

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES DOMAINES FONCTIONNELS DE LA
PROTÉINE UL24 DU VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX 1.**

Par

Luc Bertrand

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :

Patrick Labonté
INRS-Institut Armand Frappier
INRS

Examineur externe :

Roger Lippé
Département de pathologie et
biologie cellulaire
Université de Montréal

Examineur externe :

Benoît Barbeau
Département des sciences
biologiques et Centre de
recherche Biomed
UQAM

Directeur de recherche :

Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier
INRS

Résumé

Le gène codant pour la protéine UL24 est conservé à travers la famille des *Herpesviridae*, mais peu est connu sur sa fonction dans la réplication virale. Son absence entraîne en la formation de petites plages de lyse, une réduction de la production virale et la formation de plages syncytiales. Dans un modèle animal, cette protéine a également été démontrée comme importante pour la réplication virale, spécialement dans les neurones, et très importante pour la réactivation. Des études ont démontré qu'UL24 est exprimée tardivement au cours de l'infection et qu'elle se retrouve au noyau et dans le cytoplasme. Des études de comparaison ont démontré la présence de cinq domaines hautement conservés ainsi que certains résidus quasi invariants. Certains de ceux-ci ont été liés à un motif putatif d'endonucléase qui a été rapporté au cours de cette étude. Vu la disparité des phénotypes viraux observés lors de l'infection et la présence de régions conservées, notre hypothèse était qu'UL24 est une protéine multifonctionnelle qui agit du moins en partie par des interactions protéine-protéine.

Pour cette étude, nous avons commencé par étudier UL24 hors du contexte d'infection, en utilisant des plasmides d'expression, pour identifier les fonctions se rattachant directement à celle-ci et également pour faciliter l'évaluation de l'importance des domaines et des résidus conservés. Utilisant ces constructions, nous avons pu démontrer qu'UL24 est capable seule de se localiser au noyau, au nucléole, au *trans*-Golgi et au cytoplasme. En utilisant les différentes constructions, nous avons pu démontrer que la région N-terminale se retrouve au noyau et au nucléole et que la partie C-terminale, moins conservée, se retrouve au cytoplasme et au Golgi. Ceci soutient notre hypothèse qu'UL24 est multifonctionnelle. De plus, nous avons démontré que les 60 premiers résidus d'UL24 peuvent induire une localisation nucléolaire pour la eGFP.

Au début de cette étude, notre laboratoire avait démontré l'importance d'UL24 pour la dispersion de la nucléoline au cours de l'infection. Dans cette étude, nous démontrons que la portion N-terminale d'UL24 seule est capable d'induire cette dispersion et que la délétion des domaines conservés bloque ce rôle. Nous avons également testé l'impact de la substitution des résidus hautement conservés sur ce rôle. Nous avons identifié deux régions susceptibles qui lorsque mutées affectent grandement la dispersion de la nucléoline. Certains de ces résidus forment le site catalytique du motif putatif d'endonucléase alors que les autres seraient importants dans sa fonction. Puisque la fonctionnalité de ce motif n'a toujours pas été démontrée, nous ne pouvons conclure que cette fonction est importante pour la dispersion de la nucléoline, mais que la séquence le composant l'est.

Certaines de ces mutations, telles que E99A/K101A et G121A, ont été insérées dans un virus par recombinaison homologue et nous ont permis d'observer le même impact sur la dispersion de la nucléoline observé en transfection transitoire. Ces virus exhibent plusieurs phénotypes rattachés à une déficience en UL24 en infection. Ils forment des plages de lyses syncytiales, mais seulement la mutation E99A/K101A entraîne une réduction de l'efficacité de réplication, indiquant que l'un n'est pas la résultante de l'autre. Cela nous permet de séparer deux des phénotypes associés à une déficience en UL24 et soutient qu'elle serait une protéine multifonctionnelle. Également, ces virus démontrent un lien entre la dispersion de la nucléoline et l'efficacité de réplication, puisque la forte réduction de cette relocalisation observée avec la mutation E99A/K101A est associée avec une réduction de l'efficacité de réplication.

Pour déterminer les mécanismes par lesquels UL24 intervient dans la réplication virale, nous avons tenté d'identifier des partenaires d'interaction. Nous avons pu démontrer qu'UL24 fait partie de complexes protéiques dans la cellule infectée et qu'elle interagit avec la protéine Non-muscular myosin type IIa (NM2a), un moteur des microfilaments. Cette protéine est impliquée au niveau du transport des capsides et de vésicules. Durant notre étude, il a été publié que cette protéine pourrait également être un récepteur viral via une interaction avec la glycoprotéine virale, gB. Nous avons démontré une co-localisation partielle entre ces deux protéines et que l'absence d'UL24 résulte en une réduction de l'association de gB avec NM2a.

En conclusion, nos résultats ont permis d'éclaircir le rôle joué par UL24 au cours de l'infection. Nous avons pu démontrer l'importance de différents résidus dans son rôle dans la dispersion de la nucléoline et que cette fonction est importante pour une réplication virale efficace. De plus, nous avons démontré que la formation de syncytia, due à une déficience en UL24, ne résulte pas en une réduction de l'efficacité de réplication, mais que ce sont deux fonctions indépendantes d'UL24. La localisation nucléaire de la portion N-terminale et cytoplasmique de la C-terminale supporte également ce rôle multifonctionnel. La recherche de partenaires d'interaction nous a également permis de démontrer une interaction avec la protéine cellulaire NM2a, association qui serait impliquée au niveau d'un rôle cytoplasmique pour UL24, possiblement lié à la formation de polykaryocytes. Également, une absence d'UL24 affecte l'association entre NM2a et une autre protéine virale, la glycoprotéine B.

Luc Bertrand

Angela Pearson

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, qui en m'acceptant dans son laboratoire a rendu ce travail possible. Son encadrement a permis de faire fructifier mon travail tout en me laissant suffisamment de liberté pour me permettre de développer un esprit d'analyse. Merci de m'avoir permis d'explorer autant d'avenues dans mon projet. Également, je tiens à vous remercier de m'avoir donné l'occasion de participer à plusieurs congrès scientifiques à travers le monde, explorant autant le monde scientifique que géographique.

Je dis merci à mes collègues de laboratoire qui ont été à mes côtés pendant toutes ces années : Nawel Ben Abdeljelil, Alain Boulende, Amélie Bourget, Huda Hyjazie, Gabriel André Leiva-Torres, Maria Lymberopoulos, Gabriel Ouellet, Alexandre Rochette, Annie Rochette et Carolina Sanabria. De plus, j'aimerais remercier Ginette Denis, technicienne au laboratoire. Merci aussi à d'autres étudiants de l'institut, sans ordre particulier : Romain G., Ronan R., Carolina G., Carl G., Tania C., Julie C., Frédéric B., Patrick L. et Isabelle M.

Plusieurs employés de l'institut m'ont aussi beaucoup aidé lors de mes études, spécialement Marcel Desrosiers, pour son aide en microscopie à fluorescence et confocale et Anne Philippon, pour son dévouement aux étudiants et pour les réponses à toutes mes questions. J'aimerais de plus remercier Suzanne Lemieux et le programme des apprentis en bioscience, pour tous les bons moments et les expériences très enrichissantes.

Je tiens à dire un grand merci à mes parents Lucie et Yvon et ma sœur Joelle qui m'ont soutenu dans les moments difficiles et qui ont partagé avec moi les bons moments. Ils ont toujours su nourrir mon esprit inquisiteur et m'ont aidé à poursuivre mes recherches. Le soutien apporté par ma belle famille a également été grandement apprécié. Un merci également à Sébastien D., Guillaume L., André C., Guillaume P., Michaël G. et Sara B..

Un merci bien spécial à ma compagne, Isabelle, qui a partagé avec moi ces années. D'avoir enduré mes moments difficiles et partagés les meilleurs. Merci de m'avoir encouragé à donner le petit effort supplémentaire et d'avoir rendu ces années aussi agréables.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
Table des matières	v
Liste des figures et tableaux.....	x
Liste des abréviations	xii
Chapitre 1 : Introduction	1
1- Virus Herpès.....	2
1.1 - Famille des <i>Herpesviridae</i>	2
1.2 - Les virus de l'herpès humain	2
1.3 - Pathogenèse des virus herpès simplex	3
1.4 - Traitements	5
1.5 - Structure du virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1)	6
1.6 - Cycle de réplication du VHS-1	9
1.6.1 - Attachement et entrée virale	9
1.6.2 - Transport au noyau	10
1.6.3 - Cycle temporel de transcription des gènes viraux	11
1.6.4 - Réplication de l'ADN viral	12
1.6.5 - Encapsidation des génomes viraux.....	14
1.6.6 - Du noyau au cytoplasme.....	15
1.6.7 - Traversée cytoplasmique du virion	16
1.6.8 - Acquisition de l'enveloppe virale et sortie	17
2- Interactions entre le VHS-1 et la cellule hôte	17
2.1 - Le noyau et ses compartiments.....	18
2.2 - Le nucléole, un compartiment multifonctionnel	19

2.2.1 - La biogenèse des ribosomes	19
2.2.2 - Protéomique du nucléole	19
2.2.3 - Le nucléole et le cycle cellulaire	20
2.2.4 - Le nucléole et la réponse au stress	22
2.2.5 - La nucléoline	22
2.2.6 - Le nucléole et les infections virales	24
2.2.7 - La relation entre le nucléole et le VHS-1	25
2.2.8 - L'infection par le VHS-1 et les corps nucléaires PML/ND10	25
2.3 - Localisation nucléaire et nucléolaire des protéines	26
2.3.1 - Signaux consensus de localisation	26
2.3.2 - Localisation de protéines virales au noyau et au nucléole	27
2.4 - Le cytosquelette	28
2.4.1 - Les composantes du cytosquelette	28
2.4.2 - Rôles du cytosquelette	32
2.4.3 - Le cytosquelette et l'infection virale	33
2.4.4 - La myosine non musculaire de type II a	36
3 - La protéine virale UL24	37
3.1 - UL24 du VHS-1	37
3.1.1 - Phénotype UL24-déficient en culture cellulaire	38
3.1.2 - Expression de la protéine UL24	38
3.2 - Domaines conservés d'UL24	39
3.3 - Homologues d'UL24	40
3.3.1 - UL24 du VHS-2	40
3.3.2 - ORF35 du VZV	40
3.3.3 - UL76 du CMV	41

3.3.4 - BXRf1 du EBV	41
3.3.5 - U49 du virus de l'herpès humain 6	42
3.3.6 - U49 du virus de l'herpès humain 7	42
3.3.7 - ORF20 du virus du sarcome de Kaposi.....	42
3.3.8 - ORF20 du murine gamma herpes virus 68.....	43
3.3.9 - UL24 du Bovine Herpes Virus 1	43
3.3.10 - ORF37 du virus de l'herpès équine 1	44
3.4 - UL24 et la pathogenèse	44
3.4.1 - Importance d'UL24 du VHS-1 pour la pathogenèse et la réactivation virale	44
3.4.2 - UL24 du VHS-2 et la pathogenèse.....	45
3.4.3 - La pathogenèse du VZV en relation à ORF35.....	45
3.5 - Motif endonucléase putatif d'UL24.....	46
4 - Hypothèse de travail	47
Chapitre 2 : Premier Article.....	49
Résumé de la première publication	50
Contribution des auteurs	51
Summary.....	53
Introduction	54
Methods	55
Results	57
Discussion.....	61
References.....	64
Figures	67

Chapitre 3 : Deuxième Article	78
Résumé de la deuxième publication	79
Contribution des auteurs	80
Abstract	82
Introduction	83
Material and Methods	84
Results	87
Discussion	91
References	94
Figures	98
 Chapitre 4 : Troisième Article	 106
Résumé de la troisième publication	107
Contribution des auteurs	108
Abstract	110
Introduction	111
Material and Methods	113
Results	116
Discussion	119
References	123
Figures	127
 Chapitre 5 : Discussion	 134
5.1 - Localisation intracellulaire d'UL24 hors du contexte d'infection	135
5.2 - Le VHS-1, UL24 et la nucléoline	137

5.3 - Domaines et résidus conservés d'UL24 et la dispersion	
de la nucléoline	139
5.4 - UL24 et la sortie du VHS-1.....	141
5.5 - UL24, NM2a et les événements cytoplasmiques du cycle viral	142
5.6 - Modèle expliquant le rôle d'UL24 au cours de l'infection	143
Conclusions et perspectives	146
Références	148
Annexe I.....	184
Introduction	185
Résultats.....	186
Matériel et Méthode	189
Conclusion	191
Références.....	192

Liste des figures et des tableaux

Introduction

Figure 1. La réplication virale dans la muqueuse et dans les neurones	4
Figure 2. Structure du virion du VHS-1	6
Figure 3. Le cycle de réplication lytique du VHS-1.....	8
Figure 4. Réplication de l'ADN viral et les isomères génomiques	13
Figure 5. Modèles d'enveloppement du virus VHS-1	16
Figure 6. Les composantes du cytosquelette.....	29
Figure 7. Structure du moteur d'actine Myosine non musculaire de type II a	37
Figure 8. Figure représentant les transcrits contenant le cadre de lecture d'UL24.....	39
Figure 9. La protéine UL24.....	40
Figure 10. Régions et résidus conservés d'UL24.....	47

Première publication

Figure 1. UL24 deletions	67
Figure 2. Cellular localization of UL24 in the absence of viral infection	68
Figure 3. Cytoplasmic localization of UL24.....	69
Figure 4. Targeting of UL24 to nucleoli	70
Figure 5. UL24 induces the dispersal of nucleolin.....	71
Figure 6. The N-terminal portion of UL24 is sufficient to induce the dispersal of nucleolin	72
Figure 7. Cellular localization of UL24 HD deletion variants.....	73
Figure 8. Identification of a UL24 nucleolar-targeting domain	74
Supplementary figure 1. Intracellular localization of HA-UL24 over a range of plasmid DNA transfected	75
Supplementary table 1. Primer sequences	76
Journal Coverage	77

Deuxième publication

Figure 1. Substitutions introduced into HSV-1 UL24.....	98
Figure 2. Impact of UL24 variants on the localization of nucleolin.....	99
Figure 3. Quantification of nucleolin distribution patterns in cells expressing HA-UL24 variants	100
Figure 4. Construction and characterisation of vUL24-eGFP	101
Figure 5. Characterization of vUL24-E99A/K101A and vUL24-G121A.....	103
Figure 6. Distribution pattern of nucleolin in Vero cells infected with UL24 mutants	105

Troisième publication

Figure 1. Glycerol gradient fractionation of UL24-containing complexes.....	127
Figure 2. Affinity purification of UL24-interacting partners.....	128
Figure 3. Co-immunoprecipitation of NM2a with HA-UL24.....	130
Figure 4. Partial co-localization of UL24 and NM2a	131
Figure 5. Loss of co-localization between NM2a and gB in the absence of UL24 ...	132

Discussion

Figure 11. Modèle expliquant les rôles d'UL24 au cours de l'infection.	145
---	-----

Appendice

Figure 1. Co-immunoprécipitation de RR1.....	187
Figure 2. Plasmide et expression de GST-RR1	188
Figure 3. Co-localisation de UL24 et RR1.....	189

Liste des abréviations

aa	Acide aminé (Amino Acid)
ACF	«ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor»
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ARNpol	Polymérase d'ARN
ATP	Adénosine triphosphate
BDV	«Borna disease virus» (Virus de la maladie de Borna)
Cdc2	Cell division cycle 2 (Cycle de division cellulaire 2)
Cdc14	Cell division cycle 14 (Cycle de division cellulaire 14)
CDK1	«Cyclin dependent kinase 1» (Kinase dépendante des cyclines 1)
CK2	«Casein Kinase 2»
CMV	Cytomégalovirus
DFC	«Dense fibrillar center» (Centre fibrillaire dense)
dNTP	Desoxyribonucléotide triphosphate
E	«Early» (Précoce)
EBV	Virus Epstein-Barr
EHV-1	«Equine herpes virus 1» (Virus de l'herpès équine 1)
eGFP	«Enhanced green fluorescent protein» (Protéine fluorescente verte)
FC	«Fibrillar center» (Centre fibrillaire)
GAR	«Glycine and arginine rich» (Riche en Glycine et Arginine)
GC	«Granular component» (Composante granulaire)
GTP	Guanine triphosphate
H3-H4	Histone 3-Histone 4
H2A-H2B	Histone 2A-Histone 2B
HA	Hémagglutinine
HDM2	«Human double minute 2» (Minute double humain 2)
HHV	«Human herpes virus» (Virus de l'herpès humain)
HIPK2	«Homeodomain interacting protein kinase 2» (Kinase des protéines interagissantes des homéodomaines 2)
hpi	Heure post infection

HTLV	«Human T cell lymphotropic virus»
HVEM	«Herpesvirus entry mediator» (Médiateur d'entrée virus herpès)
HVS	«Herpesvirus saimiri»
IE	«Immediate Early» (Immédiat précoce)
IFAPs	«Intermediate filament associated proteins» (protéines associés aux filaments intermédiaires)
IRES	«Internal ribosome entry site» (site d'entrée ribosomale)
JNK2	c-Jun N-terminal kinase 2 (Kinase de la portion N-terminale de c-Jun)
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilo bases
Kbp	Kilo paire de bases
KSHV	«Kaposi's sarcoma associated virus» (Virus du sarcome de Kaposi)
L	«Late» (Tardif)
MAPs	«Microtubule associated proteins» (protéines associées aux microtubules)
MHV-68	«Murine gamma herpesvirus 68» (Virus herpès murin gamma 68)
MIEPs	«Major immediate early protein regulatory region» (Région régulatrice majeure des protéines intermédiaires)
MLC	«Myosin light chain» (Chaîne légère des myosines)
MTOC	«Microtubule organizing center» (Centre d'organisation des microtubules)
ND-10	«Nuclear Domain 10» (Domaines nucléaires 10)
NLS	«Nuclear localisation signal» (Signal de localisation nucléaire)
nm	Nanomètre
NM2a	«Non-muscle myosin type IIa» (Myosine non musculaire de type 2 a)
NPC	«Nuclear pore complex» (Complexe de pore nucléaire)
NoLS	«Nucleolar localisation signal» (Signal de localisation nucléolaire)
NOR	«Nucleolus organizer regions» (Régions d'organisation nucléolaire)
ORF	«Open reading frame» (Cadre de lecture ouvert)
p14ARF	«p14 alternate reading frame» (Cadre de lecture alternatif p14)
PAA	«Phosphonoacetic acid» (Acide phosphonoacétique)
PML bodies	«Promyelocytic leukaemia bodies» (Corps promyélocytique leucémiques)
PNB	«Perinucleolar bodies» (Corps périnucléolaires)
PP1	Protéine phosphatase 1
PRRSV	«Porcine reproductive and respiratory syndrome virus» (Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin)

PRV	«Pseudorabies virus»
RR	«Ribonucleotide reductase» (Réductase des ribonucléotides)
SEN5	«SUMO1/sentrin specific peptidase 5»
SNC	Système nerveux central
SWI/SNF	«Switch/Sucrose nonfermentable»
snRNP	«Small nuclear ribonucleoprotein» (Petite ribonucléoprotéine nucléaire)
snoRNA	«Small nucleolar RNA» (Petit ARN nucléolaire)
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
TIF-1A	«Translation initiation factor 1 A» (Facteur d'initiation de la traduction 1 A)
TK	Thymidine Kinase
TTF-1	«Transcription termination factor 1» (Facteur de terminaison de transcription 1)
UBF	«Upstream binding factor»
UL	«Unique long» (Unique longue)
US	«Unique short» (Unique courte)
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VHS	Virus herpès simplex
vhs	«Virion host shutoff» (Protéine d'arrêt de l'hôte du virion)
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VZV	«Varicella zoster virus» (Virus varicelle-zoster)

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1- Virus Herpès

1.1 - Famille des *Herpesviridae*

Le Comité International de Taxonomie des Virus a récemment revu la classification des virus herpès, scindant celle-ci en trois familles qui ont été incorporées dans l'ordre des *Herpesvirales*. La famille des *Herpesviridae* compte les virus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles. La famille des *Alloherpesviridae* regroupe les virus de poissons et de grenouilles tandis que la nouvelle famille des *Malacoherpesviridae* contient un virus d'huître (118). La famille des *Herpesviridae* contient trois sous-familles : les *alphaherpesvirinae*, les *betaherpesvirinae* et *gammaherpesvirinae*. Les *alphaherpesvirinae* sont neurotropiques, ont un cycle de réplication court et ils établissent la latence dans les neurones. Les *betaherpesvirinae* ont un cycle de réplication long, sont lymphotropiques et établissent la latence principalement dans les leucocytes et les cellules endothéliales (260, 261). Les *gammaherpesvirinae* sont également lymphotropiques mais infectent aussi les cellules endothéliales et ont un cycle de réplication long. Ils établissent la latence dans les cellules lymphocytaires et ils sont oncogéniques (160, 639). Une analyse des divergences génomiques entre les différents virus propose que les trois sous-familles se seraient séparées, il y a 180 à 220 millions d'années, et que les virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) et 2 auraient divergé, il y a environ 8.5 millions d'années (362).

1.2 - Les virus de l'herpès humains

Chez l'homme, nous retrouvons huit virus de l'herpès nommés Human Herpesvirus (HHV). Dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, nous avons deux virus du genre *Simplexvirus*, les virus HHV-1 et HHV-2, communément appelés VHS-1 et -2 respectivement. Également, nous retrouvons, du genre *Varicellovirus*, le virus HHV-3, communément appelé virus de la varicelle-zoster (VZV). Les virus HHV-4 et HHV-8, aussi connus sous les noms virus Epstein-Barr (EBV) et virus du sarcome de Kaposi (KSHV), font partie respectivement de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* et du genre *Lymphocryptovirus* ou *Rhadinovirus*. Dans la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, nous retrouvons le virus HHV-5, du genre *Cytomegalovirus*, également appelé cytomégalovirus (CMV) ainsi que les virus HHV-6 et HHV-7 dans le genre *Roseolovirus*. Des virus appartenant aux trois sous-familles de virus sont prévalant dans la population (118, 288).

1.3 - Pathogenèse des virus herpès simplex

Les infections par le virus herpès sont documentées depuis les balbutiements de la médecine dans la Grèce antique. Le nom «herpein», qui signifie «qui rampe» en racine grecque, caractérise les plaies formées par le virus. Les symptômes de l'infection peuvent varier grandement en fonction de l'individu ainsi que la zone infectée. L'infection par les virus herpès simplex est associée à l'apparition de lésions aux muqueuses labiales ou génitales, mais peut dans de rares cas aller jusqu'à mettre la vie de patients en danger. Le VHS-1 et -2 sont associés majoritairement aux zones labiales et génitales respectivement, mais la répartition n'est pas exclusive (274, 654). La prévalence du VHS-1 augmente avec l'âge, étant présent dans environ 25% des enfants de l'âge de 6-7 ans, 36% chez les 12-13 ans et présent dans plus de 90% chez les personnes âgées de 70 ans et plus, selon une étude faite aux États-Unis en 2006 (81). Parmi les adultes testés aux États-Unis en 2004 âgés d'environ 40 ans, la prévalence du VHS-2 était de 20 à 25% (156).

La transmission du virus se fait par contact proximal entre une personne infectée qui produit activement du virus, production qui peut être asymptomatique, et les muqueuses ou une peau dont l'intégrité est compromise. Suite à la transmission, il y a réplication du virus au site initial de l'infection et par la suite infection des neurones sensitifs innervant le tissu (Figure 1). Les virions infectent les neurones des ganglions trigéminaux pour les infections oropharyngiales ou du ganglion de la racine dorsale pour les infections génitales. La sévérité de l'infection initiale est proportionnelle avec la probabilité de la récurrence d'infection (106). La réactivation virale est induite par différents stimuli, tels que le stress, la fièvre, un état d'immunosuppression, l'hypothermie, un déséquilibre hormonal ou l'exposition aux rayons ultra-violet (UV) (533, 543). Suite à la réactivation, le virus sera transporté au site initial d'infection pour réinfecter la muqueuse. Dans de rares cas, le virus peut être transporté vers le système nerveux central (SNC) et causer en une encéphalite, qui peut être fatale. L'infection systémique par le VHS est rare, mais peut être vue chez les enfants développant une gingivostomatite primaire (246). Également, chez les patients immunosupprimés ou les nouveaux nés, il peut y avoir apparition de plaques herpétiques. L'infection des organes est la résultante d'une incapacité de l'hôte à restreindre la propagation du virus dans la muqueuse (279, 341, 424).

Les lésions formées par le virus sont caractérisées par une mort cellulaire causée par le virus et la réponse immunitaire. L'infiltration du tissu par les cellules immunitaires, leur réponse ainsi que les fluides relâchés lors de la mort cellulaire se solde par une accumulation de fluide qui devient pustuleux qui, lors de la guérison, forme une croûte sur la plaie.

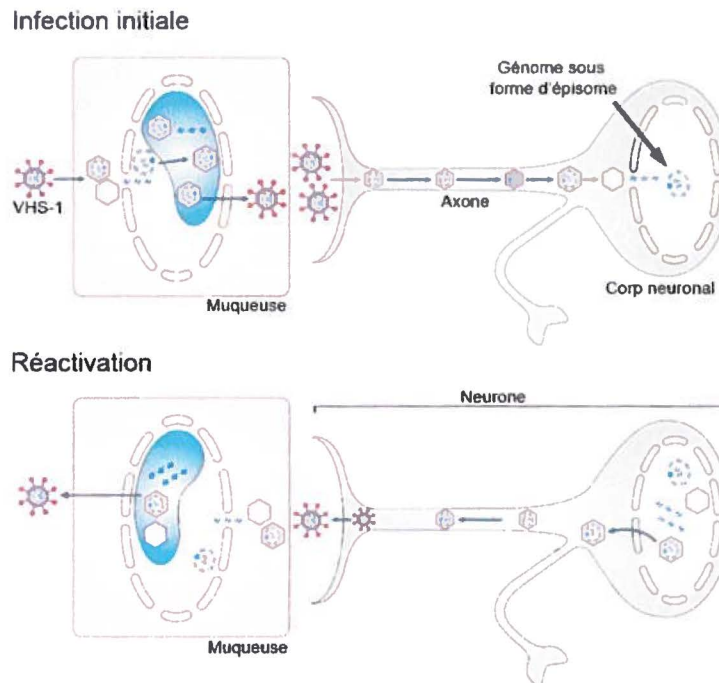


Figure 1. La réplication virale dans la muqueuse et dans les neurones. Lors de l'infection initiale, le virus infecte la muqueuse et par la suite, infecte les neurones innervant celle-ci. En latence, le génome viral s'établit sous forme d'épisome. Lors de la réactivation, il y a enclenchement du cycle lytique de réplication, transport de virions nouvellement formés le long de l'axone et réinfection au site initial d'infection. Modifié de Knipe et Cliffe (287).

La prévalence du VHS dans la population résulte en plusieurs infections atypiques résultants de gestes professionnels, de coutumes ou de contacts sportifs. Des infections au niveau des doigts peuvent être observées, majoritairement chez les dentistes, résultats de consultations et traitements sans le port de gants protecteurs; cette infection est appelée herpès Whitlow (505). Dans les sports de contact, tels que la lutte gréco-romaine ou sumo, il y a possibilité de transmission de virus herpès due aux contacts et aux possibilités de lésions cutanées, cette infection est appelée herpès gladiatorium (28, 35, 309). L'acquisition de l'infection lors de l'enfance est normalement due au contact entre l'enfant et la salive de parents infectés. Il en résulte, si l'infection est symptomatique, en des plaies orales ou faciales (564). Il est aussi possible qu'ils soient infectés par les professionnels responsables de leur soin tel que les infirmières. Également, la pratique juive orthodoxe de la circoncision a été documentée comme pouvant résulter en une transmission du rabbin à l'enfant (134).

1.4 - Traitements

Il existe des médicaments pour le traitement de l'infection par les virus herpès. Les plus couramment utilisés sont l'acyclovir, le valacyclovir, le penciclovir et le famciclovir (652). Ces molécules sont des analogues de nucléosides qui bloquent irréversiblement l'élongation de l'ADN dû au manque d'un groupe OH en 3' nécessaire à l'ajout du prochain désoxyribonucléotide tri-phosphate (dNTP) (180). Ces médicaments démontrent une faible toxicité due à la sélectivité de ce médicament qui doit être phosphorylé par la thymidine kinase virale pour pouvoir ensuite être triphosphaté et incorporé dans la chaîne d'élongation (179, 430). Chez les patients immunocompétents, la prévalence de souches résistantes à l'acyclovir est faible, mais des études récentes tendent à montrer une augmentation du nombre de cas de résistance. Par contre, chez les patients immunocompromis, ceux les plus à risque d'infections graves, le problème de résistance est beaucoup plus important (456).

L'établissement de la latence virale dans les neurones ainsi que le nombre important de gènes viraux visant à contrecarrer la réponse immunitaire rendent difficile l'immunisation contre le VHS (475). Plusieurs types de vaccins ont été utilisés pour tenter d'immuniser les personnes. La vaccination à l'aide de virus de types sauvages, stratégie similaire à celle utilisée pour la variole, n'ont pas donné de résultats intéressants (200, 440), même que dans certains cas, l'immunisation a résulté en la réactivation de virus latent (51, 311) et ces essais ont donc été abandonnés (46). Plusieurs tentatives ont été effectuées avec des virus inactivés. Par contre, la majorité des études n'avaient pas de témoins appropriés et celles qui en avaient ont obtenu des résultats qui différaient. Il en a été conclu que la protection donnée par le vaccin n'apporte que de faibles bénéfices à court terme et aucun à long terme (278, 568, 638). L'immunisation par des vaccins sous-unitaires a démontré des résultats prometteurs dans les modèles animaux, mais, lors d'essais chez l'homme, cette protection n'était pas présente (288). De plus, ces vaccins requièrent l'utilisation d'adjuvant pour éliciter une réponse (518, 577, 583). Certains de ces vaccins utilisent des protéines virales d'enveloppe, tels que gB et gD, pour induire une réponse neutralisante envers le virus. Des résultats prometteurs ont été observés avec un nouveau vaccin présentement en étude clinique qui a permis d'observer une réduction d'environ 42% de l'intensité de l'infection initiale et de la réactivation chez les femmes, mais de seulement 13% chez l'homme (576). Une autre avenue est l'utilisation de virus génétiquement modifiés. Le génome de ceux-ci est modifié par la délétion de gènes critiques pour la pathogenèse et la réactivation (216, 573) ou l'ajout de gènes pour augmenter le spectre de réponse immunitaire (350). L'avantage de ces vaccins est l'induction d'une réponse humorale et cellulaire,

contrairement aux vaccins sous-unitaires qui sont majoritairement restreints à une réponse de type Th2 (71). Par contre, la production et la conservation de virus vivants sont plus complexes. Plusieurs de ces virus sont présentement en développement ou à l'étude (86, 113, 114, 155, 370, 422, 464, 573, 643). Le succès obtenu avec la vaccination contre le VZV avec un virus atténué (383) ne peut que susciter l'espoir de voir bientôt un vaccin efficace contre le VHS.

1.5 - Structure du VHS-1

Le génome viral du VHS-1 est un acide désoxyribonucléique (ADN) linéaire à double brin d'environ 152 kilo paire de bases (kpb). Le génome est riche en résidus G+C, qui représentent environ 68% des nucléotides (282). Il est caractérisé par la présence de deux régions nommées Unique Longue (UL) et Unique Courte (US) qui vont, avec l'ordre des cadres de lectures (ORF), déterminer le nom des gènes viraux. Ces deux régions sont encadrées de régions répétées, dénommées régions répétées inversées (626). Lors de la réplication du génome, la présence de ces zones répétées peut mener à des événements de recombinaison qui peuvent résulter en un réarrangement de l'ordre et de l'orientation des portions UL et US du génome, donnant quatre organisations génomiques possibles. Ces quatre isomères sont retrouvés en quantité équimolaire lors de l'infection (124, 227).

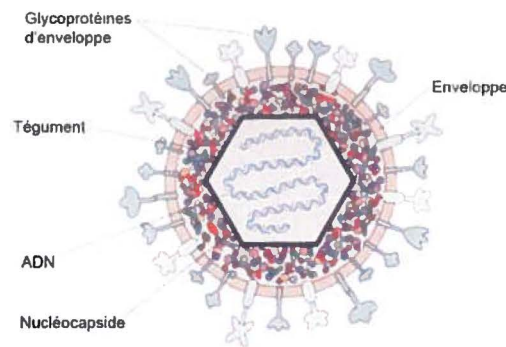


Figure 2. Structure du virion du VHS. L'on retrouve à la surface les glycoprotéines qui sont insérées dans l'enveloppe. À l'intérieur nous retrouvons le tégument, la capside et dans celle-ci le génome. Modifié de Timothy Paustian (444).

Le génome se trouve dans une capside icosaédrique d'environ 120 nanomètres (nm) de diamètre qui est composée principalement de quatre protéines VP5, VP26, VP23 et VP19C (1, 421, 507, 608, 676, 677). Dans la capside mature, on y retrouve également les protéines UL25 et UL17 qui accroîtraient la stabilité de la capside contenant l'ADN (94, 103, 418, 432, 539, 599,

600, 604, 609) et UL6 qui forme le portail permettant l'entrée et la sortie de l'ADN viral (420). Nous retrouvons également les protéines UL15, VP24, UL28 et UL33 (521). Sa structure a été caractérisée à une résolution d'environ 8.5 Å par cryomicroscopie (675). Elle est composée de 162 capsomères avec une symétrie icosaédrique T=16 (210, 528). La capside est composée de deux couches, extérieure (T=16) et intermédiaire (T=4). Elles sont disposées de façon à ce que le canal, formé par douze unités d'UL6, présent dans les deux couches coïncident, permettant l'insertion ou la sortie de l'ADN viral de la capside (74, 528). Par contre, il est possible que ce canal soit bloqué par des protéines, entre autres UL25, du tégment pour empêcher la décapsidation avant temps (674). Les capsides sont assemblées en premier lieu par l'assemblage des protéines pre-VP22a ainsi que la protéine majeure de la capside VP5. Par la suite, les triplexes de VP19C et VP23 s'assemblent et s'associent avec ceux-ci. Il est possible de retrouver trois types de capsides au cours de l'infection dû aux différents stades d'assemblage de celle-ci. Les capsides B sont composées des protéines de la capside ainsi que celles d'échafaudages pre-VP22a et VP21. Il est possible d'observer deux formes de capsides B, les «large-core», où les protéines d'échafaudages sont entières et les «small-core» où elles sont clivées (490). Dans les capsides C, les protéines d'assemblage sont remplacées par l'ADN viral (242, 541). Les capsides A n'ont que les protéines de la capside et ne sont pas les précurseurs des capsides B ou C. Elles seraient plutôt une forme défective où l'insertion de l'ADN a échoué (589, 677).

La capside est recouverte d'un assemblage de protéines partiellement structurées appelé le tégment (210, 288), étant composé d'au moins 23 protéines virales (336) (Figure 2). Les protéines majeures du tégment sont VP16 (transactivateur viral), vhs (protéine virale impliquée dans la dégradation des ARNm de l'hôte), VP22, VP1-2, UL14, UL17 (protéine de clivage et d'emballage de l'ADN), VP11/12 (activateur de chaîne de phosphorylation), VP13/14 (impliquée au niveau du transport cellulaire), US9 (impliquée au niveau du transport axonal), US10 et US11 (bloque l'activation de PKR et s'associe aux polyribosomes et l'ARN) (62, 138, 519, 565, 629, 651). Des travaux récents ont démontré que les protéines VP1-2 et UL37 joueraient un rôle primordial dans la structure et l'assemblage du tégment, servant à la fois d'ancrage à la capside et de lattice pour l'assemblage de cette partie du virion (416). Le rôle de VP22 n'est pas bien défini, mais elle interagit avec l'ARN, les microtubules et possiblement les membranes et pourrait agir à titre de régulateur de la transcription (143, 251, 404). UL14 serait importante pour le repliement ainsi que pour l'import nucléaire de certaines protéines; elle pourrait également avoir un rôle dans l'apoptose (662-664). Cet assemblage se ferait par un

réseau complexe d'interactions protéine-protéine entre les différentes composantes de ce compartiment (622).

Finalement, nous retrouvons l'enveloppe bilipidique virale qui va contenir principalement les glycoprotéines virales : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL et gM (288, 336). On y retrouve également d'autres protéines membranaires telles que UL20 (632) et US9 (169). La composition lipidique de la membrane est similaire à celle de la membrane du Golgi et différente de celle du noyau (614).

Il a été démontré qu'il est possible de retrouver des protéines de l'hôte dans les virions matures. Une étude a pu démontrer la présence de 49 protéines cellulaires (336) et certaines de celles-ci ont été observées dans d'autres virus de la famille *herpesviridae* (27, 34, 123, 142, 264, 276, 380, 619, 678).

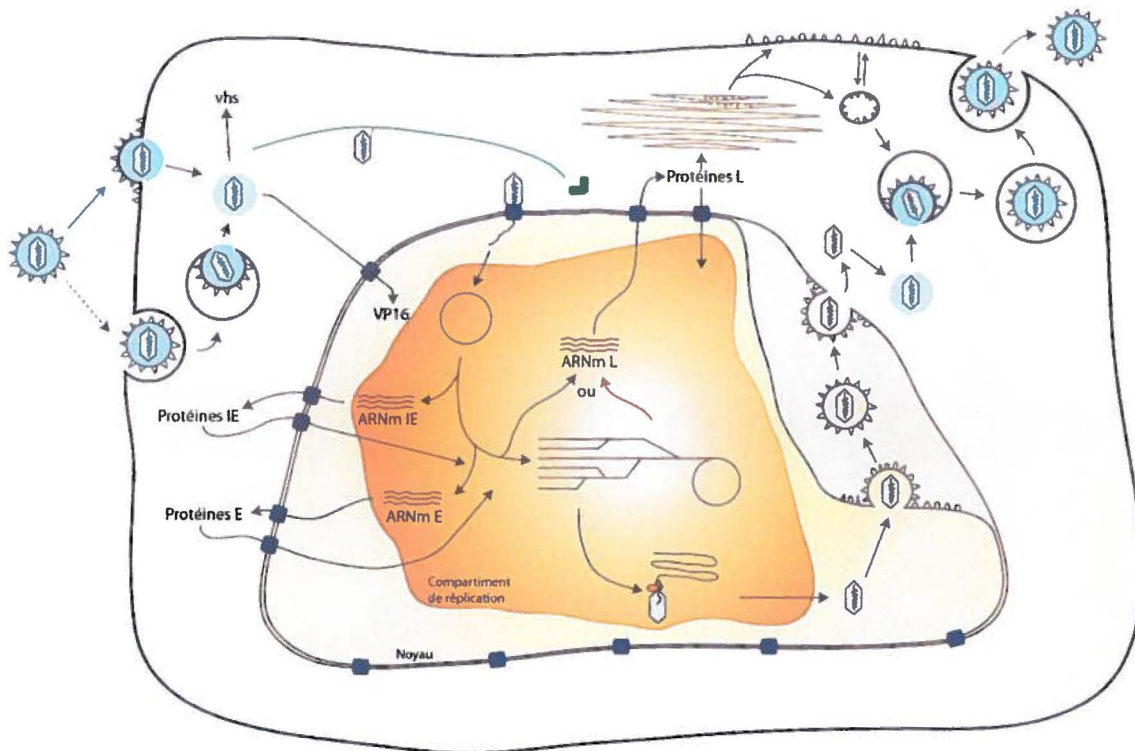


Figure 3. Le cycle de réplication lytique du VHS-1. Le tout débute par l'entrée du virion par fusion ou endocytose. La capside est partiellement détegmentée et dirigée vers le noyau. Il y a injection dans celui-ci de l'ADN viral via le pore nucléaire et circularisation de celle-ci. Il y a par la suite l'expression temporelle des gènes viraux immédiats précoces (IE) suivie des gènes précoces (E) qui vont mener à la réplication du génome et par la suite l'expression des gènes tardifs (L), comprenant les protéines structurales. Il y a assemblage des capsides dans le noyau et encapsidation de l'ADN. Il y a par la suite plusieurs étapes d'enveloppement et désenveloppement pour que la capside traverse la double membrane nucléaire, acquière son enveloppe finale et sorte de la cellule.

1.6 - Cycle de réplication du VHS-1

L'infection débute par l'attachement du virus aux récepteurs à la surface de la cellule. Cet attachement peut initier la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique, mais il est également possible qu'il déclenche une entrée par endocytose suivi d'une fusion pH dépendante avec l'endosome (Figure 3). Suite à l'entrée, il y a détégumentation des capsides et transport de celles-ci au noyau utilisant un transport actif par des moteurs du réseau d'actine et des microtubules. Utilisant le pore nucléaire, le génome viral est inséré dans le noyau et se circularise. Il y a, par la suite, transcription avec régulation temporelle des gènes immédiats-précoces, précoces et tardifs. Les protéines virales nécessaires à l'assemblage des capsides sont transportées au noyau, elles sont assemblées en capsides et il y a encapsidation de l'ADN viral. Les étapes suivantes de l'assemblage viral sont encore débattues, mais l'hypothèse la plus supportée est que les capsides bourgeonnent entre les deux membranes nucléaires et fusionnent avec l'enveloppe nucléaire externe. Il y a par la suite acquisition des protéines du tégument et transport de la capside au site final d'enveloppement et sortie du virion de la cellule. Le cycle viral complet dure environ 18-20 heures, mais cela peut varier en fonction du type cellulaire utilisé (288).

1.6.1 - Attachement et entrée virale

Le mécanisme d'entrée du virus VHS a été longtemps décrit comme étant une fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique à pH neutre. Par contre, des publications récentes ont démontré une entrée du virus par endocytose pH-dépendante et -indépendante (91, 385, 423). Les glycoprotéines virales peuvent induire la fusion à pH neutre, mais le pH peut influencer la conformation de gB pour en exposer le domaine de fusion (68, 137, 547, 575). Le mécanisme d'entrée soit par fusion ou endocytose est possiblement influencé par type de cellule infectée. Une telle spécificité a été observée pour le EBV (248).

Le VHS utilise différents récepteurs pour son entrée dans la cellule. Certains donnent un attachement de base et d'autres de haute affinité. L'interaction de gC et gB avec les molécules de sulfate d'héparane à la surface de la cellule permet d'attacher le virus à la surface, mais pas l'initiation de la fusion (542, 658). Cette interaction n'est pas nécessaire à l'infection, mais en augmente l'efficacité (307, 449). Par la suite, il y a attachement de gD à un de ses récepteurs cellulaires. Il y a trois classes de récepteurs auxquels gD peut s'attacher (571). Il y a le «herpes-virus entry mediator» (HVEM), un membre de la famille des récepteurs pour le facteur de nécrose des tumeurs (392, 633). Il y a également nectine-1 et nectine-2, qui sont des molécules

d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (192, 633). Finalement, il y a une forme modifiée de sulfate d'héparane, le «3-O-heparan sulfate» (546, 601). Le rôle des différents récepteurs n'est pas bien déterminé, mais l'expression de ceux-ci diffère dépendamment des tissus. Cette interaction ne résulte pas seulement en un attachement fort du virus à la cellule, mais elle est également importante pour induire la machinerie de fusion, possiblement due à un changement de conformation de gD, ce qui exposerait son domaine profusion en C-terminal qui interagirait avec gB ou gH/gL (92, 232). La fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire requiert la présence de gD, mais également de gB et de l'hétérodimère gH/gL (164, 330, 522). La protéine gB semble jouer un rôle important pour la fusion puisque l'interaction avec son récepteur peut induire à elle seule la fusion. De plus, il a été démontré que l'interaction de gB avec la chaîne lourde de la myosine de type IIa (NM2a) ou la glycoprotéine associée à la myéline peut induire l'entrée virale (13, 586). Sa structure a été démontrée similaire à celle d'autres protéines virales de fusion, comme celle de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et celle de la protéine gp64 du baculovirus (23, 233, 272, 494). La glycoprotéine gB contient des domaines fusogéniques qui seraient responsables de la fusion (22, 221, 222). Les protéines gB, G et gp64 forment une classe à part de protéines de fusion, celle de classe III (21). Le rôle joué par gH/gL lors de la fusion est moins clair puisque certains groupes démontrent une activité fusogénique (144, 154, 352, 585) alors que d'autres non (256, 586). Par contre, ces deux glycoprotéines font partie du quatuor, avec gB et gD, qui sont capables à elles seules d'induire la fusion. Les interactions entre ces différents joueurs semblent aussi être primordiales (14-16, 18, 89, 193).

1.6.2 - Transport au noyau

Après la fusion, des protéines du tégument se détachent et commencent à remodeler la cellule. Une de celles-ci est la vhs, qui inhibe l'expression génique cellulaire en dégradant les ARNm. Il y a également des protéines qui restent associées à la capside, comme UL36, UL37 et US3, ou qui se dirigent au noyau, telle que VP16, indépendamment de la capside (32, 463). Suivant l'entrée, la capside virale traverse l'actine corticale et est transportée sur de courtes distances sur le réseau d'actine pour se rendre jusqu'au réseau des microtubules (343). Ceux-ci seront utilisés pour le transport des capsides au noyau transport actif grâce à des moteurs de dynéine et dynactine possiblement par une interaction avec US11 (132, 136, 474, 567). Les capsides arrivent à la périphérie du noyau et s'associent aux pores nucléaires (31, 567). Cette association requiert importin β et que le cycle RanGTP/RanGDP soit intacte (435). L'association entre le portail de la capside et le pore nucléaire se ferait par l'entremise de UL25

et/ou UL36 (105, 442). Il y a par la suite injection du génome viral au noyau sans désassemblage de la capsid, via le portail de celle-ci, par le pore nucléaire (105, 329, 442). Cette injection est possiblement effectuée par la pression présente dans la capsid et également par la transcription de l'ADN viral à sa sortie du pore nucléaire (151, 329, 417). L'ADN viral rendu au noyau se circularisera, possiblement à l'aide de protéines cellulaires de réparation de l'ADN (184, 457).

1.6.3 - Cycle temporel de transcription des gènes viraux

Suite à l'entrée dans le noyau, il y a début de la transcription de gènes viraux par l'ARN polymérase II (ARNpol II). De plus, une série de modifications de la structure du noyau s'effectuent pour permettre une réplication efficace du virus (472). Il y a regroupement des protéines virales formant des compartiments où les étapes de transcription, de réplication et d'encapsidation auront lieu (367). Il y a recrutement de l'ADN viral près des domaines nucléaires 10 (ND-10) (356, 570, 595) ou vice-versa (150). L'association de ces sites promeut la transcription des gènes viraux, qui sont exprimés de manière hautement régulée et selon une cascade temporelle. De deux à quatre heures post infection (hpi), les gènes immédiat-précoces (IE) sont exprimés. L'expression des gènes ne requiert pas l'expression ou la présence de protéines virales, mais VP16, protéine du tégument, aide grandement à l'expression de ceux-ci (606). Les gènes IE consistent en ICP4, ICP0, ICP22, ICP27, US1.5 et ICP47. Cinq de ces gènes stimulent l'expression des gènes précoces (E) (127, 431, 509, 516, 563). Ces gènes ne fonctionnent pas tous de la même façon : ICP0 bloque la machinerie de répression (217, 223, 271, 328), ICP4 réprime l'expression de manière séquence spécifique (141, 298, 320, 381) ou active la transcription indépendamment de la séquence (517, 669). Ces protéines vont également promouvoir l'expression des gènes tardifs (L).

La phase suivante, l'expression des gènes E, se produit entre quatre et huit hpi. L'expression de cette phase de gènes requiert la présence d'ICP4 fonctionnel (288). Ils codent en partie pour des protéines qui servent à la réplication de l'ADN viral et pour le métabolisme des nucléotides. Il y a deux sous classes d'expression dans les gènes E : il y a ceux qui sont exprimés partiellement en même temps que les gènes IE, mais qui voient leur expression augmenter lors de l'expression de ceux-ci, par exemple ICP8 (438, 473) ou ICP6 (590). Il y a également des gènes E qui sont exprimés seulement suite à l'expression des gènes IE, comme la thymidine kinase virale (TK) (185).

Les gènes L sont la dernière phase de l'expression des gènes viraux. Ils sont divisés en deux sous-types : les «leaky-late» et les «true late ». Les premiers sont exprimés

indépendamment de la réplication du génome, mais voient leur expression augmenter suite à la réplication de l'ADN viral (ICP5, gB, gD et γ 34.5), et les seconds sont dépendants de la réplication de l'ADN pour leur expression (gC, UL41, UL36, UL38 et UL11) (101, 107, 270, 549). La distinction entre ces deux classes de gènes peut s'observer en utilisant un inhibiteur de la réplication de l'ADN viral, l'acide phosphonoacétique (PAA) (244, 365). L'expression des classes de gènes E et L requiert la présence de ICP0 (509), ICP4 (289, 466), ICP27 (508), ICP22 (464, 532) et US1.5 (433). Toutefois, la relation entre ces différentes protéines et l'expression temporelle des gènes viraux n'a pas encore été déterminée.

1.6.4 - Réplication de l'ADN viral

Les protéines virales de la classe cinétique E nécessaires à la réplication de l'ADN viral vont s'assembler sur le génome viral aux sites de réplication virale près des sites ND-10 (252, 612). Ces compartiments vont grandir et former les centres de réplication viraux, qui au cours de la réplication, finissent par occuper la majeure partie du noyau et marginalisent l'ADN cellulaire (391, 472). La réplication de l'ADN, sous forme circulaire, débute aux sites d'origine de réplication (OriS et OriL) par l'attachement d'ICP8 et/ou UL9 (228). L'activité hélicase d'UL9 permet de séparer les brins d'ADN à ces sites et à l'aide d'ICP8 recrute la machinerie hélicase et primase (UL5, UL8 et UL52) (79, 101, 468, 657). La synthèse du brin sens et anti-sens se fait par la polymérase d'ADN viral, soit le facteur de processivité UL42 ainsi que par la sous-unité catalytique UL30 (407). Il y a possibilité d'implication de facteurs cellulaires, tels que les ADN polymérase, primase, ADN ligase et topoisomérase II (145, 406, 649). Suite au début de la réplication, il y a formation de l'intermédiaire de réplication *thêta* (Θ), qui sera suivi de la réplication du type cercle roulant (52, 407) (Figure 4 A et B). Lors de ce second type de réplication, il y a synthèse d'un brin d'ADN à partir d'un génome circulaire, ce qui mènera à la formation de concatémères de génomes viraux en succession tête à queue. À ce point, la protéine UL9 n'est plus requise pour la synthèse d'ADN, mais ICP8, UL5, UL8, UL30, UL42 et UL52 le sont toujours (79, 101).

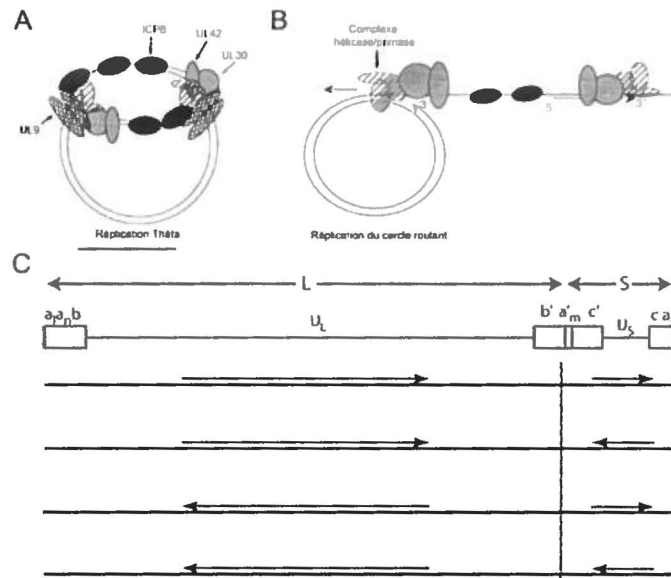


Figure 4. Réplication de l'ADN viral et les isomères génomiques. (A) Forme répllicative thêta. (B) Forme répllicative du cercle roulant. Ovale noir : ICP8, Gris : UL42 et UL30, Hachuré : UL9, Lignes obliques : Complexe hélicase primase (C) Quatre différents isoformes du génome viral du VHS avec une orientation sens et anti-sens des fragments U_L et U_S. Modifié de Fields Virology (288).

Il y a des protéines accessoires à la réplication de l'ADN qui, quoique non essentielles, permettent une réplication efficace du virus. Nous retrouvons entre autres les protéines nécessaires au métabolisme des nucléotides, telles que la thymidine kinase virale (284), la déoxyuridine triphosphate phosphatase (49) et la ribonucléotide réductase virale (RR) (97). Il y a également dans cette catégorie des enzymes de réparation d'ADN telles que l'uracile N-glycosylase (72) et l'alkaline nucléase (170, 484).

La recombinaison joue également un rôle important dans la réplication de l'ADN viral (407, 650). Cette recombinaison résulte en un échange entre les sections du génome qui sont bordées de régions répétées. Ces régions UL et US peuvent s'assembler en quatre isomères différents suivant des événements de recombinaison (Figure 4C). Plus rarement, cette recombinaison peut s'effectuer à l'intérieur de ces régions, souvent due à des bris d'un des brins d'ADN ou encore à l'action de nucléases cellulaires (247, 635). Les protéines responsables de ces événements de recombinaison n'ont été que partiellement caractérisées. Des études ont démontré que les enzymes cellulaires Rad51, Rad52 et Rad54 et les protéines virales ICP8 et UL12 sont impliquées dans ce processus (26, 299, 405, 483). Le VHS est également connu pour activer, au cours de l'infection, la machinerie de réparation de bris d'ADN, qui pourrait également y jouer un rôle (544, 650). La réplication de l'ADN induit la formation de formes branchées d'ADN, qui peuvent être sous forme de X ou Y (537, 538). La

recombinaison peut souvent résulter en la formation de ces structures branchées qui aident à l'efficacité de la réplication de l'ADN (368, 597). La recombinaison aide également à la réparation des bris d'ADN doubles brins (425). Des études génomiques démontrent que la recombinaison est un événement très fréquent pour le VHS-1 (428, 436).

