*, 2009). CIQBP interagit aussi avec les protéines UL84 (Gao *et al.*, 2008), UL44 et IE2-p86 (Du *et al.*, 2013) de ce virus et ces interactions ont lieu dans les compartiments de réplication dans le noyau (Du *et al.*, 2013).

Ensuite, CIQBP interagit aussi avec les protéines du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) Tat (Berro *et al.*, 2006) et Rev (Luo *et al.*, 1994, Tange *et al.*, 1996). Une étude protéomique a permis de démontrer que CIQBP interagit avec la version acétylée de Tat. L'acétylation de Tat induit un recrutement de CIQBP au promoteur et est associée à une diminution de l'épissage (Berro *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que CIQBP interagit avec le domaine basique de Rev et module l'activité de celle-ci *in vitro* et *in vivo* (Luo *et al.*, 1994, Tange *et al.*, 1996). Il a donc été établi que CIQBP permet d'inhiber l'épissage des pré-ARNm viraux. Cela favorise l'accumulation des transcrits viraux et la synthèse des protéines structurales et donc augmente le nombre de particules virales produites (Zheng *et al.*, 2003).

Lors d'une infection par l'EBV, CIQBP interagit avec la protéine EBNA-1 via une région riche en glycine et arginine de cette dernière (Ito *et al.*, 2000, Y. Wang *et al.*, 1997). Il a aussi été montré que cette interaction était requise pour la fonction transactivatrice de EBNA-1 (Van Scoy *et al.*, 2000, Y. Wang *et al.*, 1997) ainsi que pour la réplication *in vitro* d'un plasmide possédant l'origine de réplication du génome viral latent oriP. Sachant que CIQBP se lie à cette oriP *in vivo*, il a été postulé que cette protéine joue un rôle dans la phase latente de l'EBV (Van Scoy *et al.*, 2000).

Finalement, CIQBP est impliquée dans les infections virales via des mécanismes cellulaires favorisant la réplication virale (Watthanasurorot *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2009). En effet, il a été montré que lors d'une infection par le Sendai virus et le virus de la stomatite vésiculaire, CIQBP est relocalisée de la matrice à la membrane externe mitochondriale. Cela inhibe la signalisation antivirale mitochondriale (MAVS), ce qui favorise la réplication virale (Xu *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a aussi été montré que lors d'une infection par le "white-spot

syndrom virus" (WSSV), un virus de crustacé, C1QBP est relocalisée des mitochondries vers le cytoplasme où elle forme des complexes avec la calréticuline (Watthanasurorot *et al.*, 2013).

4.2 Interaction de C1QBP avec la protéine UL24

Comme décrites précédemment, les différentes interactions de C1QBP avec des protéines virales ont été caractérisées principalement dans le noyau de la cellule hôte. Dans cette étude, on a démontré que C1QBP interagit avec la protéine UL24 du VHS-1 et cette interaction a lieu principalement dans le cytoplasme (figure 14). Comme mentionné précédemment, C1QBP est principalement localisée dans la matrice mitochondriale (Jiang *et al.*, 1999, Muta, 1997). Cependant, malgré la prédiction d'un signal de localisation mitochondriale (MLS) dans la séquence codante d'UL24 par diverses analyses bio-informatiques, la protéine n'a jamais été détectée dans les fractions mitochondriales (Pearson *et al.*, 2002). Ainsi, la colocalisation d'UL24 avec C1QBP semble avoir lieu dans un ou des compartiment(s) cytoplasmique(s) autre(s) que les mitochondries. Ce résultat de colocalisation intracellulaire par immunofluorescence a été confirmé par des essais de co-immunoprécipitation de C1QBP lorsqu'on tire HA-UL24. Cependant, l'immunoprécipitation inverse n'a pas pu être démontrée mais cela s'explique par le fait que C1QBP est impliquée dans une multitude de fonctions comme discuté précédemment ou par une compétition entre l'anticorps et UL24 pour le site de liaison à C1QBP. Par ailleurs, les expériences de co-immunoprécipitation effectuées ne comprenaient pas une étape de « pre-clearing » des lysats cellulaires.