1.6.5 - Encapsidation des génomes viraux

Parmi les protéines virales, certaines de celles-ci sont transportées au noyau pour former la capside virale. Certaines sous-unités de la capside peuvent s'assembler au cytoplasme (489). Comme décrit précédemment, il y a trois sortes de capsides, les A, B et C; chacune a 120nm de diamètre. Leur couche externe est composée de pentons et d'hexons de VP5, la protéine majeure de la capside (488). Celles-ci sont assemblées utilisant des trimères composés de deux molécules de VP23 et une de VP19c. Les capsides B sont en plus composées des protéines VP22a et VP21, des protéines d'échafaudages, et de la protéase virale VP24 (242). L'activité de celle-ci est importante pour la maturation de la capside et son infectivité (183, 493). Cet assemblage requiert l'action d'aucune protéine cellulaire (419) et se produit dans les compartiments de réplication viraux, près des sites de réplication d'ADN (90, 120).

Suite à la réplication de l'ADN viral, une copie du génome provenant du concatémère est insérée dans la capside et celui-ci est clivé. Ces deux processus sont intrinsèquement liés (175). Au moins six gènes ont été démontrés comme étant essentiels à l'empaquetage de génomes viraux; soit UL6, UL15, UL17, UL28, UL32 et UL33 (2, 4, 302, 303, 366, 443, 596, 665). La protéine UL25 n'est pas essentielle au processus, mais l'est pour le maintien du génome dans la capside après l'empaquetage en bloquant le portail (581). L'ADN est inséré dans la capside et il y a déplacement des protéines d'échafaudage VP21 et VP22a. Le clivage du génome, suivant l'insertion, se fait sur des sites précis, dénommés pac1 et pac2 (122, 387, 560, 618). La méthode exacte d'empaquetage n'est pas connue, mais il a été proposé que le complexe de clivage balaie la séquence d'ADN jusqu'à ce qu'il reconnaisse un de ces signaux, le clive et insère l'ADN dans la capside jusqu'à ce qu'il rencontre un autre signal de clivage. Les protéines UL15, UL28 et UL33 sont proposées comme jouant le rôle de la terminase (33, 119, 240). La protéine UL6 formerait le portail d'entrée de la capside (420) et la protéine UL25 ferait office de bouchon, empêchant l'ADN de ressortir (366, 432).

1.6.6 - Du noyau au cytoplasme

Suite à l'encapsulation du génome viral, la capside doit se rendre au cytoplasme et par la suite, sortir de la cellule. La membrane interne du noyau est recouverte d'une matrice dense de protéines, dénommées lamines, qui sont dissociées lors de l'infection par les protéines virales UL31 et UL34 (486). La protéine US3 est également impliquée en activant UL31 par phosphorylation (399). Les étapes suivantes sont débattues, mais trois cheminements possibles sont proposés (378, 379) (Figure 5). Le cheminement par enveloppement et désenveloppement est le plus supporté. Ce modèle propose l'acquisition d'une première enveloppe virale à la membrane nucléaire interne. Le virus se retrouve entre les deux membranes sous forme enveloppé et, par la suite, fusionne avec l'enveloppe externe du noyau (286, 481, 558).

Il a également été proposé que les virions enveloppés présents entre les membranes nucléaires soient matures et suivent le cheminement du réticulum endoplasmique. Par la suite, ils utilisent des vésicules sécrétoires jusqu'à l'extérieur de la cellule (267). Plusieurs groupes ont obtenu des résultats allant à l'encontre de ce modèle, notamment, que les protéines de virions matures ne se retrouvent pas au site initial d'enveloppement (177, 203), que des capsides non enveloppées sont visibles au cytoplasme (129) ou encore que les lipides composant l'enveloppe virale finale correspondent à ceux du Golgi et non du noyau (614). De plus, certaines protéines présentes dans le tégument des virions nucléaire ne sont pas présentes dans les virions matures, tel que UL31 et UL34 du virus PRV(204), ou que certaines ne sont pas présentes dans les virions enveloppés primaires, mais le sont dans les virions matures, entre autres UL36, UL37, UL49, UL46 et UL47 du PRV (174, 285, 292).

Finalement, le dernier modèle a été proposé suite à des expériences en microscopie électronique utilisant la technique de cryo-FESEM (cryogeny - field emission scanning electron microscopy). Il propose que les pores nucléaires soient élargis et permettent le passage des capsides, normalement bien au-delà de la limite de ces transporteurs, au cytoplasme (322, 646, 647). Par contre, il a été démontré que les pores nucléaires gardent leur intégrité jusqu'à tard lors de l'infection (241). La plupart des résultats expérimentaux sur la sortie virale supportent le modèle d'enveloppement et de désenveloppement, qui, après la traversée de la double membrane nucléaire, voit les capsides se retrouver au cytoplasme, poursuivre leurs processus de maturation et acquièrent les dernières composantes du virion, le tégument et l'enveloppe virale.

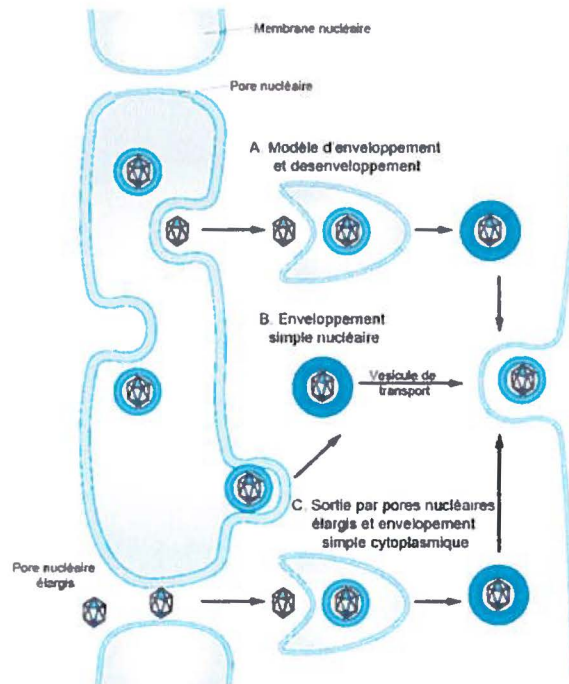


Figure 5. Modèles d'enveloppement du virus VHS. (A) Modèle majoritairement supporté d'enveloppement et de désenveloppement. (B) Sortie virale par enveloppement simple et transport via des vésicules de transport. (C) Passage de la capsid du noyau au cytoplasme par des pores élargis et enveloppement cytoplasmique. Modifié de Fields Virology (288).

1.6.7 - Traversée cytoplasmique du virion

Suivant la sortie du noyau, la capsid continue d'acquérir d'autres protéines du tégument jusqu'à son enveloppement final. Le virus acquiert un bagage de protéines qui aideront aux étapes finales de la maturation du virion et seront importantes pour une infection efficace de la prochaine cellule. Le tégument est assemblé par un réseau complexe d'interaction entre protéines (377). Le tout débute par des interactions entre la capsid, possiblement la protéine UL25, avec la protéine VP1/2 (416). Par la suite, celle-ci, en collaboration avec UL37, forme une matrice qui permet l'assemblage des couches suivantes du tégument (316). La suite de l'assemblage du tégument est moins bien définie, puisque des essais avec différents virus déficients pour des protéines du tégument ont démontré que les virus sont toujours capables de s'assembler. Par contre, une des protéines essentielles à cette étape est VP16, puisqu'une déficience pour celle-ci résulte en un blocage de l'assemblage des virions (398). Il est possible qu'elle recrute d'autres protéines importantes du tégument, tel que vhs (559) et VP22 (146).

Le déplacement de la capsid du noyau au site d'acquisition de l'enveloppe finale se fait par transport actif, initialement par le réseau d'actine sur de courtes distances par l'actine de

myosine V (491). Le déplacement au site d'enveloppement utilise le réseau des microtubules et la kinésine-2. L'interaction avec ces moteurs se ferait par l'entremise des protéines du tégument interne (653), possiblement VP1/2 (342). L'implication d'un autre moteur de transport sur les microfilaments a également été démontrée. En effet, NM2a est impliquée dans le transport jusqu'au site d'acquisition de l'enveloppe virale (615).

1.6.8 - Acquisition de l'enveloppe virale et sortie virale

Suite à la sortie du noyau, la tégumentation et le transport dans le cytoplasme, le virus arrive au site final d'enveloppement et va par la suite sortir de la cellule. Il reste beaucoup d'étapes à élucider dans ce mécanisme, mais il a été démontré que des glycoprotéines virales, telles que gE, gI et gM, qui ne sont pas essentielles pour une infection productive, sont néanmoins importantes pour l'efficacité de cette étape du cycle viral (58). Un rôle important pour la protéine du tégument UL11 a également été démontré à ce niveau (291). Les capsides tégumentées vont par la suite acquérir leur enveloppe finale au *trans*-golgi (377-379, 610). Certains groupes ont démontré que ces sites d'assemblage des virions de la famille herpès pourraient également être : les compartiments intermédiaires du réticulum endoplasmique et du Golgi (520), les endosomes (61, 168, 224), le tégusome (496), les aggresomes (429) ou les vacuoles associées au Golgi (243). Lors de l'acquisition de l'enveloppe finale, les glycoprotéines virales gB et gD jouent un rôle plus tardif que gE et gI (269). Des protéines de l'hôte, telles que la protéine kinase D, Rab1a/b et Rab 43, sont également impliquées dans ce processus (482, 671). Les complexes d'assemblage de virions ont été bien décrits pour certains virus de la famille herpès, comme le CMV (116). Par contre, jusqu'à présent, une telle organisation n'a pas été démontrée pour le VHS-1. Le transport du site d'enveloppement requiert un transport actif qui va entre autres être effectué par la myosine Va, qui va jouer un rôle dans le transport des vésicules contenant les virions du réseau du trans-Golgi à la membrane en traversant l'actine corticale (491). Suite au ré-enveloppement et au transport jusqu'à la membrane plasmique les vésicules contenant des virions matures fusionnent avec la membrane plasmique. Peu est connu sur les protéines impliquées, mais il est possible que les protéines virales UL20 et gK jouent un rôle (25, 176, 212, 376).

2- Interactions entre le VHS-1 et la cellule hôte

La propagation des virus dépend de la cellule hôte puisqu'ils utilisent les différentes ressources et la machinerie de celle-ci pour se répliquer. Ils doivent le faire tout en minimisant

ses moyens de défense et en bloquant la mort de l'hôte jusqu'au moment de la relâche des virions. Les virus ont co-évolué avec leur hôte et ont réussi à développer de multiples moyens pour en prendre le contrôle et le réorganiser pour favoriser leur réplication. La section ci-dessous décrit la relation entre les virus, en mettant l'accent sur la relation entre le VHS et la cellule hôte.

2.1 - Le noyau et ses compartiments

La différence primordiale entre les procaryotes et eucaryotes est la présence d'un compartiment séparant l'ADN génomique du reste de la cellule. Le noyau est connu principalement comme le compartiment contenant l'ADN cellulaire, mais plusieurs autres processus primordiaux pour la cellule se déroulent également au noyau. Entre autres, la synthèse et maturation des ARN messagers, la synthèse des ARN ribosomiaux et l'assemblage des ribosomes.

Le noyau est enveloppé d'une double membrane lipidique, dont la membrane externe fait partie du réticulum endoplasmique. Le noyau possède un nucléoqueuelette qui soutient sa forme et lui donne une élasticité. Il est composé de lamines (191), titine (348, 349), actine (620), la myosine nucléaire Ic (77), la kinésine KIF4A et K1D (360). L'on y retrouve également certains moteurs de transport cytoplasmique tels que les myosines Va, Vb et VI (332, 624). Ce système est lié à la chromatine directement par des liens à l'ADN, les histones et les complexes de modification de la chromatine (340, 552). Les échanges entre le cytoplasme et l'intérieur du noyau se font par l'entremise de ces pores. Les ARN, protéines et molécules diverses peuvent y passer passivement ou activement, dépendamment de leur taille (452, 605).

Le noyau est le centre de contrôle de la cellule où une grande majorité des processus cellulaires sont régulés. Il est donc normal, avec tous ces rôles, de retrouver au noyau des sous-compartiments spécialisés pour certaines fonctions. La majeure partie du noyau est composée d'ADN, soit sous forme condensée, hétérochromatine, ou euchromatine, qui est transcriptionnellement active. Nous retrouvons également au noyau une panoplie de sous-compartiments ayant des rôles spécialisés et qui, contrairement au cytoplasme, ne sont pas séparés du reste du noyau par une membrane. Nous avons les corps de Cajal, site important de maturation des petits ARN (395) et les gems, qui ont un rôle relié au corps de Cajal dans la biogenèse des petites ribonucleoprotéines nucléaires (snoRNP) (211). La fonction des «promyelocytic leukaemia bodies» (PML), aussi connus sous le nom ND-10, n'est pas bien définie, mais ils recrutent plusieurs protéines impliquées dans une grande variété de processus cellulaires, parfois pour séquestration (300). Les «splicing speckles» sont importantes pour

l'épissage des pré-ARNm et sont très dynamiques dans leur contenu (572). Finalement, nous avons le nucléole, un sous-compartiment nucléaire multifonctionnel qui est le plus visible en microscopie optique de par sa taille et sa forte densité protéique (53).

2.2 - Le nucléole, un compartiment multifonctionnel

Le nucléole est un sous-compartiment nucléaire très dynamique qui contient une grande diversité de protéines qui peuvent être en constant échange avec le nucléoplasme (598). Sa structure est maintenue par un réseau d'interactions protéine-protéine et il est divisé en trois couches : le centre fibrillaire (FC), la composante fibrillaire dense (DFC) et la composante granulaire (GC). Le nucléole s'assemble en un ou plusieurs compartiments distinct(s) lors de l'interphase dans des régions riches en ADN ribosomal (ADNr). Il se désassemble seulement lors de la condensation de la chromatine pour la division cellulaire. Non seulement le nucléole est le site primaire de la biogenèse des ribosomes, mais il joue également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la réponse au stress.

2.2.1 - La biogenèse des ribosomes

La synthèse des ARN ribosomaux (ARNr) est la principale fonction du nucléole et l'activité de celle-ci en influence la taille (397, 578). Le génome humain compte plus de 400 copies des gènes d'ADNr sur cinq chromosomes (13, 14, 15, 21 et 22), répartis en régions nommées «nucleolus organizer regions» (NOR) (235, 476). La synthèse des ARNr débute à la frontière des FC par l'ARN pol I en une forme caractéristique de sapin (384). L'ARN polycistronique 47S naissant est clivé pour former les ARNr 18S, 5.8S et 28S (295). L'ARNr 5S est transcrit par l'ARN pol III (637). Ces quatre ARNr forment la base pour l'assemblage des unités ribosomales (393). Le 18S est un des composants de la sous-unité 40S et les 5.8S, 5S et 28S de la sous-unité 60S (157). Par la suite, un assemblage de 80 snoRNP modifie ceux-ci durant leur maturation (283). Il y a également plusieurs endonucléases et exonucléases qui sont impliquées dans le traitement des ARNr (450). Après cette étape, il y a assemblage des sous-unités ribosomales 40S et 60S, composées des ARNr et de multiples protéines, dans un processus hautement dynamique et complexe qui se déroule en progressant vers l'extérieur du nucléole, traversant les DFC et GC, avant l'export vers le cytoplasme (157).

2.2.2 - Protéomique du nucléole

L'utilisation de techniques d'isolation de nucléoles (67) à grande échelle combinées à l'utilisation de spectrométrie de masse ont permis d'importantes avancées dans l'identification

de protéines résidentes du nucléole. Une première étude par le groupe de Lamond a permis d'identifier 271 protéines, et une deuxième a permis d'en identifier environ 350 de plus (8, 525). Par ailleurs, une étude plus récente, par le même groupe que la première, a permis d'identifier plus de 700 protéines résidentes du nucléole. Cette étude s'est également penchée sur la dynamique du nucléole dans différentes conditions telles que lors de l'inhibition de la transcription, résultant en une différence des protéines présentes. De celles-ci, la majorité sont impliquées dans la synthèse des ribosomes et la maturation des ARNr, mais ils ont également retrouvé des protéines reliées au cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN, des facteurs d'épissage et spécifiques à plusieurs autres fonctions (7). Le même laboratoire a récemment publié une mise à jour qui pousse le nombre de protéines identifiées à 4500 (3).

2.2.3 - Le nucléole et le cycle cellulaire

Depuis plus d'un siècle, le nucléole a servi de modèle pour décrire les phases que traverse le noyau durant le cycle cellulaire, soit la désorganisation au début du cycle cellulaire, la transmission aux deux cellules sœurs et le réassemblage suivant la fin de la mitose (133). Par contre, plusieurs des étapes du désassemblage et des mécanismes les contrôlant restent encore à être élucidés. Au cours de l'interphase, il y a une forte biogenèse des ribosomes, activité qui cesse lors de l'initiation de prophase (190). Au début de cette phase, il y a un relâchement des complexes de maturation nucléolaire et une inhibition de l'activité de l'ARN pol I d'environ 30% qui progressera jusqu'à un arrêt complet à la fin de la prophase (465). Les complexes qui sont relâchés ne sont pas totalement désassemblés. Il a été démontré que plusieurs protéines du nucléole s'associent en localisation péri-chromosomale (187-189, 455), mais il semble que les interactions entre les constituants de ces compartiments soient différentes de celles présentes dans le nucléole (9). Ces complexes interagissent avec l'ADNr (189) et migrent avec les chromosomes lors de la ségrégation de ceux-ci durant l'anaphase (524). Des protéines, telles que des sous-unités de l'ARN pol I et UBF restent associées aux NORs durant la mitose (501, 557). Les changements qui surviennent au nucléole lors de l'initiation de la mitose semblent être en grande partie dus à un changement de phosphorylation des facteurs de transcription de l'ARN pol I (231, 556, 557), de B23 (679) et des facteurs de maturation nucléolaire telle que la nucléoline (451). Cette phosphorylation est effectuée en grande partie par la kinase cycline B1-CDK1 (413). L'ajout de ces groupements explique la répression de l'activité de transcription de l'ADNr et des changements d'interactions protéine-protéine menant au désassemblage du nucléole. Cette phosphorylation est renversée par des phosphatases PP1 lors de l'anaphase et une diminution du niveau de la cycline B1-CDK1 (413).

Le processus de réassemblage des nucléoles est relativement long (403) et débute par l'activation de la transcription des ADNr et de la machinerie de maturation des ARNr lors de la fin de la télophase (235). Il y a alors assemblage des corps prénucléolaires (PNBs), qui se composent de plusieurs protéines nucléolaires (524). Ces compartiments servent à séquestrer ces protéines pour contrôler leur disponibilité et réguler l'assemblage du nucléole (403). La fibrillarine est la première protéine qui est relâchée des PNBs. Elle s'associe à l'ADNr dans les NORs et pour former le DFC des nucléoles. Par la suite, les autres protéines séquestrées au PNBs sont graduellement relâchées pour permettre la formation complète des nucléoles. À ce point, l'activité transcriptionnelle de l'ADNr s'accroît graduellement avec l'augmentation de la quantité de facteurs se trouvant au nucléole (501). La formation complète du nucléole dépend également du recrutement de l'ARNr 45S produite lors de la prophase et se retrouve dans les complexes péri-chromosomaux lors de la mitose (140, 263). Il peut y avoir fusion de nucléoles lors de leur assemblage au début de la phase G1 (524). La maturation de ce sous-compartiment se fait par l'activité des phosphatases PP1 menant à une déphosphorylation des facteurs nucléolaires et à une réorganisation de protéines présentes dans le nucléole sous trois différents compartiments : le FC, le DFC et la GC (337).

En plus d'être un sous-compartiment très dynamique au cours de la division cellulaire, le nucléole joue un rôle important au niveau de la régulation de la progression du cycle cellulaire. Il y a une dynamique de protéines qui s'associent et se dissocient du nucléole au cours du cycle; elles peuvent y subir des modifications post-traductionnelles qui influencent leur activité (162, 215, 353). Une de ces modifications est la sumoylation et une protéase spécifique à cette modification, SENP5, joue un rôle important au niveau de la progression du cycle cellulaire et de la morphologie nucléaire (130, 202). Le nucléole joue également un rôle important dans la régulation par la phosphorylation de facteurs du cycle cellulaire. Des protéines, telles que Cdc14, sont séquestrées au nucléole et sont relâchées par la phosphorylation de protéines d'ancrage (545, 621). Cette séquestration permet une régulation temporelle de leur fonction, tel que pour Cdc14, qui agit sur la ségrégation complète des chromosomes (112). La phosphatase PP1 γ est elle aussi séquestrée au nucléole lors de l'interphase (607) et suite à la dissolution des nucléoles lors du début de la mitose, elle se retrouve diffuse dans le cytoplasme, concentrée au kinétochore et jouerait un rôle dans la condensation des chromosomes (613). La transcriptase inverse des télomérases est également séquestrée au nucléole, probablement par une interaction avec la nucléoline (281), et relâchée seulement lorsque les télomères ont été répliqués à la fin de la phase S (655).

2.2.4 - Le nucléole et la réponse au stress

Comme décrit précédemment, le nucléole compte une grande variété de protéines et certaines d'entre elles sont impliquées au niveau des voies de signalisation de stress cellulaire. Une de ces voies est celle de p53 qui, en temps normal, est constamment dégradée et n'est que faiblement détectable, mais qui, suite à un stress cellulaire, voit sa dégradation interrompue et engendre son accumulation. La stabilité de p53 dans les cellules humaines est principalement médiée par HDM2 et p14ARF (467). La seconde est localisée principalement au nucléole (43) et fonctionnerait en séquestrant HDM2 au nucléole en situation de stress cellulaire (656). Ce stimulus agirait également en inhibant la biogenèse des ribosomes. Cet arrêt passerait par le facteur de transcription TIF-1A qui est phosphorylé par la kinase-2 N-terminale C-jun (JNK2) résultant en un blocage de son rôle dans la stimulation de l'ARN pol I et en sa relocalisation du nucléole au cytoplasme (359). Ce blocage, menant à un arrêt de la chaîne de production de protéines, va de pair avec les observations faites au niveau de la réponse au stress du réticulum endoplasmique et la formation des aggresomes. Ces mécanismes cellulaires induisent la formation de «stress bodies» à l'intérieur du nucléole composés de protéines associées au protéasome (308).

2.2.5 - La nucléoline

La nucléoline est une des protéines les plus abondantes du nucléole (63). Elle a une masse moléculaire de 77 kilo Dalton (kDa). Elle est hautement conservée chez les vertébrés et des homologues sont présents dans les levures (196). C'est une protéine multifonctionnelle qui est divisée en trois régions. La partie N-terminale est riche en résidus acides et est le site de nombreuses phosphorylations par la kinase caséine 2 (CK2) et la kinase dépendante des cyclines 1 (CDK1). Le centre de la protéine contient quatre domaines de reconnaissance de l'ARN et la portion C-terminale est riche en arginine et glycine. Le domaine GAR, pourrait également interagir avec l'ARN et certaines protéines ribosomales (196, 230). Elle se localise au nucléole, au nucléoplasme et à la membrane plasmique (196).

La nucléoline joue un rôle dans la transcription par l'ARN pol I et II, directement ou indirectement, suite à une phosphorylation par CK2 (37). Son action peut réguler à la hausse, mais également à la baisse l'expression de certains transcrits (208, 209, 497, 667). Dans le nucléole, elle est présente dans la GC, région impliquée dans la transcription des ARNr (477). Il a été démontré que la quantité de nucléoline présente correspond avec l'activité de l'ARN pol I et le rythme de prolifération de la cellule (128).

En plus de son rôle comme facteur de transcription, la nucléoline joue également un rôle sur un autre mécanisme de contrôle d'expression génique, la structure de la chromatine. L'ADN cellulaire est complexé avec des histones, formant des nucléosomes, qui, selon des modifications, augmentent ou diminuent la compaction de l'ADN, ce qui influence sa disponibilité pour des interactions avec des facteurs de transcription. Plusieurs enzymes jouent un rôle à ce niveau en modifiant les histones de manière covalente en ajoutant ou en retirant des groupements qui altèrent leur charge et qui modifient leur affinité pour l'ADN, résultant en un changement de condensation de l'ADN (30). Une autre modification consiste à déplacer les histones le long de l'ADN pour rendre certaines régions plus disponibles, un mécanisme appelé le glissement du nucléosome (55). Plus ce mécanisme est actif, plus les régions promotrices sont actives (439). Il a été démontré dans les levures que la nucléoline interagit avec deux joueurs impliqués dans ce mécanisme, le complexe SWI/SNF et ACF, en augmentant leur efficacité (10). De plus, les nucléosomes contenant la protéine macroH2A sont habituellement résistants à l'activité de SWI/SNF ou ACF. Toutefois, en présence de la nucléoline, ces complexes peuvent remodeler ces nucléosomes (11). La nucléoline agirait en facilitant l'interaction entre le complexe et le nucléosome, mais ne semble pas être impliquée directement dans son activité (10). Le rôle ambigu de la nucléoline dans l'activation ou la répression, discuté précédemment, pourrait s'expliquer par sa collaboration avec un autre facteur, le «transcription termination factor I» (TTF-I). Ce dernier interagit avec l'ADN directement et dirige le positionnement des nucléosomes sur certaines parties de l'ADN (305, 306).

La nucléoline peut également jouer le rôle de chaperonne des histones. Pour la formation d'un nucléosome, il y a tout d'abord déposition sur l'ADN d'un tétramère d'histone 3 et 4 (H3-H4) et par la suite de deux dimères d'histone 2A et 2B (H2A-H2B) (66). Parmi les protéines impliquées dans ce processus, la nucléoline interagit directement avec les dimères H2A-H2B et faciliterait leur association avec le tétramère H3-H4 (10, 199). Cette activité est similaire à celle exécutée par les protéines nucléoplasmine et «nucleosome assembly protein 1», qui sont deux chaperonnes d'histones bien caractérisées. La nucléoline peut également aider au transfert des dimères H2A-H2B d'un nucléosome formé à un tétramère, action qui facilite la transcription par l'ARN pol II (10).

De plus, la nucléoline agit dans la biogenèse des ribosomes. En plus de stimuler l'activité de l'ARN pol I, elle serait impliquée au niveau des étapes précoces de la maturation des ARNr, spécialement au niveau du clivage primaire des bouts 5' par son interaction avec le «small nucleolar RNA» U3 (snoRNA) (195). Elle serait également impliquée au niveau du

transport des complexes ribosomaux hors du noyau et dans l'importation des protéines ribosomales par l'interaction avec celles-ci via son domaine GAR (54).

2.2.6 - Le nucléole et les infections virales

Les indices abondent de plus en plus que les virus interagissent avec le nucléole, soit en y dirigeant des protéines ou en perturbant ses fonctions (239). Par contre, cet effet semble être dirigé vers certaines protéines nucléolaires et ne semble pas être un effet global, du moins pour certains virus (148, 301). Notamment, la redistribution de protéines nucléolaires est un processus qui a été observé pour plusieurs virus. Les interactions peuvent être utilisées par le nucléole soit pour augmenter leur efficacité de réplication ou pour bloquer l'inhibition de leur cycle par des processus du nucléole (238).

L'adénovirus redistribue la nucléoline, B23 et la fibrillarine au cytoplasme pour stimuler la réplication de l'ADN viral (354, 437, 469). L'adénovirus redistribue également la protéine B23 aux centres de réplication de l'ADN viral où elle agirait comme une chaperone de la chromatine virale en interagissant avec des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN adénoviral (236, 515). De plus, elle agirait en initiant la réplication par son interaction avec les régions terminales de l'ADN linéaire (310). Cette redistribution semble être due à une action de la protéine virale V, qui joue un rôle dans la livraison de l'ADN viral dans la cellule hôte (355).

Le virus de la poliomyélite bloque l'importation nucléaire de la nucléoline pour stimuler la traduction de sites d'initiation utilisant la séquence «internal ribosome entry site» (IRES) (255, 627) et par l'interaction avec la région 3' non traduite (627). Également, lors de l'infection par ce virus, il y a inhibition des trois ARN pol et celle de l'ARN pol I est médiée par la protéase virale 3C^{pro} (29, 636).

Chez le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), deux protéines, Rev et Tat, se localisent au nucléole (448, 504). Rev semble jouer un rôle au niveau de l'accumulation d'un des isoformes de la protéine B23, B23.1, et est impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire (70, 386). De plus, Rev serait le facteur impliqué dans le transport des ARNm viraux (93). Il utilise également le nucléole pour favoriser l'export nucléaire de ses ARNm. Cette stratégie est également utilisée par le virus herpès Saimiri (HVS) et le KSHV, puisque leurs ARNm sont incompatibles avec la machinerie cellulaire d'export qui est combinée à la machinerie d'épissage. Ces virus redistribuent des protéines clés d'export des ARNm au nucléole et utilisent, soit Rev pour le VIH ou ORF57 pour le HVS, afin d'aider leurs transcrits qui passent par le nucléole pour se rendre au cytoplasme (56, 57, 382, 487). Les virus hépatite delta et coronavirus redistribuent la fibrillarine et interagissent avec la nucléoline, via les protéines

HDAGs ou la protéine N respectivement. Ceci est fait pour à la fois augmenter leur réplication, inhiber la progression du cycle cellulaire et inhiber l'activité de l'ARN pol I (84, 314).

Plusieurs études publiées sur la famille des *nidovirales* ont établi un lien entre une localisation de la protéine N (nucléocapside) au nucléole et une réplication virale efficace (313, 447). Cette localisation résulte, du moins pour le virus du syndrome respiratoire aigue sévère (SRAS), en une inhibition de la phosphorylation de B23 (670). De plus, le virus du nil occidental affecte la stabilité de p53 par le cheminement p14ARF/HDM2/p53 (666).

2.2.7 - La relation entre le nucléole et le VHS-1

Plusieurs protéines du VHS-1 se localisent du moins transitoirement au nucléole, telles que ICP0, ICP4, ICP27, US11, UL24, UL27.5, vp22 et γ34.5 (76, 85, 321, 335, 369, 394, 498, 514). La structure même des nucléoles est affectée lors de l'infection; ils se retrouvent en bordure du noyau, marginalisés, et l'ARNr y est partiellement séquestrée (45). Une diminution de l'ARNr mature a également été observée dans des cellules infectées par le VHS-1 (44, 45, 550, 579, 628). Toutefois, il a été récemment publié que cette diminution ne serait pas due à une inhibition de la fonction de l'ARN pol I, mais à une différence dans le processus de maturation de l'ARNr dans les cellules infectées. Il mènerait à une réduction des formes 41S, 32S, 21S et 12S, à une stabilisation dans la quantité de 45S et 30S et à l'apparition de trois nouvelles formes d'ARNr (38). Les protéines ribosomales ainsi qu'un nombre restreint d'autres gènes cellulaires sont toujours traduits (206), faisant en sorte que la biogenèse, quoique réduite, n'est pas inhibée (553). Pour plusieurs protéines nucléolaires, telles que la nucléoline, B23, UBF, RPA194 et fibrillarine, il y a changement de localisation lors de l'infection (42, 344-346). Parmi ceux-ci, certaines protéines sont utilisées afin de promouvoir la réplication du VHS-1. La protéine UBF, facteur d'initiation pour l'ARN pol I, est relocalisée aux centres de réplication viraux lors de l'infection, possiblement en conjonction avec la synthèse de l'ADN viral à des temps tardifs (346, 582). La protéine US11 agirait comme inhibiteur de HIPK2, qui joue un rôle dans l'apoptose par la protéine p53, et donc, bloquerait l'arrêt du cycle cellulaire médiée par HIPK2 (197). La nucléoline a été démontrée comme importante pour une infection productive et serait impliquée, entre autres, au niveau de la sortie virale du noyau (69, 511).

2.2.8 - L'infection par le VHS-1 et les corps nucléaires PML/ND10

Les corps PML sont nommés ainsi vu un de leur principal constituant, la protéine «promyelocytic leukemia». Ce sous-compartiment nucléaire est également constitué de deux autres protéines majeures, hDaxx et Sp100. Les corps PML sont impliqués dans la régulation

de divers processus cellulaires et ont été impliqués, entre autres, dans l'oncogenèse (513), la réparation des dommages à l'ADN (125), l'apoptose (40, 592), la réponse au stress (357), la sénescence (48), l'ubiquitination et la régulation génique (673). Ces domaines sont hautement associés à la réplication de l'ADN viral et la formation des compartiments de réplication (252, 356). Les corps PML sont réorganisés lors de l'infection et cela requiert la présence de la protéine virale ICP0 (356). Cette réorganisation résulte en une dégradation des protéines PML et Sp100 (82, 401, 441). La perturbation des domaines ND10 est associée à la stimulation de la réplication lytique ou la réactivation virale (149).

2.3 - Localisation nucléaire et nucléolaire des protéines

Plusieurs protéines, autant cellulaires que virales, sont dirigées vers le noyau et le nucléole. Ces compartiments sont distincts et afin que les protéines y soient dirigées, elles doivent posséder un signal de localisation ou encore, interagir avec une protéine ciblée pour ces compartiments. Une protéine peut se retrouver au noyau par diffusion simple par les complexes de pores nucléaires (NPCs), toutefois ce processus est limité (182). Plusieurs protéines et ARN utilisent un mécanisme de transport actif dans le but de traverser la double membrane nucléaire puisque leur taille dépasse la limite des NPC et aussi afin de rendre leur translocation plus efficace. Puisque bien des processus cellulaires sont contrôlés par des mécanismes nucléaires, il n'est pas surprenant de voir autant de virus se diriger vers ces compartiments. Les virus à ADN vont, pour la plupart, se diriger vers le noyau et utiliser des facteurs cellulaires nécessaires à la réplication de leur génome. Également, certains virus utiliseront cet organite dans le but de modifier certains processus cellulaires et ultimement induire une réplication virale plus efficace (147, 237).

2.3.1 - Signaux consensus de localisation

La localisation intracellulaire se fait généralement par l'utilisation de séquences à l'intérieur de la protéine qui la dirige vers la machinerie cellulaire transportant ainsi la protéine jusqu'à sa destination. Il a été reconnu en 1984 par Karledron *et al.* qu'une courte séquence d'acides aminés (aa) est capable d'induire une localisation nucléaire (273). Cette séquence est reconnue par une chaîne de protéines agissant à titre de transporteur et permettant la translocation du cytoplasme au noyau en passant par les NPCs. Ces pores permettent le passage à travers la membrane et sont composés d'environ 30 copies de différentes protéines, appelées nucléoporines (110, 502). Différents cheminements peuvent être utilisés pour le transport actif à travers la double membrane nucléaire (347). La majorité des chemins passent

par une classe de protéines dénommées les β -karyopherins et avec l'aide d'importines. Ces deux protéines interagissent avec le signal de localisation nucléaire et permettent la traversée du pore nucléaire par un processus actif hydrolysant Ran-GTP (580). D'autres mécanismes spécifiques existent pour l'import des protéines ribosomales (259) et des histones (396) qui ont des signaux de localisation non-classiques (312).

Les signaux de localisation nucléaire (NLS) classiques sont composés d'un ou deux regroupements d'aa basiques, tels que l'arginine, la lysine et l'histidine. Ces régions sont d'une longueur d'environ quatre à cinq résidus et lorsqu'en deux parties, elles sont séparées d'environ dix à douze résidus (304). Un exemple de signal simple est celui du grand antigène T du virus SV40 (²¹⁶PKKKRRV¹³²) et pour le signal en deux parties, celui de nucléoplasmine (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKK¹⁷⁰). Une variation peut être observée au niveau de la séquence. Par contre, elle doit permettre une interaction suffisamment forte avec l'importin α pour permettre le transport, sans toutefois empêcher la séparation du transporteur et du cargo une fois rendu au noyau (194).

La structure du nucléole est très dynamique et son intégrité n'est pas maintenue par une membrane, mais bien par des interactions protéine-protéine, protéine-ADNr et protéine-ARNr. Il n'existe pas, à notre connaissance, de mécanisme bien défini responsable de la localisation nucléolaire, tel que ceux existant pour le noyau. Cette localisation serait plutôt due à une interaction avec des protéines résidentes du nucléole (75), rendant ainsi l'identification de signaux consensus de localisation très difficile (527). Notamment, un NLS est présent dans la protéine nucléoline, mais aucun signal de localisation nucléolaire (NoLS) n'a pu y être identifié. Il est postulé que son interaction avec l'ARNr et la protéine B23 serait responsable de sa localisation (108, 327, 527). Tout comme le NLS, le motif de NoLS est composé de résidus basiques, principalement d'arginine et de lysine, et peut aller de sept à trente aa de longueur (47, 479). Il est possible que ces signaux pourraient permettre une interaction avec d'autres facteurs résidents du nucléole.

2.3.2 - Localisation de protéines virales au noyau et nucléole

Comme discuté précédemment, plusieurs protéines virales se localisent au nucléole et pour certaines d'entre elles, un motif NoLS a été découvert. Chez la protéine UL54 du virus pseudorabies (PRV), un homologue de ICP27 du VHS-1, la séquence (RRRRGGRGGRAR) a été démontrée comme étant importante pour sa localisation au nucléole (325). Un signal NoLS similaire a également été identifié pour la protéine N du virus du syndrome respiratoire et reproductif porcin (PRRSV) (503), de Tat et Rev du VIH (93, 555), de NS1 du virus influenza

(219, 372) et de la protéine γ 34.5 du HSV-1 (85). Un signal de forme bipartite a été identifié pour la protéine ORF57 du HVS (57).

Pour plusieurs autres protéines virales qui se situent au nucléole, le signal de localisation n'a pas été déterminé. Il est possible que cette localisation soit due à des interactions avec des facteurs ciblés pour une localisation à ce sous-compartiment, tels que pour la protéine US11 du VHS-1 (661). Dans certains cas, non seulement des protéines virales se localisent au nucléole, mais des génomes viraux et des sites d'assemblages de virions s'y localisent. Le site de réplication du génome du virus de la maladie de Borna (BDV) (470) et la transcription du virus de l'hépatite delta (326) ont été rapportés comme se localisant au nucléole. Les capsides du virus associé aux adénovirus 2 sont assemblées aux nucléoles, et cette activité est dirigée par la protéine «assembly-activating protein» (569). L'identification de signaux NoLS peut se faire par bioinformatique (531), mais l'incertitude quant à la séquence requise fait en sorte que ces données doivent être confirmées expérimentalement (514).

2.4 - Le cytosquelette

Le cytosquelette est un regroupement de protéines jouant un rôle important dans le maintien de la structure de la cellule. Il est principalement associé aux cellules eucaryotes, mais certaines formes de protéines de structure cellulaire ont été identifiées chez les procaryotes. Il joue également un rôle important dans le transport cytoplasmique ainsi que dans le soutien de l'intégrité de certains organites. L'hypothèse de la présence d'un tel assemblage coordonnant les fonctions de la cellule a été proposé par Rudolph Peters en 1929 (453), mais le terme cytosquelette a été introduit par Paul Wintrebert en 1931(172).

2.4.1 - Les composantes du cytosquelette

Le cytosquelette est un système cytoplasmique composé principalement de trois fibres : les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules (Résumé dans la Figure 6 A, B et C). Ces filaments sont dynamiques et impliqués dans une grande partie des procédés cellulaires : du déplacement cellulaire à la ségrégation des chromosomes en passant par le système excrétoire de la cellule. La polymérisation de ces filaments se fait par l'hydrolyse de l'ATP, processus pouvant être à l'origine de certaines fonctions du cytosquelette. Par contre, la majorité des fonctions passent par les protéines motrices (Figure 6C). Ces protéines s'attachent sur le cytosquelette et, tout en utilisant l'ATP, se déplacent le long des filaments, déplaçant avec eux des vésicules, des macromolécules, des organites et des points d'ancrage de la

membrane plasmique. Le noyau possède son propre cytosquelette de filaments intermédiaires, les lamines, qui soutiennent la forme du noyau et fournissant aux pores nucléaires et à la chromatine un point d'ancrage (334).

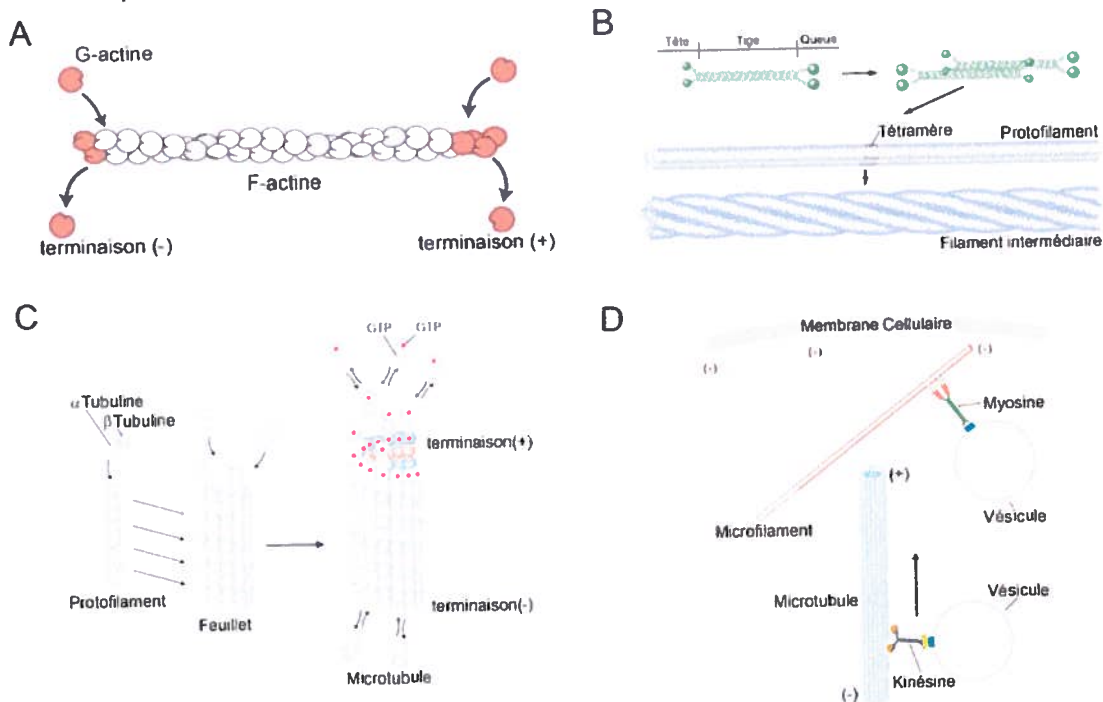


Figure 6. Les composantes du cytosquelette. (A) Les microfilaments et l'actine. La polymérisation se fait à partir de monomères (G-actine) et peut se faire par les deux extrémités, mais est favorisée à la terminaison (+). (B) Les filaments intermédiaires s'assemblent en dimères et par la suite s'associent en forme décalée pour finalement former le protofilament. Ceux-ci se tressent pour former les filaments intermédiaires. (C) L'assemblage des microtubules se fait à partir de dimères (α et β tubuline). En premier lieu, ils forment un feuillet qui se circularise pour former un cylindre. La polymérisation pour l'élongation est favorisée à l'extrémité (+). (D) Les moteurs d'actine sont nommés myosine et ceux des microtubules kinésines et dynéines. Leur mouvement est restreint à une direction. Modifié de Molecular cell biology (334).

L'actine est la protéine cellulaire la plus abondante dans la plupart des cellules. Elle est très conservée chez les eucaryotes; les protéines d'actine des amibes et des animaux ont 80% d'identité et certains homologues ont été identifiés chez les procaryotes (186). On retrouve six gènes de l'actine chez l'homme : quatre isoformes de α -actine, un de β -actine et un de γ -actine (617). Malgré la similarité de séquence entre elles, les différentes isoformes d'actine sont présentes dans différentes structures : les structures contractiles, les fibres de stress et à la pointe de mouvement des cellules (280). L'actine existe sous deux formes : les monomères G-actine et la forme assemblée ou filamenteuse, la F-actine. L'assemblage des filaments requiert

l'énergie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP et certains ions, tels que Mg^{2+} , K^+ ou Na^+ . Le processus d'assemblage est réversible, puisque la dépolymérisation des microfilaments entraîne la transformation de F-actine en G-actine. L'assemblage débute par la formation d'un noyau de trois à quatre molécules d'actine, suffisamment stable pour permettre l'élongation en un filament de 7 nm de diamètre, impliquant entre autres le complexe Arp2/3 (500). Les filaments d'actine, ou microfilaments, sont polaires, c'est-à-dire qu'il possède un bout où la pochette contenant l'ATP est exposée (+) alors que l'autre bout ne l'est pas (-); la polymérisation est plus rapide à l'extrémité (+). L'assemblage est régulé par des protéines qui interagissent avec G-actine, telle la thymosin β_4 , qui contrôle la disponibilité des monomères (315). Il y a des protéines de terminaison d'assemblage qui mettent fin au processus tandis que d'autres coupent les filaments. Les filaments formés sont par la suite assemblés à l'aide de protéines de «cross-linking», telles que fimbrine et fascine, qui avec leurs deux domaines de liaison à l'actine permettent l'attachement des différents microfilaments entre eux.

Les filaments intermédiaires sont présents dans une grande majorité des animaux, mais pas chez les plantes et les champignons. Leur rôle est principalement structural et ils s'associent aux membranes plasmique et nucléaire par des protéines d'ancrage apportant un support mécanique. Contrairement aux microfilaments et microtubules qui sont des filaments dynamiques, les filaments intermédiaires forment une structure stable, mais ils possèdent une certaine plasticité et élasticité. Ils forment un filament de 10 nm qui est structuré en forme d'hélice α , contrairement aux chaînes linéaires formées par l'actine ou les tubes creux de microtubules. Leur assemblage demeure nébuleux, mais les monomères ne s'attachent pas directement aux molécules d'ATP ou de GTP. Il existe différents types de monomères, classés selon les tissus ou sous-compartiments où ils sont retrouvés, et qui varient grandement dans leur séquence. Les lamines forment le cytosquelette du noyau, les kératines sont exprimées dans les cellules épithéliales, les neurofilaments sont seulement retrouvés dans les neurones et les filaments intermédiaires de type III regroupent les filaments exprimés dans plusieurs types cellulaires (171). Malgré la divergence de séquence, les différentes protéines des filaments ont une structure commune, formant une région centrale en hélice α bordée de domaines globuleux. La dépolymérisation des filaments intermédiaires est médiée par la phosphorylation, un processus bien illustré par la phosphorylation des lamines par la kinase dépendante de cycline 2 (Cdc2) lors de la mitose. Les filaments intermédiaires sont reliés entre eux par les protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAPs), telles que les plakines. Ils s'associent également à d'autres structures cellulaires telles que la membrane plasmique, les microfilaments et les microtubules (73, 201, 471).

Les microtubules sont composés de sous-unités globulaires de tubuline qui s'assemblent en un cylindre de diamètre de 25nm, le plus large des filaments cellulaires. Ils sont également plus rigides que les autres filaments cellulaires. Leur structure leur permet d'effectuer des mouvements de haute force de poussée sans se briser (323, 536). Les microtubules sont présents dans toutes les cellules eucaryotes et leur séquence est hautement conservée, même que des homologues sont présents chez les procaryotes. Les cellules possèdent deux types de population de microtubules, stable et instable. Les filaments stables composent les structures telles que les cils, les flagelles, les axones, ainsi qu'une structure permettant le déplacement de vésicules. Les structures instables sont par exemple celles formées lors de la mitose, qui s'assemblent rapidement et sont dépolymérisées une fois la division cellulaire terminée.

Il existe trois gènes de tubuline, les deux premiers forment un hétérodimère qui compose les microtubules (α et β) alors que le troisième aide à l'assemblage du dimère (γ). Chacune des deux sous-unités s'attache à une molécule de GTP, mais seulement celle liée à β -tubuline est hydrolysée suivant l'attachement à un autre dimère (427). Les hétérodimères interagissent non seulement avec les autres unités suivantes dans la chaîne, mais également avec celles de chaque côté (426). L'assemblage se fait d'abord par la formation de chaînes, qui forment par la suite des feuilles et vont par la suite former un cylindre. Puisqu'ils sont formés d'hétérodimères, les microtubules sont polarisés : une extrémité est exclusivement composée de α -tubuline (-) et l'autre de β -tubuline (+) (323). L'assemblage et le désassemblage des microtubules sont favorisés à l'extrémité (+) et sont contrôlés, tout comme pour les filaments d'actine, par la disponibilité de sous-unités. La vaste majorité des microtubules s'assemblent en tubes simples. Par contre, certains organites présentent des structures spécifiques de tubuline, tels que des arrangements doubles (flagelle, cilia) ou triples (centrioles, corps basal) (334). Plusieurs protéines sont impliquées dans le réarrangement des microtubules et sont appelées "microtubule-associated proteins" (MAPs). Elles sont divisées en deux classes : celles qui stabilisent la structure des microtubules, telles que MAP1A et MAP1B, et celles qui déstabilisent, telle que la katanine (645).

Les déplacements sur les structures du cytosquelette se font par des moteurs de déplacement spécifiques à chaque filament (526). Les déplacements sur les microfilaments sont générés par les molécules de myosine. Elles consistent d'une ou de deux chaînes lourdes, composées de domaines tête, cou et queue, et de chaînes légères qui régulent l'activité du moteur. La tête hydrolyse l'ATP pour générer le mouvement et la queue s'attache au cargo. Le

mouvement s'effectue en direction de l'extrémité (-), excepté pour la myosine V, qui elle se dirige vers le (+) (115).

Le transport sur les microtubules est effectué par deux classes de moteurs : les kinésines et les dynéines. Leur structure est similaire à la myosine, ayant une tête, un cou et une queue. L'activité y est aussi régulée par des chaînes légères (512, 623). La plupart des kinésines dirigent le transport vers l'extrémité (+) alors que les dynéines se déplacent vers l'extrémité (-). L'exception est la kinésine Ncd impliquée dans la mitose, plus spécifiquement dans les fuseaux reliés au centriole, qui migre vers l'extrémité (-) (660). L'attachement des moteurs à leur cargo passe normalement par des molécules à la surface des vésicules ou présentes dans la membrane, mais également par des protéines intermédiaires telles que la dynactine (530). Les filaments intermédiaires ne possèdent pas de moteurs étant donné leur rôle structural.

2.4.2 - Rôles du cytosquelette

Les différentes parties du cytosquelette ont un rôle important à jouer dans différentes fonctions cellulaires. Les filaments intermédiaires sont les plus restreints dans leur fonction, jouant un rôle primordial dans le maintien de la structure de la cellule, du noyau et des axones. Leur structure forte, mais élastique, leur permet de résister au stress sans se briser (173, 294).

L'actine peut, en se polymérisant et se dépolymérisant, induire une force permettant d'effectuer plusieurs types de mouvements. L'attachement de moteurs à une surface fixe, telle la membrane plasmique, suivi d'une polymérisation d'actine induit un phénomène appelé "actin treadmilling" qui, grâce à la polarité des microfilaments, permet d'induire un mouvement directionnel (459). Ces mouvements peuvent mener à un déplacement de la cellule, ou encore à la formation de pseudopodes (99). L'actine est également impliquée dans les déplacements intracellulaires, entre autres dans le recyclage des membranes (109). Les microfilaments ont également été impliqués dans l'endocytose (492). L'actine joue un rôle important dans la division cellulaire où plusieurs rôles lui ont été découverts; en plus d'être responsable de la formation du sillon de division à l'aide de la myosine II (458), l'actine est importante pour le déplacement des centrosomes (499), le mouvement des chromosomes (324) et la ségrégation des protéines endommagées (333). Un des rôles les plus connus de l'actine réside dans la contraction des muscles squelettiques ou lisses. L'actine agit de concert avec la myosine dans des assemblages complexes, nommés sarcomères, qui résultent en une force contractile (478).

Les microtubules jouent un rôle central dans l'organisation de la cellule. Le centre d'organisation des microtubules (MTOC) oriente les projections de microtubules et détermine la

polarité de la cellule. Ce rôle organisateur est également visible dans la dépendance de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique sur un réseau de microtubules intacts pour leur structure (207, 338). La relation s'étend également à l'appareil sécrétoire où les moteurs et le réseau des microtubules est important pour le déplacement des vésicules (78, 625, 672). Les mouvements des cils et des flagelles impliquent cette partie du cytosquelette (214, 331, 591) ainsi que la croissance axonale (415, 588, 593). Finalement, les microtubules sont également impliqués dans la division cellulaire à plusieurs niveaux, entre autres dans la ségrégation des chromosomes (126), la formation des centrosomes et des fuseaux (594).

2.4.3 - Le cytosquelette et l'infection virale

Puisque le cytosquelette est primordial à plusieurs mécanismes cellulaires, il n'est pas surprenant que les virus aient trouvé plusieurs moyens de détourner ses fonctions à leur avantage. Les premières observations de changement au cytosquelette lors d'infections virales sont survenues lorsqu'il a été démontré que la morphologie de cellules infectées change, devenant sphérique (16, 17, 18). La subversion du cytosquelette survient majoritairement pour aider à trois étapes cruciales du cycle du virus : l'entrée virale, l'assemblage des virions et la sortie de la cellule. Les virus doivent utiliser le cytosquelette pour un transport efficace dans le cytoplasme étant donné que le fort poids moléculaire des particules virales rend impossible le déplacement par diffusion simple (59, 339). Considérant une direction constante de mouvement, la vitesse maximale de diffusion libre dans le cytoplasme d'une capsid de HSV serait de 5 μm à l'heure (566).

L'entrée virale se fait à la surface de la membrane plasmique et l'actine est importante même à ces étapes précoces. L'interaction de certains virus avec leurs récepteurs peut enclencher un phénomène de regroupement des récepteurs à la surface. Par exemple, suite à l'interaction du VIH avec ses récepteurs CD4 et CXCR4, il y a induction d'un regroupement de ceux-ci par un processus dépendant des GTPases de la famille RHO et des protéines de remodelage de l'actine, comme la filamine et la cofiline (262). L'actine peut également contribuer, en collaboration avec la myosine II, à un phénomène appelé «viral surfing», où un virus est transporté à la surface de la membrane jusqu'à un site permissif à son entrée (317). Une autre restriction à l'entrée est la présence d'une structure dense d'actine sous la membrane plasmique, l'actine corticale. L'attachement du VIH induit un remodelage de cette structure en dépolymérisant l'actine corticale (668).

Une autre stratégie pour faciliter l'entrée virale et augmenter le taux d'infection est de stimuler un remodelage de la membrane plasmique. Le VHS agit à la surface de la cellule en

stimulant la formation d'extension de membranes cytoplasmiques par la polymérisation d'actine sous la surface, conduisant à une entrée virale par endocytose plutôt que par fusion (91). Ce type de projection permet non seulement l'entrée de virions à la surface, mais également de ceux à proximité. Certains virus entrent dans la cellule par la voie endosomale en stimulant l'activité de l'actine dans la formation de vésicules, d'autres en stimulant la macropinocytose (373, 510) ou encore en stimulant la formation de vésicules clathrine dépendantes (111, 226).

Suite à l'entrée, la particule virale doit être transportée par un mécanisme actif pour se rendre au site de réplication virale. Plusieurs interactions entre des capsides virales et des moteurs d'actine ou de microtubules ont été documentées. Certaines capsides interagissent avec les myosines pour un transport de courte distance jusqu'aux microtubules pour ensuite pouvoir utiliser les dynéines pour le transport au centre de la cellule. L'interaction avec ces deux moteurs peut se faire séquentiellement ou simultanément. Le transport de virus sur les microtubules jusqu'au MTOC a été documenté pour plusieurs virus tels que l'influenza, l'herpès et l'adénovirus (6, 80, 374, 474, 574, 587), mais certains groupes ont rapporté un transport indépendant des microtubules pour certains virus (198). Plusieurs virus contiennent des protéines qui interagissent avec la dynéine ou une molécule accessoire. Il y a par exemple la dynactine, utilisée pour le transport tel que l'hexon de la capside de l'adénovirus (60), VP35 du virus de l'Ébola (297), le complexe de transcription inverse du VIH (361) et les protéines VP1/2 et VP26 du téguement du VHS-1 (139, 474, 674). Le transport par la dynéine se termine au MTOC. Pour la plupart des virus à ARN, dont le cycle de réplication se déroule dans le cytoplasme, ce site convient à la formation de leur site de réplication, mais certains virus, spécialement les virus à ADN, doivent se rendre jusqu'au noyau (205, 644, 648).

Dans la plupart des cellules, le MTOC est situé à proximité du noyau, mais la traversée de cette distance par le virus, quoique courte, requiert d'autres facteurs cellulaires. L'adénovirus nécessite la présence du facteur d'export nucléaire CRM1, protéine qui peut interagir avec la kinesin-1 pour son transport du MTOC jusqu'au noyau (584). Peu est connu sur les stratégies utilisées par d'autres virus pour le transport jusqu'au noyau, mais certains modèles proposent une plus grande affinité de la capside pour le noyau ou certains de ses facteurs, que pour le MTOC (24). Certaines expériences avec le VIH ont démontré un rôle potentiel pour l'actine dans ce transport (12, 65). Également, une interaction des capsides du VHS-1 avec des moteurs dynéine et kinésine simultanément pointe vers une possibilité de transport dirigé vers l'extrémité (+) des microtubules suivant l'arrivée au MTOC pour se diriger au noyau (474).

Suivant l'arrivée au site de réplication, le virus continue de remodeler la cellule pour soutenir et rendre plus efficace sa réplication. Les complexes de réplication de certains virus

sont associés à l'actine. Le génome du virus parainfluenza humain de type 3 est associé à des ribonucléoprotéines qui sont elles associées à l'actine. Cette association aux microfilaments est requise pour la synthèse d'ARN (213). La synthèse protéique de certains virus est également liée à une interaction avec le cytosquelette. Les ARNm du virus de la vaccine co-localisent avec les microtubules et une dépolymérisation de ceux-ci inhibe la traduction virale (351, 529). Similairement pour le virus influenza, la traduction efficace des transcrits passe par une interaction avec l'actine (460). Il a également été observé pour plusieurs virus à ARN négatif que la présence de monomères de g-actine ainsi que de profiline amplifie la réplication et l'assemblage, mais le mécanisme exact n'est pas connu (225).

Les virus non-enveloppés peuvent déclencher la lyse cellulaire pour leur sortie (603). Toutefois, la sortie de virus enveloppés requiert l'utilisation de mécanismes de transport cellulaire pour permettre une sortie efficace des virions de la cellule. Les virus tels que le PRV et VHS se répliquent et s'assemblent dans le noyau. Il a été démontré, par diverses expériences, qu'il y a transport des capsides à l'intérieur du noyau sur des filaments d'actines par la myosine V jusqu'à l'enveloppe nucléaire (161, 163). À la membrane nucléaire, comme il a été décrit précédemment, il y a dépolymérisation des lamines pour permettre le passage des capsides. Une fois dans le cytoplasme, le principe est similaire au processus d'entrée, mais les moteurs utilisés sont différents, vu la directionnalité de ceux-ci, utilisant des kinésines plutôt que des dynéines (78, 135). Il y a, tout d'abord, un transport le long des microtubules jusqu'à la membrane plasmique. Par la suite, l'actine corticale peut aider à la sortie par l'interaction des virions avec des moteurs de myosine, mais la densité de cette structure forme également une barrière. Ce rôle ambivalent est démontré lors du traitement à court terme de cellules avec un dépolymérisant d'actine- α , ce qui augmente la relâche du virus de l'anémie infectieuse équine (83), par contre l'exposition à long terme inhibe la sortie du VIH (523). L'intégrité de l'actine est également importante pour le maintien de structures membranaires, telles que les radeaux lipidiques, qui sont importants pour l'enveloppe de certains virus, telle que celle du virus de l'influenza (554).

Les virus peuvent également réorganiser le cytosquelette afin de promouvoir l'infection cellule-cellule par la formation de synapses virales, comme pour le virus du VIH ou «human T-cell lymphotropic virus» (HTLV) (249, 414, 454). Le virus de la vaccine utilise également l'actine pour promouvoir l'infection de cellules avoisinantes. Une des formes du virus, les virus enveloppés intracellulaires, fusionne avec la membrane plasmique tout en restant associée à celle-ci par la protéine B5R. Ceci déclenche une cascade de phosphorylation menant à une rapide polymérisation de l'actine, formant des projections qui rapprochent le virus des cellules

avoisinentes (480, 561, 562). D'autres virus, tels que le VHS et les virus de la famille des *paramyxoviridae* et des *rétroviridae*, lors de leur sortie, induisent une polymérisation de l'actine (39, 158, 159, 218, 317, 540, 616).

2.4.4 - Myosine non-musculaire de type II a

Une des protéines d'intérêt du projet est la myosine non-musculaire de type II a (NM2a) (Figure 7). Cette protéine fait partie des moteurs moléculaires des microfilaments, famille où l'on retrouve plus de 15 classes différentes (535) ayant en commun trois caractéristiques : ils interagissent avec l'actine, hydrolysent l'ATP et produisent du mouvement (375, 534). Les myosines II sont les plus étudiées et elles forment une structure conventionnelle d'assemblage en homodimère par la formation de serpentins entre les régions de queues. Ces protéines possèdent également un domaine cou flexible ainsi qu'un domaine globuleux qui interagit avec l'actine et qui est responsable de l'hydrolyse de l'ATP (634). Les myosines non-musculaires de type II (NM2) sont séparées en trois sous-types : a, b et c. Leur distribution intracellulaire est différente possiblement due à une différence dans leur rôle (229, 277, 358, 388, 389, 408, 495). Plusieurs tâches sont associées à NM2 : la contraction cytoplasmique (100), la cytokinèse (121), la polarisation de la locomotion cellulaire (640), la croissance des neurites (659) ainsi que le trafic des membranes cellulaires (250). Ces moteurs, en plus des deux chaînes lourdes, possèdent deux chaînes légères (MLC) qui régulent leur stabilité (MLC17) et leur activité (MLC20). Une phosphorylation de MLC20 résulte en une augmentation de l'état d'activation de NM2. Plusieurs groupes ont établi une relation entre le VHS-1 et NM2a. Certains ont démontré un rôle pour ce moteur dans la sortie virale de la cellule en interagissant avec la protéine du tégument VP22. Ils ont observé une relocalisation de NM2a aux sites d'assemblage des virions. Cette interaction serait importante pour la production efficace de particules virales ainsi que pour la formation de projections membranaires (615). De plus, NM2a a également été proposée comme récepteur viral, interagissant avec gB. Le moteur serait activé et relocalisé à la membrane suivant l'attachement du virus, augmentant la susceptibilité des cellules à l'infection. Ils ont démontré qu'un blocage de cette interaction inhibe l'infection, la fusion cellule-cellule et réduit la pathogenèse (13).

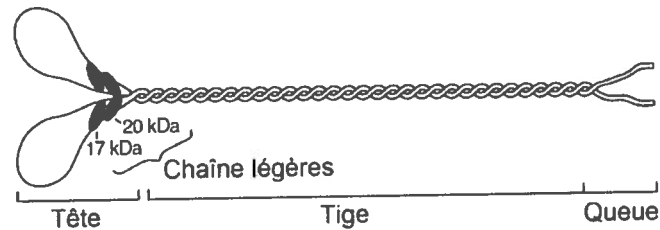


Figure 7. Structure du moteur d'actine Myosine non musculaire de type II a (102).

3 - La protéine virale UL24

3.1 - UL24 du VHS-1

Le nom UL24 vient du fait que ce gène est le 24^{ième} ORF de la région unique longue du génome viral. Les premières observations sur une potentielle activité de ce gène ont été réalisées dans le cadre d'expériences sur la région promotrice du gène *UL23*, la thymidine kinase. Lors d'insertion de mutations dans cette région, certaines de celles-ci ont mené à la formation de petites plages de lyse (96). Ces mutations se sont retrouvées dans le cadre de lecture d'UL24 vu son orientation tête-à-tête avec le gène *UL23*. Des essais ont par la suite démontré l'importance de ce gène pour une réplication virale efficace. Selon les séquences disponibles, ce gène est également conservé à travers l'ordre des *herpesviridae*, avec comme seule exception le «channel catfish virus» (117, 258). Vu les différences génomiques entre les virus, les homologues ne portent pas tous le nom UL24. Chez les autres HHV, les homologues sont : UL24 (HSV2), ORF35 (VZV), Bxrf1 (EBV), UL76 (CMV), U49 (HHV6 et 7) et ORF20 (KSHV). Dans la séquence d'UL24, plusieurs domaines ont été identifiés, dont un motif d'endonuclease (290), qui sera discuté ultérieurement, ainsi que des signaux de localisation (445). Le gène encode une protéine de 269 aa qui est très basique. Il a été déterminé dans notre laboratoire qu'UL24 a une localisation dynamique au cours de l'infection virale. Utilisant un virus muni d'une étiquette hémagglutinine (HA), il a été démontré qu'UL24 se localise transitoirement au nucléole au temps précoce de l'infection. Par la suite, elle se retrouve en périphérie du noyau ainsi que dispersée dans le cytoplasme aux temps tardifs. De plus, la dispersion d'une protéine du nucléole, la nucléoline, a été démontrée comme dépendante de la présence d'UL24 (345). Il a également été publié qu'UL24 pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M, suite à une inhibition du complexe cycline B/Cdc2 possiblement menant à l'apoptose (410, 411).

3.1.1 - Phénotype UL24-déficient en culture cellulaire

Comme décrit précédemment, l'identification du gène *UL24* s'est faite par l'observation d'une réduction de la taille des plages de lyse. En effet, une déficience en *UL24* résulte en la formation de plages de deux à trois fois plus petites qu'un virus de type sauvage (258). Ce handicap de réplication est également détecté lorsque l'on observe la cinétique de réplication virale, qui est inférieure d'un demi à un $\log_{10}$ lorsque comparé au virus de type sauvage KOS. Un autre phénotype relié à l'absence d'*UL24* est une réduction du nombre de capsides cytoplasmiques (344). Ce virus déficient, *UL24X*, forme également des plages de lyse syncytiales, c'est-à-dire que les cellules infectées fusionnent pour former des cellules multinucléées géantes, phénotype qui est plus pénétrant à haute température (257, 258). Seuls trois autres gènes du VHS-1 sont associés à ce phénotype et ils sont regroupés sous la dénomination «syn alleles». Ils codent pour les protéines gB, gK et *UL20* (506). *UL24*, tout comme gK et *UL20*, semble jouer un rôle inhibiteur sur la formation de ce type de plages (19, 20, 88, 165). Par contre, des mutations dans la séquence de gB favorisent la formation (131, 152, 181). Le VHS-1 ne forme pas normalement ce type de plages. Toutefois, d'autres virus de la famille des *herpesviridae* sont plus propices à la formation de syncytia, comme le virus VZV qui favorise la formation de polykaryocytes pour répandre l'infection de cellule à cellule (98).

3.1.2 - Expression de la protéine *UL24*

La protéine *UL24* est exprimée avec une cinétique «leaky-late», c'est-à-dire qu'elle est exprimée tardivement au cours du cycle de réplication virale, mais que son expression n'est pas strictement dépendante de la réplication de l'ADN viral (445). Cet ORF est à l'origine de plusieurs transcrits, six au total, qui débutent à trois sites d'initiation différents et qui se terminent à deux sites de poly-adénylation différents (Figure 8). Deux des sites d'initiation sont situés avant le début de l'ORF d'*UL24* et un est situé à l'intérieur, tronquant 113 aa de la portion N-terminale (104, 364). Les transcrits utilisent également deux sites de polyadénylation, celui du gène *UL24* situé à environ 1.4 kilo paires de bases (kb) du premier site d'initiation et un autre situé à environ 5.6 kb, le site de polyadénylation du gène *UL26*. La combinaison de ces différents sites donne trois transcrits courts (0.9, 1.2 et 1.4 kb) ayant une cinétique d'expression précoce alors que les transcrits longs (5.2, 5.4 et 5.6 kb) ont une expression tardive correspondant temporellement à l'expression de la protéine *UL24* (104, 445). De plus, il a été démontré que les transcrits utilisant le premier site d'initiation, formant les transcrits de 1.4 et 5.6 kb, sont importants pour l'expression de la protéine (445). L'expression d'*UL24* requiert également la présence de la protéine ICP27, une protéine multifonctionnelle impliquée, entre

autres, dans le transport des ARNm (220). Son absence résulte en une réduction de la localisation cytoplasmique des transcrits longs, mais pas des transcrits courts (446). La cinétique d'expression des transcrits et celle de la protéine UL24, ajouté au fait que l'absence d'ICP27 affecte les transcrits longs, indiquent que ces ARNm sont probablement responsables de l'expression de la protéine.

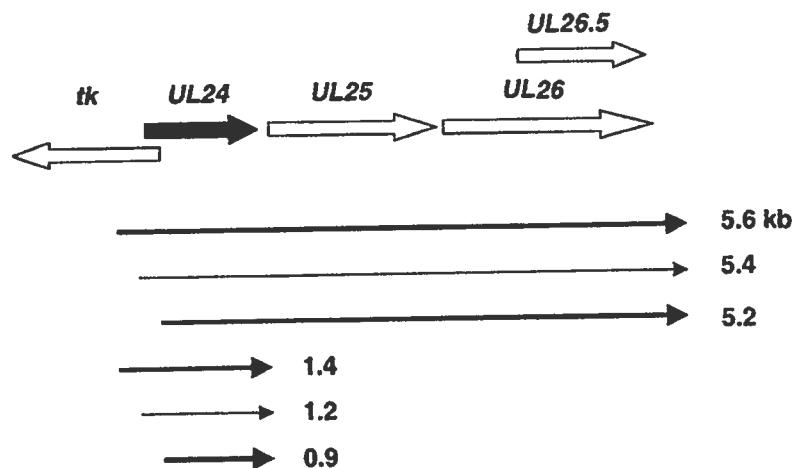


Figure 8. Figure représentant les transcrits contenant l'ORF d'UL24. Il y a trois sites d'initiation de la transcription et deux de polyadénylation, celui de UL24 et de UL26. Des trois sites d'initiation, un est situé à l'intérieur de l'ORF d'UL24. Le site de polyadénylation d'UL24 est faible alors que celui d'UL26 est fort. La combinaison de ceux-ci donne naissance à six transcrits : trois transcrits court et trois longs. (445)

3.2 - Domaines conservés de UL24

La comparaison de la séquence d'UL24 du VHS-1 et des homologues de plusieurs autres virus herpès a permis de découvrir la présence de cinq domaines hautement conservés, dénommés domaines d'homologie (HD), qui démontrent une identité de 65% au niveau des aa (258, 290). Ces régions se retrouvent principalement dans la région N-terminale d'UL24, qui est plus conservée que sa portion C-terminale. Certains résidus présents dans ces domaines sont conservés à plus de 90% au travers des différents homologues comparés. Ces résidus sont : H22, Y26, E69, V70, L72, R75, D78, I97, I98, E99, K101, Q117, G121, Q124 et Q154 (Figure 9).

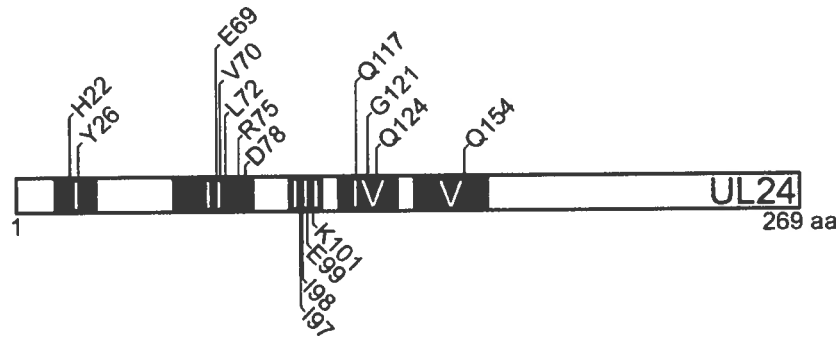


Figure 9. La protéine UL24 du VHS-1. Dénotés en noir avec les chiffres romains sont les domaines d'homologies. Certains des résidus hautement conservés sont inscrits.

3.3 - Homologues d'UL24

3.3.1 - UL24 du VHS-2

La séquence d'UL24 du VHS-2 est très similaire à celle de du VHS-1, démontrant environ 75% d'identité au niveau des aa. Elle encode une protéine de 281 aa avec une masse moléculaire de 32 kDa (363) et on y dénote la présence d'un signal de localisation nucléaire. Elle est également exprimée tardivement au cours de l'infection, détectée à partir de 9 hpi et son expression plafonne entre 12 et 24 hpi. Par contre, contrairement à UL24 du VHS-1, son expression dépend strictement de la réplication du génome viral. Elle se localise en périphérie du noyau à 9 et 12 hpi et au noyau dans des sous-compartiments à 16 hpi. En transfection, UL24 se localise dans le cytoplasme, mais elle est majoritairement nucléaire et une possible localisation nucléolaire peut être observée dans certaines cellules. La protéine est également détectée dans les virions, possiblement dans le tégument interagissant faiblement avec la capsidie contrairement à ce qui a pu être observé pour VHS-1 (336), mais qui est en accord avec certaines observations pour le CMV (631). Les auteurs suggèrent un rôle possible d'UL24 au niveau de la maturation du virion (245). Il a également été démontré pour le VHS-2 que le phénotype syncytial, dû à une mutation dans UL24, passe par un mécanisme différent que les syncytiums résultant d'une mutation dans gB (400).

3.3.2 - ORF35 du virus varicelle zoster

Le gène ORF35 du VZV code pour une protéine de 285 aa qui démontre une identité de séquence de 33% avec UL24 du VHS-1. La disposition de ce gène et de celui de la thymidine

kinase, ORF36, est également en orientation tête à tête, mais sans chevauchement des cadres de lecture. Le produit de ce gène se retrouve au noyau, tant en transfection que durant l'infection. La délétion de ORF35 résulte en la formation de plages de lyses plus petites. Également, l'impact de la délétion de ce gène sur la cinétique de croissance dépend du type cellulaire infecté, allant d'une différence négligeable dans des cellules lymphocytaires à une réduction d'un $\log_{10}$ dans des cellules épithéliales. Le VZV forme normalement des syncytia lors de sa réplication (98, 288). Par contre, la délétion de ORF35 provoque une formation aberrante de ces polykaryocytes. En effet, l'arrangement des noyaux ainsi que du Golgi est affecté et les projections faisant des ponts entre les cellules infectées sont absentes. Le patron distinct de localisation de gE dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique est devenu diffus suite à cette délétion du gène pour ORF35 (253).

3.3.3 - UL76 du cytomégalovirus

Le gène *UL76* du CMV code pour une protéine de 325 aa, dont plus de 20% sont des résidus basiques et ayant une masse moléculaire de 38 kDa. Elle démontre 27% d'identité avec *UL24* du VHS-1 et possède également un signal de localisation nucléaire. Les premières observations sur *UL76* ont été faites lors de la recherche d'un nouveau transactivateur de gènes viraux, stimulant les régions régulatrices majeures des gènes immédiats précoces (MIEPs). Il a été rapporté que cette protéine est exprimée de manière précoce lors de l'infection. Par contre, certaines observations tendent à démontrer qu'elle est en fait exprimée de manière tardive, puisque deux transcrits, de 4.5 et 5.5 kbp, ont été observés avec une cinétique tardive. La présence d'*UL76* tôt lors de l'infection serait plutôt due au fait qu'elle proviendrait du virion entrant, puisqu'elle est détectable dans des cellules nouvellement infectées en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique. En effet, il a été démontré que la protéine fait partie du virion et serait présente dans le tégument (631). En transfection, une version étiquetée d'*UL76* est majoritairement nucléaire et concentrée dans des régions globulaires, non sans rappeler le nucléole, et en infection la protéine est également nucléaire (630, 631). Le rôle de transactivateur d'*UL76* a été démontré par la transfection d'un plasmide d'expression pour celle-ci en parallèle avec des gènes rapporteurs pour certaines régions promotrices. Ils ont observé que, lorsque présente en faible quantité, *UL76* active les régions MIEPs, mais à plus forte concentration, elle a un effet inhibiteur (630). Une lignée stable exprimant *UL76* a été créée et l'on observe chez celle-ci une réduction de la croissance cellulaire ainsi qu'une réduction de la production virale et de la réplication du génome du CMV (631). Dans ces mêmes cellules, il a été rapporté que de nombreuses aberrations

chromosomales pourraient être le résultat de bris d'ADN et de la présence de centrosomes surnuméraires (548). UL76 pourrait jouer un rôle d'interrupteur sur l'expression des gènes immédiats-précoces, de par sa présence dans le virion, pour contrôler la latence. Il a également été publié que UL76 pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M, suite à une inhibition du complexe cycline B/Cdc2 (410).

3.3.4 - BXRf1 du virus Epstein Barr

Très peu est connu sur cet homologue d'UL24, sauf qu'il est toujours en orientation tête-à-tête avec le gène de la thymidine kinase, *BXLF1*, mais que les ORF ne se chevauchent pas. Il encoderait une protéine de 248 aa qui aurait une masse moléculaire prédite de 27 kDa et 28% d'identité avec UL24 du VHS-1.

3.3.5 - U49 du virus de l'herpès humain 6

Deux sous-types du HHV-6 existent : a et b. L'homologue d'UL24 chez ce virus est le gène *U49*. Il code pour une protéine de 252 aa de masse moléculaire prédite de 29.3 kDa. Il possède une identité de séquence protéique de 23% avec celle du VHS-1. Sa situation dans le génome est différente de celle retrouvée dans les autres virus humains puisqu'il se retrouve en orientation tête à tête avec le gène de *gH* (U48), sans chevaucher l'ORF. Par contre, il chevauche en partie C-terminale le cadre de lecture du gène *U50*, qui code pour une protéine reliée à UL25 du VHS-1. Le gène de la thymidine kinase est situé au cadre de lecture *U69*.

3.3.6 - U49 du virus de l'herpès humain 7

Ce virus appartient au même genre que le HHV-6. Son homologue d'UL24 se nomme également *U49* et présente la même situation génomique vis-à-vis *gH* et *U50* que chez le HHV-6. Également, l'on retrouve la thymidine kinase au cadre de lecture *U69*. Il code pour une protéine de 239 aa ayant une masse moléculaire prédite de 28.6 kDa qui présente 25% d'identité avec UL24 du VHS-1.

3.3.7 - ORF20 du virus du sarcome de Kaposi

Pour cet homologue, une seule étude a été faite et elle démontre que ORF20 pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M, suite à une inhibition du complexe cycline B/Cdc2 (410). Avec les séquences publiées, on peut constater que le gène ORF20 possède 36% d'identité avec UL24 du VHS-1 et donnerait une protéine de 28.5 kDa. Il y a chevauchement

avec le gène de la thymidine kinase, ORF21. Par contre, ce chevauchement n'est que de deux nucléotides.

3.3.8 - ORF20 du murine gamma herpes virus 68

Le virus herpès murin gamma 68 (MHV-68) est un parent proche du virus EBV et du KSHV (362). Beaucoup de similitudes existent entre les trois, ce qui fait de MHV-68 un bon modèle d'étude pour EBV et KSHV (412, 551). De plus, plus d'information est disponible sur son homologue d'UL24, ORF20. Cette dernière est une protéine de 28 kDa qui possède une localisation nucléaire. Lors de l'établissement de lignées d'expression stables pour ORF20, les cellules ne se divisent plus et finissent par entrer en apoptose. Ces observations ont mené à la découverte d'une fonction de cette protéine dans la progression du cycle cellulaire. Plus spécifiquement, elle induit un blocage en G₂/M et semble déclencher l'apoptose. Cet arrêt est probablement dû à une augmentation du niveau de cycline B, mais dans sa forme phosphorylée (inactive), ce qui entraîne une inhibition du complexe cycline B/Cdc2, nécessaire à la progression du cycle cellulaire (411). En comparant un virus sauvage ou déficient pour ORF20, aucune différence n'a été observée au niveau de la cinétique de croissance ou au niveau de la progression du cycle cellulaire. Des études *in vivo* avec ces virus n'ont pas démontré de différence au niveau des titres viraux, de l'établissement de la latence ou dans l'étendue de l'infection. Par contre, un délai dans la résorption de l'infection a été observé, puisque le virus déficient en ORF20 a pu être détecté dans une souris pour quatre jours de plus que le virus sauvage (409).

3.3.9 - UL24 du Bovine Herpes Virus 1

Ce virus fait partie de la famille des *alphaherpesvirus* et il encode un homologue d'UL24 chevauchant de deux nucléotides le gène de la thymidine kinase de par leur orientation tête à tête. Ce gène démontre 38% d'identité avec UL24 et 81% au niveau des HDs. Le gène est présent sur un transcrit de 5.2 kb qui a en commun le même site de polyadénylation que trois autres transcrits de 4.5, 2.2 et 1.3 kb. Seul le transcrit de 5.2 kb porte l'ORF de l'homologue d'UL24 et l'ablation de celui-ci n'a pas d'impact sur la croissance du virus en culture. En effet, un virus déficient n'est pas affecté quant à sa cinétique de croissance ou aux plages de lyse formées, même qu'aucune formation de syncytia n'a été observée (641). Il est possible que l'utilisation de différentes lignées cellulaires explique cette différence puisqu'il a été rapporté que le phénotype syncytial de UL24 du VHS-1 est dépendant du type cellulaire utilisé (602).

3.3.10 - ORF37 du virus de l'herpès équine 1

Le virus de l'herpès équine 1 (EHV-1) est un virus de la sous-famille des *alphaherpesvirinae* et du genre *varicellovirus*. Il cause des infections respiratoires et neurologiques et il peut engendrer des terminaisons de grossesse (5). Il possède un homologue d'UL24, le gène *ORF37*. Il code pour une protéine de 272 aa qui a une masse prédite de 29.2 kDa et une identité de 37% avec UL24 du VHS-1. Il est orienté tête à tête avec le gène de *TK* (*ORF38*), mais sans chevaucher son ORF. Son absence dans le virus n'affecte ni la taille des plages virales ni la cinétique de réplication du virus *in vitro*. Par contre, dans un modèle murin, un virus déficient pour ORF37 démontre une absence de symptômes neuronaux ainsi qu'une forte réduction de la pathogénicité. Les souris infectées par le virus déficient en ORF37 n'ont pas démontré de perte de poids et l'observation de coupes histologiques ne démontrait pas de différences importantes avec des animaux non-infectés. Par contre, les animaux infectés par le virus sauvage ou restitué démontrent une perte de masse importante ainsi que des effets importants en histopathologie au niveau des poumons et du cerveau (275).

3.4 - UL24 et la pathogénèse

3.4.1 - Importance d'UL24 du VHS-1 pour la pathogénèse et la réactivation

L'étude de l'impact d'UL24 *in vivo* a été compliquée par le chevauchement avec le gène de *tk*, important au niveau de la réplication dans les neurones, mais également essentiel pour la réactivation (95). Les virus ayant mené à la découverte d'UL24 *in vitro* ne pouvaient donc pas être utilisés *in vivo* puisque ceux-ci portaient des mutations dans le gène *tk* ou ses régions promotrices. Pour contourner ce problème, un nouveau virus, portant l'ajout de codons stop au résidu 53 a été généré : le virus UL24X (257). Chez ce virus, l'expression et l'activité de la TK ne sont pas affectées, mais le gène *UL24* est interrompu et ce virus démontre les phénotypes associés à une déficience en UL24 (258).

La réduction de l'efficacité de réplication observée *in vitro* avec un virus n'exprimant pas UL24 est également observée dans un système *in vivo* d'infection oculaire de souris par la scarification de la cornée et l'impact diffère selon le tissu infecté (318). En effet, on observe une diminution de la réplication du virus UL24X d'environ un $\log_{10}$ au niveau des muqueuses des souris lors de la réplication oculaire. La réplication aiguë au niveau des neurones est plus dramatiquement affectée avec une réduction de plus de quatre $\log_{10}$ dans les ganglions trijumeaux en comparaison avec le virus de type sauvage, KOS. Une réduction drastique de plus de 80% dans la réactivation virale *ex vivo* a également été observée suivant

l'établissement de la latence (257). La latence était établie puisque l'ADN viral de KOS et UL24X pouvait être détecté dans les ganglions du trijumeau infectés, quoiqu'à un niveau substantiellement inférieur pour UL24X avec une réduction de 2 log₁₀ de la quantité d'ADN viral. Les transcrits LATs, seuls transcrits abondamment exprimés lors de la latence, étaient également présents, mais avec une réduction d'un log₁₀ par rapport au virus KOS (257). Il semble donc que UL24 du VHS-1 soit un facteur important de pathogenèse (257, 319) et son absence a un impact profond sur les titres viraux dans les neurones, où les ressources disponibles pour la réplication des virus sont plus faibles, ainsi que dans la réactivation à partir de la latence.

3.4.2 - UL24 du VHS-2 et la pathogenèse

L'impact d'UL24 du VHS-2 sur la pathogenèse a également été testé en utilisant un virus mutant visant à rendre UL24 non fonctionnel, tout en conservant TK fonctionnel. Ce virus porte l'insertion d'une cassette β-glucuronidase dans le gène UL24 résultant en une délétion des derniers 100 aa, sans affecter l'activité de TK. Cette insertion résulte, *in vitro*, en la formation de plaques syncytiales, mais n'affecte pas la cinétique de croissance virale à basse ou haute multiplicité d'infection.

Dans un modèle murin d'infection intra-vaginale, une réduction drastique de 70 à 100% de mortalité a été constatée avec un virus déficient pour UL24 comparé au virus de type sauvage ou reconstitué. Une quasi-absence de lésions herpétiques a également été observée avec le virus déficient. La sévérité de la maladie, classifiée selon les symptômes, est également réduite et sa progression est retardée comparée au virus de type sauvage ou reconstitué. Des résultats similaires ont été obtenus avec un modèle d'infection de cochons d'Inde par voie intravaginale. L'intérêt de ce modèle est qu'il reproduit la phase de réplication aiguë et de latence du virus. Les observations démontrent que le virus déficient en UL24 peut se réactiver et que son ADN est détectable chez 70% des animaux infectés (50).

3.4.3 - La pathogenèse du VZV en relation à ORF35

La réplication du VZV, hautement associé à la cellule et la spécificité pour l'hôte lors de l'infection, rend l'étude *in vivo* des facteurs de pathogenèse de ce virus plus difficile que pour le VHS-1 (296). Un modèle utilisant des souris SCIDhu, dont le système immunitaire est absent et portant des xénogreffes de peau et de cellules T humaines, permet ces études (390). *In vitro*, l'impact de la délétion de l'ORF35 dépend du type de cellules infectées, ce qui est également observable *in vivo*. Dans les xénogreffes de peau, un impact important est observé avec la

délétion de ORF35 puisque cela résulte en une réduction d'un à deux et demi $\log_{10}$ du titre viral. Une réduction est également observée dans les greffes de cellules T, mais moindre avec une réduction d'un $\log_{10}$ aux temps précoces suivant l'infection (253). Ces résultats concordent avec les observations que l'impact de la délétion de l'ORF35 est dépendant du type cellulaire. Par ailleurs, l'impact plus important de la mutation sur la réplication au niveau épithélial va en accord avec le fait que la formation de syncytia est importante pour la propagation à ce niveau (254).

3.5 - Motif endonucléase putatif d'UL24

Une étude en bioinformatique a identifié un motif putatif d'endonucléase dans la séquence d'UL24, mais la fonction de celui-ci n'a toujours pas été démontrée. Ce motif, de type PD-(D/E)XK, est retrouvé chez plusieurs protéines impliquées dans la recombinaison et chez des enzymes de restriction. Entre autres, nous retrouvons des enzymes de réparation d'ADN et des résolvas de jonctions Holiday dans cette famille. Les résidus d'UL24 identifiés comme appartenant à ce motif sont présents dans les HDs II et III, quoique d'autres aa hautement conservés correspondent à des résidus importants pour l'activité enzymatique dans d'autres membres de cette famille. Certains de ceux-ci pourraient jouer un rôle important au niveau de la structure ou de la spécificité du substrat, tels que H22, Y26, E69, R75 et Q117 (indiqué dans la Figure 10). Utilisant des outils de prédiction de structure, il a été déterminé que la portion N-terminale d'UL24 serait hautement structurée. Par contre, la portion C-terminale, qui est moins conservée, serait peu ou pas structurée (290). La prédiction de ce motif est très difficile tant au niveau de la séquence qu'au niveau de la structure. Il est donc primordial, avant d'assumer des fonctions (293), de confirmer la fonctionnalité de ce motif, mais cette démonstration reste évasive.

Une enzyme virale possédant ce type de motif est UL12 (64). Cette enzyme possède une activité endo- et exonucléase et sa délétion résulte en une réduction drastique de formation de virus infectieux (234). La plupart des virions formés contiennent des génomes anormaux, dénotant un rôle de cette enzyme au niveau de la résolution des structures ramifiées formées lors de la réplication (461, 462). Il y a également eu de nombreuses démonstrations du rôle de cette enzyme dans la recombinaison, processus important lors de la réplication virale (461, 483, 485).

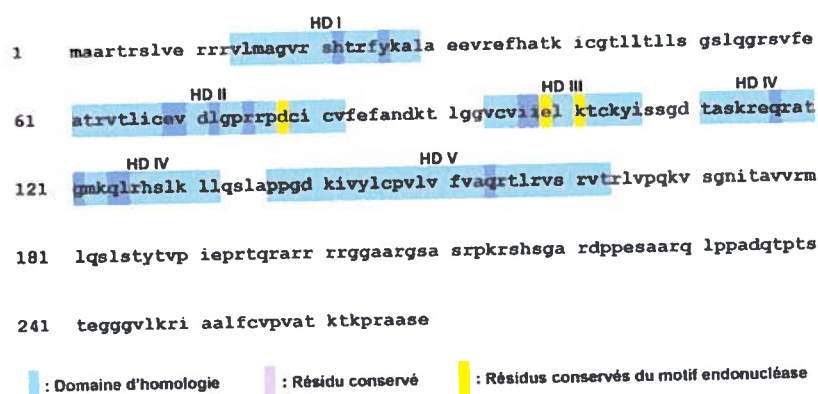


Figure 10. Séquence d'aa d'UL24 du VHS-1 indiquant les HDs, les résidus hautement conservés et ceux faisant partie du motif endonucléase qui seront analysés dans cette étude.

4 - Hypothèse de travail

Au début de ce projet, peu d'information était disponible sur la protéine UL24. Le gène codant est hautement conservé et en utilisant des virus déficients pour la protéine, plusieurs phénotypes ont été observés. Notamment, une réduction de la réplication ainsi que la formation de plages syncytiales ont été observées *in vitro*. Dans un modèle murin d'infection, un virus déficient en UL24 démontre une réplication diminuée dans les muqueuses ainsi que des titres viraux largement réduits dans les neurones. Le virus UL24 déficient démontre également une forte réduction de sa réactivation. La multitude et la diversité des conséquences dues à l'absence de cette protéine durant l'infection indiquent fortement qu'UL24 serait multifonctionnelle. Au laboratoire, il avait été démontré lors du début de mon projet qu'UL24 est importante pour la dispersion d'une protéine du nucléole lors de l'infection, la nucléoline. Ces informations nous ont conduits à formuler l'hypothèse qu'UL24 est une protéine multifonctionnelle et qu'elle effectue en partie ses fonctions par des interactions protéine-protéine. Une combinaison de stratégies de virologie moléculaire, biologie cellulaire et biochimique a été utilisée pour aborder cette question.

Le premier objectif de cette thèse était d'identifier les domaines fonctionnels de la protéine UL24. En premier lieu, nous avons testé si UL24 est directement responsable de la dispersion de la nucléoline ou si d'autres facteurs viraux étaient impliqués. Par la suite, nous voulions identifier les domaines de la protéine importants pour les phénotypes observés. Nous avons testé l'importance des différents HDs identifiés ainsi que le rôle des portions N- et C-terminales de la protéine. Nous avons aussi tenté d'identifier les séquences importantes pour la localisation d'UL24.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes penchés sur l'importance des résidus hautement conservés dans la fonction d'UL24. Certains de ceux-ci font partie du domaine putatif endonucléase tandis que d'autres non; nous voulions déterminer l'impact de la substitution de ces aa sur les fonctions d'UL24. Notre étude a voulu déterminer l'importance du motif endonucléase sur la dispersion de la nucléoline ainsi que sur les phénotypes observés *in vitro* lors de l'infection pour tenter de faire un lien entre cette activité d'UL24 et l'infection.

Finalement, nous voulions identifier des interactions protéine-protéine impliquant UL24 qui pourraient nous aider à élucider son mode d'action lors de la réplication virale. La fonction de ces protéines, si connue, nous aidera à réconcilier phénotype et fonction pour mieux comprendre l'impact d'UL24 au cours de la réplication virale.

Chapitre 2 : Première publication

Bertrand L. and Pearson A. (2008) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. J Gen Virol. May;89(pt5):1142-51

Résumé de la première publication

Titre : La portion N-terminale de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1 est suffisante pour induire une dispersion de la nucléoline.

Le gène UL24 est hautement conservé dans la famille *herpesviridae* mais sa fonction lors de l'infection n'est pas bien définie. Un lien a été établi auparavant entre UL24 et la dispersion de la nucléoline lors de l'infection. Dans cette publication, en exprimant cette protéine virale de manière transitoire hors du contexte d'infection, nous démontrons que cette protéine se localise au noyau ainsi qu'au Golgi. La majorité des cellules démontrent une localisation diffuse au noyau, mais pour certaines d'entre elles, UL24 se retrouve sous forme de points qui correspondent au nucléole. Son expression correspond avec une dispersion de la nucléoline, protéine majeure du nucléole, hors de ce sous-compartiment pour se retrouver diffuse dans le noyau. Cette relocalisation ne semble pas refléter une désorganisation majeure de la structure même du nucléole puisque la fibrillarine persiste toujours sous forme de point dans les cellules transfectées. L'expression de la portion N-terminale d'UL24, contenant les cinq domaines d'homologie, est suffisante pour induire cette dispersion. Par contre, la délétion d'un de ces domaines bloque cet effet, mais n'empêche pas la localisation au nucléole ainsi qu'aux autres sous-compartiments. Par ailleurs, les 60 premiers résidus sont suffisants à eux seuls pour induire cette localisation. En conclusion, nos résultats démontrent que la portion N-terminale d'UL24 est suffisante pour induire directement la dispersion de la nucléoline.

Contribution des auteurs

Luc Bertrand : Réalisation des manipulations, des figures de l'article; également la rédaction des sections matériel et méthodes et des légendes des figures; révision du manuscrit.

Angela Pearson : Rédaction des sections sommaire, introduction, résultats et discussion; Révision du manuscrit.

The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin.

Luc Bertrand and Angela Pearson*

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

Running title: UL24 induces nucleolin dispersal

Summary (238 words)

Main text (5095 words)

8 figures (1 Suppl. Fig. + 1 Suppl. Table)

* Corresponding author

Angela Pearson

531 boul. des Prairies

Laval, Québec

CANADA

Phone: 450-687-5010 ext. 4464

Fax: 450-686-5501

angela.pearson@iaf.inrs.ca

Summary

UL24 is widely conserved among herpesviruses but its function during infection is poorly understood. Previously, we discovered a genetic link between *UL24* and the herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of the nucleolar protein nucleolin. Here we report that in the absence of viral infection, transiently expressed *UL24* accumulated in both the nucleus and the Golgi. In the majority of transfected cells, nuclear staining for *UL24* was diffuse, but a minor staining pattern, whereby *UL24* was present in nuclear foci corresponding to nucleoli, was also observed. Expression of *UL24* correlated with the dispersal of nucleolin. This dispersal did not appear to be a consequence of a general disaggregation of nucleoli, as foci of fibrillarin staining persisted in cells expressing *UL24*. The conserved N-terminal region of *UL24* was sufficient to cause this change in subcellular distribution of nucleolin. Interestingly, a bipartite nuclear localization signal predicted within the C-terminus of *UL24* was dispensable for nuclear localization. None of the five individual *UL24* homology domains were required for nuclear or Golgi localization, but deletion of these domains resulted in the loss nucleolin dispersal activity. We determined that a nucleolar-targeting signal was contained within the first sixty amino acids of *UL24*. Our results show that the conserved N-terminal domain of *UL24* is sufficient to specifically induce dispersal of nucleolin in the absence of other viral proteins or virus-induced cellular modifications. These results suggest that *UL24* directly targets cellular factors that affect the composition of nucleoli.

Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) encodes over 80 proteins. The *UL24* gene is conserved among all three *Herpesvirinae* sub-families. *UL24* is required for efficient viral replication both in cell culture and in a mouse model of ocular HSV-1 infection, as well as for efficient reactivation (Jacobson *et al.*, 1998). *UL24* homologues in HSV-2 and varicella zoster virus (VZV) have also been shown to play a role in viral pathogenesis (Blakeney *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2005). In cell culture, *UL24* is one of a limited number of HSV-1 genes that when mutated causes the formation of syncytial plaques. The molecular basis for the phenotypes associated with *UL24* mutations is unknown.

UL24 of HSV-1 is a highly basic protein of 269 amino acids (aa). In contrast to the C-terminal domain of *UL24*, the N-terminal portion of the protein is highly conserved (Jacobson *et al.*, 1989). Within this region, five clusters of well-conserved stretches of amino acids have been identified, termed *UL24* homology domains (HD) (Fig. 1). More recently, a bioinformatics analysis suggested a PD-(D/E)XK endonuclease motif within the conserved region, the specific residues of which are contained within the second and third HD (Knizewski *et al.*, 2006). A putative bipartite nuclear localization signal has been identified in the C-terminal domain of the protein, the importance of which has yet to be determined. In both cellular fractionation studies and confocal microscopy, *UL24* protein has been found associated with the nucleus and is also present in the cytoplasm of infected cells (Lymberopoulos & Pearson, 2007; Pearson & Coen, 2002).

HSV-1 DNA replication, transcription and capsid assembly occur within nuclear structures termed viral replication compartments (reviewed in Knipe *et al.*, 2007). Infection with HSV results in dramatic changes to nuclear structure and organization. These include the marginalization of chromatin following the expansion of viral replication compartments (Monier *et al.*, 2000) and changes to the nuclear lamina (Scott & O'Hare, 2001; Simpson-Holley *et al.*, 2004). The centromeric proteins CENP-A, -B, -C are degraded (Everett *et al.*, 1999; Lomonte & Morency, 2007; Lomonte *et al.*, 2001). Promyelocytic leukemia or PML bodies are disrupted (Maul *et al.*, 1993; Maul *et al.*, 1996; Uprichard & Knipe, 1997), however, new subnuclear compartments are formed including VICE domains, which are positioned on the external periphery of viral replication compartments and are involved in the unfolded protein response (Burch & Weller, 2004). Electron microscopy has also revealed that during HSV infection, the

morphology of nucleoli is altered showing a more elongated structure (Besse & Puvion-Dutilleul, 1996).

Nucleoli constitute the sites of ribosome biogenesis, and more recently have been ascribed roles in cell cycle control as sites of sequestration of cell cycle modulators, and in response to stress (reviewed in Boisvert *et al.*, 2007). In previous work, we discovered that upon HSV-1 infection, UL24 partially localizes to nucleoli. Furthermore, we found that in addition to changes in the sub-nuclear distribution of the nucleolar protein fibrillarin, infection entrains the dispersal of the nucleolar protein nucleolin throughout the nucleus, in a manner dependent on the expression of UL24 (Lymberopoulos & Pearson, 2007).

The principal aim of this study was to test the hypothesis that *UL24* is not only necessary, but is sufficient to induce the dispersal of nucleolin, as part of our larger goal of understanding the role of nucleolar-localized UL24 in the modification of nucleolar organization during infection.

Methods

Cell Culture. COS-7 cells were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM) with high glucose, supplemented with 5% newborn calf serum, 50 units ml⁻¹ of penicillin and 50 mg ml⁻¹ of streptomycin. Cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂.

Plasmid construction. To generate a mammalian expression vector allowing the easy subcloning of the HSV-1 *UL24* gene, a DNA fragment containing the T7 promoter followed by a Pfl23II restriction site was produced by annealing the synthetic oligonucleotides 5' GATCTTAATACGACTCACTATAGGGCGTACGACTCGG and 5' GATCCCGAGTCGTACGCCCTATAGTGAGTCGTATTAA (Integrated DNA technologies) and was ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs) into the BamH1 site of a pCG-Zeo based vector (von Messling *et al.*, 2003) (provided by Veronika von Messling), forming pLBPfl. The *UL24* gene from the vector pAG5 (Griffiths & Coen, 2003) (provided by Donald M. Coen) or a version expressing UL24 fused with a hemagglutinin epitope tag (HA) from pKOSHA-UL24 (Lymberopoulos & Pearson, 2007) were excised using Pfl23II (Fermentas) and BamH1 (New England Biolabs) and inserted into pLBPfl that had been digested with the same restriction enzymes, forming the vectors pLBPfl-UL24 and pLBPfl-HA-UL24 respectively.

Deletions of the sequences corresponding to individual UL24 HDs were generated by PCR-based site-directed mutagenesis using pairs of primers flanking each HD, and the vector pKOSHA-UL24 as a template. Primers were either obtained with 5' phosphate groups, or were phosphorylated *in vitro* using T4 polynucleotide kinase (Fermentas). Deletion of the individual HDs were performed as follows: delHD1 (aa 14 to 28 inclusively) was constructed using the primers **DelHD1-5'** and **DelHD1-3'**; delHD2 (aa 61 to 81 inclusively) with **DelHD2-5'** and **DelHD2-3'**; delHD4 (aa 111 to 131 inclusively) with **DelHD4-5'** and **DelHD4-3'** and delHD5 (aa 140 to 165 inclusively) with **DelHD5-5'** and **DelHD5-3'**. The clone obtained for the deletion of HD3 using primers **DelHD3-5'** and **DelHD3-3'** contained an unexpected additional deletion of two aa at the 5' end of the domain HD3, resulting in a deletion of aa 92 to 107 instead of 94 to 107. This mutation was particularly difficult to obtain, and thus we went forward with this clone despite the deletion of the two extra residues.

A deletion corresponding to the N-terminal portion of UL24, which includes all five HDs, was obtained by restriction digest of pKOSHA-UL24 with Pfl23II and Bst11071 (Fermentas). The plasmid was then re-ligated by inserting a synthetic linker that restored the sequence from the Pfl23II site to the end of the sequence corresponding to the HA tag (annealed oligonucleotides **HAdeIN-top** and **HAdeIN-bot**). This resulted in an 86 aa protein beginning at residue 190 of UL24. To generate the C-terminal truncated version of HA-UL24, stop codons were introduced into the *UL24* open reading frame (ORF) in all three frames by inserting the annealed oligonucleotides **DelC-top** and **DelC-bot** into the Bst11071 restriction site, causing translation to end at aa 192 inclusively.

Vectors expressing fragments of UL24 as fusion proteins with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) were constructed as follows. Segments of *UL24* flanked by 5' HindIII and 3' Kpn1 restriction sites were either amplified by PCR using Pfu polymerase or constructed by annealing two oligonucleotides. The primers **S1-S** and **S2-E** were used for fragment S1-S2, **S1-S** and **S3-E** for S1-S3, **S2-S** and **S3-E** for S2-S3 and **S3-S** and **S6-E** for S3-S6. Primer sequences are detailed in Supplementary data. The PCR products were cloned into the plasmid pCR-TOPO-BluntII (Invitrogen) and subsequently excised with HindIII and Kpn1 (New England Biolabs). The inserts obtained were each ligated to the vector pEGFP-N1 (Clontech) that had been digested with HindIII and Kpn1.

Protein expression. To assess protein expression levels, 1×10^5 COS-7 cells were seeded per well in 6-well plates. The following day, cells were transfected with 3 μ g (unless indicated

otherwise) of pLBPfl-HAUL24 or mutant versions using Lipofectamine transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The luciferase expression vector pGL3 (Promega) was co-transfected to normalise loading volumes. Two days post-transfection, cells were washed with PBS, lysed in Luciferase assay lysis buffer, and assayed for luciferase activity using LARII luciferase assay reagent according to the manufacturer's instructions (Promega). Lysates were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis on a denaturing SDS 12.5% gel. The proteins were then transferred to a PVDF membrane, and analyzed by Western blotting using a monoclonal antibody directed against HA (Covance) and a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (Calbiochem). Detection was by enhanced chemiluminescence using ECL plus reagents (GE).

Confocal microscopy 4×10^4 COS-7 cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates. 24 hours later, cells were transfected with expression plasmids using Eugene6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. Two days post-transfection, cells were immunostained as described previously (Lymberopoulos & Pearson, 2007). The following primary antibodies were used: anti-HA high affinity (Roche), anti-Nucleolin (Santa Cruz or Abcam), anti-Fibrillarin (Covance), anti-GM130 (BD Bioscience), anti-Golgin-97 (Invitrogen), anti-Mannosidase II (Abcam) and anti- α -Tubulin (Calbiochem). Secondary antibodies included anti-rat, anti-mouse or anti-rabbit polyclonals coupled to Alexa-488, Alexa-568, or Alexa 647 (Invitrogen), as indicated in the text. Following the immunostaining, where indicated, the coverslips were washed three times in PBS, and incubated for five minutes with Draq5 (Biostatus) diluted 1:10000 in PBS. The coverslips were washed twice more in PBS and mounted on glass slides using Prolong Gold Anti-Fade reagent (Invitrogen). For the nocodazole assays, cells were exposed to either 1% DMSO or 1% DMSO with nocodazole (Sigma) at a final concentration of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ at twelve hours post-transfection, and then fixed a further twelve hours later. The slides were visualized using the BioRad Radiance 2000 confocal with an argon-krypton laser at 488 and 568 nm (diode 638 nm) mounted onto a Nikon E800 microscope. Images were prepared using Adobe Photoshop CS2.

Results

Construction of UL24 mammalian expression vectors In order to study the activity of UL24 in the absence of other viral proteins, and as part of a structure-function analysis, we generated a series of mammalian expression vectors encoding UL24 of HSV-1 with an N-terminal HA tag. We previously demonstrated that *HA-UL24* retains wild-type activity when introduced into the

viral genome in replacement of the endogenous *UL24* gene (Lymberopoulos & Pearson, 2007). A diagram showing the various constructs is presented in Fig. 1a. In addition to the wild-type version (HA-UL24), plasmids encoding only the N-terminal (HA-UL24Nterm) or C-terminal domain (HA-UL24Cterm) of the protein, or full-length versions lacking individual HDs (HA-UL24delHD 1 to 5) were engineered. Expression of the modified proteins was confirmed by Western blot analysis of lysates prepared from transiently transfected COS-7 cells (3 µg plasmid DNA) (Figs. 1b and c). We noted that steady-state levels of the proteins were similar, except for HA-UL24Nterm and HA-UL24Cterm for which we detected lower and higher levels respectively than those seen for the full-length forms of the protein. In order to observe both HA-UL24Nterm and HA-UL24Cterm on the same Western blot, 20 times less vector DNA corresponding to HA-UL24Cterm (0.15 µg) was transfected than for HA-UL24 wild type and HA-UL24Nterm (3 µg) (Fig. 1c).

Localization of UL24 in the absence of other viral proteins We tested how the subcellular localization of HA-UL24 in transfected cells compared to what we had found during infection by confocal microscopy (Lymberopoulos & Pearson, 2007). We observed pronounced perinuclear staining in virtually all transfected cells, as well as nuclear staining (Fig. 2). Two patterns of nuclear staining were evident. In the majority of nuclei, staining for HA-UL24 was diffuse (Fig. 2b), however, in a minority of cells, HA-UL24 was present in nuclear foci (Fig. 2c). No immunostaining was detected when only the secondary antibody was used (Fig. 2a). We next undertook co-staining experiments to determine the nature of the cellular structures targeted by HA-UL24. The pattern of perinuclear staining was suggestive of Golgi, which is composed of three major compartments, the cis-Golgi, medial-Golgi and trans-Golgi. Evidence points to Golgi- and possibly endosome-derived vesicles as playing roles in the secondary envelopment of viral particles during egress (Harley *et al.*, 2001; Turcotte *et al.*, 2005). To determine if indeed the perinuclear staining we observed for HA-UL24 corresponded to Golgi, we co-stained for HA and golgin-97, a trans-Golgi-associated protein, and found that the staining overlapped directly with HA in 64% of cells (75 cells counted in total) (Fig. 3a). In contrast, staining for GM130, a cis-Golgi marker, appeared to surround that of HA-UL24 in most cells. We only observed direct overlap of the HA and GM130 staining in 15% of cells expressing HA-UL24 (86 cells counted in total) (Fig. 3b). We obtained an intermediate result when we co-staining using an antibody specific for mannosidase II (Fig. 3c), a marker for medial-Golgi, in that most cells exhibited partial overlap of staining with HA. The perinuclear staining we observed for HA-UL24 could also be indicative of the formation of aggresomes, which consist mainly of an

accumulation of misfolded proteins. To distinguish between these two possibilities, we tested the effect of nocodazole treatment, a microtubule depolymerisation agent (De Brabander *et al.*, 1976), on the cytoplasmic staining pattern seen for HA-UL24. Aggresome formation is tightly linked to the microtubule-organizing center, but once formed, its localization and shape is not affected by the disruption of the microtubule network (Johnston *et al.*, 1998). In contrast, the Golgi becomes fragmented under these same conditions (Rogalski & Singer, 1984). We found that treatment of HA-UL24 expressing cells with $1\mu\text{g ml}^{-1}$ nocodazole twelve hours post transfection (Fig. 3e), but not with DMSO alone (Fig. 3d), resulted in the absence of perinuclear staining for HA-UL24. These results support the notion that the perinuclear staining seen for HA-UL24 represents genuine Golgi localization.