De plus, les résultats en double hybride ont montré que cette interaction se fait entre la partie C-terminale de la protéine UL24 et la forme mature de C1QBP. Ce résultat va dans le sens de l'hypothèse que la partie C-terminale est importante pour les fonctions d'UL24 dans le cytoplasme. Cette interaction pourrait être basée sur la charge sachant que C1QBP est une protéine fortement acide avec un pI=4 (Jiang *et al.*, 1999) et UL24 est une protéine fortement basique (Pearson *et al.*, 2002) avec un pI estimé à 11 (Kozlowski, 2007). Par ailleurs, il a été souvent montré dans la littérature que l'interaction de C1QBP avec une protéine donnée requiert

chez cette dernière un domaine riche en arginine, un acide aminé très basique. Par exemple, la liaison de C1QBP avec EBNA-1 de l'EBV se fait via un domaine riche en glycine-arginine de EBNA-1 (Ito *et al.*, 2000). L'interaction de C1QBP avec l'ORF73 du Saïmiri Herpes virus requiert aussi le domaine N-terminal riche en arginine de celle-ci (Hall *et al.*, 2002). L'interaction de C1QBP avec la protéine ICP27 du VHS-1 se fait dans la région comprise entre les acides aminés 166-242 de celle-ci qui contient aussi un domaine riche en arginine (Bryant *et al.*, 2000). On note que la partie C-terminale d'UL24 possède un domaine riche en arginine (R) et en glycine (G) entre les acides aminés 194 et 208 (figure 5). Il serait donc intéressant d'identifier les acides aminés importants pour l'interaction entre les deux protéines et par la suite, muter ceux-ci afin d'évaluer clairement l'importance de l'interaction dans les fonctions de la protéine UL24 et par extension, l'importance de l'interaction pour l'infection par le VHS-1.

4.3 Expression de C1QBP lors de l'infection par le VHS-1

Nous avons également montré que l'infection par le VHS-1 n'augmente pas l'expression de C1QBP dans les cellules HeLa (figure 16) contrairement à une infection par le HCMV (Du *et al.*, 2013), un autre virus herpès. Cependant, il aurait été intéressant d'effectuer les comparaisons en quantifiant les protéines dans chaque condition et en normalisant par rapport à la tubuline. Par ailleurs, cette observation pour le HCMV a été faite dans des cellules HFF qui sont des cellules non immortalisées. Il serait intéressant de voir l'effet de l'infection avec le VHS-1 dans ce type cellulaire. De plus, dans la littérature, il a été clairement démontré que C1QBP est surexprimée dans les cellules cancéreuses et plusieurs lignées cellulaires immortalisées car cette protéine serait un facteur de prolifération cellulaire (Amamoto *et al.*, 2011, Dang, 2010, McGee *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013). Ainsi, l'expression de C1QBP n'est pas modifiée par l'infection par le VHS-1 dans les cellules HeLa peut-être à cause du fait que la protéine est déjà surexprimée dans ces cellules.

4.4 Importance de C1QBP pour la réplication du VHS-1

L'étude de la réplication virale lorsque le gène de C1QBP est silencé n'avait pas encore été réalisée chez les virus herpès avant cette étude. Les phénotypes associés au silençage de ce gène sont plutôt caractérisés d'un point de vue cellulaire général. Le silençage ralentit la maturation des ribosomes car C1QBP interagit avec un facteur de "processing" d'ARNr (Yoshikawa *et al.*, 2011). Il n'affecte pas la viabilité cellulaire de base mais rend les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine (McGee *et al.*, 2011). D'autre part, une diminution de l'expression de C1QBP mène à une fragmentation des mitochondries et un patron plus ponctué du réticulum endoplasmique. C1QBP semble être important pour le maintien de l'intégrité et de la morphologie de ce dernier compartiment (Hu *et al.*, 2013).

Dans ce présent travail, le silençage de C1QBP par les siRNAs n'a démontré aucun effet sur la réplication du virus en un ou plusieurs cycles de réplication (figure 19). En ce qui concerne la protéine UL24, un mutant n'exprimant pas cette protéine ne démontre qu'une légère réduction des titres viraux en culture cellulaire (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Ainsi, du point de vue de l'interaction de C1QBP avec UL24, il n'est pas très surprenant de constater l'absence d'effet de la diminution de l'expression de C1QBP sur la réplication virale en culture cellulaire. Cependant, il se peut que l'importance de C1QBP lors de l'infection ne serait observable que dans des cellules non transformées ou dans un modèle *in vivo*. D'autre part, une étude antérieure a démontré que C1QBP interagit aussi avec ICP27, une autre protéine du VHS-1 (Bryant *et al.*, 2000). ICP27 est une protéine immédiate précoce qui joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de transcrits viraux (McLauchlan *et al.*, 1992). Son interaction avec C1QBP semble jouer un rôle dans l'épissage des ARNm puisque les deux protéines ont été co-immunoprécipitées avec des facteurs de régulation de l'épissage. Les auteurs proposent que cette interaction pourrait contribuer à la diminution de la synthèse des protéines cellulaires ou indirectement faciliter l'export nucléaire des ARNm (Bryant *et al.*, 2000). Dans ce cas, on pourrait supposer qu'en diminuant l'expression de C1QBP, on aurait une réduction du nombre de particules virales produites. Les résultats de notre étude suggèrent que le rôle de C1QBP dans l'épissage des ARNm ne serait pas essentiel pour la réplication du VHS-1, du moins dans les cellules HeLa. Il

serait de ce fait intéressant de regarder les effets de la diminution de C1QBP dans d'autres types cellulaires tels que les HFF. Par ailleurs, la réduction de l'expression par les siRNAs étant partielle, il se peut que la quantité restante de C1QBP soit suffisante pour maintenir ses fonctions.

4.5 Implication de C1QBP dans les étapes tardives du cycle du VHS-1

Il a été démontré que la protéine UL24 était impliquée dans la redistribution des glycoprotéines virales impliquées dans la fusion (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de regarder si le silençage de C1QBP mène à la formation de plages de lyse syncytiales ou aurait un effet sur la distribution des glycoprotéines de fusion, comme c'est le cas lors de l'infection par un virus déficient en UL24. Il serait intéressant de mener ces études dans les cellules HFF car il est difficile d'analyser la morphologie des plages de lyse chez les cellules HeLa mais aussi parce que les cellules HFF sont des cellules non transformées.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons pu identifier un partenaire d'interaction de la protéine UL24 du VHS-1. Il s'agit de la protéine multifonctionnelle CIQBP qui joue plusieurs rôles dans la cellule et est impliquée dans la régulation de la transcription et de l'épissage dans diverses infections virales. Cette étude a permis de montrer une co-immunoprécipitation de CIQBP avec UL24. On a également observé une colocalisation de CIQBP avec UL24 dans le cytoplasme des cellules HeLa mais également dans les cellules HFF, des cellules non immortalisées, par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale.

L'interaction entre UL24 et CIQBP a été identifiée en effectuant un criblage double hybride chez la levure d'une librairie d'ADNc provenant de cellules HeLa en utilisant la partie C-terminale d'UL24 (aa 190-269) comme appât. Ainsi, cette étude a permis d'identifier une fonction pour la partie C-terminale d'UL24 du VHS-1 qui n'est pas conservée parmi les virus herpès contrairement à la partie N-terminale (J. G. Jacobson *et al.*, 1989). Sachant que les deux parties de la protéine se retrouvent distinctement dans le cytoplasme et dans le noyau en transfection transitoire (Bertrand *et al.*, 2010), cette nouvelle interaction identifiée conforte l'hypothèse que la partie N-terminale joue un rôle dans le noyau et que la partie C-terminale est plutôt importante pour le rôle d'UL24 dans le cytoplasme.

En perspectives, il serait donc intéressant de visualiser l'interaction des deux protéines par des techniques en immunofluorescence telles que le FRET qui consiste en un transfert d'énergie entre deux protéines physiquement rapprochées, ou le BIFC qui consiste en une reconstitution d'une molécule fluorescente par l'interaction de deux protéines couplées aux deux fragments de cette molécule. Ces deux approches permettraient de confirmer, non seulement la colocalisation des deux protéines, mais plus précisément une interaction physique dans une distance de moins de 10 nm entre celles-ci. Il serait aussi intéressant d'identifier le domaine d'interaction de la protéine UL24 avec CIQBP. Une façon de le faire sera d'effectuer des mutations dans le gène

codant pour la partie C-terminale d'UL24 et pour la protéine CIQBP, puis, observer lesquelles de ces mutations rompent l'interaction. Par la suite, un virus dans lequel le gène *ul24* porte ces mutations pourra être construit. Il serait alors possible d'investiguer en profondeur l'importance de cette interaction lors de l'infection par le VHS-1 en culture cellulaire ou dans un modèle *in vivo*. Par ailleurs, il serait également intéressant de voir si la réduction de l'expression de CIQBP affecte ou non la réplication d'autres virus herpès. Ainsi, ces études permettront d'élucider les fonctions de la protéine UL24 du VHS-1 dans le cytoplasme et de mieux comprendre le rôle de cette protéine hautement conservée dans la grande famille des *Herpesviridae*.