To determine if the nuclear foci of HA-UL24 labelling we observed corresponded to nucleoli, cells were co-stained for HA and fibrillarin (Fig. 4a). Where foci of HA-UL24 staining were observed, the staining co-localized with that of fibrillarin, indicating that nucleolar localization of HA-UL24 was possible in the absence of other viral proteins. Interestingly, when we co-stained for nucleolin, we observed two patterns. In cells exhibiting foci of HA-UL24 staining, these foci co-localized with foci of nucleolin staining (Fig. 4b). However, in those cells where HA-UL24 staining was diffuse throughout the nucleus, the major staining pattern, staining for nucleolin was also diffuse (Fig. 4c).

UL24-induced dispersal of nucleolin To establish that the dispersal of nucleolin was indeed associated with UL24, we quantitated the effect of UL24 expression on the percentage of cells exhibiting this staining pattern. To identify transfected cells, the reporter construct pEGFP-N1 was co-transfected with either pLBPfl-UL24 or pLBPfl-HA-UL24, or the corresponding empty vector. We assumed that the majority of cells expressing eGFP would also contain the second expression vector. When we stained cells for nucleolin and counted the number of eGFP-positive cells that retained foci of nucleolin staining, we found that there was a positive correlation between UL24 expression and nucleolin dispersal (Fig. 5a). The effect was similar for UL24 and HA-UL24, in that an average of 70% of eGFP-positive cells co-transfected with a UL24 expression plasmid exhibited diffuse staining for nucleolin, as opposed to under 10% of cells transfected with the empty vector. Thus, UL24 was sufficient to induce the dispersal of nucleolin. This effect appeared to be specific, because in over 75% of cells expressing either UL24 or HA-UL24, foci of fibrillarin staining were detected (Fig. 5b). Furthermore, in triple labelling experiments, we found that foci of fibrillarin staining persisted in cells exhibiting diffuse nuclear staining for both HA-UL24 and nucleolin (Fig. 5c).

The N-terminal domain of UL24 is sufficient for targeting to the nucleus and dispersal of nucleolin. Analysis of the primary sequence of UL24 identified a putative bipartite nuclear localization signal in the C-terminal non-conserved region of HSV-1 UL24 (Pearson & Coen, 2002). We tested whether this domain functioned as the nuclear localization signal for UL24, and hence contributed to its ability to reach the nucleolus. We compared the localization and effect on nucleolin of the N-terminal domain, which contains the five HDs, to that observed with the C-terminal domain (Fig. 6). Because we had observed an approximately 40-fold difference in expression levels of HA-UL24Nterm and HA-UL24Cterm, we adjusted the relative amounts of plasmid DNA transfected accordingly (25 ng for HA-UL24Cterm and 1 µg for HA-UL24Nterm). We found a clear segregation with regards to the subcellular localization of the two parts of the protein. Surprisingly, the C-terminal domain containing the putative nuclear localization signal was excluded from the nucleus and accumulated in the Golgi (Figs. 6a and c). In contrast, the conserved N-terminal domain was detected exclusively in the nucleus (Figs. 6b and d), primarily in a diffuse pattern similar to what we had observed for full-length HA-UL24. Furthermore, foci of nucleolin were intact in cells expression only the C-terminus of UL24 (Fig. 6a), while those expressing the N-terminal domain exhibited diffuse nucleolin staining (Fig. 6b). We obtained the same results when identical amounts of each plasmid (200 ng) were used (data not shown). Furthermore, we confirmed that the staining pattern we observed for HA-UL24 did not change over a plasmid range 5 ng to 1 µg (Supplemental data). Thus, we concluded that the putative C-terminal nuclear localization signal was not required for the nuclear localization of UL24, and that the N-terminal domain of UL24 was sufficient for nucleolin dispersal.

UL24 homology domains are dispensable for nucleolar targeting Having determined that the conserved N-terminal domain of UL24 accumulated efficiently in the nucleus and induced the dispersal of nucleolin, we next tested the role of the HDs on these activities. A series of expression vectors encoding versions of UL24 lacking individual HDs were tested in transient transfection experiments (Fig. 7). Co-staining of cells for GM130 and HA-UL24 revealed that the HDs were dispensable for localization of the protein to the Golgi (data not shown). We also found that HA-UL24 proteins lacking any one of the five HDs were still able to localize to nuclear foci. When averaging the results from two independent experiments where between 93 and 266 cells were counted each time for each construct, we found the following. The percentage of HA-UL24-expressing cells exhibiting nucleolar foci of staining was only 4.6 +/- 2.4% for HA-UL24 wild-type, as expected; in contrast, the value was greater than 90% for each of the deleted-forms of HA-UL24, with values of 91.1 +/- 2.4% for HA-UL24del1; 95.9 +/- 1.3% for HA-

UL24del2; 96.7 $\pm$ 0.05% for HA-UL24del3; 95.9 $\pm$ for HA-UL24del4; and 97.0 $\pm$ 0.74% for HA-UL24del 5. Co-staining for fibrillarin revealed that these foci were nucleoli (data not shown). Interestingly, similar foci were also seen for nucleolin, indicating that, unlike wild-type UL24 (Fig. 7a), the deleted forms of UL24 had lost the ability to induce nucleolin dispersal (Figs. 7 b-f). Thus, the integrity of each of the HDs was required for UL24 to induce the dispersal of nucleolin, but not for targeting to nucleoli.

Identification of a nucleolar targeting signal in UL24 To identify the sequence in UL24 that directs nucleolar targeting, we undertook a systematic analysis. Vectors expressing various segments of UL24 as fusion proteins with eGFP were transiently transfected into COS-7 cells, and the ability of the fragments to direct eGFP to nucleoli was determined by confocal microscopy. Transiently expressed eGFP was distributed between the nuclear and cytoplasmic compartments, but was excluded from nucleoli (Fig 8c, left-hand panel), thus allowing the unambiguous determination of nucleolar-targeting in this assay. A schematic illustrating the various constructs tested is presented in Fig 8a. Full-length eGFP fusion proteins to fragments S1-S2, S2-S3, S1-S3 and S3-S6 were detected by Western blot (data not shown). Through standard deletion analysis we found that the N-terminal 60 aa fragment of UL24, when fused to eGFP, was sufficient to direct the protein to nucleoli (Fig. 8b). We found that in approximately 40% cells expressing eGFP-S1-S2, the eGFP signal was not excluded from the nucleolus as seen with eGFP alone. Of those, between 15 and 20% exhibited a prominent nucleolar signal as shown in Fig. 8c, middle panel. , Thus, we concluded that fragment S1-S2 contains a nucleolar localization signal.

Discussion

Localization of UL24 in the absence of other viral proteins The staining pattern we observed for HA-UL24 when expressed out of the context of infection showed similarities with the localization of HA-UL24 in infected cells (Lymberopoulos & Pearson, 2007). In each case, co-localization with nucleolar markers was observed, as well as perinuclear staining. However, while the perinuclear staining in transfected cells co-localized with the trans-Golgi marker golgin-97, in HSV-1-infected Vero cells, the Golgi becomes fragmented (Avitabile *et al.*, 1995; Campadelli *et al.*, 1993). The staining pattern for golgin-97 is greatly altered in HSV-infected Vero cells and we have not observed co-localization with HA-UL24 (Lymberopoulos and Pearson, unpublished data). Thus, it is possible that the perinuclear accumulation of HA-UL24

upon transient transfection and in the context of infection correspond to different structures, or perhaps virus-modified Golgi-related vesicles in the case of infected cells.

Our observation that wild-type UL24 of HSV-1, while able to target nucleoli, is more often detected dispersed throughout the nucleus may explain previous reports of dispersed nuclear staining, but not nucleolar localization, of the VZV *UL24* homologue, *gp35* (Ito *et al.*, 2005), and the murine gammaherpesvirus 68 homologue *ORF20* (Nascimento & Parkhouse, 2007). However, foci of nuclear staining suggestive of nucleoli have been observed for the HSV-1 *UL24* homologues of HSV-2 (Hong-Yan *et al.*, 2001) and human cytomegalovirus (Wang *et al.*, 2000). That cells were observed where both UL24 and nucleolin were dispersed but fibrillarin exhibited the typical staining pattern for cells in interphase, strongly suggests that UL24-induced dispersal of nucleolin is not a consequence of a general disaggregation of nucleoli. We propose that wild-type UL24 targets nucleoli leading to the dispersal of nucleolin, which is associated with the dispersal throughout the nucleus of UL24 itself.

UL24 induces dispersal of nucleolin Ribosome biogenesis is downregulated during HSV infection (Stenberg & Pizer, 1982; Wagner & Roizman, 1969). Nucleolin functions in both RNA polymerase I transcription and rRNA maturation, and thus plays an important role in ribosome biogenesis (Rickards *et al.*, 2007, and reviewed in Mongelard & Bouvet, 2007). An attractive hypothesis is that during infection, *UL24* contributes to this change in cellular metabolism through an effect on nucleolin. It remains to be determined if *UL24* is either necessary or sufficient to direct this down-regulation, and if so, whether the effect is direct or indirect. However, our finding that UL24 was sufficient to induce dispersal of nucleolin indicates that UL24 interacts directly with one or multiple cellular components. Nucleoli are also involved in cell cycle regulation (reviewed in Boisvert *et al.*, 2007). Because the spatial distribution of nucleolar proteins varies during the cell cycle, dispersing in M phase, it is possible that the effect of UL24 on nucleolin is related to an effect on cell cycle progression. Consistent with this hypothesis, it was recently reported that the *UL24* homologue of murine gamma herpesvirus 68, *orf 20*, when expressed in 293T cells, is associated with a cell-cycle block in G2 (Nascimento & Parkhouse, 2007).

Functional dissection of UL24 We discovered that the C-terminal domain of UL24 was both necessary and sufficient for targeting to the Golgi. Because Golgi-derived vesicles appear to play a role in the final envelopment of viral particles, one hypothesis is that this C-terminal domain would play a role in the modulation of membrane fusion events late in infection.

Disruption of these activities would then explain the syncytial plaque phenotype associated with *UL24* mutations. However, it is also possible that while Golgi-targeting information is contained within the C-terminus, functions encoded in the N-terminal portion of the protein are still required for fusion-related activities.

We found that the nucleolin dispersal activity was contained within the conserved N-terminal domain of *UL24*, suggesting that this function may be shared among virtually all herpesviruses, and represent a critical function in the viral life cycle. Our observation that deletion of any one HD abrogated the ability to disperse nucleolin could reflect the loss of specific interactions with cellular components, but it is also possible that the deletions impede correct folding without changing steady-state levels of the protein or inhibiting the nucleolar localizing activity. Contained within the *UL24* HDs are the sequences that make up the putative PD-(D/E)XK endonuclease motif. At present, the functionality of this motif is unknown, however, the amino acids constituting the predicted catalytic domain are highly conserved among herpesviruses of all families. The experiments presented here do not allow us to establish if the putative endonuclease motif plays a role in nucleolin dispersal. Further analyses involving mutations that specifically target the core residues of the putative catalytic site will be required to establish the importance of this motif in nucleolar modifications.

We found that a fragment corresponding to the first 60 aa of *UL24* was able to target nucleoli, however, it did not appear to be sufficient to disperse nucleolin, which suggests that functions in the remainder of the N-terminal domain of *UL24* must be important for this activity. This result is consistent with our finding that each of the HD deletions variants could target nucleoli but not affect the distribution of nucleolin.

Our discovery that expression of *UL24* alone is sufficient to modify the composition of nucleoli leads to further questions regarding the function of this cellular modification and the mechanisms involved. It will be of particular interest to determine the relationship between the nucleolin-dispersal activity of *UL24* and *UL24*-mutant phenotypes observed in cell culture and in an animal model of infection.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Marcel Desrosiers of the INRS-Institut Armand-Frappier Imaging Facility for technical assistance with the fluorescence microscopy experiments. We thank D. M.

Coen and V. von Messling for providing plasmids. We thank A. Griffiths for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research, the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to A.P. L.B. is a recipient graduate scholarships from the FRSQ and the Fondation Armand-Frappier. A.P. was named a Research Scholar of the FRSQ.

References

- Avitabile, E., Di Gaeta, S., Torrisi, M. R., Ward, P. L., 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**, 7472-7482.
- Besse, S. & Puvion-Dutilleul, F. (1996).** Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1), 119-129.
- Blakeney, S., Kowalski, J., Tummolo, D., DeStefano, J., Cooper, D., Guo, M., Gangolli, S., Long, D., Zamb, T., Natuk, R. J. & Visalli, R. J. (2005).** Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *J Virol* **79**, 10498-10506.
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. & Lamond, A. I. (2007).** The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 574-585.
- Burch, A. D. & Weller, S. K. (2004).** Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**, 7175-7185.
- Campadelli, G., Brandimarti, R., Di Lazzaro, C., Ward, P. L., Roizman, B. & Torrisi, M. R. (1993).** Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2798-2802.
- De Brabander, M. J., Van de Veire, R. M., Aerts, F. E., Borgers, M. & Janssen, P. A. (1976).** The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res* **36**, 905-916.
- Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Findlay, J. & Lomonte, P. (1999).** Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO* **18**, 1526-1538.
- Griffiths, A. & Coen, D. M. (2003).** High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J Virol* **77**, 2282-2286.
- Harley, C. A., Dasgupta, A. & Wilson, D. W. (2001).** Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol* **75**, 1236-1251.

- Hong-Yan, Z., Murata, T., Goshima, F., Takakuwa, H., Koshizuka, T., Yamauchi, Y. & Nishiyama, Y. (2001).** Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **22**, 321-327.
- Ito, H., Sommer, M. H., Zerboni, L., Baiker, A., Sato, B., Liang, R., Hay, J., Ruyechan, W. & Arvin, A. M. (2005).** Role of the varicella-zoster virus gene product encoded by open reading frame 35 in viral replication in vitro and in differentiated human skin and T cells in vivo. *J Virol* **79**, 4819-4827.
- Jacobson, J. G., Chen, S. H., Cook, W. J., Kramer, M. F. & Coen, D. M. (1998).** Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**, 161-169.
- Jacobson, J. G., Martin, S. L. & Coen, D. M. (1989).** A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**, 1839-1843.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. & Kopito, R. R. (1998).** Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of cell biology* **143**, 1883-1898.
- Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A. & Martin, M. A. (2007).** *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N. V., Rychlewski, L. & Ginalski, K. (2006).** Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**, 2575-2577.
- Lomonte, P. & Morency, E. (2007).** Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS letters* **581**, 658-662.
- Lomonte, P., Sullivan, K. F. & Everett, R. D. (2001).** Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J Biol Chem* **276**, 5829-5835.
- Lymberopoulos, M. H. & Pearson, A. (2007).** Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**, 397-409.
- Maul, G. G., Guldner, H. H. & Spivack, J. G. (1993).** Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2679-2690.
- Maul, G. G., Ishov, A. M. & Everett, R. D. (1996).** Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**, 67-75.
- Mongelard, F. & Bouvet, P. (2007).** Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* **17**, 80-86.
- Monier, K., Armas, J. C., Etteldorf, S., Ghazal, P. & Sullivan, K. F. (2000).** Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**, 661-665.
- Nascimento, R. & Parkhouse, R. M. (2007).** Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* **88**, 1446-1453.

- Pearson, A. & Coen, D. M. (2002).** Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**, 10821-10828.
- Rickards, B., Flint, S. J., Cole, M. D. & LeRoy, G. (2007).** Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol* **27**, 937-948.
- Rogalski, A. A. & Singer, S. J. (1984).** Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J Cell Biol* **99**, 1092-1100.
- Scott, E. S. & O'Hare, P. (2001).** Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**, 8818-8830.
- Simpson-Holley, M., Baines, J., Roller, R. & Knipe, D. M. (2004).** Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol* **78**, 5591-5600.
- Stenberg, R. M. & Pizer, L. I. (1982).** Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**, 474-487.
- 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**, 8847-8860.
- Uprichard, S. L. & Knipe, D. M. (1997).** Assembly of herpes simplex virus replication proteins at two distinct intranuclear sites. *Virology* **229**, 113-125.
- von Messling, V., Springfield, C., Devaux, P. & Cattaneo, R. (2003).** A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* **77**, 12579-12591.
- Wagner, E. K. & Roizman, B. (1969).** Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**, 36-46.
- Wang, S. K., Duh, C. Y. & Chang, T. T. (2000).** Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**, 2407-2416.

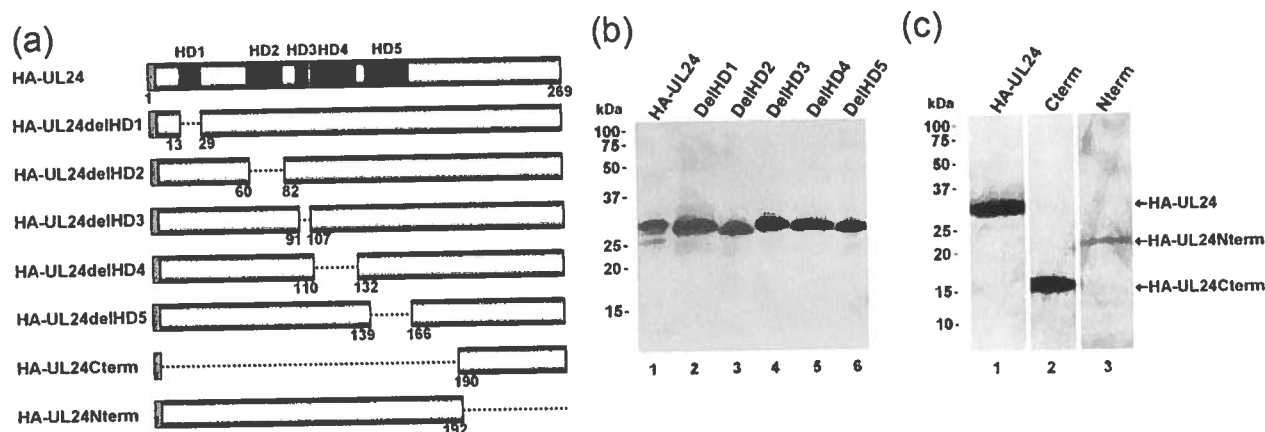


Fig. 1. UL24 deletions. Diagram illustrating the deletion series of HA-tagged UL24 proteins used. (a) The N-terminal HA tag is represented by a hatched box. For the wild-type protein, the HDs are shown in solid black; the remainder of the protein is in grey. Dotted lines represent the deleted regions. (b) Western blot showing the expression of the UL24 HD deletions. (c) Western blot showing the expression of the C-terminal and N-terminal portion of UL24. The positions of molecular mass markers are indicated to the left of the panels, and the position of the different UL24 proteins are indicated by arrows to the right.

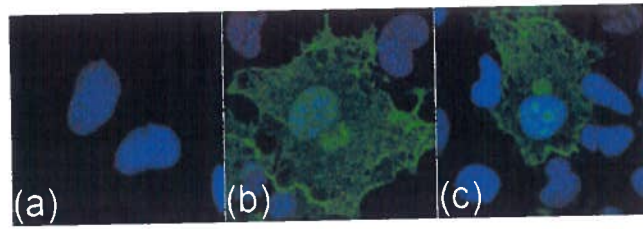


Fig. 2. Cellular localization of UL24 in the absence of viral infection. The localization of HA-UL24 in transiently transfected COS-7 cells was assessed by confocal microscopy. Nuclei were stained with Draq5 (blue) and HA-UL24 was visualised by indirect immunofluorescence using a primary antibody specific for HA and a secondary antibody conjugated to the fluorophor Alexa 488 (green). (a) Negative control showing staining with the secondary antibody only. (b) The major staining pattern observed for HA-UL24. (c) The minor HA-UL24 staining pattern.

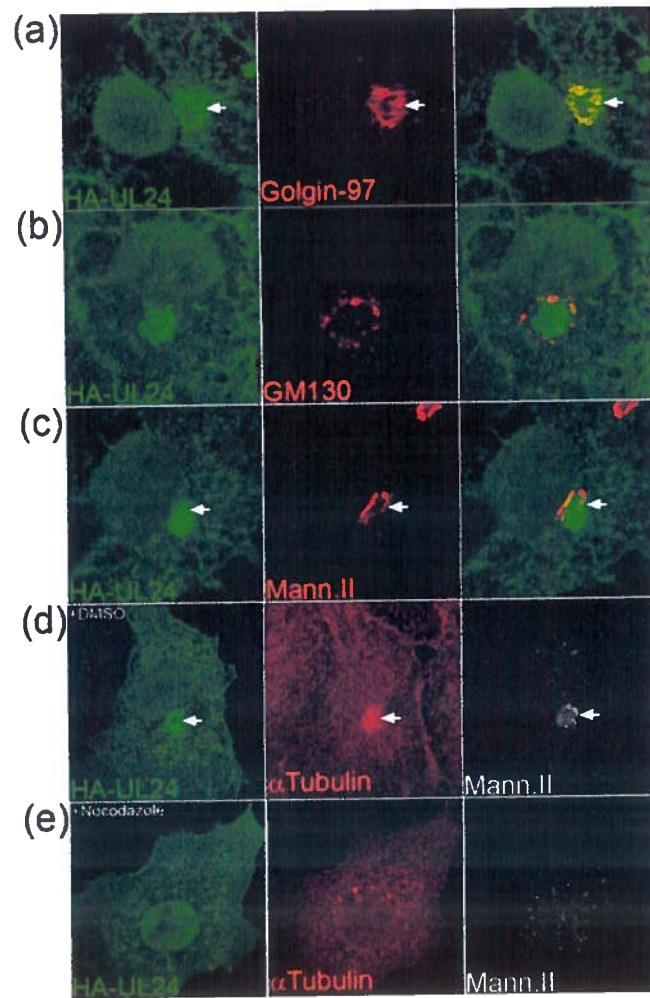


Fig. 3. Cytoplasmic localization of UL24. Confocal microscopy images showing cells dual-labelled for HA-UL24 and cellular markers. Transiently transfected COS-7 cells expressing HA-UL24 were co-stained for HA and either (a) Golgin-97, a marker for the trans-Golgi, (b) GM130, which localizes to the cis-Golgi, or (c), mannosidase II, a marker for the medial-Golgi,. Secondary antibodies coupled to either Alexa 488 (green) and Alexa 568 (red) were used to visualise HA-UL24 and the different Golgi markers respectively. Merged images are shown in the right hand panels. Arrows indicate sites of co-localization. (d) Twelve hours post-transfection with a plasmid expressing HA-UL24, cells were exposed to DMSO alone for another twelve hours, and then triple-stained for HA-UL24, α -tubulin, and mannosidase II. The secondary antibodies used were coupled to Alexa 488 (green), Alexa 568 (red) and Alexa 647 (white) respectively. (e) Twelve hours post-transfection with a plasmid expressing HA-UL24, cells were exposed to $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ of nocodazole in DMSO for another twelve hours, and immunostained as in (d).

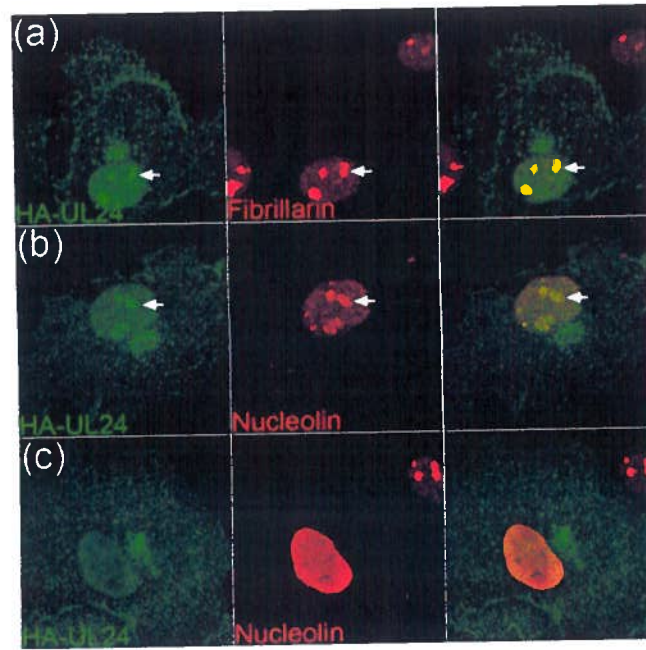


Fig. 4. Targeting of UL24 to nucleoli. Confocal microscopy images showing staining patterns for HA-UL24 and nucleolar markers. (a) COS-7 cells transiently expressing HA-UL24 were co-stained for HA and the nucleolar protein fibrillarin. Shown is a cell that exhibits the minor HA-UL24 distribution pattern. (b) Shown is a cell that exhibits the minor HA-UL24 distribution pattern co-stained for HA and nucleolin. (c) Shown is a cell that exhibits the major HA-UL24 distribution pattern co-stained for HA and nucleolin. Secondary antibodies coupled to Alexa 488 (green) and Alexa 568 (red) were used for HA and nucleolar proteins respectively. Merged images are shown in the right hand panels. Arrows indicate sites of co-localization.

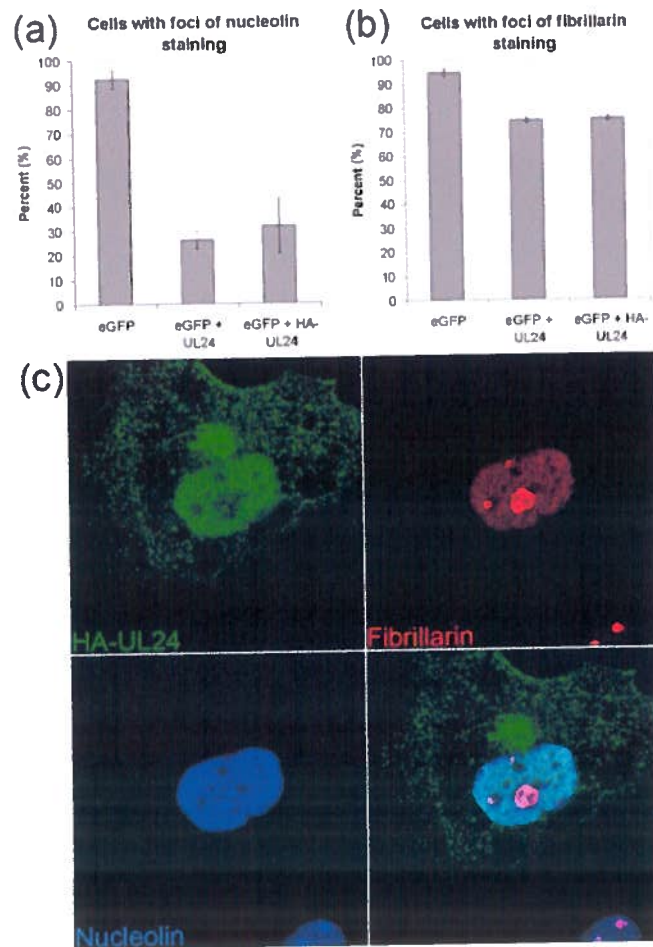


Fig. 5. UL24 induces dispersal of nucleolin. Quantification of the effect of UL24 on nucleolin dispersal. COS-7 cells were co-transfected with the eGFP expression plasmid pEGFP-N1 and either an expression plasmid for UL24, HA-UL24 or the corresponding empty vector. (a) Cells were stained for nucleolin and analyzed by confocal microscopy. The percentage of eGFP-positive cells retaining foci of nucleolin staining was scored. (b) Cells were stained for fibrillarin, and the percentage of eGFP positive cells exhibiting wild type foci of fibrillarin staining was assessed. Results represent the average of three independent experiments, in which 46 to 201 cells were counted for each individual co-transfection assay. Error bars represent the standard deviation. (c) COS-7 cells transiently expressing HA-UL24 were triple-stained for HA, fibrillarin and nucleolin, using secondary antibodies coupled to Alexa 488 (green), Alexa 568 (red) and Alexa 647 (blue) respectively. The merged image is shown in bottom right corner.

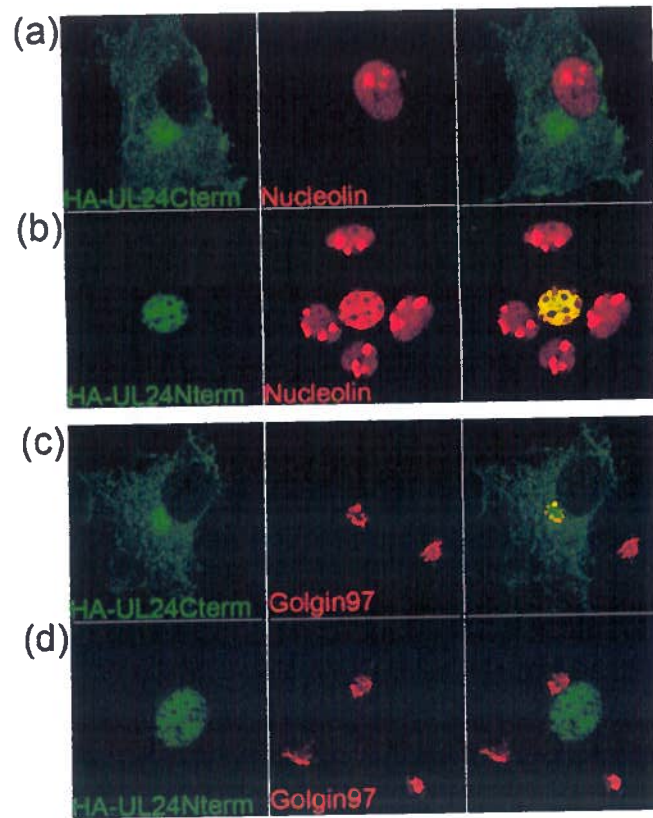


Fig. 6. The N-terminal portion of UL24 is sufficient to induce the dispersal of nucleolin. Confocal images showing the localization of the N- and C-terminal portions of UL24 in transiently transfected COS-7 cells. Shown in the upper two rows of panels are cells expressing either HA-UL24Cterm (a) or HA-UL24Nterm (b) that were co-stained for HA (green) and nucleolin (red). In the bottom two rows of panels are cells expressing HA-UL24Cterm (c) or HA-UL24Nterm (d) that were co-stained for HA (green) and GM130 (red). Secondary antibodies coupled to Alexa 488 or Alexa 568 were used respectively. Merged images are shown in the right-hand panels.

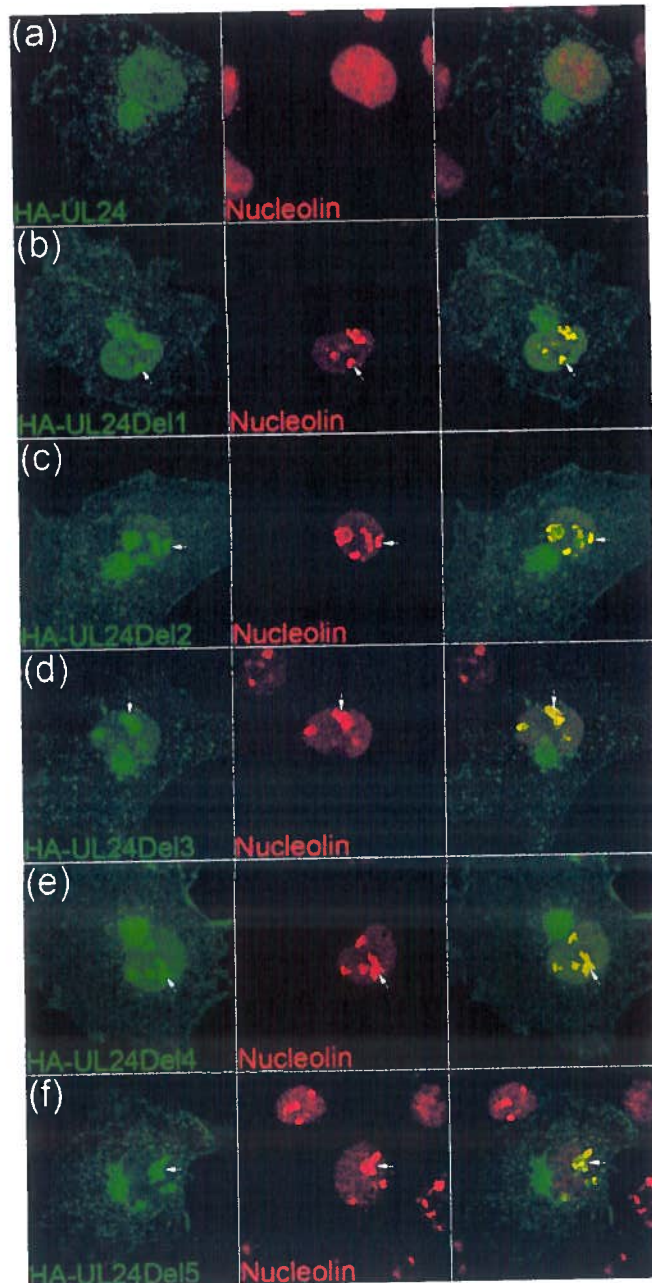


Fig. 7. Cellular localization of UL24 HD deletion variants. Confocal images showing co-staining for HA and nucleolin of cells expressing HA-UL24 proteins harboring HD deletions. (a) The major staining pattern for wild-type HA-UL24 is shown. (b-f) Localization of UL24 variants with deletions corresponding to HD 1 to 5 respectively. Secondary antibodies used were as described in Fig. 4. Merged images are shown in the right-hand panels. Arrows indicate sites of co-localization.

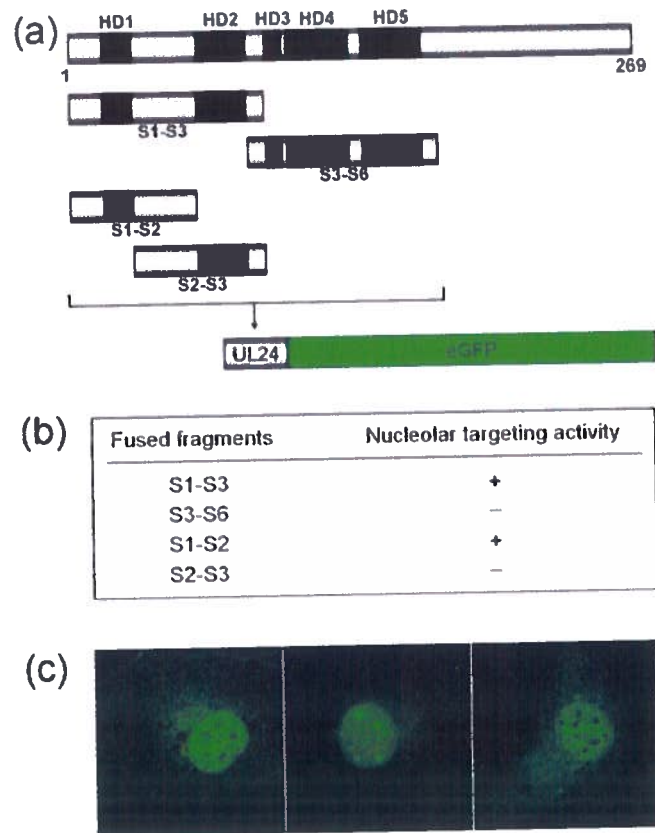
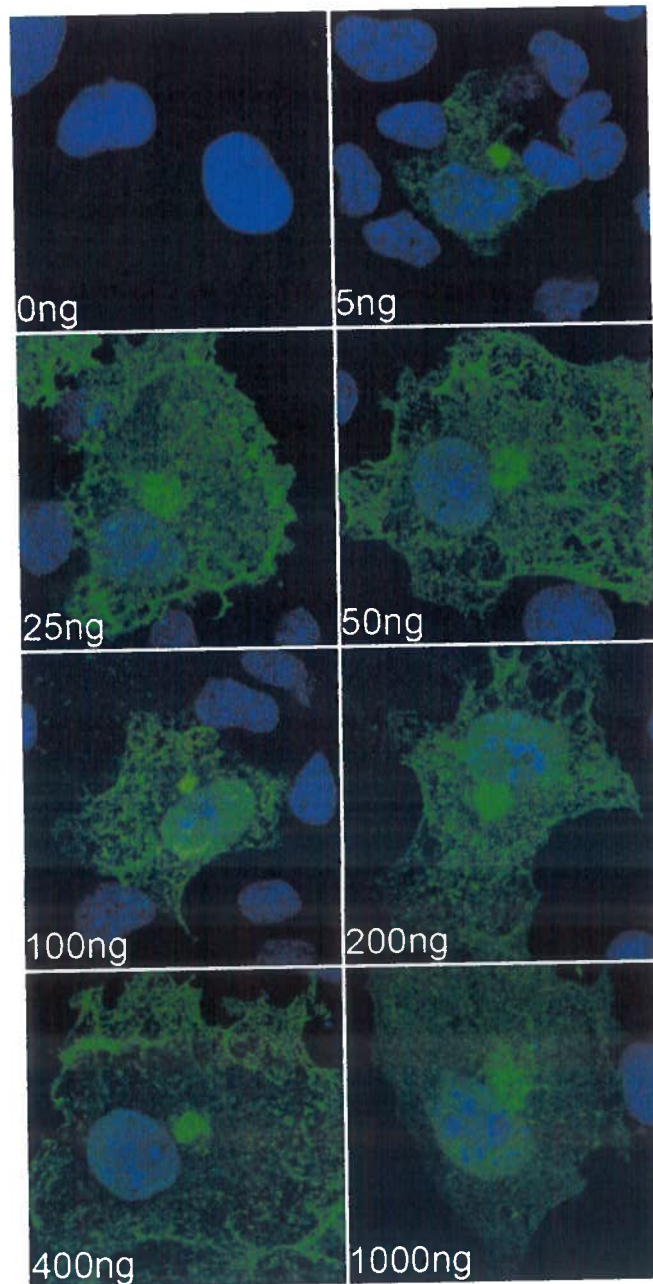


Fig. 8. Identification of a UL24 nucleolar-targeting domain. (a) Diagram illustrating UL24 fragments fused to eGFP. Fragments S1 to S6 correspond to the regions between HDs. (b) Summary of the nucleolar targeting activity detected for different UL24 fragments. (c) Confocal images showing, from left to right, the localization of unfused eGFP, eGFP fused to the fragment S1-S2 and eGFP fused to the fragment S2-S3.



Supplemental fig. 1. Intracellular localisation of UL24 in relation to the amount of DNA transfected. COS-7 cells transfected with different DNA concentration, indicated in the lower left corner of the panels. HA-UL24 was detected by indirect immunofluorescence using Alexa-488 (green) and nuclei visualised using Draq5 (blue).

Name	Sequence
DelHD1-5'	/5Phos/GCGTCTGCGTTCGACCAGGC
DelHD1-3'	GCCAAAGAGGTGCGGGAGTTTC
DelHD2-5'	/5Phos/CTCGAACACCGAGCGACC
DelHD2-3'	TTCGAATTCGCCAATGACAAG
DelHD3-5'	CCCGCCCAGCGTCTTGTC
DelHD3-3'	TCTTCGGGGACACCGCC
DelHD4-5'	GTCCCCGGAAGAAATATATTGC
DelHD4-3'	CAGTCCCTCGCGCTCCG
DelHD5-5'	ACCCGGAGGCGCGAGGG
DelHD5-3'	CGGCTCGTCCCGCAGAAG
HADelN-top	GTACGTCGGTTGCTATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGCCTA
HADelN-bot	TAGGCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATAGCAACCGAC
DelC-top	TACGGTCCCTGACTGACTGACCATTGA
DelC-bot	TCAATGGTCAGTCAGTCAGGGACCGTA
S1-S	GAGCTCAAGCTTATGGCCGCGAGAACGCGC
S2-S	GAGCTCAAGCTTATGGCCAAAGAGGTGCGGGAG
S2-E	CGGTACCGTCTCGAACACCGAGCGACCC
S3-S	GAGCTCAAGCTTATGGTGTTTTCGAATTCGCCAATGACAAG
S3-E	CGGTACCGTCCCGCCAGCGTCTTGTC
S6-E	CGGTACCGTGTATACGTGGACAGGCTCTG

Supplemental table 1. Primer sequences. List of primers used in the article and their sequence.

JGV

ISSN 0022-1317

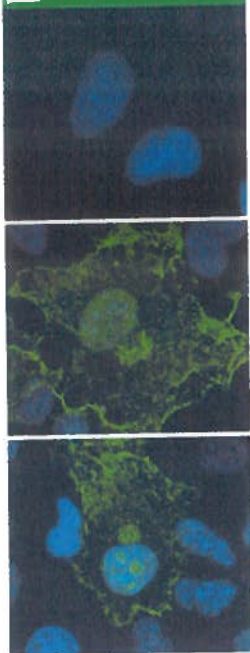
<http://vir.sgmjournals.org>

May 2008

Volume 89, part 5

Pages 1097-1328

Journal of General Virology



Published by the Society for General Microbiology

Journal coverage Figure : Copie de la figure 2 de l'article

Chapitre 3 : Deuxième Publication

Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H, Pearson A. (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for the dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol.* Jan;84(1):109-18

Résumé de la deuxième publication

Titre : Les résidus conservés d'UL24 du virus herpès simplex sont importants pour la dispersion de la protéine nucléolaire nucléoline.

La famille des protéines UL24 est largement conservée dans les *herpesviridae*. Nous avons précédemment démontré l'importance d'UL24 pour la dispersion de la nucléoline lors de l'infection. De plus, nous avons démontré que la partie N-terminale d'UL24 se localise au nucléole et est capable d'induire cette dispersion en absence d'autres protéines virales. Dans cet article, notre hypothèse était que les résidus hautement conservés d'UL24 sont importants dans la fonction de dispersion de la nucléoline. Nous avons construit un éventail de mutations dans UL24 résultant en la substitution d'acides aminés conservés et nous avons testé celles-ci pour leur effet sur la localisation de la nucléoline. Nous n'avons pas observé de changement de localisation sauf que certaines versions démontraient une localisation nucléolaire plus importante. Celles démontrant une localisation plus importante étaient également plus fortement affectées dans leur rôle de dispersion de la nucléoline. Deux régions d'UL24 étaient particulièrement sensibles à ces mutations et correspondaient à des acides aminés dans un motif potentiel d'endonucléase. Deux de ces mutations ont été testées en infection utilisant des virus recombinants. Leurs phénotypes de dispersion de la nucléoline concordaient avec les observations obtenues en transfection transitoire. Les mutations E99A/K101A et G121A résultaient en la formation de plages syncytiales, phénotype observé chez un virus déficient en UL24. Par contre, seule la mutation E99A/K101A résultait en une réduction de l'efficacité de réplication virale, lorsque comparée au virus de type sauvage KOS. Ce résultat démontre une séparation des phénotypes de réduction de réplication virale et la formation de plages syncytiales, supportant un rôle multifonctionnel d'UL24 lors de l'infection. Notre étude a identifié plusieurs résidus importants dans la fonction de dispersion de la nucléoline et supporte l'importance du motif putatif d'endonucléase dans la fonction d'UL24.

Contribution des auteurs

Luc Bertrand : Expériences pour les figures 1, 2, 3, 4, 6, préparation des figures et du manuscrit.

Gabriel Leiva-Torres : Expériences pour figure 5 et fabrication de certains plasmides d'expression

Huda Hyjazie : Mutagenèse dirigée et fabrication de certains plasmides d'expression

Angela Pearson : Révision et correction du manuscrit.

Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for the dispersal of the nucleolar protein nucleolin.

Luc Bertrand, Gabriel André Leiva-Torrest†, Huda Hyjazie and Angela Pearson*
INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, CANADA

Running title : Importance of conserved residues in HSV-1 UL24 (46 characters)

Abstract (250)

Main Text (4447)

Figures

*Corresponding Author

Angela Pearson

532, boul. Des Prairies

Laval, Québec

CANADA

Phone : 450-687-5010

Fax : 450-686-5501

angela.pearson@iaf.inrs.ca

† Present address : McGill University, Department of Microbiology and Immunology

Abstract

The UL24 family of proteins is widely conserved among herpesviruses. We demonstrated previously that UL24 of herpes simplex virus 1 is important for the dispersal of nucleolin from nucleolar foci throughout the nucleus of infected cells. Furthermore, the N-terminal portion of UL24 localizes to nuclei and can disperse nucleolin in the absence of any other viral proteins. In this study, we tested the hypothesis that highly conserved residues in UL24 are important for the ability of the protein to modify the nuclear distribution of nucleolin. We constructed a panel of substitution mutations in UL24, and tested their effect on nucleolin staining patterns. We found that modified UL24 proteins exhibited a range of sub-cellular distributions. Mutations associated with a wild type localization pattern for UL24 correlated with high levels of nucleolin dispersal. Interestingly, mutations targeting two regions, namely within the first homology domain, and overlapping or near the previously identified PD-(D/E)XK endonuclease motif, caused the most altered UL24 localization pattern as well as the most drastic reduction in its ability to disperse nucleolin. Viral mutants corresponding to the substitutions G121A and E99A/K101A both exhibited a syncytial plaque phenotype at 39°C. vUL24-E99A/K101A replicated to lower titers than did vUL24-G121A or KOS. Furthermore, the E99A/K101A mutation caused the greatest impairment of HSV-1 induced dispersal of nucleolin. Our results identified residues in UL24 that are critical for the ability of UL24 to alter nucleoli, and further support the notion that the endonuclease motif is important for the function of UL24 during infection.

Introduction

The UL24 protein is conserved throughout the *Herpesviridae* family and, to the best of our knowledge, a *UL24* homolog has been identified in all *Herpesvirales* genomes sequenced to date with the exception of the channel catfish virus (9, 10, 19). UL24 of HSV-1 is required for efficient virus replication both *in vitro* and *in vivo*, and for reactivation from latency in a mouse model of ocular infection (18). *UL24* is one of the few HSV-1 genes, along with *gB*, *gK* and *UL20*, in which mutations have been identified that cause the formation of syncytial plaques (2, 7, 34, 36, 39). The *UL24*-associated syncytial phenotype is only partially penetrant at 37°C, but is fully penetrant at 39°C. Indications are that *gK* and *UL20* have an inhibitory effect on the formation of syncytia (1), while certain mutations in *gB* entrain an uncontrolled fusogenic activity (11, 13, 15).

UL24 is a highly basic protein of 269 amino acids (aa) that is expressed with leaky-late kinetics (31). Five homology domains (HD), which consist of stretches of amino acids with high percentage of identity between homologs, are present in the *UL24* open reading frame (ORF) (19). In addition, a PD-(D/E)XK endonuclease motif has been identified that falls within the HDs (20); however, a role for this motif has yet to be demonstrated. In infected cells, UL24 is detected in the nucleus and the cytoplasm, and transiently localizes to nucleoli (23). In the absence of other viral proteins, UL24 accumulates in the Golgi apparatus and in the nucleus, where it usually exhibits a diffuse staining pattern, but in a minority of cells is detected in nucleoli (3).

During infection, the formation of the viral replication compartments in the nucleus and the action of several viral proteins result in a remodeling of the nucleus. Chromatin is marginalized (29, 40), Promyelocytic Leukemia bodies are dispersed (26, 27) and the nuclear lamina is disrupted (33, 37). HSV-1 infection also affects the nucleolus, a prominent nuclear sub-structure implicated in the synthesis of ribosomal RNA (rRNA), cell cycle regulation and nucleo-cytoplasmic shuttling (5). Nucleoli become elongated following infection, and the synthesis of mature rRNA is reduced (4, 38, 42). Several HSV-1 proteins have been shown to localize to, or associate with, the nucleolus (12). The viral protein VP22 associates with the nucleolus and with dispersed nucleolin in HSV-1 infected cells (22), and RL1, US11 and ICP0 have also been shown to localize to nucleoli (24, 30, 35). Previously, we showed that nucleolin is dispersed throughout the nucleus upon HSV-1 infection, and that UL24 is involved in this

nuclear modification (23). We further found that the N-terminal portion of UL24 is sufficient to induce the redistribution of nucleolin in the absence of other viral proteins (3).

In this study, we sought to test the hypothesis that the endonuclease motif, which is made up of some of the most highly conserved residues in UL24, is important for the dispersal of nucleolin. A panel of substitution mutations in UL24 were generated, and the impact on the function of UL24 assessed.

Material and Methods

Cells and viruses. Vero and COS-7 cells were propagated as described previously (3). The virus strains KOS and UL24XG (18) were generously provided by Donald M. Coen (Harvard Medical School). For the plaque morphology assays, infected cells were incubated in D-MEM media containing high glucose, with 0.33% methylcellulose, and supplemented with 2% newborn calf serum, 50 U/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin.

Plasmid construction. To generate mutations in the *UL24* gene, polymerase chain reaction (PCR) site-directed mutagenesis was carried out on the plasmid pAG5 (16) or pLB-HA-UL24 (3). PCR reactions were performed using complimentary sets of mutagenic oligonucleotides. DNA from the reactions was digested with Dpn1 (Roche) to remove the wild-type template DNA, and ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs). Following transformation into DH5 α bacteria, plasmids were sequenced to verify the presence of the desired mutation, and the absence of other sequence changes in the *UL24* ORF. DNA sequencing was carried out by the McGill University and Genome Innovation Center. The different mutations and the corresponding mutagenic oligonucleotides used are indicated below. The nucleotide changes are represented in bold characters. For E69A/V70A (UL24E69AV70A_{top} 5'- GTCACCTTAATAT GCG**C**AG**C**GGACCTGGGACGGCGC-and UL24E69A_{bot} 5'- GCGCGGTCCCAGGTCCG**C**T**G**C GCATATTAAGGTGAC), for L72A (UL24L72A_{top} 5'- GCGAAGTGGAC**G**CGGGACCGCGCCG and UL24L72A_{bot} 5'- CGGCGCGGTCCC**G**CGTCCACTTCGC), for R75A/D78A (UL24R75AD78A_{top} 5'- CCTGGGACCG**G**CCCGCCCCG**C**CTGCATCTGC and UL24R75AD78A_{bot} 5'- GCAGATGCAG**G**CGGGGCGGG**C**CGGTCCCAGG), for I97A/I98A (UL24I97AI98A_{top} 5'- CTGGGCGGGGTTTGTGT**C**GG**C**AGAACTAAAGACATGC and UL24I97AI98A_{bot} 5'- GCATGTCTTTAGTTCT**G**CG**G**CACACAAACCCCGCCAG), for E99A/K101A (UL24E99K101A_{top} 5'- GGGTTTGTGTCATCATAG**C**ACTAG**C**GACATGCAA

ATATATTTCTTCCG and UL24E99AK101Abot 5'-CGGAAGAAATATATTTGCATGTCGCTAG TGCTATGATGACACAAACCC), for Q117A (UL24Q117A_{top} 5'- CGCCAGCAAACGCGAGGCA CGGGCCACGGGGATG and UL24Q117Abot 5'- CATCCCCGTGGCCCGTGCCCTCGCGTTTG CTGGCG), for G121A (UL24G121A_{top} 5'- GAGCAACGGGGCCACGGCGATGAAGCAGCTG CGC and UL24G121Abot 5'- GCGCAGCTGCTTCATCGCCGTGGCCCGTTGCTC), for Q124A/L125A (UL24Q124/L125A_{top} 5'- GGGCCACGGGGATGAAGGCGGCGCGCCACTCC CTGAAGC and UL24Q124A/L125Abot 5'-GCTTCAGGGAGTGGCGCGCCGCGCTTCATCCC CGTGGCCC), for Q154A (UL24Q154A_{top} 5'- CCTGGTGTGTTGTCGCCGCGACGGACGCTCC GCGTC and UL24Q154Abot 5'- GACGCGGAGCGTCCGTGCGGCGACAAACACCAGG), for H22L (UL24H22L_{top} 5'- GCAGGGGTACGAAGCCTTACGCGCTTCTACAAG-3' and UL24H22L_{bot} 5'- CTTGTAGAAGCGCGTAAGGCTTCGTACCCCTGC-3') and for Y26A (UL24Y26A_{top} 5'- CGAAGCCATACGCGCTTCGCCAAGGCGCTTGCCAAAG -3'and UL24Y26Abot 5'- CTTTGGCAAGCGCCTTGCGGAAGCGCGTATGGCTTCG-3').

For all mutations other than H22L and Y26A, mutagenesis was performed on the plasmid pAG5, and then subcloned into the mammalian expression vector pLBPfl-HA-UL24. For the substitutions H22L and Y26A, mutagenesis was performed on the plasmid pLB-HA-UL24 then subcloned back into pLBPfl-HA-UL24 in case mutations had arisen in the rest of the vector during the mutagenesis step.

The plasmid pBamH1QeGFP was obtained by the insertion of an expression cassette containing the CMV promoter driving the eGFP gene, into the Bsp119I site of pAG5. The CMV-eGFP cassette was amplified from the template pEFP-N1 (Clontech) using primers eGFP-CMVp-Start 5'-**TTCGAA**TAGTTATTAATAGTAATCAATTACG-3' and eGFP-STOP-End 5'-**TTCGAA**ATCTAGAGTCGCGGCCGC-3', which contain Bsp119I sites at their 5' ends. The PCR fragment was inserted in the pCR-BluntII-TOPO vector (Invitrogen), and then digested with Bsp119I (New England Biolabs) along with the vector pAG5, which were ligated together using T4 DNA ligase.

Transfection and western blotting. To assess expression of hemagglutinin epitope (HA) tagged UL24 protein expression, 1.5×10^5 COS-7 cells were seeded per well in 6-well plates. The following day, cells were transfected with 3 μ g of pLBPfl-HAUL24 or mutant versions using Lipofectamine transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two days post-transfection, cells were washed with PBS and lysed in 150 μ l of RIPA lysis buffer (500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic Acid, 0.1% SDS and 50mM Tris pH 8.0).

0.2 µg of a β-galactosidase expression vector was co-transfected to normalize loading according to transfection efficiency. β-galactosidase activity was quantified using the luminescent β-gal detection kit II (Clontech) following the manufacturer's instructions. Normalized volumes of lysate were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis on a denaturing SDS 12.5% gel. For infected cell lysates, Vero cells were infected at an MOI of 10, and lysed in RIPA lysis buffer 18 hpi. Proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore), and analyzed by Western blotting using a monoclonal antibody directed against HA (Covance), and a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Calbiochem). Detection was by enhanced chemiluminescence using ECL plus reagents (GE-Amersham).

Construction of recombinant viruses. Recombinant viruses were produced by homologous recombination essentially as described previously (16). The virus vUL24-eGFP was obtained by co-transfecting KOS infectious DNA and the transfer plasmid pBamH1QeGFP that had been linearized with XbaI (New England Biolabs). Recombinant viruses with mutant versions of *UL24* or in the case of the rescue virus, wild-type *UL24*, were obtained by co-transfection of vUL24-eGFPb infectious DNA and the appropriate linearized transfer vector—pAG5 for the rescue virus, and pKOS-UL24-E99A/K101A or pKOS-UL24-G121A for the mutant viruses. DNA was transfected into Vero cells using Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Recombinant viruses engineered to express eGFP or to contain other forms of altered *UL24* genes were screened for based on the presence or absence of eGFP expression respectively. The *UL24* ORF of each recombinant virus was sequenced to ensure the absence of undesired mutations.

Viral growth curves. Viral yield was assayed using one-step growth curves. 2.5×10^5 Vero cells were seeded in duplicate in cell culture tubes containing 2 ml of complete medium. The next day, cells were infected with the indicated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 5. At 6, 12, 18 and 24 hours post infection (hpi), the respective tubes were removed from the incubator and placed at -80°C. Tubes were thawed, sonicated, and total virus (cell-associated and cell-free) was titrated.

Southern blotting. Overall genome structure of vUL24-eGFPb and c, and vUL24-eGFPrescue was analyzed by restriction digest with BamH1. Viral genomic DNA was isolated by phenol:chloroform extraction of isolated virions. 1.5 µg of viral DNA were digested with BamH1 (New England Biolabs), as well as 100 ng of the plasmid pAG5, which contains the wild-type

BamH1 Q fragment, and pBamH1QeGFP, which is the original transfer plasmid used for the construction of vUL24-eGFP. Restriction digest products were run on an agarose gel, and transferred by capillarity action to a positively-charged nylon membrane. The membrane was then blotted with a dioxygenin (DIG)-labeled probe corresponding to the wild-type BamH1 Q fragment in pBluescript II SK+. The probe was generated using the Random primed DNA labeling kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. The signal was detected using the substrate CSPD (Roche).

Immunofluorescence. Transient transfection of COS-7 cells was performed as described previously (3). For analysis of infected cells, 4×10^4 Vero cells were seeded on glass coverslips the day before infection at an MOI of 10, and fixed 18 hpi. Cells were immunostained as described previously (3). The following primary antibodies were used, as indicated in the text: rat monoclonal anti-HA high affinity (Roche), rabbit polyclonal anti-nucleolin (Abcam), mouse monoclonal anti-nucleolin (Santa Cruz). Secondary antibodies used were: goat anti-rat Alexa-488-conjugated, and goat anti-mouse or anti-rabbit Alexa-568-conjugated (Invitrogen), as indicated in the text. After immunostaining, cells were washed three times in PBS, and incubated with Draq5 (Biostatus) diluted 1:500 in PBS at 37°C for 30 minutes. The cells were then washed once in PBS, and coverslips mounted on glass slides using Prolong Gold Anti-Fade reagent (Invitrogen). The slides were visualized using a BioRad Radiance 2000 confocal with an argon–krypton laser at 488 and 568 nm (diode 638nm) mounted onto a Nikon E800 microscope using a 60x objective, with an aperture of 1.4, and a 1.6x software magnification in Lasershar software (Biorad). Images were prepared using Adobe Photoshop CS4.

Results

Substitution of highly conserved residues in UL24. The five UL24 HDs in HSV-1 UL24 contain clusters of amino acids that have a high degree of identity between UL24 proteins encoded by different herpesviruses. Previously, we deleted each of these HDs individually, and found that removal of any one resulted in a protein that localized efficiently to nucleoli, but no longer caused the dispersal of nucleolin (3). We hypothesized that this lack of activity was a result of misfolding of the protein due to these relatively large deletions. Thus, in order to identify regions in UL24 that were important for its effect on nucleoli, we undertook a strategy of site-directed mutagenesis. We compared UL24 of HSV-1 (strain KOS) and several other UL24 homologs. Based on this analysis, we generated a panel of modified versions of UL24, where

some of the most conserved residues were substituted individually or in pairs, namely H22 (100% identity among 78 UL24 homologs), Y26 (99%), E69 (100%)/V70 (94%), L72 (96%), R75 (100%)/D78 (100%), I98 (58%)/I98 (68%), E99 (100%)/K101 (100%), Q117 (100%), G121A (100%), Q124A (99%)/L125A (97%) and Q154 (92%). The mutations generated are represented in figure 1A. The residues D78, E99, and K101A are part of the PD-(D/E)XK endonuclease motif. H22 and Y26, while not part of the motif, are residues that are conserved among several members of this family of endonucleases and have been proposed to play a role in substrate specificity (14, 20, 21). Mutations of the *HA-UL24* gene were introduced into the mammalian expression vector pLBPfl-*HA-UL24*. To assess for protein expression, the vectors encoding different versions of HA-UL24, either wild-type or with point mutations, were transiently transfected into COS-7 cells. Western blot analysis was carried out on cell lysates prepared 48 hours post-transfection (Fig. 1B). We found that although levels of UL24-I97A/I98A were lower than for the other proteins, all the different versions of UL24 were expressed.

Differential impact of substituting conserved residues in UL24 on the dispersal of nucleolin. We next sought to test the impact of the mutations on the ability of UL24 to induce the dispersal of nucleolin. COS-7 cells were transiently transfected with each of the various HA-UL24 expression vectors. 48 hours later, cells were fixed, permeabilized and immunostained for HA (green) and nucleolin (red) (Fig. 2). Localization of HA-UL24 variants and of nucleolin was determined by confocal microscopy. We found that all substituted forms of HA-UL24 exhibited strong perinuclear staining, which we have previously demonstrated corresponds to the Golgi apparatus, and speckled cytoplasmic staining--both similar to what has been seen for wild-type HA-UL24 (3). However, we observed a range of nuclear staining patterns for the different forms of HA-UL24. For the mutations H22L, Y26A, I97A/I98A and E99A/K101A, protein localization in the nucleus was found predominantly in the nucleolus. In contrast, the staining pattern for L72A was similar to that seen for wild-type HA-UL24, in that there was diffuse nuclear staining in the vast majority of cells, and few cells exhibiting punctuate nuclear staining. The pattern for E69A/V70A, R75A/D78A, Q117A, G121A, Q124A/L125A and Q154A was intermediate in that many cells showed the presence of weak nuclear foci of staining, however the shape was distorted as compared to the typical nucleolar staining pattern. We next quantitated the impact of the UL24 mutations on the distribution pattern seen for nucleolin in these cells. For each mutation, we counted the number of cells expressing HA-UL24 that retained nuclear foci of nucleolin staining. In each case, the status of nucleolin staining was determined for more than 100 transfected cells, in three independent assays. The results

presented represent the average of the three experiments and the standard deviations (Fig. 3). We found that the localization of nucleolin also varied depending on the UL24 substitution analyzed. For wild type UL24, only $\approx 16\%$ of cells expressing HA-UL24 exhibited the characteristic punctate nucleolar staining for nucleolin, similar to what we have previously shown. For the mutations, three groups were observed. The substitutions H22L, Y26A, I97A/I98A and E99A/K101A severely affected the ability of UL24 to modify nucleoli such that the number of cells retaining clear foci of nucleolin staining was greater than 60%. The E69A/V70A, R75A/D78A, Q117A, G121A, Q124A/L125A and Q154A mutations had only a slight to moderate effect, with between 20 and 45% of cells exhibiting the typical strong foci of nucleolin staining, while the majority of cells showed only weak, distorted foci of staining or diffuse staining. Interestingly, the L72A mutation did not appear to have any effect the ability of UL24 to induce the dispersal of nucleolin in that only 9% of cells retained foci of nucleolin staining. Thus, highly conserved residues in UL24 were of variable importance for the ability of this protein to modify nucleoli.

Construction and characterisation of vUL24-eGFP. To improve the efficiency of screening for recombinants in the generation of *UL24* mutant viruses, we first constructed a virus containing an eGFP expression cassette within the *UL24* gene (Fig. 4A). Two independent isolates of vUL24-eGFP (b and c) were produced. To ensure that any phenotypes we ultimately observed in viruses engineered to contain *UL24* mutations were due to the inserted mutations and not to a change in the starting virus, we also constructed a rescue virus for vUL24-eGFPb. vUL24-eGFPbResc was generated by co-transfection of infectious DNA from vUL24eGFPb with a transfer plasmid containing the wild-type *UL24*. The genome integrity of the viruses was confirmed by restriction digest and Southern blot analysis. Viral genomic DNA from KOS, vUL24-eGFPb and c, vUL24-eGFPbResc, and the plasmids pAG5 and pBamH1QeGFP, were digested with BamHI and resolved on an agarose gel (Fig. 4B). No difference in the overall digestion pattern was detected for the different viruses. The DNA was then transferred to a positively charged nylon membrane and analyzed by Southern blot with a probe corresponding to pAG5, which contains the BamH1 Q fragment in pBluescript II SK+ (Fig. 4C). As expected, a band of approximately 3.5 kb was detected for each virus (see Fig. 4A), and an additional band of 1.4 kb was seen for vUL24eGFPb and c. Thus, the overall genome organization for vUL24-eGFP was as expected.

A virus yield assay was carried out on the two vUL24eGFP isolates and the rescue virus (Fig. 4D). We found that vUL24-eGFPb and c replicated to titers a half a $\log_{10}$ lower than the

wild-type virus KOS. This is consistent with what has been shown previously for UL24-deficient viruses (18). In contrast, the rescue virus replicated to levels similar to KOS. To determine plaque phenotypes, Vero cells were infected at low MOI, overlaid with medium containing methylcellulose, and incubated at 34, 37 or 39°C. Two days post infection, images of the plaques were taken using a phase contrast microscope (Fig. 4E). At 34°C, we did not detect a difference between the viruses. At 37°C, UL24X, vUL24-eGFPb and c appeared to form somewhat smaller plaques than KOS or vUL24-eGFPResc. As expected, we found that both isolates of vUL24-eGFP (b and c) formed syncytial plaques at 39°C, similar to those observed with the UL24-null virus UL24X. In contrast, both the KOS and the rescue virus formed non-syncytial plaques at 39°C. We concluded that our starting virus, vUL24-eGFPb, did not contain any mutations other than the eGFP insertion that impaired replication in cell culture or conferred a syncytial phenotype.

Construction and characterization of vUL24 E99A/K101A and vUL24 G121A. For consistency, all recombinant viruses were made using vUL24eGFPb as a starting virus. We inserted the mutations E99A/K101A and G121A in *UL24*. Each of these residues is invariant among all the predicted UL24 proteins from the different herpesviruses sequenced to date. (There are currently 78 complete sequences of herpesvirus *UL24* homologs available in the NCBI database.) Two independent isolates of each virus were produced. Expression of the modified forms of UL24 was confirmed by Western blot analysis of cell lysates harvested 18 hpi (Fig. 5A and B). The blot was probed for UL24, and then stripped and probed for ICP8 as an internal control. We noted that vUL24-E99A/K101A migrated slightly faster than the wildtype UL24. We often detected a similar shift in lysates from transiently transfected cells. However, both UL24 E99A/K101A and UL24 G121A were expressed at similar levels as UL24 in KOS.

We carried out a viral yield assay on the UL24 mutant viruses. We found that the E99A/K101A mutation reduced viral titers by approximately half a log₁₀ (Fig. 5C); however, the G121A mutation resulted in replication levels similar to KOS (Fig. 5D). We next tested whether the mutations affected plaque phenotype (Fig. 5E and F). We found that both vUL24-E99A/K101A and vUL24-G121A, which have mutations in different HDs, resulted in the formation of syncytial plaques at 39°C, similar to those formed by UL24X. Thus, substitutions targeting highly conserved residues in different HDs conferred a syncytial plaque phenotype, while only the mutation affecting the endonuclease motif appeared to affect viral replication.

Substitution of highly conserved residues in UL24 cause defects in HSV-1-induced dispersal of nucleolin. To determine whether the effect of the UL24 substitutions on nucleolin in transfected cells reflected the importance of the residues during infection, we tested the impact of the mutations on the ability of the HSV-1 to modify nucleoli. Vero cells were grown on coverslips, and either mock-infected, or infected with vUL24-E99A/K101A a and b, vUL24-G121A a and b, KOS or UL24X. Cells were fixed at 18 hpi, immunostained for nucleolin (green) and the nuclei stained with Draq5 (blue) (Fig. 6A). As we have seen previously, we observed foci of nucleolin in very few KOS-infected cells (less than 2%), while the vast majority of cells infected with UL24X retained foci of nucleolin (73%). vUL24-E99AK101A resembled UL24X in that the majority of infected cells showed foci of nucleolin staining (60%), and vUL24-G121A exhibited an intermediate phenotype in that we detected clear foci of nucleolin in only 28% of infected cells (Fig. 6B). Hence, we found that the effect of these mutations on the ability of UL24 to disperse nucleolin in the context of infection followed a similar trend to that observed in transfected cells. Our results provide further evidence that these highly conserved residues in the endonuclease motif are particularly important for the ability of UL24 to induce the dispersal of nucleolin.

Discussion

We previously demonstrated that UL24 is involved in the HSV-1-induced dispersal of nucleolin, and that it plays an essential role in this process (3, 23). In this study, we furthered our investigation to identify residues important for this function, and to test the hypothesis that the previously identified endonuclease motif was important for this activity.

Effect of substituting of highly conserved residues on subcellular localization of UL24. In transiently transfected COS-7 cells, all of the modified HA-UL24 proteins retained perinuclear localization similar to that seen for the wild type form of the protein (3). This result is consistent with our previous finding that the C-terminal portion of the protein alone localizes to the Golgi apparatus. The different nuclear staining patterns observed for the various substituted forms of the protein correlated with that observed for nucleolin. Typically, in those cells where a particular HA-UL24 variant was present in clear nucleolar foci, nucleolin was also localized to nucleoli. In contrast, in cells where HA-UL24 was diffuse in the nucleus, we found that nucleolin

staining was dispersed. Because we have previously shown that nucleolar localization is retained upon deletion of any one of the HDs, we conclude that the substitutions studied here did not affect the targeting of HA-UL24 to nucleoli. Rather, it is likely that all of the substituted forms tested localized to nucleoli, but forms that retained the ability to alter nucleoli exhibited a concomitant change in distribution pattern as this organelle was modified.

Importance of the PD-(D/E)XK endonuclease motif for the ability of UL24 to disperse nucleolin. Our results support the notion that the endonuclease motif is especially important for the effect of UL24 on nucleoli. Substitutions targeting the putative catalytic domain (E99A/K101A) or immediately adjacent to it (I97A/I98A), as well as residues that have been proposed to be important for substrate specificity (H22L and Y26A) (14, 20, 21) had the most dramatic effect. Although all substituted forms of UL24 were expressed in COS-7 cells, we noted that UL24-I97A/I98A repeatedly exhibited reduced expression levels by western blot analysis on lysates from transiently transfected cells. Its expression could however easily be detected in our immunofluorescence assay, and at an intensity apparently similar to that seen with the other modified versions of UL24. Regardless, we cannot exclude the possibility that the reduction in nucleolin dispersal seen for UL24-I97A/I98A was partially due to a reduced level of expression. Interestingly, several residues that were as equally well conserved as E99, K101, H22 and Y26, such as L72A, Q117A, and G121A, did not appear to be of great importance for the ability of UL24 to disperse nucleolin.

Importance of highly conserved residues in UL24 during infection. The importance of the endonuclease motif for the dispersal of nucleolin also held true in the context of infection. Two independently derived isolates were obtained for each of the recombinant viruses vUL24-E99A/K101A and vUL24-G121A. We found that each pair of isolates behaved similarly. The E99A/K101A mutation caused a decrease in HSV-1-induced dispersal of nucleolin, similar to that seen with the UL24-null virus. In contrast, the G121A mutation had only a moderate impact. These findings were consistent with our results in the transient transfection assays. Thus, the E99A/K101A mutation affects a site in the protein that is important for the effect of UL24 on nucleoli during infection. Furthermore, this mutation also caused a decrease in viral titers suggesting that it affected a function important for efficient replication. UL12 is another HSV-1 protein with a nuclease motif, and for which the nuclease activity has been confirmed. UL12 may play a role in resolving X and Y DNA structures arising during viral DNA replication, and in encapsidation (32). A nuclease activity has not yet been reported for UL24, however, the discovery that the motif is important for the function of the protein suggests that UL24 may

indeed possess a nuclease function. Evidence is accumulating that the nucleolus is an organelle often targeted by viruses to increase their replication efficiency, and circumvent cellular control systems (12, 17). Adenovirus induces the redistribution of nucleolar proteins nucleolin and B23 to the cytoplasm (25), and poliovirus also causes the relocalization of nucleolin to the cytoplasm (41). The nucleolus is involved in cell cycle regulation, and the coronavirus N protein binds nucleolin and disrupts cytokinesis (8, 43). A role for nucleolar localization and viral mRNA transport to the cytoplasm has been shown for HIV protein Rev (28) and herpesvirus samiri ORF57 (6). Further experiments will be required to establish the mechanism underlying the effect of UL24 on nucleoli, and the function of this cellular modification in infection.

Substitution of highly conserved residues in UL24 causes syncytial plaques. vUL24-E99A/K101A was impaired for viral replication in cell culture, while vUL24-G121A replicated to similar titers as seen for KOS. However, both the E99A/K101A and G121A mutation caused a syncytial plaque phenotype at 39°C. Therefore, even though the G121A change is a conservative substitution, it did have an impact on at least one function of the protein during infection. Thus, the E99A/K101A mutation resulted in a phenotype resembling that of a UL24-null virus, while the G121A mutation appeared to only affect the formation of syncytia. In transient transfection assays, both UL24-E99A/K101A and UL24-G121A localized to the Golgi apparatus in a manner similar to that seen for the wild-type protein. This perinuclear localization was consistent with our previous observation that the C-terminal portion of UL24 is sufficient to target the Golgi apparatus (3). However, this result also suggests that the conserved N-terminal region of UL24 is dispensable for Golgi localization, yet is important for the ability of UL24 to inhibit aberrant cell fusion during infection. Furthermore, because vUL24-G121A replicated to similar titers as wild type virus, this also suggests that the *UL24*-associated syncytial phenotype is not inextricably associated with a reduction in HSV-1 replication in cell culture.

In summary, our mutational analysis established the importance of the endonuclease motif in UL24 for the dispersal of nucleolin, and suggests that this motif is important for efficient viral replication. Further studies will be required to determine whether UL24 possesses an endonuclease activity.

Acknowledgements

L.B. was supported by graduate scholarships from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Fonds pour la recherche en santé du Québec (FRSQ), and Fondation Armand-Frappier. G.-A.L.T. was supported by a graduate scholarship from FRSQ. This project was funded through an infrastructure grant from the Canada Foundation for Innovation and an operating grant from CIHR to A.P.

We would like to thank D. M. Coen (Harvard Medical School) for the viral strains KOS and UL24X, and A. Griffiths for comments on the manuscript.

References

1. **Avitabile, E., G. Lombardi, T. Gianni, M. Capri, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J Virol* **78**:8015-25.
2. **Baines, J. D., P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-24.
3. **Bertrand, L., and A. Pearson.** 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J Gen Virol* **89**:1142-51.
4. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* **71**:33-44.
5. **Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A. I. Lamond.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:574-85.
6. **Boyne, J. R., and A. Whitehouse.** 2006. Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15190-5.
7. **Bzik, D. J., B. A. Fox, N. A. DeLuca, and S. Person.** 1984. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* **137**:185-90.
8. **Chen, H., T. Wurm, P. Britton, G. Brooks, and J. A. Hiscox.** 2002. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* **76**:5233-50.
9. **Davison, A. J.** 1992. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* **186**:9-14.

10. **Davison, A. J.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**:69-88.
11. **Diakidi-Kosta, A., G. Michailidou, G. Kontogounis, A. Sivropoulou, and M. Arsenakis.** 2003. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affects both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate. *Virus Res* **93**:99-108.
12. **Emmott, E., and J. A. Hiscox.** 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* **10**:231-8.
13. **Engel, J. P., E. P. Boyer, and J. L. Goodman.** 1993. Two novel single amino acid syncytial mutations in the carboxy terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 confer a unique pathogenic phenotype. *Virology* **192**:112-20.
14. **Feder, M., and J. M. Bujnicki.** 2005. Identification of a new family of putative PD-(D/E)XK nucleases with unusual phylogenomic distribution and a new type of the active site. *BMC Genomics* **6**:21.
15. **Goodman, J. L., and J. P. Engel.** 1991. Altered pathogenesis in herpes simplex virus type 1 infection due to a syncytial mutation mapping to the carboxy terminus of glycoprotein B. *J Virol* **65**:1770-8.
16. **Griffiths, A., and D. M. Coen.** 2003. High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J Virol* **77**:2282-6.
17. **Hiscox, J. A.** 2002. The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* **147**:1077-89.
18. **Jacobson, J. G., S. H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**:161-9.
19. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and D. M. Coen.** 1989. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**:1839-43.
20. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**:2575-7.
21. **Kosinski, J., M. Feder, and J. M. Bujnicki.** 2005. The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function. *BMC Bioinformatics* **6**:172.
22. **Lopez, M. R., E. F. Schlegel, S. Wintersteller, and J. A. Blaho.** 2008. The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* **136**:175-88.
23. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
24. **MacLean, C. A., F. J. Rixon, and H. S. Marsden.** 1987. The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells. *J Gen Virol* **68** (Pt 7):1921-37.

25. **Matthews, D. A.** 2001. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J Virol* **75**:1031-8.
26. **Maul, G. G., H. H. Guldner, and J. G. Spivack.** 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* **74** (Pt 12):2679-90.
27. **Maul, G. G., A. M. Ishov, and R. D. Everett.** 1996. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**:67-75.
28. **Meyer, B. E., and M. H. Malim.** 1994. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* **8**:1538-47.
29. **Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K. F. Sullivan.** 2000. Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**:661-5.
30. **Morency, E., Y. Coute, J. Thomas, P. Texier, and P. Lomonte.** 2005. The protein ICP0 of herpes simplex virus type 1 is targeted to nucleoli of infected cells. Brief report. *Arch Virol* **150**:2387-95.
31. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:10821-8.
32. **Porter, I. M., and N. D. Stow.** 2004. Replication, recombination and packaging of amplicon DNA in cells infected with the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12. *J Gen Virol* **85**:3501-10.
33. **Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**:5564-75.
34. **Ruyechan, W. T., L. S. Morse, D. M. Knipe, and B. Roizman.** 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* **29**:677-97.
35. **Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala, and L. Frappier.** 2008. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* **4**:e1000100.
36. **Sanders, P. G., N. M. Wilkie, and A. J. Davison.** 1982. Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **63**:277-95.
37. **Scott, E. S., and P. O'Hare.** 2001. Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**:8818-30.
38. **Silverstein, S., and D. L. Engelhardt.** 1979. Alterations in the protein synthetic apparatus of cells infected with herpes simplex virus. *Virology* **95**:334-42.
39. **Tognon, M., R. Guandalini, M. G. Romanelli, R. Manservigi, and B. Trevisani.** 1991. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res* **18**:135-50.
40. **Uprichard, S. L., and D. M. Knipe.** 1997. Assembly of herpes simplex virus replication proteins at two distinct intranuclear sites. *Virology* **229**:113-25.

41. **Waggoner, S., and P. Sarnow.** 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* **72**:6699-709.
42. **Wagner, E. K., and B. Roizman.** 1969. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**:36-46.
43. **Wurm, T., H. Chen, T. Hodgson, P. Britton, G. Brooks, and J. A. Hiscox.** 2001. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* **75**:9345-56.

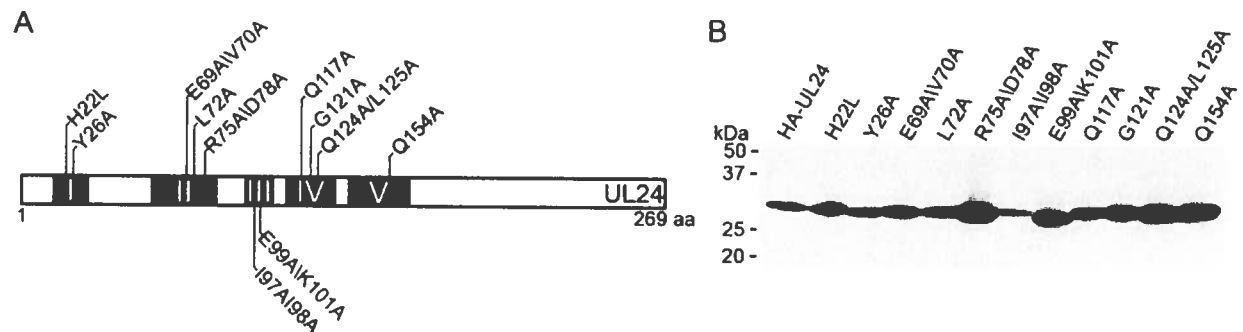


Fig. 1. Substitutions introduced into HSV-1 UL24. (A) The large rectangle represents the UL24 protein. Black boxes illustrate the positions of the five homology domains, numbered one to five in Roman numerals. The different single and double substitutions studied are indicated above or below the rectangle. (B) Expression of the different versions of HA-UL24 as detected by Western Blot analysis of lysates prepared from transiently transfected COS-7 cells, using an antibody directed against the HA tag. Positions of molecular mass markers are indicated to the left of the panel.

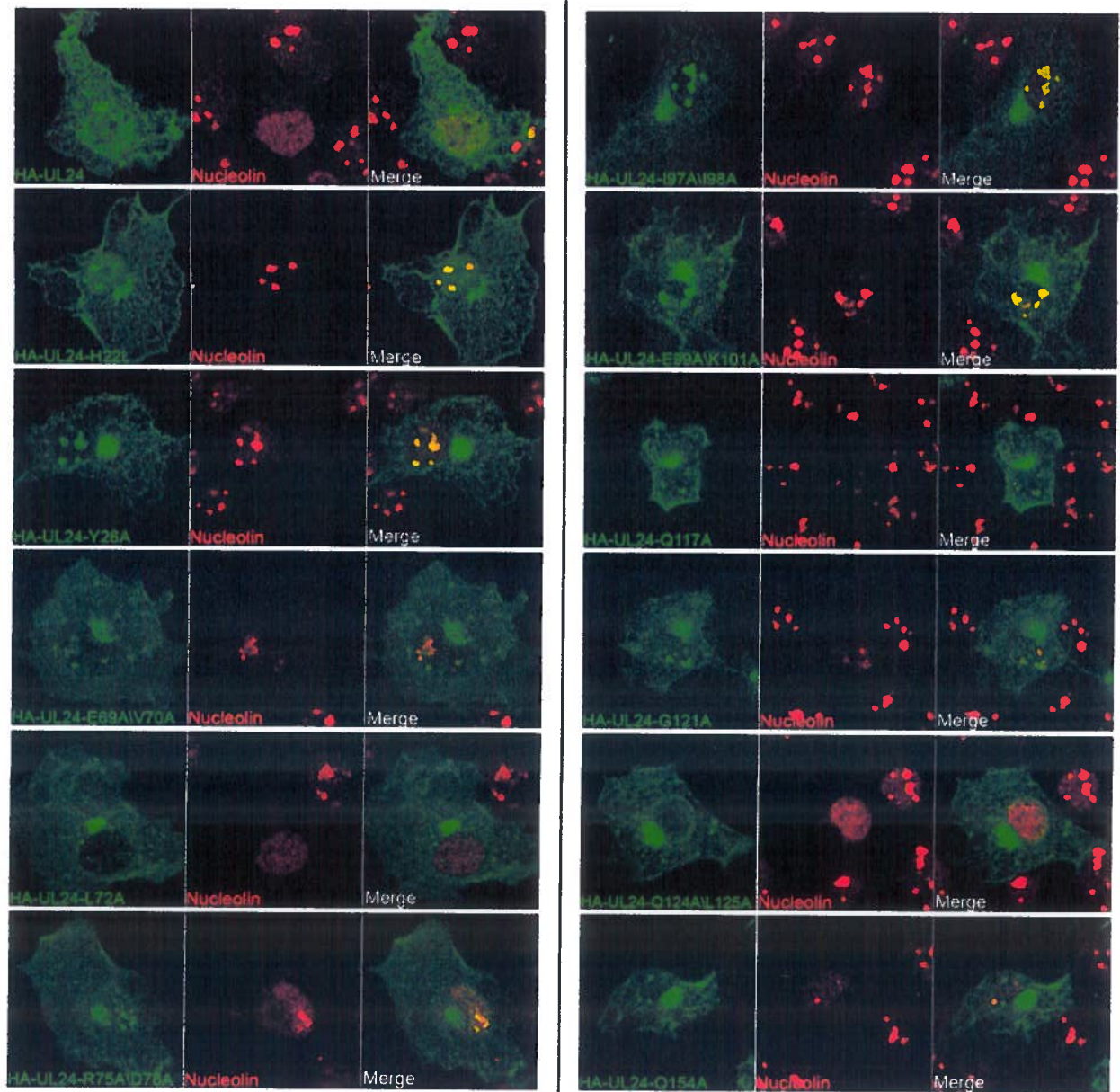


Fig. 2. Impact of UL24 variants on the localization of nucleolin. Confocal images of COS-7 cells transiently expressing different forms of HA-UL24 with the indicated amino acid substitutions or with the wild type UL24 sequence, and immunostained for HA-UL24 (HA : Green), and nucleolin (Red). In each set of three panels, the left-hand, middle, and right-hand panels correspond to HA-UL24, nucleolin and the merged image respectively. Co-localization of the two signals is indicated by the yellow color in the merged panels.

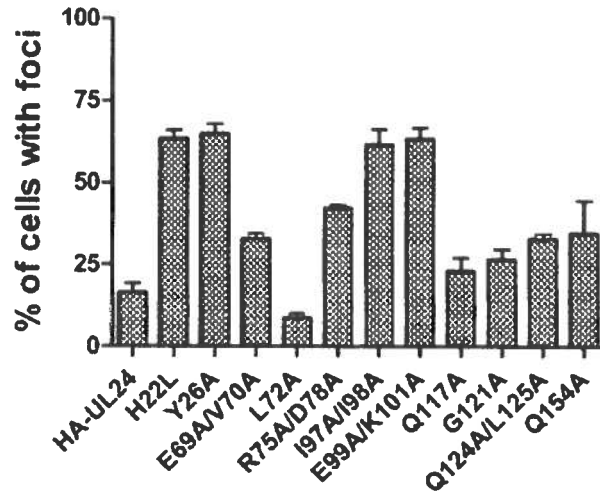


Fig. 3. Quantification of nucleolin distribution patterns in cells expressing HA-UL24 variants. COS-7 cells were transiently transfected with vectors expressing HA-UL24 wild-type or the substituted forms indicated. Two days post-transfection, cells were co-stained for HA and nucleolin. The graph shows the percentage of cells expressing HA-UL24 that exhibited clear foci of nucleolin staining with little or no diffuse staining in the nucleus. Results shown represent the average of three independent experiments, where more than 100 cells were analyzed for each mutation in each experiment. Error bars represent the standard error of the mean.

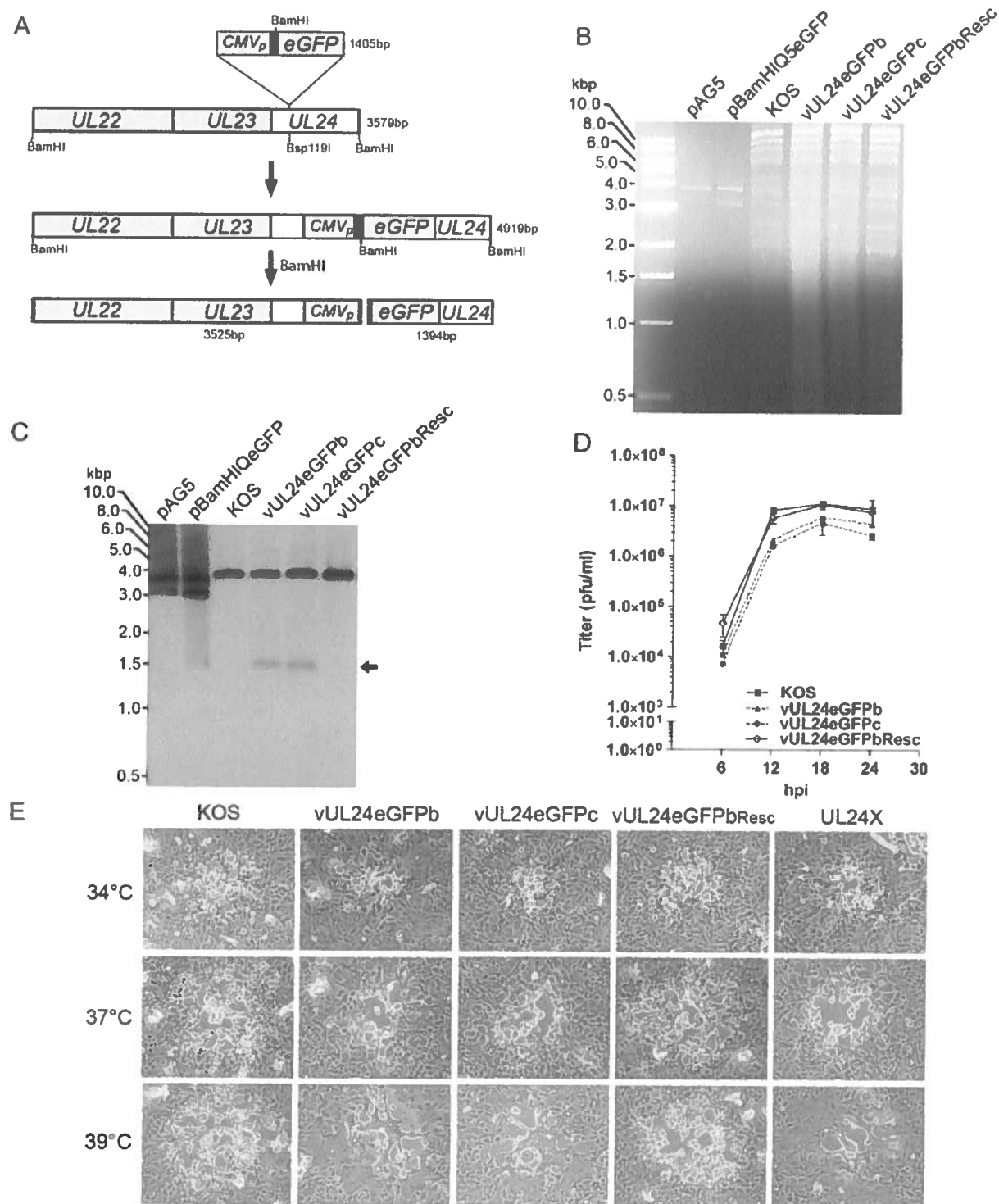


Fig. 4. vUL24-eGFP. (A) Schematic representation of the insertion of an eGFP expression cassette in the *UL24* ORF, and the resulting BamHI fragments. The grey boxes represent the genes present in the BamHI Q fragment of the HSV-1 genome and the inserted eGFP expression cassette. The *UL24* ORF is denoted by a white box. The black box between the

cytomegalovirus (CMV) promoter and eGFP gene represents the multiple cloning site from the plasmid pEGFP-N1. The top section represents the wild-type BamHI Q fragment and the insertion site of the eGFP cassette. The middle section represents the BamHI Q fragment following insertion. The bottom section shows the fragments obtained after BamHI digestion. (B) Genome analysis of vUL24-eGFP b and c, and vUL24-eGFPbRescue. Ethidium bromide-stained agarose gel shows fragments generated following BamHI digestion of viral DNA and control plasmids. Plasmids contained either the wild-type BamHI Q fragment (pAG5) or the fragment containing the eGFP insertion (pBamHIQeGFP). Positions of the molecular mass markers are indicated to the left of the panel. (C) Southern blot analysis using a probe corresponding to BamHI Q fragment in pBluescript II SK+. Arrow to the left of the panel indicates the position of the fragment generated due to the insertion of the eGFP cassette. (D) Characterisation of vUL24-eGFP viruses and vUL24-eGFPrescue in a one-step growth curve. Results shown represent the average of two independent experiments done in duplicate. Error bars represent the standard error of the mean. (E) Plaque morphology was assessed for the different viruses on Vero cells two dpi grown at the indicated temperatures.

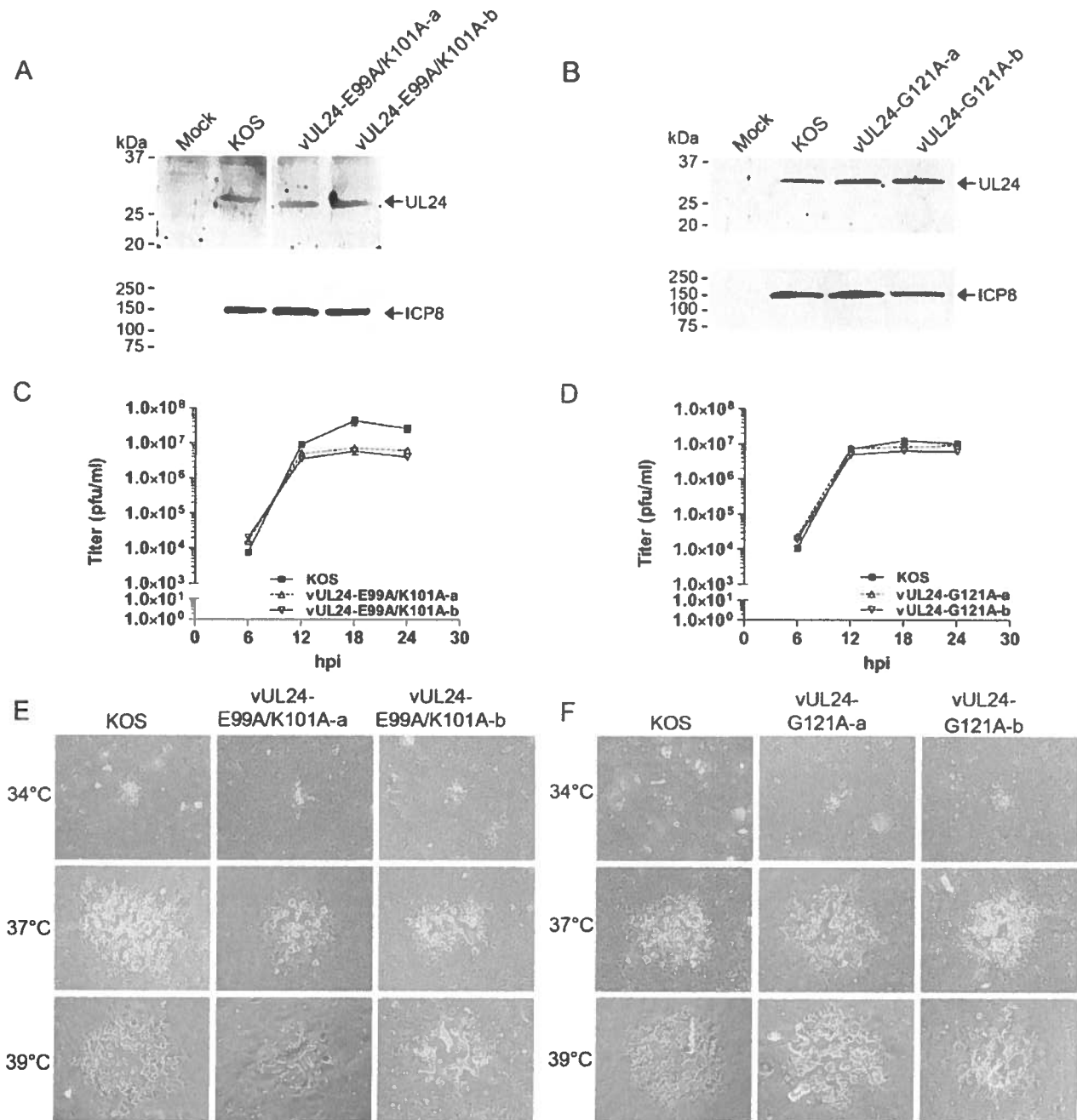
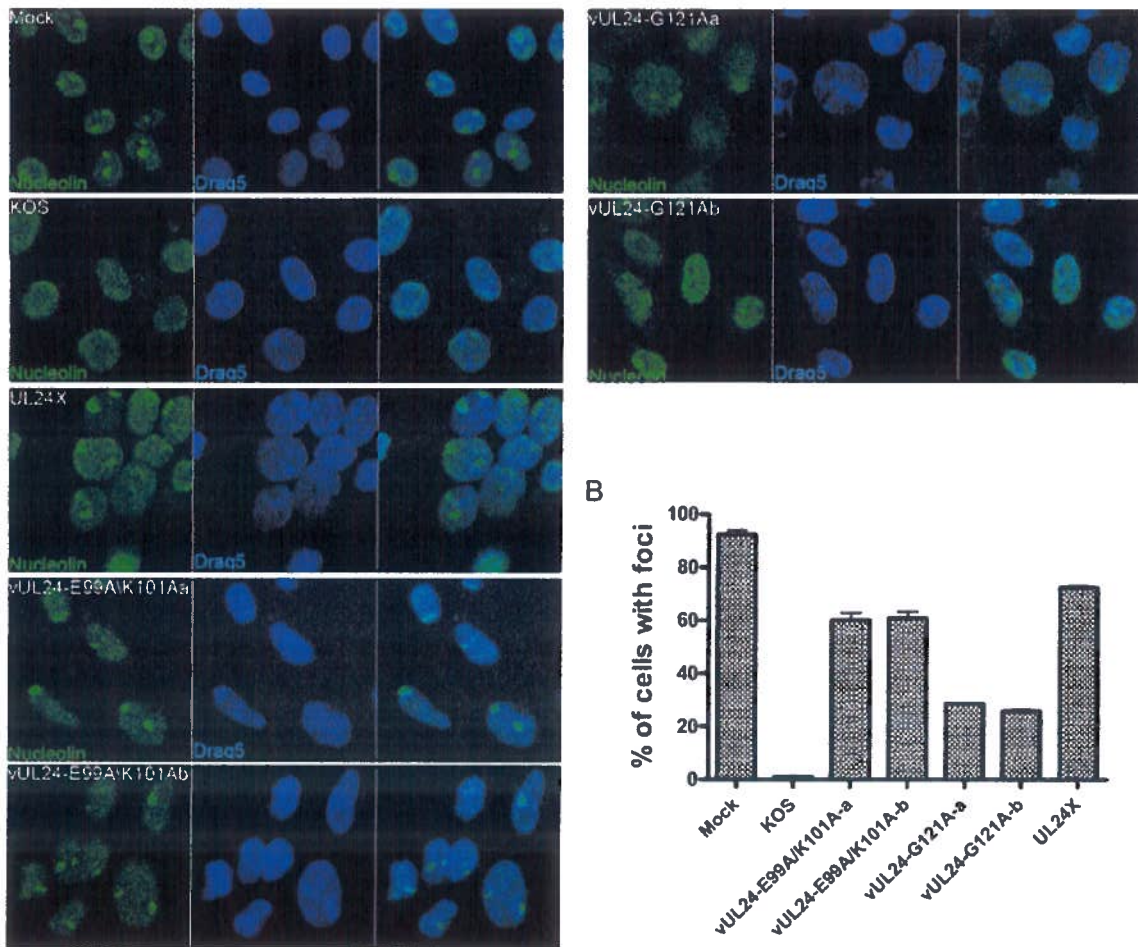


Fig. 5. Characterisation of vUL24 E99A/K101A and vUL24 G121A. (A) Western blot showing expression of UL24 in Vero cells infected with vUL24 E99A/K101A (a and b) (top panel). Blot was stripped and reblotted for the viral protein ICP8 as a control (bottom panel). (B) Western blot showing expression of UL24 in cells infected with vUL24 G121A (a and b) (top panel). Blot was stripped and reblotted for the viral protein ICP8 as a control (bottom panel). The position of molecular mass markers are indicated to the left of each panel. Arrows to the right of the panels mark the position of the protein. (C) One-step growth analysis of vUL24-E99A/K101A (isolates a

and b). (D) One-step growth analysis of vUL24-G121A (isolates a and b). (E) Analysis of plaque morphology for vUL24-E99A/K101A (a and b) and (F) for vUL24-G121A (a and b) on Vero cells at two dpi grown at the indicated temperatures.

A



B

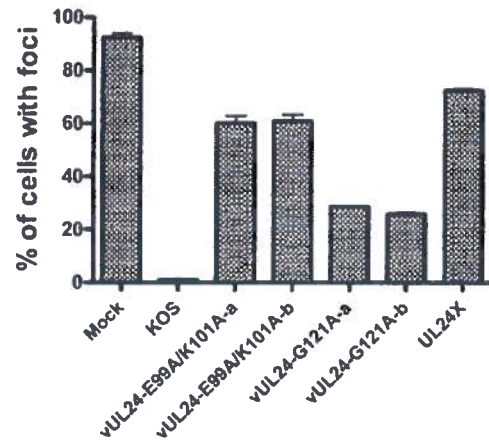


Fig. 6. Distribution pattern of nucleolin in Vero cells infected with UL24 mutants. (A) Confocal images of cells either mock-infected or infected with the indicated virus. Cells were immunostained for nucleolin (green), and nuclei were stained with DraG5 (blue). Left-hand panels show nucleolin localization, center panels show stained nuclei, and merged images are shown in the right-hand panels. **(B)** Quantification of the distribution pattern for nucleolin in cells infected with the indicated UL24 mutants. Cells were either mock-infected, or infected at an MOI of 10 and stained for nucleolin at 18 hrs pi. Cells were analyzed by confocal microscopy, and the number of cells showing clear foci of nucleolin staining was scored. Results shown represent the average of two independent experiments in which the localization of nucleolin in more than 150 cells was analysed for each mutant virus. Error bars represent the standard error of the mean.

Chapitre 4 : Troisième publication

Bertand L, Ben Abdeljelil N, Pearson A. (2012) UL24 Protein of Herpes Simplex-1 Interacts with Non-Muscle Myosin II A and Affects its Association with Glycoprotein B. (manuscrit en préparation)

Résumé de la troisième publication

Titre : La protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1 interagit avec la myosine non musculaire de type II a et affecte son association avec la glycoprotéine B.

Le gène codant pour la protéine UL24 est hautement conservé dans la famille des virus herpès. Une déficience pour celle-ci résulte *in vitro* en une réduction de l'efficacité de la réplication virale et dans la formation de plages syncytiales. Nous avons précédemment rapporté un rôle pour UL24 dans la dispersion de certaines protéines du nucléole. Dans cette étude, utilisant une approche de sédimentation sur gradient de glycérol, nous avons démontré qu'UL24 fait partie de complexes de haute masse moléculaire. Nous avons identifié NM2a comme partenaire d'interaction d'UL24 par purification par affinité de protéines associées. NM2a est un moteur d'actine ayant de multiples rôles et qui a été impliqué comme récepteur viral par son interaction avec la glycoprotéine B, dans la fusion cellule-cellule et dans la sortie virale du VHS-1. Nous avons observé une colocalisation de UL24 et NM2a près de la membrane cytoplasmique et dans le cytoplasme dans des cellules transfectées de façon transitoire et dans des cellules infectées. À la lumière d'une récente publication que NM2a est un récepteur fonctionnel de gB, nous avons étudié l'effet de l'absence d'UL24 sur cette relation. Nous avons observé une réduction de la co-localisation entre ces deux protéines lors de l'infection avec un virus déficient en UL24, indiquant une possible modification de la localisation d'un des deux partenaires. Ces résultats identifient, par immunoprécipitation, un premier partenaire d'interaction pour UL24 qui serait lié à un rôle au niveau cytoplasmique et qui pourrait être impliqué dans la formation de plages syncytiales résultant de l'absence d'UL24.

Contribution des auteurs

Luc Bertrand : Manipulations expérimentales pour toutes les figures. Réalisation des figures et du manuscrit.

Nawel Ben Abdeljelil : Analyse de quantification de la co-localisation avec les glycoprotéines virales et réalisation des graphiques pour la figure 5. Rédaction de la portion quantification des matériel et méthodes.

Angela Pearson : Révision et correction du manuscrit.

UL24 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Forms a Complex with Non-Muscle Myosin Type II A and Affects its Association with Glycoprotein B. (114/150)

Luc Bertrand, Nawel Ben Abdeljelil and Angela Pearson*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies,
Laval, Québec, H7V 1V7 CANADA

Running Title : UL24 interacts with NM2a

Abstract (236/250)

Main Text (3572 words)

Figures (5)

*Corresponding Author

INRS-Institut Armand-Frappier

531, boul. des Prairies

Laval, Québec, H7V 1B7

CANADA

Phone : 1-450-687-5010

Fax : 1-450-686-5501

angela.pearson@iaf.inrs.ca

Abstract

The UL24 gene is widely conserved in the *Herpesviridae* family. Mutant herpes simplex virus 1 (HSV-1) strains that do not express UL24 exhibit a reduction in viral replication *in vitro*, and form syncytial plaques. We previously demonstrated a role for UL24 in the relocalization of the nucleolar proteins nucleolin and B23 during infection. In this study, we discovered that UL24 is part of high molecular weight complexes in infected cells, and demonstrated that NM2a co-immunoprecipitates with UL24. This actin motor protein plays multiple roles in the cell, and has been implicated as a gB receptor for viral entry, in cell-cell fusion and in viral egress. We observed partial colocalization of UL24 and NM2a in cells transiently expressing the viral protein, as well as in infected cells at sites near cellular membranes and in the cytoplasm. Given the link between NM2a and gB, we tested the hypothesis that UL24 could affect this relationship. We observed a reduction in colocalization between these two proteins in the absence of UL24. This effect may contribute to the syncytial phenotype observed in cells infected with a UL24-null virus. Our results constitute the first report of an interaction partner for HSV-1 UL24, and suggest a mechanism by which UL24 affects fusion during infection.

Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) causes cold sores and the infection results in viral persistence in the innervating neurons (32). Consequences of HSV-1 infection can be severe in cases of eye involvement, resulting in keratitis and in some cases blindness (34). Although rare, HSV-1 can also cause encephalitis in immunocompetent individuals. In immunosuppressed patients and in newborns, infections are often severe and can also include extensive herpetic plaques and disseminated infections (reviewed in 19). *UL24*, the 24th open reading frame in the unique long region of the viral genome, is important for pathogenicity in a mouse model of infection (7), for efficient viral replication in mucous membranes, and for high viral titers in neurons (26). This gene is conserved throughout the *Herpesviridae* family, with possibly one exception (13). *UL24* is a protein of 269 amino acids (aa) that contains five homology domains (HD), which contain highly conserved residues present in other *UL24* homologues (27) and a PD-(D/E)XK endonuclease motif (33). It is one of four HSV-1 proteins, along with gB, gK and *UL20*, whose altered function appears to be associated with a syncytial phenotype, (3, 10, 51, 58). While gB has been shown to be a fusion protein and can induce syncytia formation (15, 18, 21), *UL24*, gK, *UL20* and gM have an inhibitory role on cell-cell fusion (2, 27, 31). *UL24* protein localizes to the nucleus, nucleolus and cytoplasm during infection (40), and a similar localization is observed upon transient expression of the protein in COS-7 cells, in addition to trans-Golgi localization (6). In our laboratory, we previously demonstrated a role for *UL24* in the dispersal of nucleolar proteins nucleolin and B23. This viral protein is essential for the specific dispersal of these nucleolar factors during infection (39, 40). Furthermore, we showed that the N-terminal domain of *UL24* was not only necessary but was sufficient for the redistribution of nucleolin (5, 6, 40) and B23 (39). Little is known regarding the functions of the cytoplasmic pool of *UL24* during infection.

The cellular cytoskeleton present in the cytoplasmic compartment of the cell is composed of microfilaments, intermediate filaments and microtubules (35). It is involved in

many functions, such as motility, cell division, organelle transport and cellular trafficking (20, 24, 45). In addition, many viruses have been shown to use the microtubule and actin cytoskeleton for cytoplasmic transport (8, 22, 46, 53, 54). The cytoskeleton plays an essential role in the transport of viral capsids in the cytoplasm since movement by free diffusion alone is not sufficient (9, 37). Upon entry, HSV-1 capsids are transported to the nuclear pore via microtubules (55). This transport is essential for viral infection (55), and occurs through the interaction of viral tegument proteins with cellular motors (47); in one model, US11 has been proposed to interact with the dynein motor and the dynactin complex (16, 17). The steps following assembly of new capsids in the nucleus, including virion maturation and egress are not fully understood (30, 42). It is widely accepted that following the acquisition of a primary envelope at the inner-nuclear membrane, the virus fuses with the outer-nuclear membrane and the capsid is released into the cytoplasm (reviewed in 29, 48). Final tegumentation of the virion then occurs (reviewed in 42). Afterwards, the tegumented capsids use active transport to reach the site of final envelopment (38, 64), most likely the trans-Golgi network and associated vesicles (14, 56, 60). Recent work demonstrated a role for amyloid precursor protein, a transmembrane glycoprotein linked to cellular transport both in epithelial and neuronal cells, in directing capsids to the final site of envelopment (11).

Several interactions between HSV-1 and transport motors have been demonstrated, related to capsid transport (17, 55, 63), protein localization (49), mRNA transport (50), and viral entry (1, 62). Previous studies have revealed several links between the protein Non-muscle Myosin Type II a (NM2a) and herpesvirus infections. It has been reported that, during HSV-1 infection, NM2a retracts from the periphery of the cell, is relocalized to proposed viral assembly sites, and furthermore, that its inhibition results in a drastic reduction of virus release in Vero cells (63). In addition, another group identified an interaction between c-Cbl and NM2a during Kaposi's Sarcoma Herpesvirus infection that results in the formation of blebs and promotes viral

entry (62). Finally, NM2a was proposed as a functional viral entry receptor, more specifically as a gB receptor, and a role for this interactions in cell-cell fusion has been suggested (1).