6 REFERENCES

- Akhtar J & Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* 276(24):7228-7236.
- Amamoto R, Yagi M, Song Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, Naito S, Yokomizo A, Kuroiwa K, Tokunaga S, Kato S, Hiura H, Samori T, Kang D & Uchiumi T (2011) Mitochondrial p32/C1QBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter prostate-specific antigen relapse time after radical prostatectomy. *Cancer Sci* 102(3):639-647.
- Amelio AL, Giordani NV, Kubat NJ, O'Neil JE & Bloom DC (2006) Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant. *J Virol* 80(4): 2063-2068.
- Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y & Kawaguchi Y (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
- Avitabile E, Di Gaeta S, Torrisi MR, Ward PL, Roizman B & Campadelli-Fiume G (1995) Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol* 69(12):7472-7482.
- Avitabile E, Lombardi G & Campadelli-Fiume G (2003) Herpes simplex virus glycoprotein K, but not its syncytial allele, inhibits cell-cell fusion mediated by the four fusogenic glycoproteins, gD, gB, gH, and gL. *J Virol* 77(12):6836-6844.
- Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G & Roizman B (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* 65(12):6414-6424.
- Battesti A & Bouveret E (2012) The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* 58(4):325-334.
- Bauer A & Kuster B (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* 270(4):570-578.
- Beitia Ortiz de Zarate I, Kaelin K & Rozenberg F (2004) Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J Virol* 78(3):1540-1551.
- Ben Abdeljelil N, Rochette P-A & Pearson A (2013) The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* 444(1-2):263-273.
- Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Cohen GH & Eisenberg RJ (2005) Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol* 79(18):11588-11597.
- Berro R, Kehn K, de la Fuente C, Pumfery A, Adair R, Wade J, Colberg-Poley AM, Hiscott J & Kashanchi F (2006) Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32. *J Virol* 80(7):3189-3204.

- Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H & 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):109-118.
- Bertrand L & Pearson A (2008) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J Gen Virol* 89(Pt 5):1142-1151.
- Blakeney S, Kowalski J, Tummolo D, DeStefano J, Cooper D, Guo M, Gangolli S, Long D, Zamb T, Natuk RJ & Visalli RJ (2005) Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *J Virol* 79(16):10498-10506.
- Bloom DC, Giordani NV & Kwiatkowski DL(2010) Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1799(3-4): 246-256.
- Boehmer PE & Lehman IR (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 66:347-384.
- Borowicz B & Domaniewski J (1991) Characterization of herpes simplex virus type 1 DNA during latent infection in mice. *Pol Arch Weter* 31(3-4):5-14.
- Bortz E, Whitelegge JP, Jia Q, Zhou ZH, Stewart JP, Wu TT & Sun R (2003) Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol* 77(24):13425-13432.
- Brack AR, Klupp BG, Granzow H, Tirabassi R, Enquist LW & Mettenleiter TC (2000) Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* 74(9):4004-4016.
- Brideau AD, Enquist LW & Tirabassi RS (2000) The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J Clin Virol* 17(2):69-82.
- Brokstad KA, Kalland KH, Russell WC & Matthews DA (2001) Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 281(5):1161-1169.
- Bryant HE, Matthews DA, Wadd S, Scott JE, Kean J, Graham S, Russell WC & Clements JB (2000) Interaction between herpes simplex virus type 1 IE63 protein and cellular protein p32. *J Virol* 74(23):11322-11328.
- Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Gottlinger H, Campadelli-Fiume G, Palu G & Parolin C (2007) Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol* 81(20):11468-11478.
- Cockrell SK, Sanchez ME, Erazo A & Homa FL (2009) Role of the UL25 Protein in Herpes Simplex Virus DNA Encapsidation. *J Virol* 83(1): 47-57.
- Coller KE, Lee JI, Ueda A & Smith GA (2007) The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J Virol* 81(21): 11790-11797.
- Cook ML & Stevens JG (1973) Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun* 7(2):272-288.

- Crawford LV, Lane DP, Denhardt DT, Harlow EE, Nicklin PM, Osborn K & Pim DC (1980) Characterization of the complex between SV40 large T antigen and the 53K host protein in transformed mouse cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 1:179-187.
- Crump CM, Yates C & Minson T (2007) Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *J Virol* 81(14):7380-7387.
- Dang CV (2010) p32 (C1QBP) and cancer cell metabolism: is the Warburg effect a lot of hot air? *Mol Cell Biol* 30(6):1300-1302.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ & Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154(1): 171-177.
- de Bruyn Kops A & Knipe DM (1994) Preexisting nuclear architecture defines the intranuclear location of herpesvirus DNA replication structures. *J Virol* 68(6):3512-3526.
- Deatly AM, Spivack JG, Lavi E & Fraser NW (1987) RNA from an immediate early region of the type 1 herpes simplex virus genome is present in the trigeminal ganglia of latently infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10):3204-3208.
- Deb TB & Datta K (1996) Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. Hyaluronic acid-binding protein as P-32 protein, co-purified with splicing factor SF2. *J Biol Chem* 271(4):2206-2212.
- Deppert W, Steinmayer T & Richter W (1989) Cooperation of SV40 large T antigen and the cellular protein p53 in maintenance of cell transformation. *Oncogene* 4(9):1103-1110.
- Deriziotis P, Graham SA, Estruch SB & Fisher SE (2014) Investigating Protein-protein Interactions in Live Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Vis Exp* 10.3791/51438(87).
- Deshmane SL & Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 63(2):943-947.
- Dingwell KS, Brunetti CR, Hendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ & Johnson DC (1994) Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* 68(2):834-845.
- Dingwell KS & Johnson DC (1998) The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J Virol* 72(11):8933-8942.
- Dove SL & Hochschild A (2004) A bacterial two-hybrid system based on transcription activation. *Methods Mol Biol* 261:231-246.
- Du G & Stinski MF (2013) Interaction network of proteins associated with human cytomegalovirus IE2-p86 protein during infection: a proteomic analysis. *PLoS One* 8(12):e81583.
- Efstathiou S, Minson AC, Field HJ, Anderson JR & Wildy P (1986) Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *J Virol* 57(2):446-455.
- Efstathiou S & Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res* 111(2):108-119.

- Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C & Cohen GH (2012) Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* 4(5):800-832.
- Epstein MA (1962) Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* 12:589-597.
- Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R & Johnson DC (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):10187-10192.
- Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-246.
- Gao Y, Colletti K & Pari GS (2008) Identification of human cytomegalovirus UL84 virus- and cell-encoded binding partners by using proteomics analysis. *J Virol* 82(1):96-104.
- Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EI, Willis AC & Reid KB (1994) Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J Exp Med* 179(6):1809-1821.
- Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N & Mettenleiter TC (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* 75(8):3675-3684.
- Griffiths A & Coen DM (2003) High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J Virol* 77(3): 2282-2286.
- Hall KT, Giles MS, Calderwood MA, Goodwin DJ, Matthews DA & Whitehouse A (2002) The Herpesvirus Saimiri Open Reading Frame 73 Gene Product Interacts with the Cellular Protein p32. *J Virol* 76(22):11612-11622.
- Hannah BP, Heldwein EE, Bender FC, Cohen GH & Eisenberg RJ (2007) Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* 81(9):4858-4865.
- Harley CA, Dasgupta A & Wilson DW (2001) Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol* 75(3):1236-1251.
- Hayward GS, Jacob RJ, Wadsworth SC & Roizman B (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11):4243-4247.
- Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ & Harrison SC (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313(5784):217-220.
- Hill TJ, Blyth WA, Harbour DA, Berrie EL & Tullo AB (1983) Latency and other consequences of infection of the nervous system with herpes simplex virus. *Prog Brain Res* 59:173-184.
- Holland LE, Anderson KP, Shipman C, Jr. & Wagner EK (1980) Viral DNA synthesis is required for the efficient expression of specific herpes simplex virus type 1 mRNA species. *Virology* 101(1):10-24.

- Hollinshead M, Johns HL, Sayers CL, Gonzalez-Lopez C, Smith GL & Elliott G (2012) Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *EMBO J* 31(21):4204-4220.
- Hu M, Crawford SA, Henstridge DC, Ng IH, Boey EJ, Xu Y, Febbraio MA, Jans DA & Bogoyevitch MA (2013) p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival. *Biochem J* 453(3):381-391.
- Ito S, Ikeda M, Kato N, Matsumoto A, Ishikawa Y, Kumakubo S & Yanagi K (2000) Epstein-barr virus nuclear antigen-1 binds to nuclear transporter karyopherin alpha1/NPI-1 in addition to karyopherin alpha2/Rch1. *Virology* 266(1):110-119.
- Jacobson, Chen S-H, Cook WJ, Kramer MF & Coen DM (1998) Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* 242(1):161-169.
- Jacobson JG, Martin SL & Coen DM (1989) A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* 63(4):1839-1843.
- Jiang J, Zhang Y, Krainer AR & Xu RM (1999) Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):3572-3577.
- Johns HL, Gonzalez-Lopez C, Sayers CL, Hollinshead M & Elliott G (2014) Rab6 dependent post-Golgi trafficking of HSV1 envelope proteins to sites of virus envelopment. *Traffic* 15(2):157-178.
- Johnson DC, Webb M, Wisner TW & Brunetti C (2001) Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol* 75(2):821-833.
- Jones PC & Roizman B (1979) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol* 31(2):299-314.
- Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NG, Stuart DI & Jones IM (2008) The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* 15(10):1024-1030.
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10):5752-5756.
- Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T, Tsujimura K, Madbouly H, Yamaguchi T, Ohya K & Fukushi H (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400(2):259-270.
- Knipe DM & Cliffe A (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature reviews. Microbiology* 6(3):211-221.
- Knizewski L, Kinch L, Grishin NV, Rychlewski L & Ginalski K (2006) Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* 80(5):2575-2577.
- Koegl M & Uetz P (2007) Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6(4):302-312.