In this study, based on our working hypothesis that UL24 exerts its functions at least in part through protein-protein interactions, we sought to identify UL24-associated proteins in HSV-1-infected cells to better understand the role of this multifunctional protein. We identified the motor protein NM2a as interacting with UL24 in extracts of infected cells. This result prompted us to test the hypothesis that UL24 affects the interaction of NM2a with gB, which was confirmed upon our discovery that the absence of UL24 during infection resulted in a decrease in the association of gB and its newly identified receptor NM2a in the cytoplasm.

Material and methods

Cell culture and viruses

Vero cells were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 5 % newborn calf serum (NCS) (Invitrogen), 50 U/ml of penicillin and 50 µg/ml of streptomycin (Invitrogen). HeLa cells were cultured in DMEM with 8 % foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) with the same concentration of antibiotics. Infections were carried out in DMEM with 2% NCS and the same concentration of antibiotics. The HSV-1 strain KOS and UL24X (26) were originally provided by D.M. Coen. The strain vHA-UL24, which was constructed in a KOS background, has been described previously (40).

Preparation of whole cell extracts from infected cells

1.5×10^7 Vero or HeLa cells were seeded in T175 flasks, incubated overnight and then infected with the indicated virus at an MOI of 10 in DMEM containing 2% NCS. Flasks were gently shaken every 15 minutes for one hour, then the media was removed and replaced with DMEM containing 5% NCS. At 18 hpi, the cells were washed once with Phosphate Buffered Saline (PBS) and lysed on ice using 1ml per flask of either RIPA lysis buffer (500 mM NaCl, 1%

Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0 and one tablet of complete protease inhibitor (Roche)) or PA Buffer (120 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100 and one tablet of protease inhibitor) (28) for 15 minutes. Extracts for glycerol gradients were prepared in PA buffer containing 5% glycerol (v/v). Lysed cells were scraped and cellular debris pelleted by centrifugation at 13 000 rpm for 30 minutes at 4°C in a microcentrifuge. Supernatants were carefully removed and transferred to pre-chilled eppendorf tubes, and stored at -80°C.

Protein fractionation by glycerol gradient sedimentation

Glycerol solutions of 8% and 25% were prepared in a glycerol gradient buffer (40mM potassium phosphate, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA and 0.05% Triton X-100, pH 7.4). Using a gradient mixer, 12 ml continuous gradients were poured in a 14x89 mm thin wall ultracentrifuge tubes (Beckman). Whole cell extracts were layered on top of the gradient, and tubes were centrifuged at 150 000xg in a SW41Ti rotor for 18 hours in a Beckman-Coulter Optima L-100K ultracentrifuge. Fractions of 750 µl were collected dropwise.

Immunoprecipitations, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, and Western blotting

Whole cell extracts were pre-cleared using 50 µl of Protein G beads (Roche) for 1 hour on an inverter at 4°C. Immunoprecipitation (IP) of HA-UL24 was performed using 50 µl of anti-HA affinity matrix (Roche) for 3 hours at 4°C on an inverter. Tubes were then centrifuged for 5 minutes at 6 000 rpm at 4°C using a microcentrifuge, the supernatants were removed, and the beads were washed three times with 1 ml of PA buffer. Washes were performed for 15 min at 4°C on an inverter. After the final wash, beads were resuspended in 150 µl of 6x protein loading dye (37.5 % Glycerol, 3.75 % Sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.05% Bromophenol Blue, 0.5 M Tris pH 6.8, 20% β-mercaptoethanol) and boiled for 1 minute. Proteins were

resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). For silver staining of gels, the ProteoSilver plus kit (Sigma) was used according to the manufacturer's instructions. For Western blotting, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore), and analyzed by Western blotting using a monoclonal antibody directed against HA (Covance) or a rabbit polyclonal antibody against NM2a (Abcam), and a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody directed against mouse (Calbiochem) or rabbit (Bethly). Detection was by enhanced chemiluminescence using ECL plus reagents (GE-Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Indirect Immunofluorescence experiments

Transfections were performed using the vector pLB-HA-UL24 (6) and Fugene6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. HeLa cells were seeded at a confluence of 1×10^5 cells per well in a 24-well plate into which sterile coverslips had been placed. The next day, the plasmid and reagent were incubated for 15 minutes in DMEM media, and added to HeLa cells. After 5 hours, the cells were washed and then incubated for a further 48 hours prior to processing for immunofluorescence (IF). For analysis of infected cells, HeLa or Vero cells were seeded at 1×10^5 cells per well and grown overnight. The next day, cells were infected at an MOI of 10, shaken every 15 minutes for one hour. The media was then removed and replaced with DMEM containing 5% NCS. At the indicated time, the transfected or infected cells were washed in PBS and fixed for ten minutes using a 2% paraformaldehyde solution prepared in PBS. Cells were then washed with PBS, and the coverslips processed for IF as described previously (6). Rat anti-HA (Roche), rabbit anti-NM2a (Abcam), mouse anti-gB (Abcam), mouse anti-gD (Abcam) and mouse anti-gL (43) primary antibodies were used at dilutions of 1/250, 1/250, 1/200, 1/200 and 1/100 respectively. The goat Alexa-coupled secondary antibodies against rat, rabbit and mouse (Invitrogen) were used at a dilution of 1/1000. The nuclear stain Draq5 (Biostatus) was used at a concentration of 1/500 and was

included with the secondary antibody solution. After immunostaining, the cells were washed once in PBS, and the coverslips were mounted on glass slides using Prolong Gold Anti-Fade reagent (Invitrogen). Confocal microscopy was carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier imaging facility using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal with an argon–krypton laser at 488 and 568 nm (diode 638nm) mounted onto a Nikon E800 microscope using a 100x objective and a 1.6x software magnification in Lasersharp software (Bio-Rad). Images were prepared using Adobe Photoshop CS5.

Quantification of co-localization

To quantitate the degree of colocalization of gB, gD and gL staining (green) with NM2a staining (red), the Manders overlap coefficient (41) was calculated using the JACoP tool (52). The different images were first background-subtracted; the program allowed adjusting thresholds of the two images to define pixels that were positive in both channels prior to analysis. Using the JACoP plug-in, the rate of co-localization was determined on a pixel-to-pixel basis by scatter. The Manders overlap coefficient varies from 0 to 1, with 0 corresponding to non-overlapping images and 1 corresponding to 100% co-localization between the two images. At least 10 fields of view were analyzed for each condition, which represent at least 32 cells per condition. Statistical analysis of the significance between data sets was undertaken using the t test with a value of $P < 0.05$ for significance.

Results

UL24 of HSV-1 is present in high molecular weight protein complexes

To determine if UL24 had interacting partners, we fractionated extracts from HSV-1-infected HeLa cells on glycerol gradients to see if a portion of UL24 sedimented at a higher molecular weight than that corresponding to its predicted molecular mass, which would indicate an association with other proteins. Cells were infected for 18 hours with the virus vHA-UL24

(40), which expresses UL24 with an N-terminal hemagglutinin (HA) affinity tag. This virus replicates like the wild type parental virus KOS, and does not form syncytial plaques (40). Whole cell extracts were applied to a 8%-25% continuous glycerol gradient. Following centrifugation, gradients were separated in 16 fractions. Samples of each fraction were resolved by SDS-PAGE, and were analyzed by western blotting using an antibody directed against HA (Figure 1A). As a control for the efficacy of the gradient fractionation, we also analyzed fractions from a gradient run in parallel where we stained the proteins with silver (Figure 1B); we observed the expected general pattern of sedimentation of proteins according to molecular weight (Figure 1B). To assign the molecular weights corresponding to the different fractions, a native molecular weight marker was fractionated in parallel (data not shown). Surprisingly, we found that the fractions where we detected HA-UL24 (6-9) corresponded to a molecular weight of 242 to 720 kDa. In contrast, had UL24 fractionated corresponding to its predicted molecular mass, we would have expected to detect it in fractions 13-14. These results demonstrate that UL24 is present in one or multiple high molecular weight complexes.

NM2a co-precipitates with HA-UL24

To identify the proteins present in the UL24 complex, we immunoprecipitated (IP) HA-UL24 using a anti-HA matrix. Whole cell extracts prepared from either KOS- or vHA-UL24-infected cells, were used for immunoprecipitation using an antibody directed against HA. The precipitated proteins were separated by SDS-PAGE, and visualized by staining with silver (Figure 2A). We observed a band, between the 150 and 250 kDa protein markers, that was specific for the HA co-IP performed on extracts from HeLa cells infected with vHA-UL24, and was not seen when extracts of cells infected with KOS were used. We were unable to discern if a similar band was present in the anti-HA IP performed on infected Vero cell extracts due to the presence of non-specific bands at the same place on the gel. The specific band was excised from the gel and subjected to tryptic digest, and the resulting peptides were identified by mass

spectrometry. The results indicated the presence of NM2a. This hit had a score of 1652, and 26 unique peptides were identified (Figure 2B). We subsequently tested the glycerol gradient fractionation profile of NM2a in extracts of HSV-1-infected cells. We found that NM2a was present in the peak fractions for UL24 (Figure 2C). We also observed a second peak for NM2a at the bottom of the gradient.

To confirm the interaction of UL24 with NM2a, we performed a co-IP Western blot experiment. We found that NM2a co-precipitated with HA-UL24 using HeLa cell extracts, and also using Vero cell lysates (Figure 3). These interactions were specific, because we did not observe them when we used extracts from cells infected with KOS. We have thus far been unable to detect HA-UL24 co-precipitating using an antibody directed against NM2a. This is likely due to the high abundance of NM2a in the cells as compared to UL24, and that only a portion of NM2a co-fractionated with HA-UL24.

Partial co-localization of UL24 and NM2a

To identify cellular compartments where UL24 and NM2a associate, we first studied the localization of HA-UL24 and NM2a in HeLa cells that transiently expressed HA-UL24 (Figure 4A). HeLa cells were co-immunostained for HA and NM2a. No signal was detected using an antibody directed against HA in mock-transfected cells (Figure 4A, top panel). We did not observe a difference in the subcellular distribution of NM2a in the presence or absence of UL24; however, we were able to detect several sites with overlap of staining for NM2a and HA-UL24, especially near or at the cell membrane (Figure 4A).

We next investigated the localization of UL24 with respect to NM2a in Vero cells infected with vHA-UL24. Upon infection, we observed a change in staining pattern for NM2a, from the periphery of the cell to a more perinuclear region, as reported by other groups (1, 63). A similar change was observed in cells infected with wild type virus KOS or a UL24-deficient virus, UL24X (data not shown). In HA-UL24-infected cells, we observed a partial colocalization

between NM2a and HA-UL24, which appeared to be more pronounced at membranes and in the perinuclear region (Figure 4B, bottom panel).

Reduced association of NM2a and HSV-1 gB in the absence of UL24

Because a direct interaction between NM2a and gB has been demonstrated (1), and in light of the interaction we identified between UL24 and NM2a, we tested the hypothesis that UL24 affects the interaction of gB and NM2a during infection. Vero cells were infected with the wild-type virus KOS or the UL24-deficient virus, UL24X (27), and processed for IF at 9 hpi. Interestingly, in the absence of UL24, we found that the partial colocalization of gB and NM2A seen in KOS-infected cells (Figure 5A, top panel), appeared to be reduced (Figure 5A, bottom panel). We also tested for a change in the colocalization between NM2a and two other viral glycoproteins, gD and gL. Although we did detect some degree of overlapping staining with NM2A, it did not appear that there was an appreciable change in colocalization of either of these glycoproteins with NM2a when cells were infected with UL24X as compared to KOS (Figure 5C and E). To further validate our observations, we quantified the colocalization in both conditions by calculating the Manders coefficient. We observed a significant reduction of the Manders overlap coefficients between NM2a and gB in the absence of UL24 (24%) compared to an infection with wild-type virus (42%) ($p < 0.0001$) (Figure 5B); however, we did not observe such a reduction for gD and gL (Figure 5D and F).

Discussion

Herein, we report our discovery that UL24 interacts with NM2a in infected cells and has an impact on the association of gB with this cellular motor.

Identification of a UL24-interacting partner

The use of a recombinant virus expressing an epitope-tagged UL24 protein allowed us to identify the cellular motor NM2a as a UL24-interacting partner. Although cytoskeletal proteins

are among known contaminants in mass spectrometry proteomic experiments, the negative results obtained using extracts from cells infected with a virus that expresses the untagged form of UL24 are strong proof that the interaction is specific. The weight of the complex with which UL24 sedimented is consistent with that of a fully formed motor (230 kDa). Although we confirmed the interaction by IP-western blotting in two different cell types, when the IPs were carried out using an antibody that precipitated tagged UL24, we were unable to observe UL24 co-precipitating using an antibody directed against NM2a. This might be due to the stoichiometry difference between the two proteins, and that not all of UL24 interacts with NM2a, as seen by the partial overlap between the staining patterns for the two proteins in the confocal microscopy images, as well as evidenced by the second peak of NM2a seen in the glycerol gradient fractions. Thus, our results also suggest that UL24 interacts with other proteins, whose identity remains to be determined. Although none of the UL24 protein detected following glycerol gradient sedimentation was present in fractions corresponding to a monomeric HA-UL24 protein, this observation may reflect the limited sensitivity of the assay used, and we cannot rule out the possibility that some UL24 functions as a single polypeptide. Nevertheless, our results indicate that in infected cells, UL24 is primarily complexed with other proteins.

Impact of UL24 on NM2a

A change in the spatial distribution of NM2a in HSV-1-infected cells has been documented previously, and involves a relocalization of NM2a to the perinuclear region (63). It is possible that UL24 plays a role at this level; however, in studies comparing infection with a wild type virus to that of a UL24-null virus, we did not detect a difference in the staining pattern for NM2a (data not shown). Interestingly, a role for short distance transport has been shown for several viruses either from the nucleus to the microtubule organizing center, to the virus assembly site or to the plasma membrane to help cross the cortical actin (reviewed in 57). It is

possible that through its interaction with NM2a, UL24 could play a role in facilitating any of these steps, although further experiments would be required to test this hypothesis.

UL24 affects the association of gB with NM2a

Recently, we found that UL24 affects the subcellular staining pattern of viral glycoproteins B and D in human foreskin fibroblasts leading to a decrease in the association of these proteins with filamentous actin (Ben Abdeljelil N. and Pearson A., submitted). The results presented here suggest that for gB at least this change may reflect a decrease in the interaction of gB with NM2a. The protein NM2a has been identified as a receptor for gB, and this interaction might be important not only for viral entry but also for cell-cell fusion (1). Thus, one possible model to explain the syncytial plaque phenotype seen in the absence of a functional UL24 protein, is that there is a critical reduction in the interaction of gB and NM2a, which may lead to unregulated cell-cell fusion. Infection by UL24X of COS-7 cells, which are deficient for NM2a (59), did not result in syncytial plaques, even at high temperature (data not shown). While this result is consistent with NM2a being required for syncytia formation, we have so far been unable to block the formation of syncytial plaques upon infection with a UL24-null virus using an inhibitor of NM2a (data not shown). Thus, it is possible that the inhibitory effect of UL24 on syncytia formation does not require active NM2a. We also cannot rule out the possibility that the formation of syncytia is due to the change in gB localization per se and not due to the loss of the interaction of UL24 and NM2a.

The exact mechanisms governing cell-cell fusion are still elusive, but it is known that it requires at least four viral glycoproteins : gB, gD and gH/gL (61). The recycling of gB from the cell surface back to the Golgi apparatus has been demonstrated to be important in the regulation of cell fusion (2, 4, 12), and NM2a plays a role in membrane recycling pathways between the plasma membrane and the Golgi, as well as in vesicular trafficking (23, 25). The

results presented here could link these two pathways together and provide us with an insight into the mechanisms regulating syncytia formation.

Although NM2a was identified as an entry receptor for gB (1), UL24 of HSV-1 is expressed late in infection (44), and there is no evidence to date that it is packaged in the virion. Thus, it is unlikely that UL24 has an impact on early events during infection by a cell-free virus particle (36). Plaques formed by UL24-null viruses are smaller than those formed by wild type virus (27), which would be consistent with a defect in cell-to-cell transmission. We propose a model whereby UL24 affects the interaction of gB with NM2a at later times in infection, and that these interactions are important for efficient cell-to-cell transmission of virus. Thus, the interaction of UL24 and NM2a may be a useful target for the development of antivirals that inhibit virus spread. Further studies are required to identify the binding sites on UL24 responsible for the interaction with NM2a.

In summary, we have identified a new interacting partner for UL24. NM2a is a highly interesting cellular protein as it has previously been linked to both viral entry and egress. This interaction could be related to the syncytial phenotype seen with UL24-deficient viruses. We propose that this phenotype is the result of a decrease in the interaction of gB and NM2a resulting in the mistargeting of this fusogenic protein or a change in its fusogenic activity. It will be interesting to see how mutations in gB that confer a *syn* phenotype affect the co-localization of gB with NM2a.

Acknowledgements

L.B. was supported by scholarships from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Fondation Armand-Frappier (FAF). This project was funded through an infrastructure grant from the Canadian Foundation for Innovation (#9991) and an operating grant from CIHR (MOP82924) to A.P.

We would also like to thank P. Spears and R. Longnecker for the antiserum against gL.

References

1. **Arii, J., H. Goto, T. Suenaga, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Imai, A. Minowa, H. Akashi, H. Arase, Y. Kawaoka, and Y. Kawaguchi.** 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-62.
2. **Avitabile, E., G. Lombardi, T. Gianni, M. Capri, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J Virol* **78**:8015-25.
3. **Baines, J. D., P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-24.
4. **Beitia Ortiz de Zarate, I., L. Cantero-Aguilar, M. Longo, C. Berlioz-Torrent, and F. Rozenberg.** 2007. Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *J Virol* **81**:13889-903.
5. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**:109-18.
6. **Bertrand, L., and A. Pearson.** 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J Gen Virol* **89**:1142-51.
7. **Blakeney, S., J. Kowalski, D. Tummolo, J. DeStefano, D. Cooper, M. Guo, S. Gangolli, D. Long, T. Zamb, R. J. Natuk, and R. J. Visalli.** 2005. Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *J Virol* **79**:10498-506.
8. **Brandenburg, B., and X. Zhuang.** 2007. Virus trafficking - learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol* **5**:197-208.
9. **Bray, D.** 2001. *Cell movements : from molecules to motility*, 2nd ed. Garland Pub., New York.
10. **Bzik, D. J., B. A. Fox, N. A. DeLuca, and S. Person.** 1984. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* **137**:185-90.
11. **Cheng, S. B., P. Ferland, P. Webster, and E. L. Bearer.** 2011. Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell. *PLoS One* **6**:e17966.
12. **Chouljenko, V. N., A. V. Iyer, S. Chowdhury, J. Kim, and K. G. Kousoulas.** 2010. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. *J Virol* **84**:8596-606.
13. **Davison, A. J.** 1992. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* **186**:9-14.
14. **de Oliveira, A. P., D. L. Glauser, A. S. Laimbacher, R. Strasser, E. M. Schraner, P. Wild, U. Ziegler, X. O. Breakefield, M. Ackermann, and C. Fraefel.** 2008. Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics. *J Virol* **82**:4974-90.
15. **Diakidi-Kosta, A., G. Michailidou, G. Kontogounis, A. Sivropoulou, and M. Arsenakis.** 2003. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affects both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate. *Virus Res* **93**:99-108.

16. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, E. Diefenbach, D. J. Holland, R. A. Boadle, P. J. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**:3282-91.
17. **Dohner, K., A. Wolfstein, U. Prank, C. Echeverri, D. Dujardin, R. Vallee, and B. Sodeik.** 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**:2795-809.
18. **Engel, J. P., E. P. Boyer, and J. L. Goodman.** 1993. Two novel single amino acid syncytial mutations in the carboxy terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 confer a unique pathogenic phenotype. *Virology* **192**:112-20.
19. **Fatahzadeh, M., and R. A. Schwartz.** 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* **57**:737-63; quiz 764-6.
20. **Fletcher, D. A., and R. D. Mullins.** 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**:485-92.
21. **Goodman, J. L., and J. P. Engel.** 1991. Altered pathogenesis in herpes simplex virus type 1 infection due to a syncytial mutation mapping to the carboxy terminus of glycoprotein B. *J Virol* **65**:1770-8.
22. **Greber, U. F., and M. Way.** 2006. A superhighway to virus infection. *Cell* **124**:741-54.
23. **Heimann, K., J. M. Percival, R. Weinberger, P. Gunning, and J. L. Stow.** 1999. Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J Biol Chem* **274**:10743-50.
24. **Heng, Y. W., and C. G. Koh.** 2010. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:1622-33.
25. **Ikonen, E., J. B. de Almeida, K. R. Fath, D. R. Burgess, K. Ashman, K. Simons, and J. L. Stow.** 1997. Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci* **110 (Pt 18)**:2155-64.
26. **Jacobson, J. G., S. H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**:161-9.
27. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and D. M. Coen.** 1989. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**:1839-43.
28. **Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* **5**:403-7.
29. **Johnson, D. C., and J. D. Baines.** 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* **9**:382-94.
30. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2011. Nuclear envelope breakdown can substitute for primary envelopment-mediated nuclear egress of herpesviruses. *J Virol* **85**:8285-92.
31. **Klupp, B. G., R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter.** 2000. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J Virol* **74**:6760-8.
32. **Knipe, D. M., and P. M. Howley.** 2007. *Fields virology*, 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
33. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**:2575-7.
34. **Liesegang, T. J.** 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* **20**:1-13.
35. **Lodish, H. F.** 2000. *Molecular cell biology*, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
36. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.

37. **Luby-Phelps, K.** 1994. Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **6**:3-9.
38. **Luxton, G. W., J. I. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith.** 2006. The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J Virol* **80**:201-9.
39. **Lymberopoulos, M. H., A. Bourget, N. B. Abdeljelil, and A. Pearson.** 2011. Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* **412**:341-8.
40. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
41. **Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, and J. A. Aten.** 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**:375-382.
42. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**:222-34.
43. **Novotny, M. J., M. L. Parish, and P. G. Spear.** 1996. Variability of herpes simplex virus 1 gL and anti-gL antibodies that inhibit cell fusion but not viral infectivity. *Virology* **221**:1-13.
44. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:10821-8.
45. **Pollard, T. D., and J. A. Cooper.** 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**:1208-12.
46. **Radtke, K., K. Dohner, and B. Sodeik.** 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* **8**:387-400.
47. **Radtke, K., D. Kieneke, A. Wolfstein, K. Michael, W. Steffen, T. Scholz, A. Karger, and B. Sodeik.** 2010. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog* **6**:e1000991.
48. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
49. **Roberts, K. L., and J. D. Baines.** 2010. Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol* **84**:9889-96.
50. **Rode, K., K. Dohner, A. Binz, M. Glass, T. Strive, R. Bauerfeind, and B. Sodeik.** 2011. Uncoupling uncoating of herpes simplex virus genomes from their nuclear import and gene expression. *J Virol* **85**:4271-83.
51. **Ruyechan, W. T., L. S. Morse, D. M. Knipe, and B. Roizman.** 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* **29**:677-97.
52. **Segal, A. L., A. H. Katcher, V. J. Brightman, and M. F. Miller.** 1974. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *J Dent Res* **53**:797-803.
53. **Smith, G. A., and L. W. Enquist.** 2002. Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**:135-61.
54. **Sodeik, B.** 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* **8**:465-72.
55. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
56. **Sugimoto, K., M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto, and Y. Kawaguchi.** 2008. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol* **82**:5198-211.

57. **Taylor, M. P., O. O. Koyuncu, and L. W. Enquist.** 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol* **9**:427-39.
58. **Tognon, M., R. Guandalini, M. G. Romanelli, R. Manservigi, and B. Trevisani.** 1991. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res* **18**:135-50.
59. **Tullio, A. N., D. Accili, V. J. Ferrans, Z. X. Yu, K. Takeda, A. Grinberg, H. Westphal, Y. A. Preston, and R. S. Adelstein.** 1997. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12407-12.
60. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
61. **Turner, A., B. Bruun, T. Minson, and H. Browne.** 1998. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* **72**:873-5.
62. **Valiya Veettil, M., S. Sadagopan, N. Kerur, S. Chakraborty, and B. Chandran.** 2010. Interaction of c-Cbl with myosin IIA regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *PLoS Pathog* **6**:e1001238.
63. **van Leeuwen, H., G. Elliott, and P. O'Hare.** 2002. Evidence of a role for nonmuscle myosin II in herpes simplex virus type 1 egress. *J Virol* **76**:3471-81.
64. **Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-37.

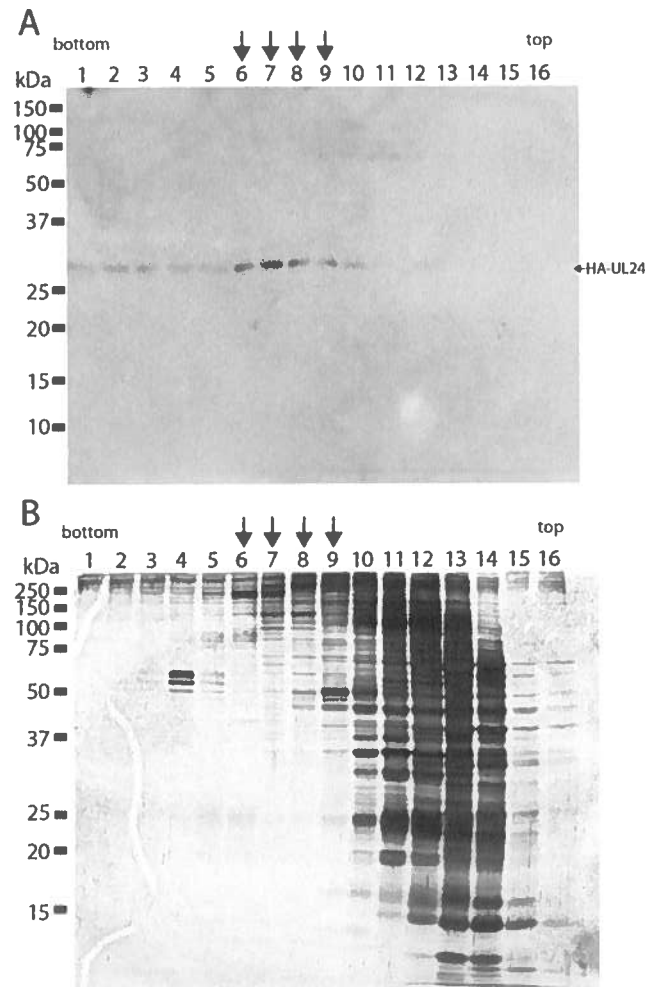
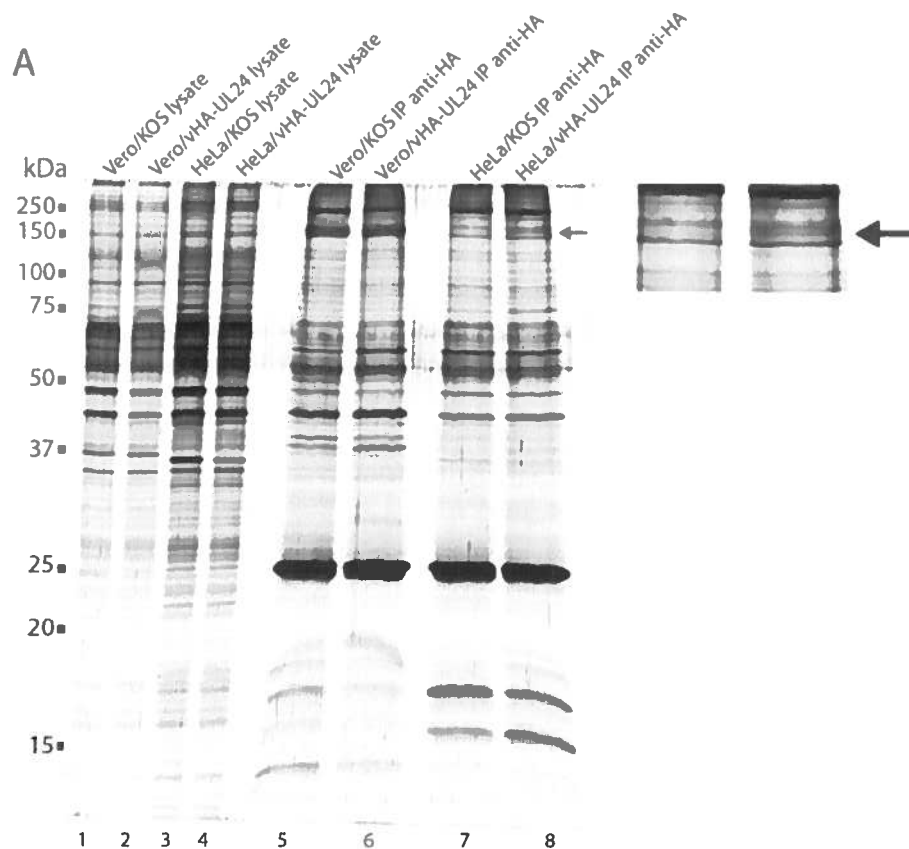


FIG. 1. Glycerol gradient fractionation of UL24-containing complexes. Lysates from Vero cells infected with vHA-UL24 for 18 hours were fractionated on a 8%-25% continuous glycerol gradient. (A) Samples of the fractions were analysed by western blot with an antibody directed against HA, to detect HA-UL24. The arrow on the right of the panel indicates the position of HA-UL24. Fractions to the left represent the bottom of the gradient (high sedimentation coefficient) and to the right the top (low sedimentation coefficient). The arrows above the panel denote lanes corresponding to the peak UL24 fractions. (B) Samples from the same fractions were also resolved by SDS-PAGE followed by staining with silver to show the total protein separation profile. The position of the molecular mass markers are indicated to the left of the panels.



B

Protein	MS Score	Peptides identified
Non-muscle myosin type IIA	1652	EQADFAIEALAK LRLEVNQAMK LDPHLVLDQLR VIQYLAYVASSHK VISGVLQGNIVFK VISGVLQGNIVFKK IMGIPPEEQMGLLR IAEFTTNLTETEEK NFINNPLAQADWAAK QLLQANPILEAFGNAK LTEMETLQSQLMAEK IAEFTTNLTETEEKSK ANLQIDQINTDLNLER LQVELDNVTGLLSQSDSK LQQELDDLVDLDHQR TQLEELEDELLQATEDAK KANLQIDQINTDLNLER IIGLDQVAGMSETALPGAFK TLEEEAKTHEAQIQEMR SMEAEMIQLQEELAAER IRELESQISELQEDLESER MQQNIQEELEEQLEEEESAR INFVNGYIVGANIETYLLEK LQQLFNHTMFILEQEYQYR DFSALESQLDQTQELLQEEENR ALEQQVEEMKTQLEELEDELLQATEDAK



FIG. 2. Affinity purification of UL24-interacting partners. (A) Silver stained gel of co-immunoprecipitated proteins following anti-HA precipitation. Lanes 1-4 show the samples of the whole lysates from KOS- and vHA-UL24-infected Vero and HeLa cells. Lanes 5-8 show the proteins obtained following immunoprecipitation with an anti-HA affinity matrix. The arrow indicates a co-immunoprecipitated protein of approximately 200 kDa. (B) Identification by mass spectrometry of NM2a from the 26 peptides listed. (C) The fractions from the glycerol gradient used in figure 1 were blotted against NM2a. Arrows indicate wells corresponding to peak UL24 fractions.

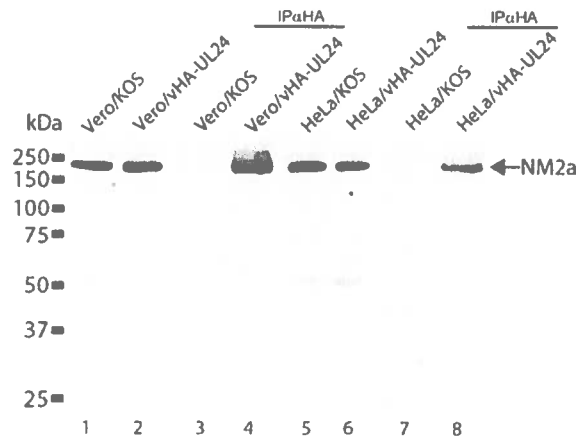


FIG. 3. Co-immunoprecipitation of NM2a with HA-UL24. Immunoprecipitation against HA on lysates from Vero and HeLa cells infected with either KOS or vHA-UL24 were carried out followed by a western blot directed against NM2a. Lanes 1,2, 5 and 6 correspond to 1 % of the indicated lysate input. Lanes 3,4 and 7,8 are the immunoprecipitates obtained in each condition. The arrow on the right indicates the position of NM2a. The position of the molecular mass markers are indicated to the left of the figure.

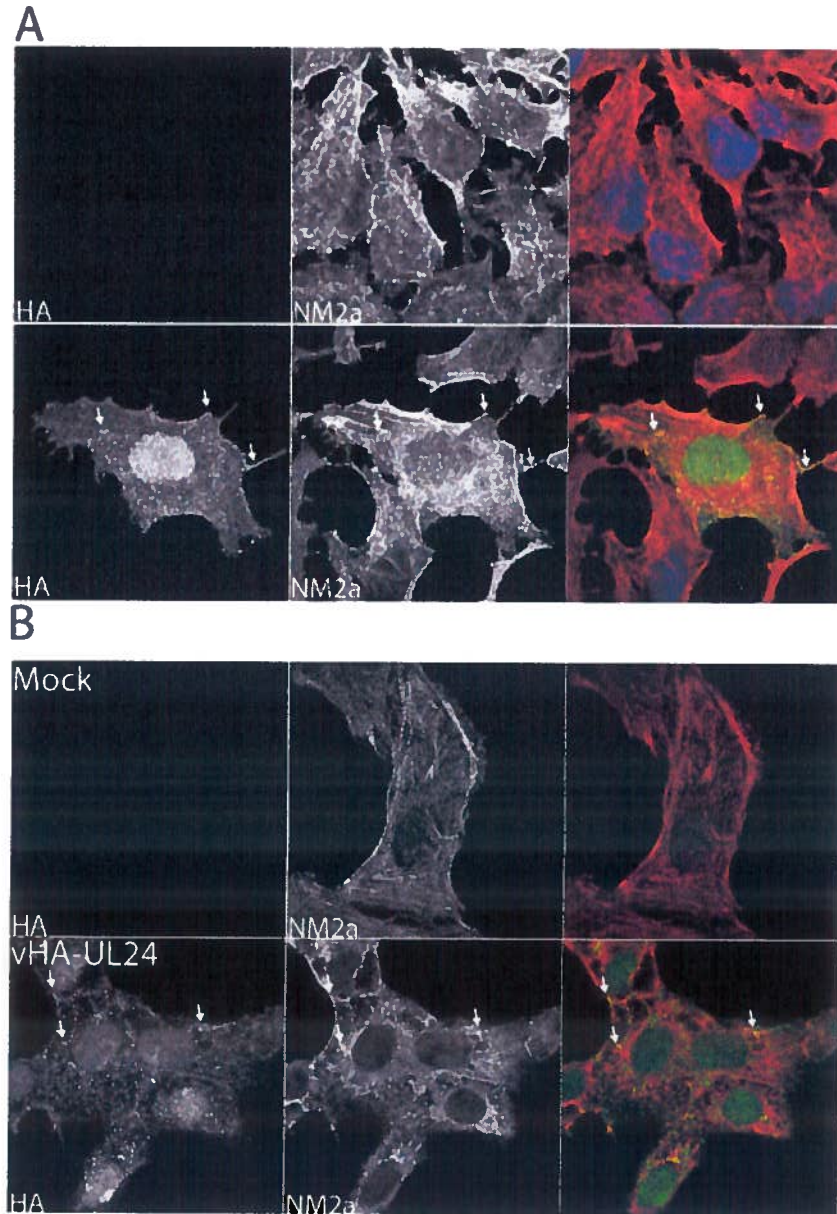


FIG. 4. Partial co-localization of UL24 and NM2a. (A) HeLa cells were either mock-transfected (top panels) or transfected with a mammalian expression vector for HA-UL24 (pLB-HA-UL24) (bottom panels) and then co-immunostained for HA (green) and NM2a (red). (B) Mock- (top panels) and vHA-UL24-infected (bottom panels) Vero cells were fixed at 12 hpi and co-immunostained for HA (green) and NM2a (red). Nuclei were stained with Draq5 (blue). Merged images are shown in right hand panels. Arrows indicate areas of co-localization.

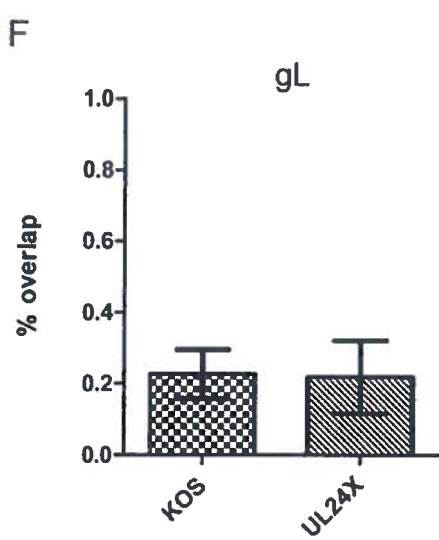
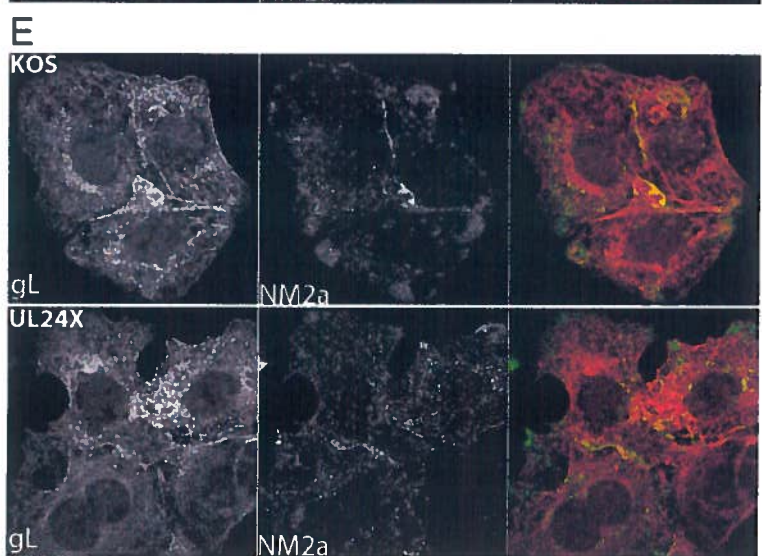
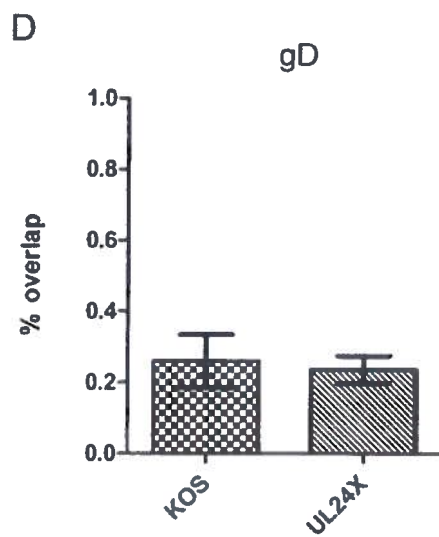
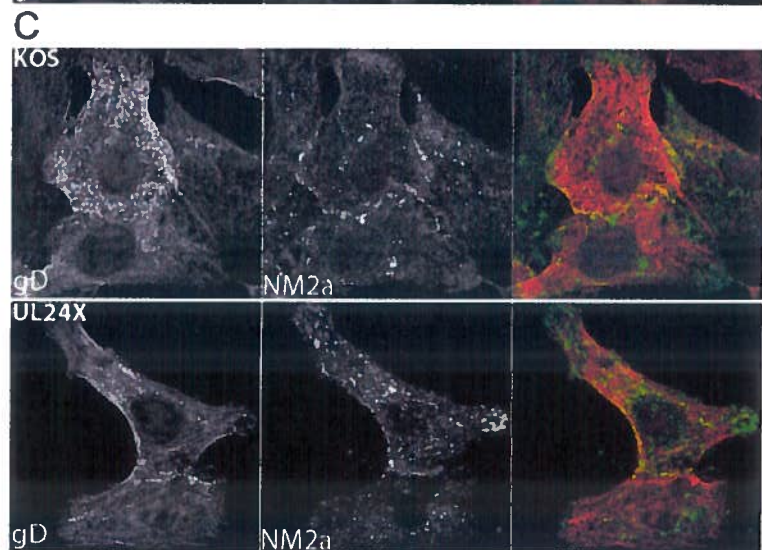
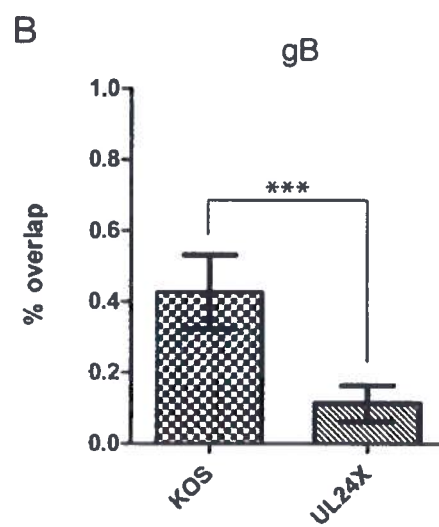
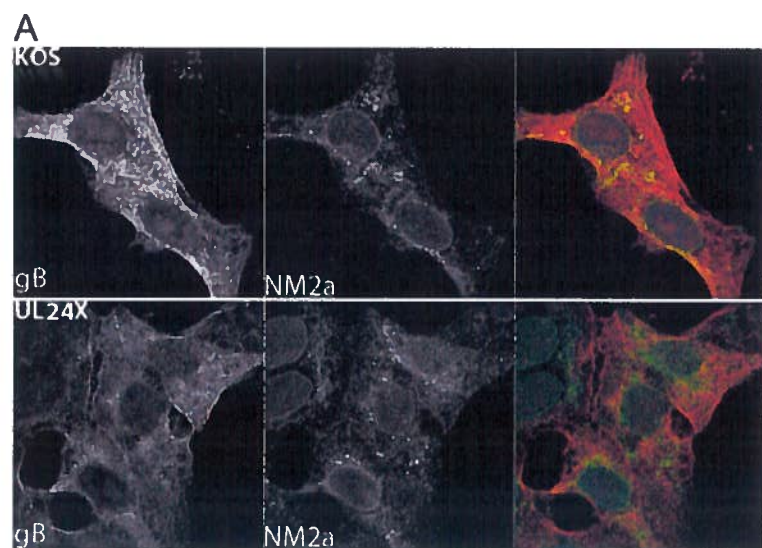


FIG. 5. Loss of co-localization between NM2a and gB in the absence of UL24. Vero cells were either KOS- or UL24X-infected for 9 hours and then co-immunostained for NM2a (red) and for gB, gD or gL (green). (A) gB and NM2a co-localisation in cells infected with KOS (top panels) or UL24X (bottom panels). (C,E) gD and gL co-localization with NM2a under the same conditions. (B) Quantification of the co-localization between gB and NM2a according to the Mander's coefficient on a total of 10 field of view (more than 32 cells total). (D,F) Graph representing the same quantification for gD and gL under the same conditions. *** = $p < 0.0001$

Chapitre 5 : Discussion

5. Discussion

Dans ce travail, plusieurs avenues ont été utilisées pour identifier les domaines fonctionnels de la protéine virale UL24. Cette tâche s'est divisée en deux parties : de un trouver les fonctions se rattachant directement à UL24 et deuxièmement, identifier les domaines importants pour ces fonctions. En utilisant UL24 hors du contexte d'infection, nous avons pu circonscrire sa localisation intracellulaire ainsi que les rôles qui s'y rattachent. L'utilisation de plasmides en transfection transitoire nous a également permis de tester une panoplie de mutants en vue d'identifier l'impact de ces substitutions d'aa sur les fonctions d'UL24. De plus, certaines mutations nous ont permis de délimiter des régions importantes à la localisation intracellulaire. Nous avons également utilisé des virus portant certaines mutations pour évaluer leur impact en contexte d'infection. Finalement, en utilisant un virus portant une étiquette sur la protéine UL24, nous avons pu déterminer qu'UL24 fait partie de complexes protéiques et participe à des interactions protéine-protéine qui interviennent dans la relation virus-cellule hôte. En effet, nous avons pu démontrer une interaction entre UL24 et NM2a ainsi qu'avec la protéine ribonucléotide réductase (discuté dans l'annexe I).

5.1 Localisation intracellulaire d'UL24 hors du contexte d'infection

Pour étudier UL24 hors du contexte d'infection, nous avons construit un plasmide d'expression mammifère exprimant celle-ci joint, par sa partie N-terminale, à une étiquette HA. En plus de ce plasmide, des versions portant UL24 avec la délétion de chacun des HDs ont été réalisées. Ces domaines sont hautement conservés au travers de la famille des *herpesviridae* et sont possiblement importants pour la fonction d'UL24. De plus, pour identifier le rôle de la portion C-terminale, ne portant pas ces domaines, des versions exprimant seulement la portion N- ou C-terminale ont été réalisées. Ces différents plasmides ont été utilisés pour des essais de transfection transitoire.

Il a été publié que UL24 est détectable à partir d'environ 6 hpi et est présente pour le restant de l'infection. Aux temps précoces, elle se localise au nucléole ainsi qu'au cytoplasme sous forme de points. Au cours du cycle d'infection, sa localisation devient majoritairement cytoplasmique et périnucléaire (345). Les processus et les compartiments cellulaires sont modifiés lors de l'infection. Néanmoins, nos résultats sur la localisation d'UL24 hors du contexte infectieux, mais également en absence d'autres protéines virales concordaient avec les observations dans les cellules infectées. Utilisant notre plasmide d'expression, nous avons déterminé qu'elle se localise au noyau ainsi qu'au cytoplasme, concentrée dans la région

périnucléaire. De plus, dans une faible quantité de cellules, un marquage sous forme de point au noyau était visible. Des études de co-marquage nous ont permis de déterminer que ce marquage se situe au nucléole, mais la faible proportion de cellules démontrant ce marquage est un sujet qui sera discuté dans la section 5.2. Ce type de localisation nucléaire a également été observé pour d'autres homologues d'UL24 tels que ceux du virus VHS-2, CMV et MHV-68 (245, 411, 630). Une localisation nucléaire a été rapportée pour ORF35 du VZV, mais les images publiées ne permettent pas de déterminer une localisation plus précise (253). Suite à la publication de nos résultats, une autre équipe a confirmé une localisation au nucléole pour UL24 en contexte de transfection (514). Plusieurs autres protéines du VHS-1 se localisent au nucléole : US11, UL12, UL27.5, ICP0, ICP4, ICP27, γ 34.5 et VP22 (69, 85, 321, 335, 369, 394, 514, 661). Ces protéines ont des rôles variés, mais certaines de celles-ci jouent un rôle dans la régulation de la transcription, rôle qui a également été proposé pour un des homologues d'UL24. Il est donc possible que la localisation à ce sous-compartiment soit importante pour une fonction à ce niveau. La protéine UL12, qui se retrouve également au nucléole, est une alcaline phosphatase qui possède un motif endonucléase et est impliquée dans l'encapsidation du génome viral. La localisation de ces deux protéines possédant un même domaine endonucléase pointe à une importance possible de cette localisation dans la fonction d'endonucléase ou dans sa séquestration lorsque le rôle de cet enzyme n'est pas nécessaire ou favorable à la réplication virale.

Nous avons détecté la protéine HA-UL24 à travers le cytoplasme. Par contre, elle était concentrée dans la région périnucléaire. Les organites majeurs se trouvant dans cette région sont le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Utilisant des marqueurs pour le RE, nous n'avons vu qu'une très faible co-localisation avec HA-UL24 en absence d'autres protéines virales. Par contre, l'utilisation de marqueurs pour le Golgi nous a permis d'observer une forte co-localisation, particulièrement avec le *trans*-Golgi. Ce type de localisation n'a pas été observé au cours de l'infection de cellules Vero (Lymberopoulos MH et Pearson A., résultats non publiés). Par contre, la structure du Golgi est fortement affectée dans ces cellules lors de l'infection par le VHS-1 (17). Il y a également une autre structure, visible au cours de l'infection, qui se situe à cet endroit, les aggrésomes. Leur formation dépend de la présence d'un squelette de microtubule intact, mais une fois formés, leurs localisations et structures demeurent intactes même en absence de cette partie du cytosquelette. En traitant les cellules avec une drogue qui induit une dépolymérisation des microtubules, ce marquage en périphérie du noyau a été perdu, indiquant qu'UL24 ne se localise pas dans ces structures, mais bien au Golgi. Plusieurs laboratoires ont démontré un rôle important du *trans*-Golgi ou des vésicules qui en dérivent sur

les événements reliés à l'enveloppement secondaire du VHS, où plusieurs processus de fusion membranaire se déroulent (269, 482, 610, 642). La protéine UL24 est une des allèles *syn*, associée à la formation de plages syncytiales, qui est due à une fusion aberrante des cellules infectées. La localisation d'UL24 à cet organite concorde également avec ce phénotype puisque plusieurs joueurs impliqués dans la formation de ce type de plages se localisent également à cet endroit, telles que les protéines virales gK et UL20 (167).

La portion C-terminale d'UL24, qui est moins conservée que la partie N-terminale, contient un possible signal de localisation nucléaire bipartite. Il a également été observé chez les homologues des virus VHS-2 et CMV. Deux des constructions réalisées, où seule la portion N- ou C-terminale est exprimée, nous ont permis de faire les premières observations quant à l'importance de ce domaine. Nous avons observé que la portion C-terminale, malgré qu'elle porte le domaine de localisation nucléaire putatif, est absente du noyau et se localise principalement au Golgi et au cytoplasme. Par contre, la partie N-terminale est présente presque exclusivement au noyau. Ces résultats nous indiquent clairement que le NLS observé n'est pas nécessaire à la localisation nucléaire d'UL24. De plus, des versions d'UL24 où les HDs ont été supprimés peuvent encore se localiser au noyau et au nucléole. Ces résultats démontrent que ceux-ci ne sont pas essentiels pour cette localisation ou que plus d'un signal existe dans la partie N-terminale d'UL24. Pour mieux définir la région contenant ce NLS, nous avons procédé à la fusion de portions d'UL24 avec la protéine fluorescente verte (eGFP). Ces essais nous ont permis de délimiter aux 60 premiers aa d'UL24 la séquence nécessaire à une localisation nucléaire et nucléolaire. Les spécifications requises pour un signal NoLS ne sont toujours pas bien définies, comme discuté dans la section 2.3.1. La plupart nécessitent la présence de plusieurs résidus basiques qui se suivent (47), mais étant donné le contenu hautement basique d'UL24, ceci rend l'identification de résidus importants plus ardue. De plus, il est possible qu'il y ait plus d'une région responsable de cette localisation, ce qui rendrait une approche par mutagenèse dirigée plus difficile. La localisation au Golgi peut se faire par la présence de résidus tyrosines et également par la présence de signal de rétention à cet organite (402). La localisation à ce sous-compartiment peut également se faire par l'interaction avec des protéines résidentes du Golgi. Les signaux de localisation au Golgi de la protéine UL24 restent à être déterminés.

5.2 Le VHS-1, UL24 et le nucléole

Lors de l'infection, plusieurs changements surviennent dans les cellules. Le VHS-1 modifie les compartiments cellulaires pour optimiser sa réplication. Plusieurs de ces

mécanismes restent encore inconnus ou peu définis et de plus, le rôle de certaines protéines virales reste encore inconnu. Tel était le cas pour UL24, il y a quelques années; peu d'études avaient été effectuées sur son rôle et la plupart des connaissances étaient sur les phénotypes qui surviennent en son absence lors de l'infection. Dans notre laboratoire, nous avons observé un impact d'UL24 sur le remodelage d'un des sous-compartiments du noyau, le nucléole. En effet, la protéine UL24 a été démontrée comme étant essentielle à la redistribution de la nucléoline (345) et de B23 (344) hors du nucléole au cours de l'infection de fibroblastes et de cellules d'origine épithéliale. D'autres laboratoires ont également rapporté cette observation, mais un d'entre eux pointe vers une autre protéine virale qui se localise au nucléole comme étant responsable de cette relocalisation, la protéine ICP4 (69). Par contre, la cinétique d'expression de cette protéine ne correspond pas avec celle de la dispersion de la nucléoline. De plus, il est possible que l'absence de ce facteur de transcription viral, primordial au bon déroulement du cycle viral, affecte l'expression d'UL24.

Nos études sur l'activité d'UL24 hors du contexte infectieux ont révélé que très peu de cellules démontraient un marquage d'UL24 au nucléole et que la majorité démontrait un signal réparti au nucléoplasme. Lors d'essais de co-marquage avec des protéines résidentes du nucléole, nous avons observé une dispersion spécifique de la nucléoline, tel que vu lors de l'infection. De plus, l'intégrité du nucléole dans son ensemble n'est pas affectée puisqu'un marquage pour la fibrillarine, une autre protéine de ce sous-compartiment, n'est pas affectée. Ceci démontre que la protéine UL24 seule est capable d'induire la dispersion spécifique de la nucléoline. Un autre groupe a rapporté une dispersion de la nucléoline au cytoplasme lors de l'infection (69), mais nous n'avons pu reproduire le résultat avec deux anticorps différents, un monoclonal et l'autre polyclonal. Il est possible que la présence des protéines gI et gE au cours de l'infection produise un bruit de fond dans la région périnucléaire, vu leur fonction comme récepteur Fc (265).

La dispersion de deux protéines du nucléole, la nucléoline (42, 345) et B23 (344), par UL24 peut possiblement aider à trouver un mécanisme sur la dispersion de la nucléoline. Cette première protéine possède un NLS, mais pas de NoLS. Sa localisation nucléolaire serait possiblement due à une interaction avec la protéine B23, qui elle possède un NoLS. Il se peut que l'interaction directe ou indirecte d'UL24 avec ce complexe bloquerait l'import au nucléole de la nucléoline en empêchant B23 d'effectuer son rôle à ce niveau. Une autre possibilité serait qu'UL24 influence le cycle cellulaire et enclenche les mécanismes qui induisent la dispersion de certaines protéines nucléolaires au début de la mitose (133). En effet, il a été publié qu'UL24 et certains de ses homologues pourraient induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (410).