- Kolb AW, Ane C & Brandt CR (2013) Using HSV-1 genome phylogenetics to track past human migrations. *PLoS One* 8(10):e76267.
- Komuro M, Tajima M & Kato K (1989) Transformation of Golgi membrane into the envelope of herpes simplex virus in rat anterior pituitary cells. *Eur J Cell Biol* 50(2):398-406.
- Koyama AH & Uchida T (1987) The mode of entry of herpes simplex virus type 1 into Vero cells. *Microbiol Immunol* 31(2):123-130.
- Kozlowski LP. 2007-2013 Isoelectric Point Calculator. <http://isoelectric.ovh.org>.
- Krainer AR, Mayeda A, Kozak D & Binns G (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell* 66(2):383-394.
- Kubat NJ, Tran RK, McAnany P & Bloom DC (2004) Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J Virol* 78(3): 1139-1149.
- Lamberti C & Weller SK (1996) The herpes simplex virus type 1 UL6 protein is essential for cleavage and packaging but not for genomic inversion. *Virology* 226(2):403-407.
- Lamberti C & Weller SK (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):2463-2473.
- Leach NR & Roller RJ (2010) Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology* 406(1):127-137.
- Leiva-Torres GA, Rochette PA & Pearson A (2010) Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* 91(Pt 5):1109-1116.
- Liesegang TJ (2001) Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 20(1):1-13.
- Lin SR, Jiang MJ, Wang HH, Hu CH, Hsu MS, Hsi E, Duh CY & Wang SK (2013) Human cytomegalovirus UL76 elicits novel aggresome formation via interaction with S5a of the ubiquitin proteasome system. *J Virol* 87(21):11562-11578.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 82(17):8605-8618.
- Luo Y, Batalao A, Zhou H & Zhu L (1997) Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* 22(2):350-352.
- Luo Y, Yu H & Peterlin BM (1994) Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* 68(6):3850-3856.
- Lymberopoulos MH, Bourget A, Ben Abdeljelil N & Pearson A (2011) Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412(2):341-348.
- Lymberopoulos MH & Pearson A (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.

- Majumdar M, Meenakshi J, Goswami SK & Datta K (2002) Hyaluronan binding protein 1 (HABP1)/C1QBP/p32 is an endogenous substrate for MAP kinase and is translocated to the nucleus upon mitogenic stimulation. *Biochem Biophys Res Comm* 291(4):829-837.
- Manders EMM, Verbeek FJ & Aten JA (1993) Measurement of co-localisation of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 169:375-382
- Mann SL, Meyers JD, Holmes KL & Corey L (1984) Prevalence and incidence of herpesvirus infections among homosexually active men. *J Infect Dis* 149(6):1026-1027.
- Marschall M, Marzi A, aus dem Siepen P, Jochmann R, Kalmer M, Auerochs S, Lischka P, Leis M & Stamminger T (2005) Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem* 280(39):33357-33367.
- Matis J & Kudelova M (2001) Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virologica* 45(5-6):269-277.
- McGee AM, Douglas DL, Liang Y, Hyder SM & Baines CP (2011) The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle* 10(23):4119-4127.
- McLauchlan J, Phelan A, Loney C, Sandri-Goldin RM & Clements JB (1992) Herpes simplex virus IE63 acts at the posttranscriptional level to stimulate viral mRNA 3' processing. *J Virol* 66(12):6939-6945.
- McMillan TN & Johnson DC (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(4):1928-1940.
- Meenakshi J, Anupama, Goswami SK & Datta K (2003) Constitutive expression of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in normal fibroblast cells perturbs its growth characteristics and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 300(3):686-693.
- Meng JJ, Rojas M, Bacon W, Stickney JT & Ip W (2005) Methods to study protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 289:341-358.
- Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol* 76(4):1537-1547.
- Milbradt J, Auerochs S & Marschall M (2007) Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C. *J Gen Virol* 88(Pt 10):2642-2650.
- Milbradt J, Auerochs S, Sticht H & Marschall M (2009) Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *J Gen Virol* 90(Pt 3):579-590.
- Muta T (1997) p32 Protein, a Splicing Factor 2-associated Protein, Is Localized in Mitochondrial Matrix and Is Functionally Important in Maintaining Oxidative Phosphorylation. *J Biol Chem* 272(39):24363-24370.
- Nascimento R, Costa H, Dias JD & Parkhouse RM (2011) MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Arch Virol* 156(3):375-386.