Par contre, il est possible que cet arrêt soit dû à un effet indirect causé par des dommages à l'ADN. Il a été rapporté que UL76 du CMV, un homologue d'UL24, pourrait induire des aberrations chromosomales par la présence de centrioles surnuméraires ainsi que par la présence de bris d'ADN (548), ceci n'a pas été observé pour UL24 du VHS-1. Ces effets pourraient avoir comme conséquence d'induire la réponse de dommage à l'ADN, qui implique plusieurs facteurs du nucléole et qui bloque la progression du cycle cellulaire. De plus, ces essais ont été effectués en contexte de transfection et l'influence d'UL24 sur la progression du cycle cellulaire en infection n'est pas connue. En infection, certains facteurs nucléolaires se dispersent indépendamment de la présence d'UL24, tels que UBF, RPA194 et la fibrillarine (346), ce qui démontre que différents mécanismes sont à l'œuvre dans la redistribution des protéines du nucléole.

5.3 - Domaines et résidus conservés d'UL24 et la dispersion de la nucléoline

Tel que discuté dans la section 3.2, la séquence d'UL24 contient plusieurs régions conservées, les HDs, ainsi que certains résidus quasi-invariants. Nous avons fabriqué des versions d'UL24 où les HDs ont été supprimés ainsi que des versions présentant des substitutions d'aa les plus hautement conservés; certains de ceux-ci font partie du domaine putatif d'endonucléase. La délétion d'un des HDs de UL24 n'a pas affecté la localisation de la protéine puisqu'elle présente toujours une localisation cytoplasmique sous forme de point et concentrée au Golgi ainsi qu'une localisation nucléaire et nucléolaire. Notamment, la très grande majorité des cellules présentait un marquage fort au nucléole, contrairement à la version de type sauvage d'UL24. Dans une analyse sur l'effet de ces versions sur la nucléoline, nous avons observé une absence de dispersion de la nucléoline. Il est possible que les cinq HD soient essentiels pour qu'il y ait cette relocalisation, mais également que ces délétions empêchent UL24 de se replier correctement. Ces résultats suggèrent que UL24 s'accumule au nucléole tant qu'il n'y a pas dispersion de la nucléoline et suite à cette dispersion, elle semble sortir de ce sous-compartiment.

Des versions exprimant seulement la portion N- ou C-terminale d'UL24 ont également été testées. La localisation de celles-ci a été discutée précédemment, indiquant que la portion N-terminale se rend au noyau et nucléole et que la portion C-terminale se retrouve au Golgi et diffus dans le cytoplasme. En observant la dispersion de la nucléoline avec ces versions, nous avons pu démontrer que la portion N-terminale est capable à elle seule d'effectuer cette

relocalisation. Ceci indique que les HDs pourraient possiblement être impliqués dans cette fonction et que la portion C-terminale, moins conservée, n'a aucun effet direct à ce niveau.

Certains résidus d'UL24 sont conservés à plus de 90% et certains de ceux-ci ont été reliés à un possible motif d'endonucléase. Nous avons analysé l'impact sur la localisation et la fonction d'UL24 de la substitution de plusieurs de ces aa. Les différentes versions de la protéine ne démontraient pas de différence au niveau de leur localisation; ils se retrouvaient dans tous les compartiments attendus. Par contre, certains d'entre eux démontraient un marquage plus fort pour le nucléole, comme observé pour les mutants des HDs. En analysant le co-marquage avec nucléoline, nous avons noté un effet variable des différentes mutations sur la dispersion de la nucléoline. Certaines mutations démontraient des effets faibles ou partiels (E69A/V70A, L72A, R75/D78A, Q117A, G121A, Q124A/L125A et Q154A) et d'autres une réduction importante de cette fonction (H22L, Y26A, I97A/I98A et E99A/K101A). Il est intéressant de noter que malgré la haute conservation de ces résidus, seulement certains d'entre eux semblent très importants dans la fonction de dispersion de la nucléoline. L'effet le plus fort semble se regrouper au niveau des HDs un et trois et les résidus substitués dans ces HDs font partie du motif endonucléase ou joueraient un rôle au niveau de sa fonction. Ceci tend à démontrer l'importance de ce motif dans la dispersion de la nucléoline par UL24 (41).

Certaines de ces mutations ont été insérées dans un virus recombinant pour déterminer si la réduction visible de la nucléoline au cours de transfection transitoire était également visible en infection. Nous avons confirmé nos observations en utilisant en parallèle deux virus portant chacune des mutations, c'est-à-dire une réduction importante de la dispersion de la nucléoline suite à l'insertion de la mutation E99A/K101A et un impact moindre pour la mutation G121A. Lorsque nous avons analysé la réplication de ces virus, nous avons constaté une diminution comparable à un virus UL24 déficient pour la mutation E99A/K101A. Par contre, le virus vUL24-G121A n'a pas démontré de réduction. Une autre protéine virale qui possède un motif endonucléase est UL12 et un virus déficient pour celle-ci démontre également une réduction importante de la production virale ainsi qu'un retard dans la sortie virale du noyau (462). Une absence d'UL24 résulte également en des déficiences lors de la sortie virale, puisqu'une étudiante au laboratoire a démontré une réduction de capsides virales cytoplasmiques lors de l'infection par le virus UL24X (344). Cet effet pourrait être dû à un retard au niveau de l'assemblage des capsides et de l'encapsidation, mais ceci reste à être démontré. De plus, une importance pour la nucléoline a été démontrée dans la sortie des capsides virales du noyau (511).

5.4 - UL24 et la formation de syncytia

Une déficience en UL24 est également associée à un phénotype de plages syncytiales et les virus vUL24-E99A/K101A ainsi que vUL24-G121A forment tous deux ce type de plages. Ces deux mutations ont un effet différent sur la dispersion de la nucléoline ainsi que sur l'efficacité de réplication virale. Par contre, elles ont un effet similaire sur la fusion de cellules infectées. Cela concorde avec notre hypothèse qu'UL24 est une protéine multifonctionnelle puisque les différentes fonctions d'UL24 ne sont pas toutes affectées par les mêmes mutations. Les versions mutantes d'UL24 se retrouvent en partie au Golgi, localisation également vue pour la portion C-terminale d'UL24. Cet organite est impliqué au niveau de plusieurs phénomènes de fusion membranaire et dans l'enveloppement secondaire du virus. Il est possible, vu sa localisation lorsque exprimée seule, que la portion C-terminale soit responsable de ce rôle d'UL24 et que la portion N-terminale n'est pas impliquée directement. De plus, la séparation des phénotypes de formation de polykaryocytes et de réduction de la production virale démontre que ceux-ci ne sont pas la résultante du même effet de l'absence d'UL24, mais plutôt à plus d'un défaut dans le cycle viral. Puisque la localisation d'UL24 change au cours du cycle de réplication virale, on peut déduire qu'elle jouerait en premier un rôle au niveau du nucléole et par la suite serait relocalisée au cytoplasme et au Golgi pour y effectuer un autre rôle au niveau des événements de fusion membranaire. Dans ce modèle, l'absence d'UL24 résulterait pour le premier en une réduction de l'efficacité de réplication et pour le second dans la formation de plages syncytiales.

Les mécanismes liés à la formation des plages syncytiales ne sont pas élucidés, mais plusieurs joueurs sont connus, notamment les protéines gB, gK et UL20. Cette dernière joue un rôle au niveau de l'enveloppement cytoplasmique des virions, possiblement au niveau du *trans*-Golgi et en interagissant avec gK (178). Le rôle d'UL20 dans l'enveloppement, rattachée à certains résidus de la portion C-terminale, n'est pas nécessaire dans sa fonction au niveau de la formation de syncytia; il s'agirait donc de deux mécanismes indépendants (371). Il a été démontré que gK et UL20 interagissent ensembles et de plus, peuvent interagir avec gB, qui est essentielle à la fusion membranaire (88, 165, 611). La protéine gB est localisée à la membrane plasmique et est par la suite endocytée vers des vésicules rattachées à l'enveloppement final des virions (36). Les protéines UL20 et gK jouent un rôle inhibiteur sur la formation de plages syncytiales, possiblement via leur interaction avec gB et en modulant son activité fusogénique et sa présence à la surface de la cellule (20, 87, 166). Une association entre UL24 et ces différentes protéines n'a pas été démontrée, mais leur rôle et mode d'action peuvent nous renseigner sur les possibles mécanismes où intervient UL24. Il est possible qu'UL24 module

leur interaction avec les récepteurs intracellulaires, mécanisme qui pourrait en moduler l'activité fusogénique (131). Il est possible également qu'UL24 affecte le recyclage des glycoprotéines virales de la membrane aux endosomes ou dans leur rétention à ces endroits.

5.5 UL24, NM2a et les événements cytoplasmiques du cycle viral

Dans notre recherche de partenaires d'interaction pour UL24, nous avons démontré une interaction avec un moteur d'actine, NM2a. Cette protéine est impliquée dans plusieurs mécanismes, mais certains rôles spécifiques lui ont été attribués au cours de l'infection. Une publication récente démontre un rôle pour cette protéine comme récepteur fonctionnel d'entrée pour le virion (13). Il est peu probable qu'UL24 soit impliquée à ce niveau puisque la protéine ne fait pas partie du virion et, de plus, elle est exprimée de manière tardive. Néanmoins, cet article démontre que NM2a et son interaction avec gB peut jouer un rôle au niveau des fusions cellulaires. Une possibilité serait qu'UL24 forme un complexe avec NM2a, ce qui en réduirait la disponibilité, mais la différence du niveau de l'expression de ces deux protéines fait en sorte que ce mécanisme n'aurait que peu d'effet. Il est plus probable qu'UL24 ait un impact sur la fusion des cellules infectées en modulant l'interaction entre gB et NM2a, comme décrit à la section précédente, ou dans l'activité du moteur, ce qui reste à déterminer.

NM2a est impliquée dans le transport au niveau du Golgi et dans le recyclage des membranes. En vue de ces fonctions, une hypothèse serait que lors de l'infection, elle participe aux étapes d'internalisation des glycoprotéines et/ou sur leur transport vers le site d'enveloppement des virions. La protéine UL24 pourrait agir à ce niveau et son absence mènerait à une dérégulation de ce mécanisme, résultant possiblement à une accumulation de glycoprotéines virales à la surface de la cellule. Ce modèle suggérerait aussi un possible défaut dans l'enveloppement secondaire des virions, quoiqu'un tel défaut n'a jamais été détecté par microscopie électronique avec un virus déficient en UL24. Le moteur NM2a a également été démontré comme interagissant avec les virions suite à leur désenveloppement à la membrane externe du noyau, via VP22, pour favoriser leur transport au site d'enveloppement. Nos expériences nous ont permis d'observer une relocalisation partielle de NM2a lors de l'infection, de la périphérie de la cellule à la région périnucléaire, qui est visible en absence ou présence d'UL24. Par contre, le chevauchement de ce signal avec celui de gB diminue significativement. Ceci indique qu'il est probable que ce soit l'association de gB avec NM2a qui est perdue avec un virus UL24X.

La localisation des glycoprotéines est importante pour la transmission cellule-cellule, qui est un moyen efficace d'infecter les cellules avoisinantes en diminuant l'exposition au système

immunitaire, aux anticorps neutralisants et en dirigeant les virions vers des cellules non-infectées situées à proximité (266). Le VHS infecte des tissus polarisés et il a été démontré que les virions sont principalement dirigés, lors de la sortie, vers les parties latérale et basolatérale de la cellule plutôt que la partie apicale (268). Une autre preuve que ce moyen de transmission est important est que des virus déficients pour ce type de transmission sont sévèrement atténués en modèle animal (434). Deux glycoprotéines virales qui ne sont pas impliquées dans l'entrée virale sont impliquées dans la transmission cellule-cellule, gE et gI. En effet, il a été démontré pour ces deux protéines virales qu'elles doivent s'accumuler au trans-Golgi pour par la suite être relocalisées aux jonctions cellulaires pour qu'il y ait une infection efficace des cellules voisines (153). En leur absence, les virions s'accumulent au cytoplasme et sont dirigés vers la partie apicale de la cellule (268). La formation de syncytia est une stratégie utilisée par certains virus, tel que le VZV pour faciliter l'infection (98), mais le VHS ne forme pas normalement ce type de plages. Il est possible que la dérégulation du mécanisme régissant le ciblage et l'internalisation des glycoprotéines virales impliquées lors de l'enveloppement final et dans la transmission cellule-cellule résulte en la formation de plages syncytiales (20, 506, 680). Les protéines virales gK et UL20 sont associées à un phénotype *syn* et sont aussi impliquées dans l'internalisation et la rétention des glycoprotéines virales (20). Possiblement qu'UL24, qui est également liée à ce phénotype, pourrait être impliquée dans ces mécanismes de contrôle de la localisation des glycoprotéines virales et dans la transmission cellule-cellule, possiblement via son interaction avec NM2a.

Nous avons observé une co-localisation de UL24 et NM2a à la périphérie de la cellule, près de la membrane, ainsi qu'en périphérie du noyau. Cette dernière pourrait être dans les sites d'assemblage des virions où NM2a joue un rôle dans le transport des capsides (615). Celle à la membrane est possiblement reliée à l'actine corticale, qui joue un rôle ambivalent dans la sortie virale (83, 523). Il est possible que NM2a, de concert avec UL24, aide dans la sortie des virions, dans leur assemblage ou dans l'infection de cellules avoisinantes.

5.6 Modèle expliquant les rôles d'UL24 au cours de l'infection

Les éléments dont nous disposons jusqu'à présent ne nous permettent pas de décrire précisément le mécanisme d'action d'UL24 au cours de l'infection. Néanmoins, les fonctions que nous avons identifiées au laboratoire ainsi que les données disponibles sur les homologues de celle-ci nous permettent d'identifier des étapes où UL24 pourrait jouer un rôle (schématisé en Figure 11). Le rôle le plus précoce trouvé pour UL24 et ses homologues est dans la régulation des gènes IE. Ce rôle a été identifié pour la protéine UL76 du CMV (630), mais, à la

différence d'UL24, UL76 a été démontrée comme faisant partie du virion. Il est possible que UL24 joue un rôle dans la régulation d'expression génique en influençant la dynamique de certaines protéines du nucléole, un sous-compartiment qui a été démontré comme important pour l'efficacité du transport nucléo-cytoplasmique actif de transcrits de plusieurs virus. Les protéines nucléoline et B23 pourraient jouer un rôle dans ce transport, mais également dans la stimulation de la réplication du génome comme il a été démontré pour l'adénovirus (57, 255, 354, 437, 627). Un rôle pour la nucléoline dans la sortie virale du noyau a été démontré et une étudiante au laboratoire a observé un défaut dans la sortie virale en absence d'UL24 (344). Il est possible que la dispersion de la nucléoline soit nécessaire pour que ce processus soit efficace.

La fonctionnalité du domaine endonucléase d'UL24 n'a toujours pas été démontrée, mais les résidus qui le composent sont importants pour l'efficacité de réplication du virus. Une autre protéine virale, UL12, possède un motif similaire et est importante dans la résolution des formes d'ADN recombiné avant l'empaquetage dans les capsides (26, 461, 462, 483). Une déficience pour celle-ci résulte en un retard dans la sortie nucléaire des capsides et en l'empaquetage de formes anormales de génomes viraux. Il est possible, si le motif présent dans UL24 est fonctionnel, qu'elle soit importante pour résoudre les structures d'ADN viral.

Plus tard au cours de l'infection, UL24 se retrouve au cytoplasme dans des structures en forme de points et concentrée en région périnucléaire. Nos essais en transfection nous ont permis de démontrer une localisation au *trans*-Golgi, ce qui concorderait avec un rôle au niveau des étapes d'assemblage des virions. De plus, le phénotype UL24 déficient pour la formation de plages syncytiales pointe vers un rôle dans l'enveloppement secondaire, dans le contrôle des processus de fusion ou dans la régulation des protéines de fusion. En ce sens, UL24 pourrait aider à l'internalisation des glycoprotéines ou dans leur séquestration dans les sites d'enveloppement final. En effet, le cytosquelette est important pour ces étapes finales de la réplication. Il est possible que l'interaction entre UL24 et NM2a affecte le recyclage des glycoprotéines en promouvant ce mécanisme via l'activation de NM2a. Ceci résulterait en une augmentation de l'internalisation des glycoprotéines, et donc de gB, et une présence réduite à la surface. De plus, l'interaction avec NM2a pourrait se faire à ces mêmes étapes. Une possibilité est qu'UL24 pourrait activer ce moteur et augmenter l'efficacité de ces étapes, mais également en jouant sur son interaction avec gB. Il est également possible qu'UL24 intervienne lors de la sortie des virions ou dans la traversée de l'actine corticale en interagissant avec NM2a pour promouvoir le mouvement des virions vers la membrane plasmique. De plus, il est possible qu'UL24, via son interaction avec NM2a, promeut l'infection de type cellule-cellule en

régulant le transport de glycoprotéines virales impliquées dans ce mode de transmission, gE et gI. UL24 pourrait également aider au transport vers ces zones de juxtaposition cellulaire pour promouvoir l'infection de cellules avoisinantes.

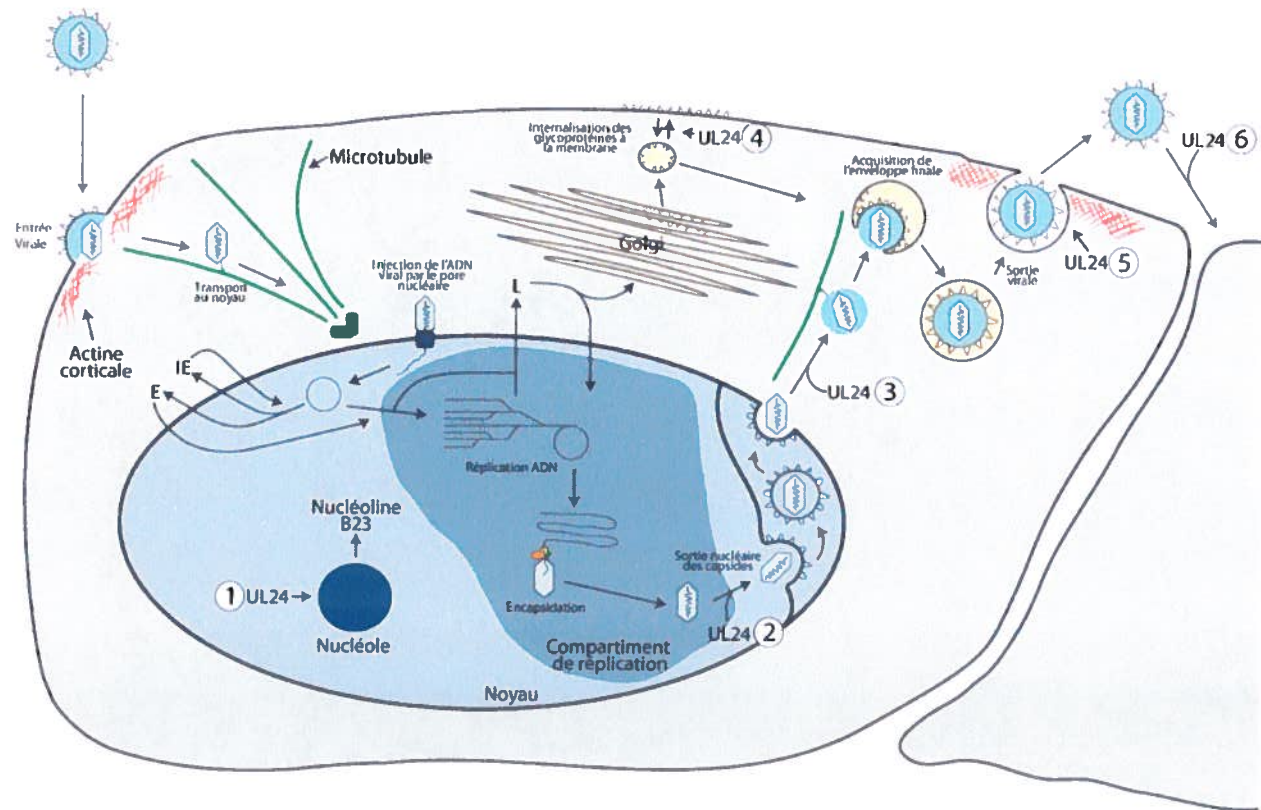


Figure 11. Modèle des rôles d'UL24 au cours de l'infection. UL24 agit au niveau du nucléole en induisant une relocalisation de la nucléoline et de B23 hors de ce sous-compartiment (1). UL24 agit au niveau de la sortie nucléaire des capsides (2). Possiblement par son interaction avec NM2a, UL24 pourrait jouer un rôle sur le transport des capsides avant l'enveloppement secondaire (3), dans l'endocytose des glycoprotéines virales à la membrane plasmique (4) et/ou dans la traversée de l'actine corticale lors de la sortie des virions (5). Elle pourrait également jouer un rôle dans la transmission cellule-cellule (6).

Conclusions et perspectives

Les premières expériences de cette thèse se sont concentrées sur l'étude de la protéine UL24 hors du contexte d'infection. Ceci nous a permis de circonscrire la localisation d'UL24 dans les différents compartiments cellulaires. Nous avons observé qu'elle se retrouve aux mêmes endroits que lors de l'infection, ce qui nous permet de conclure que sa localisation ne dépend pas d'autres protéines virales, ni de modifications cellulaires apportées lors de l'infection. Nous avons pu déterminer que la protéine se retrouve au nucléole et également au niveau du *trans*-Golgi. De plus, l'utilisation de versions portant des délétions a permis de déterminer que les portions N- et C-terminales ont une localisation différente. Ces observations soutiennent un rôle multifonctionnel pour UL24. Nous avons démontré que les 60 premiers aa d'UL24 sont capables d'induire une localisation au niveau du nucléole d'une protéine hétérologue et que la portion C-terminale se localise au Golgi. Il serait intéressant de poursuivre cette étude pour identifier les résidus impliqués dans la localisation d'UL24 et l'effet de la mutation de ceux-ci en contexte infectieux.

Les fonctions connues d'UL24 avant cette étude n'étaient que les phénotypes observables avec le virus UL24X. Des études au laboratoire avaient permis de démontrer un rôle sur la localisation de la nucléoline durant l'infection. Nos études en transfection nous ont permis de confirmer ce rôle et de plus d'assigner cette fonction à la portion N-terminale qui est suffisante pour induire la dispersion. La délétion des HDs abolit cette fonction, mais il est possible que le repliement de la protéine soit affecté par ces modifications. L'utilisation de versions d'UL24 avec substitutions d'un ou de deux résidus, modifications moins drastiques que les délétions, nous ont permis de prouver l'importance de deux régions de résidus conservés pour la dispersion de la nucléoline. Ceux-ci sont rattachés à un motif d'endonucléase putatif dont la fonction n'a pas encore été démontrée. Il serait intéressant dans un premier temps de vérifier la fonctionnalité de celui-ci et d'identifier les potentielles cibles lors de l'infection. Il est possible que ces cibles soient reliées à la fonction d'UL24 au nucléole ou pour résoudre les formes branchées de l'ADN viral, rôle similaire à la protéine UL12 du VHS-1.

L'étude en contexte infectieux avec certaines des mutations a permis de confirmer les résultats obtenus *in vitro* sur la dispersion de la nucléoline. Un impact fort sur cette dispersion est lié à une réduction des titres viraux du même ordre qu'un virus déficient pour UL24. Ceci indique que la dispersion de la capacité de disperser la nucléoline est importante pour l'efficacité de la réplication du VHS-1. Les deux virus testés résultent en la formation de plages syncytiales, un autre phénotype associé à une déficience pour UL24. Dans un premier temps, ceci permet de séparer deux des phénotypes du virus UL24X, indiquant que la diminution de la

réplication virale n'est pas due à la formation de ce type de plages. Ces observations soutiennent également l'hypothèse qu'UL24 est multifonctionnelle.

Finalement, la recherche de partenaires d'interactions d'UL24 nous a permis d'identifier NM2a comme protéine interagissante. Nous avons utilisé diverses méthodes pour observer cette interaction. La présence de co-localisation à la membrane ainsi qu'au cytoplasme soutient que possiblement la portion C-terminale est impliquée à ce niveau. NM2a a été impliquée dans le transport des capsides virales ainsi que dans la fusion entre cellules infectées. Elle est également un récepteur pour la protéine de fusion gB, interaction qui pourrait mener à la formation de plages syncytiales. Nos expériences nous ont permis d'observer un changement de co-localisation entre ces deux protéines en absence d'UL24. Il est possible que gB soit localisée de manière aberrante et que ceci entraîne une dérégulation dans les processus de fusion, résultant en la formation de polykaryocytes. Le site d'interaction entre UL24 et NM2a n'est pas connu, mais la disponibilité de plusieurs mutants au laboratoire pourrait nous aider à identifier des résidus conservés importants pour cette interaction. Il serait intéressant de voir l'effet de l'abolition de cette interaction en contexte d'infection *in vitro* et *in vivo*. Un groupe a rapporté une réduction importante de la pathogenèse du VHS-1 en utilisant un inhibiteur de NM2 et a attribué ce phénotype à une perte d'interaction avec gB. Par contre, UL24 est également un facteur de pathogenèse et il est possible que cet inhibiteur ait eu un effet indirect sur une fonction d'UL24. Il est donc possible que les résultats des recherches présentées mènent à une potentielle cible thérapeutique qui pourrait aider dans le traitement des infections par le VHS-1. Également, vu la conservation d'UL24 dans les différentes familles de virus herpes, il est possible que les résultats obtenus s'appliquent à d'autres virus.

Références :

1. **Adamson, W. E., D. McNab, V. G. Preston, and F. J. Rixon.** 2006. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *J Virol* **80**:1537-48.
2. **Adelman, K., B. Salmon, and J. D. Baines.** 2001. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3086-91.
3. **Ahmad, Y., F. M. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley, and A. I. Lamond.** 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* **37**:D181-4.
4. **al-Kobaisi, M. F., F. J. Rixon, I. McDougall, and V. G. Preston.** 1991. The herpes simplex virus UL33 gene product is required for the assembly of full capsids. *Virology* **180**:380-8.
5. **Allen, G. P., and J. T. Bryans.** 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol* **2**:78-144.
6. **Amorim, M. J., E. A. Bruce, E. K. Read, A. Foeglein, R. Mahen, A. D. Stuart, and P. Digard.** 2011. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol* **85**:4143-56.
7. **Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond, and M. Mann.** 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**:77-83.
8. **Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann, and A. I. Lamond.** 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**:1-11.
9. **Angelier, N., M. Tramier, E. Louvet, M. Coppey-Moisand, T. M. Savino, J. R. De Mey, and D. Hernandez-Verdun.** 2005. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell* **16**:2862-71.
10. **Angelov, D., V. A. Bondarenko, S. Almagro, H. Menoni, F. Mongelard, F. Hans, F. Miettton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, S. Dimitrov, and P. Bouvet.** 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J* **25**:1669-79.
11. **Angelov, D., A. Molla, P. Y. Perche, F. Hans, J. Cote, S. Khochbin, P. Bouvet, and S. Dimitrov.** 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* **11**:1033-41.
12. **Arhel, N., A. Genovesio, K. A. Kim, S. Miko, E. Perret, J. C. Olivo-Marin, S. Shorte, and P. Charneau.** 2006. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* **3**:817-24.
13. **Arii, J., H. Goto, T. Suenaga, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Imai, A. Minowa, H. Akashi, H. Arase, Y. Kawaoka, and Y. Kawaguchi.** 2010. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**:859-62.
14. **Atanasiu, D., W. T. Saw, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2010. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *J Virol* **84**:12292-9.
15. **Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, T. M. Cairns, B. Reilly, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2007. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18718-23.
16. **Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, M. P. de Leon, H. Lou, B. P. Hannah, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2010. Bimolecular complementation defines functional regions of Herpes simplex virus gB that are involved with gH/gL as a necessary step leading to cell fusion. *J Virol* **84**:3825-34.

17. **Avitabile, E., S. Di Gaeta, M. R. Torrisi, P. L. Ward, B. Roizman, and G. Campadelli-Fiume.** 1995. Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol* **69**:7472-82.
18. **Avitabile, E., C. Forghieri, and G. Campadelli-Fiume.** 2009. Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD. *J Virol* **83**:10752-60.
19. **Avitabile, E., G. Lombardi, and G. Campadelli-Fiume.** 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**:6836-44.
20. **Avitabile, E., G. Lombardi, T. Gianni, M. Capri, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J Virol* **78**:8015-25.
21. **Backovic, M., and T. S. Jardetzky.** 2011. Class III viral membrane fusion proteins. *Adv Exp Med Biol* **714**:91-101.
22. **Backovic, M., T. S. Jardetzky, and R. Longnecker.** 2007. Hydrophobic residues that form putative fusion loops of Epstein-Barr virus glycoprotein B are critical for fusion activity. *J Virol* **81**:9596-600.
23. **Backovic, M., R. Longnecker, and T. S. Jardetzky.** 2009. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2880-5.
24. **Bailey, C. J., R. G. Crystal, and P. L. Leopold.** 2003. Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J Virol* **77**:13275-87.
25. **Baines, J. D., P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-24.
26. **Balasubramanian, N., P. Bai, G. Buchek, G. Korza, and S. K. Weller.** 2010. Physical interaction between the herpes simplex virus type 1 exonuclease, UL12, and the DNA double-strand break-sensing MRN complex. *J Virol* **84**:12504-14.
27. **Baldick, C. J., Jr., and T. Shenk.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* **70**:6097-105.
28. **Ban, F., S. Asano, S. Ozawa, H. Eda, J. Norman, W. G. Stroop, and K. Yanagi.** 2008. Analysis of herpes simplex virus type 1 restriction fragment length polymorphism variants associated with herpes gladiatorum and Kaposi's varicelliform eruption in sumo wrestlers. *J Gen Virol* **89**:2410-5.
29. **Banerjee, R., M. K. Weidman, S. Navarro, L. Comai, and A. Dasgupta.** 2005. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J Gen Virol* **86**:2315-22.
30. **Bannister, A. J., and T. Kouzarides.** 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**:381-95.
31. **Batterson, W., D. Furlong, and B. Roizman.** 1983. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol* **45**:397-407.
32. **Batterson, W., and B. Roizman.** 1983. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* **46**:371-7.
33. **Beard, P. M., N. S. Taus, and J. D. Baines.** 2002. DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells. *J Virol* **76**:4785-91.
34. **Bechtel, J. T., R. C. Winant, and D. Ganem.** 2005. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:4952-64.

35. **Becker, T. M., R. Kodsi, P. Bailey, F. Lee, R. Levandowski, and A. J. Nahmias.** 1988. Grappling with herpes: herpes gladiatorum. *Am J Sports Med* **16**:665-9.
36. **Beitia Ortiz de Zarate, I., L. Cantero-Aguilar, M. Longo, C. Berlioz-Torrent, and F. Rozenberg.** 2007. Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *J Virol* **81**:13889-903.
37. **Belenguer, P., V. Baldin, C. Mathieu, H. Prats, M. Bensaid, G. Bouche, and F. Amalric.** 1989. Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **17**:6625-36.
38. **Belin, S., K. Kindbeiter, S. Hacot, M. A. Albaret, J. X. Roca-Martinez, G. Therizols, O. Grosso, and J. J. Diaz.** 2010. Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* **16**:131-40.
39. **Berkova, Z., S. E. Crawford, S. E. Blutt, A. P. Morris, and M. K. Estes.** 2007. Expression of rotavirus NSP4 alters the actin network organization through the actin remodeling protein cofilin. *J Virol* **81**:3545-53.
40. **Bernardi, R., and P. P. Pandolfi.** 2003. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* **22**:9048-57.
41. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**:109-18.
42. **Bertrand, L., and A. Pearson.** 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J Gen Virol* **89**:1142-51.
43. **Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C. J. Sherr.** 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* **24**:985-96.
44. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* **71**:33-44.
45. **Besse, S., and F. Puvion-Dutilleul.** 1996. Intracellular retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J Cell Sci* **109** (Pt 1):119-29.
46. **Biberstein, H. H., and M. Jessner.** 1958. Experiences with herpin in recurrent herpes simplex together with a review and analysis of the literature on the use of CNS-substance as a virus-antigen-carrier. *Dermatologica* **117**:267-87.
47. **Birbach, A., S. T. Bailey, S. Ghosh, and J. A. Schmid.** 2004. Cytosolic, nuclear and nucleolar localization signals determine subcellular distribution and activity of the NF-kappaB inducing kinase NIK. *J Cell Sci* **117**:3615-24.
48. **Bischof, O., O. Kirsh, M. Pearson, K. Itahana, P. G. Pelicci, and A. Dejean.** 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* **21**:3358-69.
49. **Bjornberg, O., A. C. Bergman, A. M. Rosengren, R. Persson, I. R. Lehman, and P. O. Nyman.** 1993. dUTPase from herpes simplex virus type 1; purification from infected green monkey kidney (Vero) cells and from an overproducing Escherichia coli strain. *Protein Expr Purif* **4**:149-59.
50. **Blakeney, S., J. Kowalski, D. Tummolo, J. DeStefano, D. Cooper, M. Guo, S. Gangolli, D. Long, T. Zamb, R. J. Natuk, and R. J. Visalli.** 2005. Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *J Virol* **79**:10498-506.
51. **Blank, H., and H. G. Haines.** 1973. Experimental human reinfection with herpes simplex virus. *J Invest Dermatol* **61**:223-5.
52. **Boehmer, P. E., and I. R. Lehman.** 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* **66**:347-84.

53. **Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A. I. Lamond.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:574-85.
54. **Bouvet, P., J. J. Diaz, K. Kindbeiter, J. J. Madjar, and F. Amalric.** 1998. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* **273**:19025-9.
55. **Bowman, G. D.** 2010. Mechanisms of ATP-dependent nucleosome sliding. *Curr Opin Struct Biol* **20**:73-81.
56. **Boyne, J. R., and A. Whitehouse.** 2009. Nucleolar disruption impairs Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57-mediated nuclear export of intronless viral mRNAs. *FEBS Lett* **583**:3549-56.
57. **Boyne, J. R., and A. Whitehouse.** 2006. Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15190-5.
58. **Brack, A. R., B. G. Klupp, H. Granzow, R. Tirabassi, L. W. Enquist, and T. C. Mettenleiter.** 2000. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* **74**:4004-16.
59. **Bray, D.** 2001. *Cell movements : from molecules to motility*, 2nd ed. Garland Pub., New York.
60. **Bremner, K. H., J. Scherer, J. Yi, M. Vershinin, S. P. Gross, and R. B. Vallee.** 2009. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* **6**:523-35.
61. **Brunetti, C. R., K. S. Dingwell, C. Wale, F. L. Graham, and D. C. Johnson.** 1998. Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and - independent mechanisms. *J Virol* **72**:3330-9.
62. **Bryant, K. F., J. C. Cox, H. Wang, J. M. Hogle, A. D. Ellington, and D. M. Coen.** 2005. Binding of herpes simplex virus-1 US11 to specific RNA sequences. *Nucleic Acids Res* **33**:6090-100.
63. **Bugler, B., M. Caizergues-Ferrer, G. Bouche, H. Bourbon, and F. Amalric.** 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem* **128**:475-80.
64. **Bujnicki, J. M., and L. Rychlewski.** 2001. The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis. *Virus Genes* **22**:219-30.
65. **Bukrinskaya, A., B. Brichacek, A. Mann, and M. Stevenson.** 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**:2113-25.
66. **Burgess, R. J., and Z. Zhang.** 2010. Histones, histone chaperones and nucleosome assembly. *Protein Cell* **1**:607-12.
67. **Busch, H., M. Muramatsu, H. Adams, W. J. Steele, M. C. Liao, and K. Smetana.** 1963. Isolation of Nucleoli. *Exp Cell Res* **24**:SUPPL9:150-63.
68. **Cairns, T. M., J. C. Whitbeck, H. Lou, E. E. Heldwein, T. K. Chowdary, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2011. Capturing the herpes simplex virus core fusion complex (gB-gH/gL) in an acidic environment. *J Virol* **85**:6175-84.
69. **Calle, A., I. Ugrinova, A. L. Epstein, P. Bouvet, J. J. Diaz, and A. Greco.** 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **82**:4762-73.
70. **Cannavo, G., M. Paiardini, D. Galati, B. Cervasi, M. Montroni, G. De Vico, D. Guetard, M. L. Bocchino, I. Picerno, M. Magnani, G. Silvestri, and G. Piedimonte.** 2001. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. *Blood* **97**:1756-64.

71. **Cappel, R.** 1976. Comparison of the humoral and cellular immune response after immunization with live, UV inactivated herpes simplex virus and a subunit vaccine and efficacy of these immunizations. *Arch Virol* **52**:29-35.
72. **Caradonna, S. J., and Y. C. Cheng.** 1981. Induction of uracil-DNA glycosylase and dUTP nucleotidohydrolase activity in herpes simplex virus-infected human cells. *J Biol Chem* **256**:9834-7.
73. **Carberry, K., T. Wiesenfahrt, R. Windoffer, O. Bossinger, and R. E. Leube.** 2009. Intermediate filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**:852-64.
74. **Cardone, G., D. C. Winkler, B. L. Trus, N. Cheng, J. E. Heuser, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2007. Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography. *Virology* **361**:426-34.
75. **Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares, and I. Campos.** 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**:E107-12.
76. **Catez, F., M. Erard, N. Schaerer-Uthurralt, K. Kindbeiter, J. J. Madjar, and J. J. Diaz.** 2002. Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**:1126-39.
77. **Cavellan, E., P. Asp, P. Percipalle, and A. K. Farrants.** 2006. The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J Biol Chem* **281**:16264-71.
78. **Caviston, J. P., and E. L. Holzbaur.** 2006. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* **16**:530-7.
79. **Challberg, M. D.** 1986. A method for identifying the viral genes required for herpesvirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9094-8.
80. **Chambers, R., and T. Takimoto.** 2010. Trafficking of Sendai virus nucleocapsids is mediated by intracellular vesicles. *PLoS One* **5**:e10994.
81. **Chayavichitsilp, P., J. V. Buckwalter, A. C. Krakowski, and S. F. Friedlander.** 2009. Herpes simplex. *Pediatr Rev* **30**:119-29; quiz 130.
82. **Chelbi-Alix, M. K., and H. de The.** 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* **18**:935-41.
83. **Chen, C., O. A. Weisz, D. B. Stolz, S. C. Watkins, and R. C. Montelaro.** 2004. Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol* **78**:882-91.
84. **Chen, H., T. Wurm, P. Britton, G. Brooks, and J. A. Hiscox.** 2002. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* **76**:5233-50.
85. **Cheng, G., M. E. Brett, and B. He.** 2002. Signals that dictate nuclear, nucleolar, and cytoplasmic shuttling of the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:9434-45.
86. **Chou, J., E. R. Kern, R. J. Whitley, and B. Roizman.** 1990. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* **250**:1262-6.
87. **Chouljenko, V. N., A. V. Iyer, S. Chowdhury, D. V. Chouljenko, and K. G. Kousoulas.** 2009. The amino terminus of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK) modulates gB-mediated virus-induced cell fusion and virion egress. *J Virol* **83**:12301-13.
88. **Chouljenko, V. N., A. V. Iyer, S. Chowdhury, J. Kim, and K. G. Kousoulas.** 2010. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. *J Virol* **84**:8596-606.
89. **Chowdary, T. K., T. M. Cairns, D. Atanasiu, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and E. E. Heldwein.** 2010. Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nat Struct Mol Biol* **17**:882-8.

90. **Church, G. A., and D. W. Wilson.** 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol* **71**:3603-12.
91. **Clement, C., V. Tiwari, P. M. Scanlan, T. Valyi-Nagy, B. Y. Yue, and D. Shukla.** 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* **174**:1009-21.
92. **Cocchi, F., D. Fusco, L. Menotti, T. Gianni, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7445-50.
93. **Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen.** 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* **64**:881-5.
94. **Cockrell, S. K., J. B. Huffman, K. Toropova, J. F. Conway, and F. L. Homa.** 2011. Residues of the UL25 protein of herpes simplex virus that are required for its stable interaction with capsids. *J Virol* **85**:4875-87.
95. **Coen, D. M., M. Kosz-Vnenchak, J. G. Jacobson, D. A. Leib, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, K. L. Tyler, and D. M. Knipe.** 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4736-40.
96. **Coen, D. M., S. P. Weinheimer, and S. L. McKnight.** 1986. A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* **234**:53-9.
97. **Cohen, G. H.** 1972. Ribonucleotide reductase activity of synchronized KB cells infected with herpes simplex virus. *J Virol* **9**:408-18.
98. **Cole, N. L., and C. Grose.** 2003. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev Med Virol* **13**:207-22.
99. **Condeelis, J., A. Hall, A. Bresnick, V. Warren, R. Hock, H. Bennett, and S. Ogihara.** 1988. Actin polymerization and pseudopod extension during amoeboid chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* **10**:77-90.
100. **Condeelis, J. S., and D. L. Taylor.** 1977. The contractile basis of amoeboid movement. V. The control of gelation, solation, and contraction in extracts from *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* **74**:901-27.
101. **Conley, A. J., D. M. Knipe, P. C. Jones, and B. Roizman.** 1981. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J Virol* **37**:191-206.
102. **Conti, M. A., and R. S. Adelstein.** 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* **121**:11-8.
103. **Conway, J. F., S. K. Cockrell, A. M. Copeland, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 2010. Labeling and localization of the herpes simplex virus capsid protein UL25 and its interaction with the two triplexes closest to the penton. *J Mol Biol* **397**:575-86.
104. **Cook, W. J., and D. M. Coen.** 1996. Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 UL24 mRNA expression via differential polyadenylation. *Virology* **218**:204-13.
105. **Copeland, A. M., W. W. Newcomb, and J. C. Brown.** 2009. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol* **83**:1660-8.
106. **Corey, L., H. G. Adams, Z. A. Brown, and K. K. Holmes.** 1983. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Ann Intern Med* **98**:958-72.
107. **Costa, R. H., B. G. Devi, K. P. Anderson, B. H. Gaylord, and E. K. Wagner.** 1981. Characterization of a major late herpes simplex virus type 1 mRNA. *J Virol* **38**:483-96.
108. **Creancier, L., H. Prats, C. Zanibellato, F. Amalric, and B. Bugler.** 1993. Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin. *Mol Biol Cell* **4**:1239-50.

109. **Crivello, J. F., and C. R. Jefcoate.** 1980. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem* **255**:8144-51.
110. **Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait, and M. J. Matunis.** 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**:915-27.
111. **Cureton, D. K., R. H. Massol, S. P. Whelan, and T. Kirchhausen.** 2010. The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Pathog* **6**.
112. **D'Amours, D., F. Stegmeier, and A. Amon.** 2004. Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* **117**:455-69.
113. **Da Costa, X., M. F. Kramer, J. Zhu, M. A. Brockman, and D. M. Knipe.** 2000. Construction, phenotypic analysis, and immunogenicity of a UL5/UL29 double deletion mutant of herpes simplex virus 2. *J Virol* **74**:7963-71.
114. **Da Costa, X. J., C. A. Jones, and D. M. Knipe.** 1999. Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6994-8.
115. **Dantzig, J. A., T. Y. Liu, and Y. E. Goldman.** 2006. Functional studies of individual myosin molecules. *Ann N Y Acad Sci* **1080**:1-18.
116. **Das, S., A. Vasanji, and P. E. Pellett.** 2007. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J Virol* **81**:11861-9.
117. **Davison, A. J.** 1992. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* **186**:9-14.
118. **Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**:171-7.
119. **Davison, M. D., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 1992. Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **73** (Pt 10):2709-13.
120. **de Bruyn Kops, A., S. L. Uprichard, M. Chen, and D. M. Knipe.** 1998. Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology* **252**:162-78.
121. **De Lozanne, A., and J. A. Spudich.** 1987. Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**:1086-91.
122. **Deiss, L. P., J. Chou, and N. Frenkel.** 1986. Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J Virol* **59**:605-18.
123. **del Rio, T., T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross, and L. W. Enquist.** 2005. Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* **79**:3903-19.
124. **Delius, H., and J. B. Clements.** 1976. A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: evidence for inversions of the unique DNA regions. *J Gen Virol* **33**:125-33.
125. **Dellaire, G., and D. P. Bazett-Jones.** 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**:963-77.
126. **DeLuca, J. G.** 2010. Kinetochore-microtubule dynamics and attachment stability. *Methods Cell Biol* **97**:53-79.
127. **DeLuca, N. A., A. M. McCarthy, and P. A. Schaffer.** 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol* **56**:558-70.
128. **Derenzini, M.** 2000. The AgNORs. *Micron* **31**:117-20.
129. **Desai, P. J.** 2000. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* **74**:11608-18.

130. **Di Bacco, A., J. Ouyang, H. Y. Lee, A. Catic, H. Ploegh, and G. Gill.** 2006. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* **26**:4489-98.
131. **Diakidi-Kosta, A., G. Michailidou, G. Kontogounis, A. Sivropoulou, and M. Arsenakis.** 2003. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affects both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate. *Virus Res* **93**:99-108.
132. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, E. Diefenbach, D. J. Holland, R. A. Boadle, P. J. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**:3282-91.
133. **Dimario, P. J.** 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol* **239**:99-178.
134. **Distel, R., V. Hofer, S. Bogger-Goren, I. Shalit, and B. Z. Garty.** 2003. Primary genital herpes simplex infection associated with Jewish ritual circumcision. *Isr Med Assoc J* **5**:893-4.
135. **Dohner, K., C. H. Nagel, and B. Sodeik.** 2005. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* **13**:320-7.
136. **Dohner, K., A. Wolfstein, U. Prank, C. Echeverri, D. Dujardin, R. Vallee, and B. Sodeik.** 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**:2795-809.
137. **Dollery, S. J., M. G. Delboy, and A. V. Nicola.** 2010. Low pH-induced conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* **84**:3759-66.
138. **Donnelly, M., J. Verhagen, and G. Elliott.** 2007. RNA binding by the herpes simplex virus type 1 nucleocytoplasmic shuttling protein UL47 is mediated by an N-terminal arginine-rich domain that also functions as its nuclear localization signal. *J Virol* **81**:2283-96.
139. **Douglas, M. W., R. J. Diefenbach, F. L. Homa, M. Miranda-Saksena, F. J. Rixon, V. Vittone, K. Byth, and A. L. Cunningham.** 2004. Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* **279**:28522-30.
140. **Dousset, T., C. Wang, C. Verheggen, D. Chen, D. Hernandez-Verdun, and S. Huang.** 2000. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell* **11**:2705-17.
141. **Douville, P., M. Hagmann, O. Georgiev, and W. Schaffner.** 1995. Positive and negative regulation at the herpes simplex virus ICP4 and ICP0 TAATGARAT motifs. *Virology* **207**:107-16.
142. **Dry, I., D. M. Haig, N. F. Inglis, L. Imrie, J. P. Stewart, and G. C. Russell.** 2008. Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* **82**:5390-7.
143. **Duffy, C., E. F. Mbong, and J. D. Baines.** 2009. VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection. *J Virol* **83**:1009-17.
144. **Duus, K. M., C. Hatfield, and C. Grose.** 1995. Cell surface expression and fusion by the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex: analysis by laser scanning confocal microscopy. *Virology* **210**:429-40.
145. **Ebert, S. N., S. S. Shtrom, and M. T. Muller.** 1990. Topoisomerase II cleavage of herpes simplex virus type 1 DNA in vivo is replication dependent. *J Virol* **64**:4059-66.
146. **Elliott, G., G. Mouzakis, and P. O'Hare.** 1995. VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *J Virol* **69**:7932-41.
147. **Emmott, E., and J. A. Hiscox.** 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* **10**:231-8.

148. **Emmott, E., C. Smith, S. R. Emmett, B. K. Dove, and J. A. Hiscox.** 2010. Elucidation of the avian nucleolar proteome by quantitative proteomics using SILAC and changes in cells infected with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Proteomics* **10**:3558-62.
149. **Everett, R. D.** 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**:761-70.
150. **Everett, R. D., and J. Murray.** 2005. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol* **79**:5078-89.
151. **Evilevitch, A., L. Lavelle, C. M. Knobler, E. Raspaud, and W. M. Gelbart.** 2003. Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9292-5.
152. **Fan, Z., M. L. Grantham, M. S. Smith, E. S. Anderson, J. A. Cardelli, and M. I. Muggeridge.** 2002. Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J Virol* **76**:9271-83.
153. **Farnsworth, A., and D. C. Johnson.** 2006. Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-cell spread. *J Virol* **80**:3167-79.
154. **Farnsworth, A., T. W. Wisner, M. Webb, R. Roller, G. Cohen, R. Eisenberg, and D. C. Johnson.** 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**:10187-92.
155. **Farrell, H. E., C. S. McLean, C. Harley, S. Efstathiou, S. Inglis, and A. C. Minson.** 1994. Vaccine potential of a herpes simplex virus type 1 mutant with an essential glycoprotein deleted. *J Virol* **68**:927-32.
156. **Fatahzadeh, M., and R. A. Schwartz.** 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* **57**:737-63; quiz 764-6.
157. **Fatica, A., and D. Tollervey.** 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**:313-8.
158. **Favoreel, H. W., C. Van den Broeke, A. Desplanques, M. Deruelle, G. Van Minnebruggen, H. Nauwynck, S. Glorieux, N. Van Opdenbosch, and N. De Regge.** 2010. Alphaherpesvirus use and misuse of cellular actin and cholesterol. *Vet Microbiol* **143**:2-7.
159. **Favoreel, H. W., G. Van Minnebruggen, D. Adriaensen, and H. J. Nauwynck.** 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8990-5.
160. **Feederle, R., S. D. Linnstaedt, H. Bannert, H. Lips, M. Bencun, B. R. Cullen, and H. J. Delecluse.** 2011. A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog* **7**:e1001294.
161. **Feierbach, B., S. Piccinotti, M. Bisher, W. Denk, and L. W. Enquist.** 2006. Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLoS Pathog* **2**:e85.
162. **Finkbeiner, E., M. Haindl, and S. Muller.** 2011. The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J* **30**:1067-78.
163. **Forest, T., S. Barnard, and J. D. Baines.** 2005. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat Cell Biol* **7**:429-31.
164. **Forrester, A., H. Farrell, G. Wilkinson, J. Kaye, N. Davis-Poynter, and T. Minson.** 1992. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* **66**:341-8.
165. **Foster, T. P., V. N. Chouljenko, and K. G. Kousoulas.** 2008. Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *J Virol* **82**:6310-23.

166. **Foster, T. P., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas.** 2004. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J Virol* **78**:5347-57.
167. **Foster, T. P., J. M. Melancon, T. L. Olivier, and K. G. Kousoulas.** 2004. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. *J Virol* **78**:13262-77.
168. **Fraile-Ramos, A., A. Pelchen-Matthews, T. N. Kledal, H. Browne, T. W. Schwartz, and M. Marsh.** 2002. Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic* **3**:218-32.
169. **Frame, M. C., D. J. McGeoch, F. J. Rixon, A. C. Orr, and H. S. Marsden.** 1986. The 10K virion phosphoprotein encoded by gene US9 from herpes simplex virus type 1. *Virology* **150**:321-32.
170. **Francke, B., H. Moss, M. C. Timbury, and J. Hay.** 1978. Alkaline DNase activity in cells infected with a temperature-sensitive mutant of herpes simplex virus type 2. *J Virol* **26**:209-13.
171. **Franke, W. W.** 1987. Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* **48**:3-4.
172. **Frixione, E.** 2000. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**:73-94.
173. **Fuchs, E., and K. Weber.** 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**:345-82.
174. **Fuchs, W., H. Granzow, B. G. Klupp, M. Kopp, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* **76**:6729-42.
175. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, T. Leege, and T. C. Mettenleiter.** 2009. Characterization of pseudorabies virus (PrV) cleavage-encapsidation proteins and functional complementation of PrV pUL32 by the homologous protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **83**:3930-43.
176. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 1997. The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J Virol* **71**:5639-46.
177. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* **76**:364-78.
178. **Fulmer, P. A., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas.** 2007. UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment. *J Virol* **81**:3097-108.
179. **Furman, P. A., P. de Miranda, M. H. St Clair, and G. B. Elion.** 1981. Metabolism of acyclovir in virus-infected and uninfected cells. *Antimicrob Agents Chemother* **20**:518-24.
180. **Furman, P. A., M. H. St Clair, and T. Spector.** 1984. Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *J Biol Chem* **259**:9575-9.
181. **Gage, P. J., M. Levine, and J. C. Glorioso.** 1993. Syncytium-inducing mutations localize to two discrete regions within the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *J Virol* **67**:2191-201.
182. **Galy, V., I. W. Mattaj, and P. Askjaer.** 2003. *Caenorhabditis elegans* nucleoporins Nup93 and Nup205 determine the limit of nuclear pore complex size exclusion in vivo. *Mol Biol Cell* **14**:5104-15.
183. **Gao, M., L. Matusick-Kumar, W. Hurlburt, S. F. DiTusa, W. W. Newcomb, J. C. Brown, P. J. McCann, 3rd, I. Deckman, and R. J. Colanno.** 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J Virol* **68**:3702-12.

184. **Garber, D. A., S. M. Beverley, and D. M. Coen.** 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**:459-62.
185. **Garfinkle, B., and B. R. McAuslan.** 1974. Regulation of herpes simplex virus-induced thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **58**:822-9.
186. **Garner, E. C., C. S. Campbell, D. B. Weibel, and R. D. Mullins.** 2007. Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* **315**:1270-4.
187. **Gautier, T., C. Dauphin-Villemant, C. Andre, C. Masson, J. Arnoult, and D. Hernandez-Verdun.** 1992. Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. *Exp Cell Res* **200**:5-15.
188. **Gautier, T., N. Fomproix, C. Masson, M. C. Azum-Gelade, N. Gas, and D. Hernandez-Verdun.** 1994. Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol Cell* **82**:81-93.
189. **Gautier, T., M. Robert-Nicoud, M. N. Guilly, and D. Hernandez-Verdun.** 1992. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* **102 (Pt 4)**:729-37.
190. **Gebrane-Younes, J., N. Fomproix, and D. Hernandez-Verdun.** 1997. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci* **110 (Pt 19)**:2429-40.
191. **Gerace, L., A. Blum, and G. Blobel.** 1978. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* **79**:546-66.
192. **Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and P. G. Spear.** 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-20.
193. **Gianni, T., M. Amasio, and G. Campadelli-Fiume.** 2009. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *J Biol Chem* **284**:17370-82.
194. **Gilchrist, D., B. Mykytka, and M. Rexach.** 2002. Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J Biol Chem* **277**:18161-72.
195. **Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet.** 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* **17**:1476-86.
196. **Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet.** 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112 (Pt 6)**:761-72.
197. **Giraud, S., C. Diaz-Latoud, S. Hacot, J. Textoris, R. P. Bourette, and J. J. Diaz.** 2004. US11 of herpes simplex virus type 1 interacts with HIPK2 and antagonizes HIPK2-induced cell growth arrest. *J Virol* **78**:2984-93.
198. **Glotzer, J. B., A. I. Michou, A. Baker, M. Saltik, and M. Cotten.** 2001. Microtubule-independent motility and nuclear targeting of adenoviruses with fluorescently labeled genomes. *J Virol* **75**:2421-34.
199. **Godfrey, J. E., A. D. Baxevanis, and E. N. Moudrianakis.** 1990. Spectropolarimetric analysis of the core histone octamer and its subunits. *Biochemistry* **29**:965-72.
200. **Goldman, L.** 1961. Reactions of autoinoculation for recurrent herpes simplex. *Arch Dermatol* **84**:1025-6.
201. **Goldman, R. D., B. Grin, M. G. Mendez, and E. R. Kuczmarski.** 2008. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* **20**:28-34.
202. **Gong, L., and E. T. Yeh.** 2006. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* **281**:15869-77.