- Nascimento R, Dias JD & Parkhouse RM (2009) The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch Virol* 154(7):1143-1149.
- Nascimento R & Parkhouse RM (2007) Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* 88(Pt 5):1446-1453.
- Neumann DM, Bhattacharjee PS, Giordani NV, Bloom DC & Hill JM (2007) In vivo changes in the patterns of chromatin structure associated with the latent herpes simplex virus type 1 genome in mouse trigeminal ganglia can be detected at early times after butyrate treatment. *J Virol* 81(23): 13248-13253.
- Newcomb WW, Homa FL & Brown JC (2006) Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices. *J Virol* 80(13): 6286-6294.
- Nicola AV, Hou J, Major EO & Straus SE (2005) Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol* 79(12):7609-7616.
- Nicola AV, McEvoy AM & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* 77(9):5324-5332.
- Ohrmalm C & Akusjarvi G (2006) Cellular splicing and transcription regulatory protein p32 represses adenovirus major late transcription and causes hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *J Virol* 80(10):5010-5020.
- Pan D, Flores O, Umbach JL, Pesola JM, Bentley P, Rosato PC, Leib DA, Cullen BR & Coen DM (2014) A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency. *Cell Host Microbe* 15(4):446-456.
- Park R & Baines JD (2006) Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol* 80(1):494-504.
- Pasdeloup D, McElwee M, Beilstein F, Labetoulle M & Rixon FJ (2013) Herpesvirus tegument protein pUL37 interacts with dystonin/BPAG1 to promote capsid transport on microtubules during egress. *J Virol* 87(5):2857-2867.
- Pearson A & Coen DM (2002) Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* 76(21):10821-10828.
- Perry LJ & McGeoch DJ (1988) The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69 (Pt 11):2831-2846.
- Piper RC & Katzmann DJ (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:519-547.
- Preston CM & Newton AA (1976) The effects of herpes simplex virus type 1 on cellular DNA-dependent RNA polymerase activities. *J Gen Virol* 33(3):471-482.

- Preston VG, Murray J, Preston CM, McDougall IM & Stow ND (2008) The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J Virol* 82(13): 6654-6666.
- Quina AS, Buschbeck M & Di Croce L (2006) Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol* 72(11): 1563-1569.
- Quinlan MP, Chen LB & Knipe DM (1984) The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* 36(4):857-868.
- Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hubinger A & Reschke M (1996) Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 141(3-4):557-572.
- Rand KH, Rasmussen LE, Pollard RB, Arvin A & Merigan TC (1977) Cellular immunity and herpesvirus infections in cardiac-transplant patients. *N Engl J Med* 296(24):1372-1377.
- Remillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G & Lippe R (2009) Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic* 10(8):1074-1083.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM & Katz DR (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17(3):205-215.
- Rixon FJ, Addison C & McLauchlan J (1992) Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Gen Virol* 73 (Pt 2):277-284.
- Roberts KL & Baines JD (2010) Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol* 84(19):9889-9896.
- Robles-Flores M, Rendon-Huerta E, Gonzalez-Aguilar H, Mendoza-Hernandez G, Islas S, Mendoza V, Ponce-Castaneda MV, Gonzalez-Mariscal L & Lopez-Casillas F (2002) p32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein; interaction and cellular localization of P32-PKC complexes in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 277(7):5247-5255.
- Roche S, Bressanelli S, Rey FA & Gaudin Y (2006) Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313(5784):187-191.
- Rodi DJ, Soares AS & Makowski L (2002) Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. *J Mol Biol* 322(5):1039-1052.
- Roizman B & Whitley RJ (2013) An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu Rev Microbiol* 67:355-374.
- Sagou K, Uema M & Kawaguchi Y (2010) Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J Virol* 84(4):2110-2121.
- Sengupta A, Banerjee B, Tyagi RK & Datta K (2005) Golgi localization and dynamics of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/C1QBP) during the cell cycle. *Cell Res* 15(3):183-186.

- Sheaffer AK, Newcomb WW, Brown JC, Gao M, Weller SK & Tenney DJ (2000) Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 UL26 protease into capsids. *J Virol* 74(15):6838-6848.
- Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC & Tenney DJ (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol* 75(2):687-698.
- Simpson-Holley M, Colgrove RC, Nalepa G, Harper JW & Knipe DM (2005) Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* 79(20): 12840-12851.
- Skepper JN, Whiteley A, Browne H & Minson A (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* 75(12):5697-5702.
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705):1315-1317.
- Sodeik B, Ebersold MW & Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136(5):1007-1021.
- Soltys BJ, Kang D & Gupta RS (2000) Localization of P32 protein (gC1q-R) in mitochondria and at specific extramitochondrial locations in normal tissues. *Histochem Cell Biol* 114(3):245-255.
- Stannard LM, Fuller AO & Spear PG (1987) Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J Gen Virol* 68 (Pt 3):715-725.
- Steiner I, Spivack JG, Deshmane SL, Ace CI, Preston CM & Fraser NW (1990) A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia. *J Virol* 64(4):1630-1638.
- Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML & Feldman LT (1987) RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235(4792):1056-1059.
- Storz P, Hausser A, Link G, Dedio J, Ghebrehiwet B, Pfizenmaier K & Johannes FJ (2000) Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *J Biol Chem* 275(32):24601-24607.
- Stow ND (2001) Packaging of genomic and amplicon DNA by the herpes simplex virus type 1 UL25-null mutant KUL25NS. *J Virol* 75(22): 10755-10765.
- Streilein JW, Dana MR & Ksander BR (1997) Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today* 18(9):443-449.
- Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H & Kawaguchi Y (2012) Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *J Virol* 86(9):5264-5277.

- Tang X & Bruce JE (2009) Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods Mol Biol* 492:283-293.
- Tange TO, Jensen TH & Kjems J (1996) In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem* 271(17):10066-10072.
- Thurlow JK, Murphy M, Stow ND & Preston VG (2006) Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J Virol* 80(5): 2118-2126.
- Tirabassi RS & Enquist LW (1998) Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle. *J Virol* 72(6):4571-4579.
- Tirabassi RS, Townley RA, Eldridge MG & Enquist LW (1997) Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains. *J Virol* 71(9):6455-6464.
- Turcotte S, Letellier J & Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79(14):8847-8860.
- Uetz P & Hughes RE (2000) Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol* 3(3):303-308.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM & Cullen BR (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.
- Van Criekinge W & Beyaert R (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* 2:1-38.
- van Leeuwen H, Elliott G & O'Hare P (2002) Evidence of a role for nonmuscle myosin II in herpes simplex virus type 1 egress. *J Virol* 76(7):3471-3481.
- van Leeuwen HC & O'Hare P (2001) Retargeting of the mitochondrial protein p32/gC1Qr to a cytoplasmic compartment and the cell surface. *J Cell Sci* 114(Pt 11):2115-2123.
- Van Scoy S, Watakabe I, Krainer AR & Hearing J (2000) Human p32: a coactivator for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1-mediated transcriptional activation and possible role in viral latent cycle DNA replication. *Virology* 275(1):145-157.
- Vasilescu J, Guo X & Kast J (2004) Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* 4(12):3845-3854.
- Visalli RJ, Natuk RJ, Kowalski J, Guo M, Blakeney S, Gangolli S & Cooper D (2014) Vaccination with a HSV-2 UL24 mutant induces a protective immune response in murine and guinea pig vaginal infection models. *Vaccine* 32(12):1398-1406.
- Wang SK, Duh CY & Chang TT (2000) Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 81(Pt 10):2407-2416.
- Wang SK, Duh CY & Wu CW (2004) Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J Virol* 78(18):9750-9762.

- Wang Y, Finan JE, Middeldorp JM & Hayward SD (1997) P32/TAP, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology* 236(1):18-29.
- Wattanasurorot A, Jiravanichpaisal P, Soderhall K & Soderhall I (2013) A calreticulin/gC1qR complex prevents cells from dying: a conserved mechanism from arthropods to humans. *J Mol Cell Biol* 5(2):120-131.
- Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, Loepfe E, Ackermann M, Mueller M & Walther P (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* 79(2):1071-1083.
- Wysocka J & Herr W (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* 28(6):294-304.
- Xu L, Xiao N, Liu F, Ren H & Gu J (2009) Inhibition of RIG-I and MDA5-dependent antiviral response by gC1qR at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5):1530-1535.
- Yoshikawa H, Komatsu W, Hayano T, Miura Y, Homma K, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Tachikawa H, Yamauchi Y, Isobe T & Takahashi N (2011) Splicing factor 2-associated protein p32 participates in ribosome biogenesis by regulating the binding of Nop52 and fibrillarin to preribosome particles. *Mol Cell Proteomics* 10(8):M110 006148.
- Zenner HL, Yoshimura S, Barr FA & Crump CM (2011) Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. *J Virol* 85(16):8012-8021.
- Zhang X, Zhang F, Guo L, Wang Y, Zhang P, Wang R, Zhang N & Chen R (2013) Interactome analysis reveals that C1QBP (complement component 1, q subcomponent binding protein) is associated with cancer cell chemotaxis and metastasis. *Mol Cell Proteomics* 12(11):3199-3209.
- Zheng YH, Yu HF & Peterlin BM (2003) Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells. *Nat Cell Biol* 5(7):611-618.