203. **Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**:3675-84.
204. **Granzow, H., B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2004. The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J Virol* **78**:1314-23.
205. **Greber, U. F., and M. Fornerod.** 2005. Nuclear import in viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**:109-38.
206. **Greco, A., N. Bausch, Y. Coute, and J. J. Diaz.** 2000. Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of host proteins whose synthesis is sustained or stimulated during the course of herpes simplex virus type 1 infection. *Electrophoresis* **21**:2522-30.
207. **Griffing, L. R.** 2010. Networking in the endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans* **38**:747-53.
208. **Grinstein, E., Y. Shan, L. Karawajew, P. J. Snijders, C. J. Meijer, H. D. Royer, and P. Wernet.** 2006. Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *J Biol Chem* **281**:22223-35.
209. **Grinstein, E., P. Wernet, P. J. Snijders, F. Rosl, I. Weinert, W. Jia, R. Kraft, C. Schewe, M. Schwabe, S. Hauptmann, M. Dietel, C. J. Meijer, and H. D. Royer.** 2002. Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer. *J Exp Med* **196**:1067-78.
210. **Grunewald, K., P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister, and A. C. Steven.** 2003. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* **302**:1396-8.
211. **Gubitz, A. K., W. Feng, and G. Dreyfuss.** 2004. The SMN complex. *Exp Cell Res* **296**:51-6.
212. **Guggemoos, S., F. T. Just, and A. Neubauer.** 2006. The equine herpesvirus 1 UL20 product interacts with glycoprotein K and promotes egress of mature particles. *J Virol* **80**:95-107.
213. **Gupta, S., B. P. De, J. A. Drazba, and A. K. Banerjee.** 1998. Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol* **72**:2655-62.
214. **Haimo, L. T., and J. L. Rosenbaum.** 1981. Cilia, flagella, and microtubules. *J Cell Biol* **91**:125s-130s.
215. **Haindl, M., T. Harasim, D. Eick, and S. Muller.** 2008. The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep* **9**:273-9.
216. **Halford, W. P., R. Puschel, E. Gershburg, A. Wilber, S. Gershburg, and B. Rakowski.** 2011. A live-attenuated HSV-2 ICP0 virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. *PLoS One* **6**:e17748.
217. **Halford, W. P., C. Weisend, J. Grace, M. Soboleski, D. J. Carr, J. W. Balliet, Y. Imai, T. P. Margolis, and B. M. Gebhardt.** 2006. ICP0 antagonizes Stat 1-dependent repression of herpes simplex virus: implications for the regulation of viral latency. *Virol J* **3**:44.
218. **Haller, C., S. Rauch, and O. T. Fackler.** 2007. HIV-1 Nef employs two distinct mechanisms to modulate Lck subcellular localization and TCR induced actin remodeling. *PLoS One* **2**:e1212.
219. **Han, H., Z. Q. Cui, W. Wang, Z. P. Zhang, H. P. Wei, Y. F. Zhou, and X. E. Zhang.** 2010. New regulatory mechanisms for the intracellular localization and trafficking of influenza A virus NS1 protein revealed by comparative analysis of A/PR/8/34 and A/Sydney/5/97. *J Gen Virol* **91**:2907-17.
220. **Hann, L. E., W. J. Cook, S. L. Uprichard, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 1998. The role of herpes simplex virus ICP27 in the regulation of UL24 gene expression by differential polyadenylation. *J Virol* **72**:7709-14.
221. **Hannah, B. P., T. M. Cairns, F. C. Bender, J. C. Whitbeck, H. Lou, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2009. Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J Virol* **83**:6825-36.

222. **Hannah, B. P., E. E. Heldwein, F. C. Bender, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2007. Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* **81**:4858-65.
223. **Harle, P., B. Sainz, Jr., D. J. Carr, and W. P. Halford.** 2002. The immediate-early protein, ICP0, is essential for the resistance of herpes simplex virus to interferon-alpha/beta. *Virology* **293**:295-304.
224. **Harley, C. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson.** 2001. Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol* **75**:1236-51.
225. **Harpen, M., T. Barik, A. Musiyenko, and S. Barik.** 2009. Mutational analysis reveals a noncontractile but interactive role of actin and profilin in viral RNA-dependent RNA synthesis. *J Virol* **83**:10869-76.
226. **Harrison, I. P., and A. McKnight.** 2011. Cellular entry via an actin and clathrin-dependent route is required for Lv2 restriction of HIV-2. *Virology* **415**:47-55.
227. **Hayward, G. S., R. J. Jacob, S. C. Wadsworth, and B. Roizman.** 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:4243-7.
228. **He, X., and I. R. Lehman.** 2000. Unwinding of a herpes simplex virus type 1 origin of replication (Ori(S)) by a complex of the viral origin binding protein and the single-stranded DNA binding protein. *J Virol* **74**:5726-8.
229. **Heimann, K., J. M. Percival, R. Weinberger, P. Gunning, and J. L. Stow.** 1999. Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J Biol Chem* **274**:10743-50.
230. **Heine, M. A., M. L. Rankin, and P. J. DiMario.** 1993. The Gly/Arg-rich (GAR) domain of Xenopus nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization. *Mol Biol Cell* **4**:1189-204.
231. **Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T. M. Michaelidis, and I. Grummt.** 1998. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* **17**:7373-81.
232. **Heldwein, E. E., and C. Krummenacher.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:1653-68.
233. **Heldwein, E. E., H. Lou, F. C. Bender, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and S. C. Harrison.** 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* **313**:217-20.
234. **Henderson, J. O., L. J. Ball-Goodrich, and D. S. Parris.** 1998. Structure-function analysis of the herpes simplex virus type 1 UL12 gene: correlation of deoxyribonuclease activity in vitro with replication function. *Virology* **243**:247-59.
235. **Hernandez-Verdun, D., P. Roussel, and J. Gebrane-Younes.** 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* **115**:2265-70.
236. **Hindley, C. E., A. D. Davidson, and D. A. Matthews.** 2007. Relationship between adenovirus DNA replication proteins and nucleolar proteins B23.1 and B23.2. *J Gen Virol* **88**:3244-8.
237. **Hiscox, J. A.** 2003. The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res* **95**:13-22.
238. **Hiscox, J. A.** 2002. The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* **147**:1077-89.
239. **Hiscox, J. A., A. Whitehouse, and D. A. Matthews.** 2010. Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* **10**:4077-86.
240. **Hodge, P. D., and N. D. Stow.** 2001. Effects of mutations within the herpes simplex virus type 1 DNA encapsidation signal on packaging efficiency. *J Virol* **75**:8977-86.
241. **Hofemeister, H., and P. O'Hare.** 2008. Nuclear pore composition and gating in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol* **82**:8392-9.

242. **Homa, F. L., and J. C. Brown.** 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**:107-122.
243. **Homman-Loudiyi, M., K. Hultenby, W. Britt, and C. Soderberg-Nauclder.** 2003. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol* **77**:3191-203.
244. **Honess, R. W., and D. H. Watson.** 1977. Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid. *J Virol* **21**:584-600.
245. **Hong-Yan, Z., T. Murata, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, and Y. Nishiyama.** 2001. Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **22**:321-7.
246. **Huang, C., D. Morse, B. Slater, M. Anand, E. Tobin, P. Smith, M. Dupuis, R. Hull, R. Ferrera, B. Rosen, and L. Grady.** 2004. Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses. *Clin Infect Dis* **39**:630-5.
247. **Huang, K. J., C. C. Ku, and I. R. Lehman.** 2006. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8995-9000.
248. **Hutt-Fletcher, L. M.** 2007. Epstein-Barr virus entry. *J Virol* **81**:7825-32.
249. **Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham.** 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**:1713-6.
250. **Ikonen, E., J. B. de Almeida, K. R. Fath, D. R. Burgess, K. Ashman, K. Simons, and J. L. Stow.** 1997. Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci* **110 (Pt 18)**:2155-64.
251. **Ingvarsdottir, K., and J. A. Blaho.** 2010. Association of the herpes simplex virus major tegument structural protein VP22 with chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1799**:200-6.
252. **Ishov, A. M., and G. G. Maul.** 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134**:815-26.
253. **Ito, H., M. H. Sommer, L. Zerboni, A. Baiker, B. Sato, R. Liang, J. Hay, W. Ruyechan, and A. M. Arvin.** 2005. Role of the varicella-zoster virus gene product encoded by open reading frame 35 in viral replication in vitro and in differentiated human skin and T cells in vivo. *J Virol* **79**:4819-27.
254. **Iwasaki, T., R. Muraki, T. Kasahara, Y. Sato, T. Sata, and T. Kurata.** 2001. Pathway of viral spread in herpes zoster: detection of the protein encoded by open reading frame 63 of varicella-zoster virus in biopsy specimens. *Arch Virol Suppl*:109-19.
255. **Izumi, R. E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta.** 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* **76**:17-29.
256. **Jackson, J. O., and R. Longnecker.** 2010. Reevaluating herpes simplex virus hemifusion. *J Virol* **84**:11814-21.
257. **Jacobson, J. G., S. H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**:161-9.
258. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and D. M. Coen.** 1989. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**:1839-43.
259. **Jakel, S., and D. Gorlich.** 1998. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* **17**:4491-502.
260. **Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* **5**:403-7.

261. **Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2002. Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency. *Front Biosci* **7**:d1575-82.
262. **Jimenez-Baranda, S., C. Gomez-Mouton, A. Rojas, L. Martinez-Prats, E. Mira, R. Ana Lacalle, A. Valencia, D. S. Dimitrov, A. Viola, R. Delgado, A. C. Martinez, and S. Manes.** 2007. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* **9**:838-46.
263. **Jimenez-Garcia, L. F., M. L. Segura-Valdez, R. L. Ochs, L. I. Rothblum, R. Hannan, and D. L. Spector.** 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* **5**:955-66.
264. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16286-91.
265. **Johnson, D. C., M. C. Frame, M. W. Ligas, A. M. Cross, and N. D. Stow.** 1988. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* **62**:1347-54.
266. **Johnson, D. C., and M. T. Huber.** 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* **76**:1-8.
267. **Johnson, D. C., and P. G. Spear.** 1982. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* **43**:1102-12.
268. **Johnson, D. C., M. Webb, T. W. Wisner, and C. Brunetti.** 2001. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol* **75**:821-33.
269. **Johnson, D. C., T. W. Wisner, and C. C. Wright.** 2011. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *J Virol* **85**:4910-26.
270. **Jones, P. C., and B. Roizman.** 1979. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol* **31**:299-314.
271. **Jung, M., R. L. Finnen, C. E. Neron, and B. W. Banfield.** 2011. The alphaherpesvirus serine/threonine kinase us3 disrupts promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *J Virol* **85**:5301-11.
272. **Kadlec, J., S. Loureiro, N. G. Abrescia, D. I. Stuart, and I. M. Jones.** 2008. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* **15**:1024-30.
273. **Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson, and A. E. Smith.** 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**:499-509.
274. **Kalinyak, J. E., G. Fleagle, and J. J. Docherty.** 1977. Incidence and distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 from genital lesions in college women. *J Med Virol* **1**:175-81.
275. **Kasem, S., M. H. Yu, S. Yamada, A. Kodaira, T. Matsumura, K. Tsujimura, H. Madbouly, T. Yamaguchi, K. Ohya, and H. Fukushi.** 2010. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* **400**:259-70.
276. **Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* **78**:11187-97.
277. **Kelley, C. A., J. R. Sellers, D. L. Gard, D. Bui, R. S. Adelstein, and I. C. Baines.** 1996. Xenopus nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *J Cell Biol* **134**:675-87.
278. **Kern, A. B., and B. L. Schiff.** 1964. Vaccine Therapy in Recurrent Herpes Simplex. *Arch Dermatol* **89**:844-5.

279. **Kesson, A. M.** 2001. Management of neonatal herpes simplex virus infection. *Paediatr Drugs* **3**:81-90.
280. **Khaitlina, S. Y.** 2001. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* **202**:35-98.
281. **Khurts, S., K. Masutomi, L. Delgermaa, K. Arai, N. Oishi, H. Mizuno, N. Hayashi, W. C. Hahn, and S. Murakami.** 2004. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem* **279**:51508-15.
282. **Kieff, E. D., S. L. Bachenheimer, and B. Roizman.** 1971. Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol* **8**:125-32.
283. **Kiss, T.** 2001. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J* **20**:3617-22.
284. **Kit, S., and D. R. Dubbs.** 1963. Acquisition of thymidine kinase activity by herpes simplex-infected mouse fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* **11**:55-9.
285. **Klupp, B. G., W. Fuchs, H. Granzow, R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter.** 2002. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol* **76**:3065-71.
286. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2011. Nuclear envelope breakdown can substitute for primary envelopment-mediated nuclear egress of herpesviruses. *J Virol* **85**:8285-92.
287. **Knipe, D. M., and A. Cliffe.** 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* **6**:211-21.
288. **Knipe, D. M., and P. M. Howley.** 2007. *Fields virology*, 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
289. **Knipe, D. M., W. T. Ruyechan, B. Roizman, and I. W. Halliburton.** 1978. Molecular genetics of herpes simplex virus: demonstration of regions of obligatory and nonobligatory identity within diploid regions of the genome by sequence replacement and insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:3896-900.
290. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**:2575-7.
291. **Kopp, M., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, E. Mundt, A. Karger, and T. C. Mettenleiter.** 2003. The pseudorabies virus UL11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. *J Virol* **77**:5339-51.
292. **Kopp, M., B. G. Klupp, H. Granzow, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter.** 2002. Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm. *J Virol* **76**:8820-33.
293. **Kosinski, J., M. Feder, and J. M. Bujnicki.** 2005. The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function. *BMC Bioinformatics* **6**:172.
294. **Kreplak, L., K. Richter, U. Aebi, and H. Herrmann.** 2008. Electron microscopy of intermediate filaments: teaming up with atomic force and confocal laser scanning microscopy. *Methods Cell Biol* **88**:273-97.
295. **Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler.** 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* **1803**:673-83.
296. **Ku, C. C., J. Besser, A. Abendroth, C. Grose, and A. M. Arvin.** 2005. Varicella-Zoster virus pathogenesis and immunobiology: new concepts emerging from investigations with the SCIDhu mouse model. *J Virol* **79**:2651-8.
297. **Kubota, T., M. Matsuoka, T. H. Chang, M. Bray, S. Jones, M. Tashiro, A. Kato, and K. Ozato.** 2009. Ebolavirus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J Virol* **83**:6952-6.
298. **Kuddus, R., B. Gu, and N. A. DeLuca.** 1995. Relationship between TATA-binding protein and herpes simplex virus type 1 ICP4 DNA-binding sites in complex formation and repression of transcription. *J Virol* **69**:5568-75.

299. **Kudoh, A., S. Iwahori, Y. Sato, S. Nakayama, H. Isomura, T. Murata, and T. Tsurumi.** 2009. Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol* **83**:6641-51.
300. **Lallemant-Breitenbach, V., and H. de The.** 2010. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a000661.
301. **Lam, Y. W., V. C. Evans, K. J. Heesom, A. I. Lamond, and D. A. Matthews.** 2010. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected cells. *Mol Cell Proteomics* **9**:117-30.
302. **Lamberti, C., and S. K. Weller.** 1998. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol* **72**:2463-73.
303. **Lamberti, C., and S. K. Weller.** 1996. The herpes simplex virus type 1 UL6 protein is essential for cleavage and packaging but not for genomic inversion. *Virology* **226**:403-7.
304. **Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, and A. H. Corbett.** 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**:5101-5.
305. **Langst, G., P. B. Becker, and I. Grummt.** 1998. TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J* **17**:3135-45.
306. **Langst, G., T. A. Blank, P. B. Becker, and I. Grummt.** 1997. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J* **16**:760-8.
307. **Laquerre, S., R. Argnani, D. B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, and J. C. Glorioso.** 1998. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J Virol* **72**:6119-30.
308. **Latonen, L., H. M. Moore, B. Bai, S. Jaamaa, and M. Laiho.** 2011. Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* **30**:790-805.
309. **Laur, W. E., R. E. Posey, and J. D. Waller.** 1979. Herpes gladiatorum. *Arch Dermatol* **115**:678.
310. **Lawrence, F. J., B. McStay, and D. A. Matthews.** 2006. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *J Cell Sci* **119**:2621-31.
311. **Lazar, M. P.** 1956. Vaccination for recurrent herpes simplex infection; initiation of a new disease site following the use of unmodified material containing the live virus. *AMA Arch Derm* **73**:70-1.
312. **Lee, B. J., A. E. Cansizoglu, K. E. Suel, T. H. Louis, Z. Zhang, and Y. M. Chook.** 2006. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* **126**:543-58.
313. **Lee, C., D. Hodgins, J. G. Calvert, S. K. Welch, R. Jolie, and D. Yoo.** 2006. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology* **346**:238-50.
314. **Lee, C. H., S. C. Chang, C. J. Chen, and M. F. Chang.** 1998. The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting. *J Biol Chem* **273**:7650-6.
315. **Lee, S. H., and R. Dominguez.** 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* **29**:311-25.
316. **Leege, T., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2009. Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **90**:1560-8.
317. **Lehmann, M. J., N. M. Sherer, C. B. Marks, M. Pypaert, and W. Mothes.** 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* **170**:317-25.

318. **Leib, D. A., D. M. Coen, C. L. Bogard, K. A. Hicks, D. R. Yager, D. M. Knipe, K. L. Tyler, and P. A. Schaffer.** 1989. Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J Virol* **63**:759-68.
319. **Leiva-Torres, G. A., P. A. Rochette, and A. Pearson.** 2010. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* **91**:1109-16.
320. **Leopardi, R., N. Michael, and B. Roizman.** 1995. Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box. *J Virol* **69**:3042-8.
321. **Leopardi, R., and B. Roizman.** 1996. Functional interaction and colocalization of the herpes simplex virus 1 major regulatory protein ICP4 with EAP, a nucleolar-ribosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4572-6.
322. **Leuzinger, H., U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild.** 2005. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**:13047-59.
323. **Li, H., D. J. DeRosier, W. V. Nicholson, E. Nogales, and K. H. Downing.** 2002. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* **10**:1317-28.
324. **Li, H., F. Guo, B. Rubinstein, and R. Li.** 2008. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat Cell Biol* **10**:1301-8.
325. **Li, M., S. Wang, M. Cai, and C. Zheng.** 2011. Identification of Nuclear and Nucleolar Localization Signals of PRV Early Protein UL54 Reveals that Its Nuclear Targeting is Required for Efficient Production of PRV. *J Virol*.
326. **Li, Y. J., T. Macnaughton, L. Gao, and M. M. Lai.** 2006. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J Virol* **80**:6478-86.
327. **Li, Y. P., R. K. Busch, B. C. Valdez, and H. Busch.** 1996. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* **237**:153-8.
328. **Liang, L., and B. Roizman.** 2008. Expression of gamma interferon-dependent genes is blocked independently by virion host shutoff RNase and by US3 protein kinase. *J Virol* **82**:4688-96.
329. **Liashkovich, I., W. Hafezi, J. M. Kuhn, H. Oberleithner, and V. Shahin.** 2011. Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *J Mol Recognit* **24**:414-21.
330. **Ligas, M. W., and D. C. Johnson.** 1988. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* **62**:1486-94.
331. **Lindemann, C. B., and K. A. Lesich.** 2010. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* **123**:519-28.
332. **Lindsay, A. J., and M. W. McCaffrey.** 2009. Myosin Vb localises to nucleoli and associates with the RNA polymerase I transcription complex. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**:1057-72.
333. **Liu, B., L. Larsson, A. Caballero, X. Hao, D. Oling, J. Grantham, and T. Nystrom.** 2010. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* **140**:257-67.
334. **Lodish, H. F.** 2000. *Molecular cell biology*, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
335. **Lopez, M. R., E. F. Schlegel, S. Wintersteller, and J. A. Blaho.** 2008. The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* **136**:175-88.
336. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.

337. **Louvet, E., M. Tramier, N. Angelier, and D. Hernandez-Verdun.** 2008. Time-lapse microscopy and fluorescence resonance energy transfer to analyze the dynamics and interactions of nucleolar proteins in living cells. *Methods Mol Biol* **463**:123-35.
338. **Lowe, M.** 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **23**:85-93.
339. **Luby-Phelps, K.** 1994. Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **6**:3-9.
340. **Luderus, M. E., J. L. den Blaauwen, O. J. de Smit, D. A. Compton, and R. van Driel.** 1994. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* **14**:6297-305.
341. **Luker, G. D., J. L. Prior, J. Song, C. M. Pica, and D. A. Leib.** 2003. Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *J Virol* **77**:11082-93.
342. **Luxton, G. W., J. I. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith.** 2006. The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J Virol* **80**:201-9.
343. **Lyman, M. G., and L. W. Enquist.** 2009. Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *J Virol* **83**:2058-66.
344. **Lymberopoulos, M. H., A. Bourget, N. B. Abdeljelil, and A. Pearson.** 2011. Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* **412**:341-8.
345. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
346. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2010. Relocalization of upstream binding factor to viral replication compartments is UL24 independent and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis. *J Virol* **84**:4810-5.
347. **Macara, I. G.** 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:570-94, table of contents.
348. **Machado, C., and D. J. Andrew.** 2000. D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol* **151**:639-52.
349. **Machado, C., C. E. Sunkel, and D. J. Andrew.** 1998. Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol* **141**:321-33.
350. **Macmillan, L., G. O. Ifere, Q. He, J. U. Igietseme, K. L. Kellar, D. M. Okenu, and F. O. Eko.** 2007. A recombinant multivalent combination vaccine protects against Chlamydia and genital herpes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **49**:46-55.
351. **Mallardo, M., S. Schleich, and J. Krijnse Locker.** 2001. Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol Biol Cell* **12**:3875-91.
352. **Maresova, L., T. J. Pasieka, and C. Grose.** 2001. Varicella-zoster Virus gB and gE coexpression, but not gB or gE alone, leads to abundant fusion and syncytium formation equivalent to those from gH and gL coexpression. *J Virol* **75**:9483-92.
353. **Matafora, V., A. D'Amato, S. Mori, F. Blasi, and A. Bachi.** 2009. Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Mol Cell Proteomics* **8**:2243-55.
354. **Matthews, D. A.** 2001. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J Virol* **75**:1031-8.
355. **Matthews, D. A., and W. C. Russell.** 1998. Adenovirus core protein V interacts with p32--a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *J Gen Virol* **79** (Pt 7):1677-85.
356. **Maul, G. G., A. M. Ishov, and R. D. Everett.** 1996. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**:67-75.

357. **Maul, G. G., E. Yu, A. M. Ishov, and A. L. Epstein.** 1995. Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* **59**:498-513.
358. **Maupin, P., C. L. Phillips, R. S. Adelstein, and T. D. Pollard.** 1994. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci* **107 (Pt 11)**:3077-90.
359. **Mayer, C., H. Bierhoff, and I. Grummt.** 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**:933-41.
360. **Mazumdar, M., and T. Misteli.** 2005. Chromokinesins: multitasked players in mitosis. *Trends Cell Biol* **15**:349-55.
361. **McDonald, D., M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman, and T. J. Hope.** 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159**:441-52.
362. **McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson, and E. A. Telford.** 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**:443-58.
363. **McGeoch, D. J., C. Cunningham, G. McIntyre, and A. Dolan.** 1991. Comparative sequence analysis of the long repeat regions and adjoining parts of the long unique regions in the genomes of herpes simplex viruses types 1 and 2. *J Gen Virol* **72 (Pt 12)**:3057-75.
364. **McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame, D. McNab, L. J. Perry, J. E. Scott, and P. Taylor.** 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **69 (Pt 7)**:1531-74.
365. **McLean, G., F. Rixon, N. Langeland, L. Haarr, and H. Marsden.** 1990. Identification and characterization of the virion protein products of herpes simplex virus type 1 gene UL47. *J Gen Virol* **71 (Pt 12)**:2953-60.
366. **McNab, A. R., P. Desai, S. Person, L. L. Roof, D. R. Thomsen, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 1998. The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J Virol* **72**:1060-70.
367. **McNamee, E. E., T. J. Taylor, and D. M. Knipe.** 2000. A dominant-negative herpesvirus protein inhibits intranuclear targeting of viral proteins: effects on DNA replication and late gene expression. *J Virol* **74**:10122-31.
368. **McVoy, M. A., and D. Ramnarain.** 2000. Machinery to support genome segment inversion exists in a herpesvirus which does not naturally contain invertible elements. *J Virol* **74**:4882-7.
369. **Mears, W. E., V. Lam, and S. A. Rice.** 1995. Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J Virol* **69**:935-47.
370. **Meignier, B., B. Martin, R. J. Whitley, and B. Roizman.** 1990. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020. II. Studies in immunocompetent and immunosuppressed owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Infect Dis* **162**:313-21.
371. **Melancon, J. M., P. A. Fulmer, and K. G. Kousoulas.** 2007. The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment. *Virol J* **4**:120.
372. **Melen, K., L. Kinnunen, R. Fagerlund, N. Ikonen, K. Y. Twu, R. M. Krug, and I. Julkunen.** 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol* **81**:5995-6006.
373. **Mercer, J., and A. Helenius.** 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**:510-20.
374. **Merino-Gracia, J., M. F. Garcia-Mayoral, and I. Rodriguez-Crespo.** 2011. The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *FEBS J*.
375. **Mermall, V., P. L. Post, and M. S. Mooseker.** 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**:527-33.
376. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**:167-80.

377. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**:1537-47.
378. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**:423-9.
379. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**:222-34.
380. **Michael, K., B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter, and A. Karger.** 2006. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *J Virol* **80**:1332-9.
381. **Michael, N., and B. Roizman.** 1993. Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product occurs within the context of the viral genome and is associated with all three identified cognate sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2286-90.
382. **Michienzi, A., L. Cagnon, I. Bahner, and J. J. Rossi.** 2000. Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8955-60.
383. **Mick, G.** 2010. Vaccination: a new option to reduce the burden of herpes zoster. *Expert Rev Vaccines* **9**:31-5.
384. **Miller, O. L., Jr., and B. R. Beatty.** 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**:955-7.
385. **Milne, R. S., A. V. Nicola, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **79**:6655-63.
386. **Miyazaki, Y., T. Nosaka, and M. Hatanaka.** 1996. The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Biochimie* **78**:1081-6.
387. **Mocarski, E. S., and B. Roizman.** 1982. Herpesvirus-dependent amplification and inversion of cell-associated viral thymidine kinase gene flanked by viral alpha sequences and linked to an origin of viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:5626-30.
388. **Mochida, S.** 1995. Role of myosin in neurotransmitter release: functional studies at synapses formed in culture. *J Physiol Paris* **89**:83-94.
389. **Mochida, S., H. Kobayashi, Y. Matsuda, Y. Yuda, K. Muramoto, and Y. Nonomura.** 1994. Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* **13**:1131-42.
390. **Moffat, J. F., M. D. Stein, H. Kaneshima, and A. M. Arvin.** 1995. Tropism of varicella-zoster virus for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice. *J Virol* **69**:5236-42.
391. **Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K. F. Sullivan.** 2000. Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**:661-5.
392. **Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-36.
393. **Moore, P. B., and T. A. Steitz.** 2002. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**:229-35.
394. **Morency, E., Y. Coute, J. Thomas, P. Texier, and P. Lomonte.** 2005. The protein ICP0 of herpes simplex virus type 1 is targeted to nucleoli of infected cells. Brief report. *Arch Virol* **150**:2387-95.
395. **Morris, G. E.** 2008. The Cajal body. *Biochim Biophys Acta* **1783**:2108-15.
396. **Mosammaparast, N., K. R. Jackson, Y. Guo, C. J. Brame, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and L. F. Pemberton.** 2001. Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* **153**:251-62.
397. **Moss, T., and V. Y. Stefanovsky.** 2002. At the center of eukaryotic life. *Cell* **109**:545-8.
398. **Mossman, K. L., R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley.** 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* **74**:6287-99.

399. **Mou, F., E. Wills, and J. D. Baines.** 2009. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* **83**:5181-91.
400. **Muggeridge, M. I.** 2000. Characterization of cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus 2 glycoproteins gB, gD, gH and gL in transfected cells. *J Gen Virol* **81**:2017-27.
401. **Muller, S., and A. Dejean.** 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* **73**:5137-43.
402. **Munro, S.** 1998. Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* **8**:11-5.
403. **Muro, E., J. Gebrane-Younis, A. Jobart-Malfait, E. Louvet, P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun.** 2010. The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus* **1**:202-211.
404. **Murphy, M. A., M. A. Bucks, K. J. O'Regan, and R. J. Courtney.** 2008. The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids. *Virology* **376**:279-89.
405. **Muylaert, I., and P. Elias.** 2010. Contributions of nucleotide excision repair, DNA polymerase eta, and homologous recombination to replication of UV-irradiated herpes simplex virus type 1. *J Biol Chem* **285**:13761-8.
406. **Muylaert, I., and P. Elias.** 2007. Knockdown of DNA ligase IV/XRCC4 by RNA interference inhibits herpes simplex virus type I DNA replication. *J Biol Chem* **282**:10865-72.
407. **Muylaert, I., K. W. Tang, and P. Elias.** 2011. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **286**:15619-24.
408. **Narula, N., I. McMorro, G. Plopper, J. Doherty, K. S. Matlin, B. Burke, and J. L. Stow.** 1992. Identification of a 200-kD, brefeldin-sensitive protein on Golgi membranes. *J Cell Biol* **117**:27-38.
409. **Nascimento, R., H. Costa, J. D. Dias, and R. M. Parkhouse.** 2011. MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Arch Virol* **156**:375-86.
410. **Nascimento, R., J. D. Dias, and R. M. Parkhouse.** 2009. The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch Virol* **154**:1143-9.
411. **Nascimento, R., and R. M. Parkhouse.** 2007. Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* **88**:1446-53.
412. **Nash, A. A., B. M. Dutia, J. P. Stewart, and A. J. Davison.** 2001. Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:569-79.
413. **Negi, S. S., and M. O. Olson.** 2006. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J Cell Sci* **119**:3676-85.
414. **Nejmeddine, M., A. L. Barnard, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham.** 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* **280**:29653-60.
415. **Neukirchen, D., and F. Bradke.** 2011. Cytoplasmic linker proteins regulate neuronal polarization through microtubule and growth cone dynamics. *J Neurosci* **31**:1528-38.
416. **Newcomb, W. W., and J. C. Brown.** 2010. Structure and capsid association of the herpesvirus large tegument protein UL36. *J Virol* **84**:9408-14.
417. **Newcomb, W. W., S. K. Cockrell, F. L. Homa, and J. C. Brown.** 2009. Polarized DNA ejection from the herpesvirus capsid. *J Mol Biol* **392**:885-94.
418. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, and J. C. Brown.** 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**:6286-94.
419. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, B. L. Trus, N. Cheng, A. Steven, F. Booy, and J. C. Brown.** 1999. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and

- identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J Virol* **73**:4239-50.
420. **Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller, and J. C. Brown.** 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **75**:10923-32.
 421. **Newcomb, W. W., B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, J. S. Wall, and J. C. Brown.** 1993. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol* **232**:499-511.
 422. **Nguyen, L. H., D. M. Knipe, and R. W. Finberg.** 1992. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. *J Virol* **66**:7067-72.
 423. **Nicola, A. V., A. M. McEvoy, and S. E. Straus.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **77**:5324-32.
 424. **Nikkels, A. F., P. Delvenne, C. Sadzot-Delvaux, S. Debrus, J. Piette, B. Rentier, G. Lipcsei, P. Quatresooz, and G. E. Pierard.** 1996. Distribution of varicella zoster virus and herpes simplex virus in disseminated fatal infections. *J Clin Pathol* **49**:243-8.
 425. **Nimonkar, A. V., and P. E. Boehmer.** 2003. Reconstitution of recombination-dependent DNA synthesis in herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10201-6.
 426. **Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan, and K. H. Downing.** 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**:79-88.
 427. **Nogales, E., S. G. Wolf, and K. H. Downing.** 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**:199-203.
 428. **Norberg, P., S. Tyler, A. Severini, R. Whitley, J. A. Liljeqvist, and T. Bergstrom.** 2011. A genome-wide comparative evolutionary analysis of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus. *PLoS One* **6**:e22527.
 429. **Nozawa, N., Y. Yamauchi, K. Ohtsuka, Y. Kawaguchi, and Y. Nishiyama.** 2004. Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Exp Cell Res* **299**:486-97.
 430. **O'Brien, J. J., and D. M. Campoli-Richards.** 1989. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **37**:233-309.
 431. **O'Hare, P., and G. S. Hayward.** 1985. Three trans-acting regulatory proteins of herpes simplex virus modulate immediate-early gene expression in a pathway involving positive and negative feedback regulation. *J Virol* **56**:723-33.
 432. **Ogasawara, M., T. Suzutani, I. Yoshida, and M. Azuma.** 2001. Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J Virol* **75**:1427-36.
 433. **Ogle, W. O., and B. Roizman.** 1999. Functional anatomy of herpes simplex virus 1 overlapping genes encoding infected-cell protein 22 and US1.5 protein. *J Virol* **73**:4305-15.
 434. **Ohara, P. T., M. S. Chin, and J. H. LaVail.** 2000. The spread of herpes simplex virus type 1 from trigeminal neurons to the murine cornea: an immunoelectron microscopy study. *J Virol* **74**:4776-86.
 435. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
 436. **Okamoto, H., T. A. Watanabe, and T. Horiuchi.** 2011. Double rolling circle replication (DRCR) is recombinogenic. *Genes Cells* **16**:503-13.

437. **Okuwaki, M., A. Iwamatsu, M. Tsujimoto, and K. Nagata.** 2001. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J Mol Biol* **311**:41-55.
438. **Orberg, P. K., and P. A. Schaffer.** 1987. Expression of herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein, ICP8, in transformed cell lines: complementation of deletion mutants and inhibition of wild-type virus. *J Virol* **61**:1136-46.
439. **Padinhateeri, R., and J. F. Marko.** 2011. Nucleosome positioning in a model of active chromatin remodeling enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:7799-803.
440. **Panscherewski, D., and B. Rohde.** 1962. [On the serology and therapy of recurrent herpes simplex]. *Hautarzt* **13**:275-8.
441. **Parkinson, J., and R. D. Everett.** 2000. Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins. *J Virol* **74**:10006-17.
442. **Pasdeloup, D., D. Blondel, A. L. Isidro, and F. J. Rixon.** 2009. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol* **83**:6610-23.
443. **Patel, A. H., and J. B. MacLean.** 1995. The product of the UL6 gene of herpes simplex virus type 1 is associated with virus capsids. *Virology* **206**:465-78.
444. **Paustian, T.** June 2011. Through the Microscope. University of Wisconsin-Madison University of Wisconsin-Madison. www.microbiologytext.com
445. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:10821-8.
446. **Pearson, A., D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2004. ICP27 selectively regulates the cytoplasmic localization of a subset of viral transcripts in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* **78**:23-32.
447. **Pei, Y., D. C. Hodgins, C. Lee, J. G. Calvert, S. K. Welch, R. Jolie, M. Keith, and D. Yoo.** 2008. Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. *Virus Res* **135**:107-14.
448. **Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**:256-63.
449. **Pertel, P. E., A. Fridberg, M. L. Parish, and P. G. Spear.** 2001. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* **279**:313-24.
450. **Pertschy, B., C. Schneider, M. Gnädig, T. Schafer, D. Tollervey, and E. Hurt.** 2009. RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J Biol Chem* **284**:35079-91.
451. **Peter, M., J. Nakagawa, M. Doree, J. C. Labbe, and E. A. Nigg.** 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**:791-801.
452. **Peters, R.** 2006. Introduction to nucleocytoplasmic transport: molecules and mechanisms. *Methods Mol Biol* **322**:235-58.
453. **Peters, R. A.** 1963. Biochemical lesions and lethal synthesis. Pergamon Press, Oxford, New York,.
454. **Piguet, V., and Q. Sattentau.** 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* **114**:605-10.
455. **Pinol-Roma, S.** 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* **10**:77-90.
456. **Piret, J., and G. Boivin.** 2011. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:459-72.

457. **Poffenberger, K. L., and B. Roizman.** 1985. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* **53**:587-95.
458. **Pollard, T. D.** 2010. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **22**:50-6.
459. **Pollard, T. D., and G. G. Borisy.** 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453-65.
460. **Portela, A., and P. Digard.** 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**:723-34.
461. **Porter, I. M., and N. D. Stow.** 2004. Replication, recombination and packaging of amplicon DNA in cells infected with the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12. *J Gen Virol* **85**:3501-10.
462. **Porter, I. M., and N. D. Stow.** 2004. Virus particles produced by the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12 contain abnormal genomes. *J Gen Virol* **85**:583-91.
463. **Post, L. E., S. Mackem, and B. Roizman.** 1981. Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters. *Cell* **24**:555-65.
464. **Post, L. E., and B. Roizman.** 1981. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25**:227-32.
465. **Prescott, D. M., and M. A. Bender.** 1962. Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res* **26**:260-8.
466. **Preston, C. M.** 1979. Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK. *J Virol* **29**:275-84.
467. **Prives, C.** 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* **95**:5-8.
468. **Purifoy, D. J., R. B. Lewis, and K. L. Powell.** 1977. Identification of the herpes simplex virus DNA polymerase gene. *Nature* **269**:621-3.
469. **Puvion-Dutilleul, F., and M. E. Christensen.** 1993. Alterations of fibrillarin distribution and nucleolar ultrastructure induced by adenovirus infection. *Eur J Cell Biol* **61**:168-76.
470. **Pyper, J. M., J. E. Clements, and M. C. Zink.** 1998. The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J Virol* **72**:7697-702.
471. **Qin, Z., M. J. Buehler, and L. Kreplak.** 2010. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *J Biomech* **43**:15-22.
472. **Quinlan, M. P., L. B. Chen, and D. M. Knipe.** 1984. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* **36**:857-68.
473. **Quinlan, M. P., and D. M. Knipe.** 1985. Stimulation of expression of a herpes simplex virus DNA-binding protein by two viral functions. *Mol Cell Biol* **5**:957-63.
474. **Radtke, K., D. Kieneke, A. Wolfstein, K. Michael, W. Steffen, T. Scholz, A. Karger, and B. Sodeik.** 2010. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog* **6**:e1000991.
475. **Rajcani, J., and V. Durmanova.** 2006. Developments in herpes simplex virus vaccines: old problems and new challenges. *Folia Microbiol (Praha)* **51**:67-85.
476. **Raska, I.** 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* **13**:517-25.
477. **Raska, I., P. J. Shaw, and D. Cmarko.** 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* **18**:325-34.
478. **Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes, and R. A. Milligan.** 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**:58-65.

479. **Reed, M. L., B. K. Dove, R. M. Jackson, R. Collins, G. Brooks, and J. A. Hiscox.** 2006. Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein. *Traffic* **7**:833-48.
480. **Reeves, P. M., B. Bommarius, S. Lebeis, S. McNulty, J. Christensen, A. Swimm, A. Chahroudi, R. Chavan, M. B. Feinberg, D. Veach, W. Bornmann, M. Sherman, and D. Kalman.** 2005. Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med* **11**:731-9.
481. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
482. **Remillard-Labrosse, G., and R. Lippe.** 2009. Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN. *Commun Integr Biol* **2**:434-6.
483. **Reuven, N. B., A. E. Staire, R. S. Myers, and S. K. Weller.** 2003. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease and single-stranded DNA binding protein mediate strand exchange in vitro. *J Virol* **77**:7425-33.
484. **Reuven, N. B., and S. K. Weller.** 2005. Herpes simplex virus type 1 single-strand DNA binding protein ICP8 enhances the nuclease activity of the UL12 alkaline nuclease by increasing its processivity. *J Virol* **79**:9356-8.
485. **Reuven, N. B., S. Willcox, J. D. Griffith, and S. K. Weller.** 2004. Catalysis of strand exchange by the HSV-1 UL12 and ICP8 proteins: potent ICP8 recombinase activity is revealed upon resection of dsDNA substrate by nuclease. *J Mol Biol* **342**:57-71.
486. **Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**:5564-75.
487. **Ristea, S., M. Dobbstein, and J. Roth.** 2000. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 and cellular exportin 1 protein relocate each other to a subnucleolar structure. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:857-65.
488. **Rixon, F. J.** 1993. Structure and assembly of herpesviruses. *Seminars in Virology* **4**:135-144.
489. **Rixon, F. J., C. Addison, A. McGregor, S. J. Macnab, P. Nicholson, V. G. Preston, and J. D. Tatman.** 1996. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol* **77 (Pt 9)**:2251-60.
490. **Rixon, F. J., and D. McNab.** 1999. Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of in vitro-assembled procapsids. *J Virol* **73**:5714-21.
491. **Roberts, K. L., and J. D. Baines.** 2010. Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol* **84**:9889-96.
492. **Robertson, A. S., E. Smythe, and K. R. Ayscough.** 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **66**:2049-65.
493. **Robertson, B. J., P. J. McCann, 3rd, L. Matusick-Kumar, W. W. Newcomb, J. C. Brown, R. J. Colonno, and M. Gao.** 1996. Separate functional domains of the herpes simplex virus type 1 protease: evidence for cleavage inside capsids. *J Virol* **70**:4317-28.
494. **Roche, S., S. Bressanelli, F. A. Rey, and Y. Gaudin.** 2006. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**:187-91.
495. **Rochlin, M. W., K. Itoh, R. S. Adelstein, and P. C. Bridgman.** 1995. Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J Cell Sci* **108 (Pt 12)**:3661-70.
496. **Roffman, E., J. P. Albert, J. P. Goff, and N. Frenkel.** 1990. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol* **64**:6308-13.
497. **Roger, B., A. Moisand, F. Amalric, and P. Bouvet.** 2002. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* **277**:10209-19.

498. **Roller, R. J., L. L. Monk, D. Stuart, and B. Roizman.** 1996. Structure and function in the herpes simplex virus 1 RNA-binding protein U(s)11: mapping of the domain required for ribosomal and nucleolar association and RNA binding in vitro. *J Virol* **70**:2842-51.
499. **Rosenblatt, J., L. P. Cramer, B. Baum, and K. M. McGee.** 2004. Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell* **117**:361-72.
500. **Rouiller, I., X. P. Xu, K. J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T. D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein.** 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **180**:887-95.
501. **Roussel, P., C. Andre, L. Comai, and D. Hernandez-Verdun.** 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**:235-46.
502. **Rout, M. P., J. D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait.** 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**:635-51.
503. **Rowland, R. R., R. Kervin, C. Kuckleburg, A. Sperlich, and D. A. Benfield.** 1999. The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* **64**:1-12.
504. **Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* **63**:1-8.
505. **Rubright, J. H., and A. B. Shafritz.** 2011. The herpetic whitlow. *J Hand Surg Am* **36**:340-2.
506. **Ruyechan, W. T., L. S. Morse, D. M. Knipe, and B. Roizman.** 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* **29**:677-97.
507. **Saad, A., Z. H. Zhou, J. Jakana, W. Chiu, and F. J. Rixon.** 1999. Roles of triplex and scaffolding proteins in herpes simplex virus type 1 capsid formation suggested by structures of recombinant particles. *J Virol* **73**:6821-30.
508. **Sacks, W. R., C. C. Greene, D. P. Aschman, and P. A. Schaffer.** 1985. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol* **55**:796-805.
509. **Sacks, W. R., and P. A. Schaffer.** 1987. Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *J Virol* **61**:829-39.
510. **Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, T. Albrecht, and R. A. Davey.** 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog* **6**.
511. **Sagou, K., M. Uema, and Y. Kawaguchi.** 2010. Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J Virol* **84**:2110-21.
512. **Sakakibara, H., and K. Oiwa.** 2011. Molecular organization and force-generating mechanism of dynein. *FEBS J*.
513. **Salomoni, P., and P. P. Pandolfi.** 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell* **108**:165-70.
514. **Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala, and L. Frappier.** 2008. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* **4**:e1000100.
515. **Samad, M. A., M. Okuwaki, H. Haruki, and K. Nagata.** 2007. Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett* **581**:3283-8.

516. **Samaniego, L. A., A. L. Webb, and N. A. DeLuca.** 1995. Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. *J Virol* **69**:5705-15.
517. **Sampath, P., and N. A. Deluca.** 2008. Binding of ICP4, TATA-binding protein, and RNA polymerase II to herpes simplex virus type 1 immediate-early, early, and late promoters in virus-infected cells. *J Virol* **82**:2339-49.
518. **Sanchez-Pescador, L., R. L. Burke, G. Ott, and G. Van Nest.** 1988. The effect of adjuvants on the efficacy of a recombinant herpes simplex virus glycoprotein vaccine. *J Immunol* **141**:1720-7.
519. **Sanchez, R., and I. Mohr.** 2007. Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* **81**:3455-64.
520. **Sanchez, V., E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* **74**:3842-51.
521. **Sandri-Goldin, R. M.** 2006. Alpha herpesviruses : molecular and cellular biology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
522. **Sarmiento, M., M. Haffey, and P. G. Spear.** 1979. Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoprotein VP7(B2) in virion infectivity. *J Virol* **29**:1149-58.
523. **Sasaki, H., M. Nakamura, T. Ohno, Y. Matsuda, Y. Yuda, and Y. Nonomura.** 1995. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2026-30.
524. **Savino, T. M., J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J. B. Sibarita, and D. Hernandez-Verdun.** 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* **153**:1097-110.
525. **Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J. C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser, and J. J. Diaz.** 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* **13**:4100-9.
526. **Schliwa, M., and G. Woehlke.** 2003. Molecular motors. *Nature* **422**:759-65.
527. **Schmidt-Zachmann, M. S., and E. A. Nigg.** 1993. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**:799-806.
528. **Schrag, J. D., B. V. Prasad, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 1989. Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* **56**:651-60.
529. **Schramm, B., and J. K. Locker.** 2005. Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication. *Traffic* **6**:839-46.
530. **Schroer, T. A.** 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:759-79.
531. **Scott, M. S., P. V. Troshin, and G. J. Barton.** 2011. NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* **12**:317.
532. **Sears, A. E., I. W. Halliburton, B. Meignier, S. Silver, and B. Roizman.** 1985. Herpes simplex virus 1 mutant deleted in the alpha 22 gene: growth and gene expression in permissive and restrictive cells and establishment of latency in mice. *J Virol* **55**:338-46.
533. **Segal, A. L., A. H. Katcher, V. J. Brightman, and M. F. Miller.** 1974. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *J Dent Res* **53**:797-803.
534. **Sellers, J. R.** 1999. Myosins, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
535. **Sellers, J. R.** 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**:3-22.
536. **Sept, D., N. A. Baker, and J. A. McCammon.** 2003. The physical basis of microtubule structure and stability. *Protein Sci* **12**:2257-61.
537. **Severini, A., A. R. Morgan, D. R. Tovell, and D. L. Tyrrell.** 1994. Study of the structure of replicative intermediates of HSV-1 DNA by pulsed-field gel electrophoresis. *Virology* **200**:428-35.
538. **Severini, A., D. G. Scraba, and D. L. Tyrrell.** 1996. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**:3169-75.

539. **Sheaffer, A. K., W. W. Newcomb, M. Gao, D. Yu, S. K. Weller, J. C. Brown, and D. J. Tenney.** 2001. Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol* **75**:687-98.
540. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, C. Horensavitz, M. Pypaert, and W. Mothes.** 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* **9**:310-5.
541. **Sherman, G., and S. L. Bachenheimer.** 1988. Characterization of intranuclear capsids made by ts morphogenic mutants of HSV-1. *Virology* **163**:471-80.
542. **Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear.** 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**:1273-81.
543. **Ship, II, M. F. Miller, and C. Ram.** 1977. A retrospective study of recurrent herpes labialis (RHL) in a professional population, 1958-1971. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **44**:723-30.
544. **Shirata, N., A. Kudoh, T. Daikoku, Y. Tatsumi, M. Fujita, T. Kiyono, Y. Sugaya, H. Isomura, K. Ishizaki, and T. Tsurumi.** 2005. Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *J Biol Chem* **280**:30336-41.
545. **Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau, and R. J. Deshaies.** 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**:233-44.
546. **Shukla, D., J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, and P. G. Spear.** 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**:13-22.
547. **Siekavizza-Robles, C. R., S. J. Dollery, and A. V. Nicola.** 2010. Reversible conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B with fusion-from-without activity is triggered by mildly acidic pH. *Virology* **7**:352.
548. **Siew, V. K., C. Y. Duh, and S. K. Wang.** 2009. Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *J Biomed Sci* **16**:107.
549. **Silver, S., and B. Roizman.** 1985. gamma 2-Thymidine kinase chimeras are identically transcribed but regulated a gamma 2 genes in herpes simplex virus genomes and as beta genes in cell genomes. *Mol Cell Biol* **5**:518-28.
550. **Silverstein, S., and D. L. Engelhardt.** 1979. Alterations in the protein synthetic apparatus of cells infected with herpes simplex virus. *Virology* **95**:334-42.
551. **Simas, J. P., and S. Efstathiou.** 1998. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**:276-82.
552. **Simon, D. N., and K. L. Wilson.** 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**:695-708.
553. **Simonin, D., J. J. Diaz, T. Masse, and J. J. Madjar.** 1997. Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78 (Pt 2)**:435-43.
554. **Simpson-Holley, M., D. Ellis, D. Fisher, D. Elton, J. McCauley, and P. Digard.** 2002. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**:212-25.
555. **Siomi, H., H. Shida, M. Maki, and M. Hatanaka.** 1990. Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol* **64**:1803-7.
556. **Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun.** 2000. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* **148**:259-70.

557. **Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun.** 1999. The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci* **112 (Pt 19)**:3259-68.
558. **Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne, and A. Minson.** 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* **75**:5697-702.
559. **Smibert, C. A., B. Popova, P. Xiao, J. P. Capone, and J. R. Smiley.** 1994. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol* **68**:2339-46.
560. **Smiley, J. R., J. Duncan, and M. Howes.** 1990. Sequence requirements for DNA rearrangements induced by the terminal repeat of herpes simplex virus type 1 KOS DNA. *J Virol* **64**:5036-50.
561. **Smith, G. L., B. J. Murphy, and M. Law.** 2003. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol* **57**:323-42.
562. **Smith, G. L., A. Vanderplasschen, and M. Law.** 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* **83**:2915-31.
563. **Smith, I. L., M. A. Hardwicke, and R. M. Sandri-Goldin.** 1992. Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* **186**:74-86.
564. **Smith, J. S., and N. J. Robinson.** 2002. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**:S3-28.
565. **Snyder, A., K. Polcicova, and D. C. Johnson.** 2008. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol* **82**:10613-24.
566. **Sodeik, B.** 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* **8**:465-72.
567. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
568. **Soltz-Szots, J.** 1971. [Therapy of recurrent Herpes simplex]. *Z Haut Geschlechtskr* **46**:267-72.
569. **Sonntag, F., K. Schmidt, and J. A. Kleinschmidt.** 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10220-5.
570. **Sourvinos, G., and R. D. Everett.** 2002. Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *EMBO J* **21**:4989-97.
571. **Spear, P. G., R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**:1-8.
572. **Spector, D. L., and A. I. Lamond.** 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
573. **Spector, F. C., E. R. Kern, J. Palmer, R. Kaiwar, T. A. Cha, P. Brown, and R. R. Spaete.** 1998. Evaluation of a live attenuated recombinant virus RAV 9395 as a herpes simplex virus type 2 vaccine in guinea pigs. *J Infect Dis* **177**:1143-54.
574. **Spuul, P., G. Balistreri, L. Kaariainen, and T. Ahola.** 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* **84**:7543-57.
575. **Stampfer, S. D., H. Lou, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and E. E. Heldwein.** 2010. Structural basis of local, pH-dependent conformational changes in glycoprotein B from herpes simplex virus type 1. *J Virol* **84**:12924-33.
576. **Stanberry, L. R., S. L. Spruance, A. L. Cunningham, D. I. Bernstein, A. Mindel, S. Sacks, S. Tying, F. Y. Aoki, M. Slaoui, M. Denis, P. Vandepapeliere, and G. Dubin.** 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347**:1652-61.
577. **Starr, S. E., S. A. Karatela, S. L. Shore, A. Duffey, and A. J. Nahmias.** 1975. Stimulation of human lymphocytes by Herpes simplex virus antigens. *Infect Immun* **11**:109-12.

578. **Stefanovsky, V. Y., G. Pelletier, R. Hannan, T. Gagnon-Kugler, L. I. Rothblum, and T. Moss.** 2001. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**:1063-73.
579. **Stenberg, R. M., and L. I. Pizer.** 1982. Herpes simplex virus-induced changes in cellular and adenovirus RNA metabolism in an adenovirus type 5-transformed human cell line. *J Virol* **42**:474-87.
580. **Stewart, M.** 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:195-208.
581. **Stow, N. D.** 2001. Packaging of genomic and amplicon DNA by the herpes simplex virus type 1 UL25-null mutant KUL25NS. *J Virol* **75**:10755-65.
582. **Stow, N. D., V. C. Evans, and D. A. Matthews.** 2009. Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* **90**:69-73.
583. **Straus, S. E., B. Savarese, M. Tigges, A. G. Freifeld, P. R. Krause, D. M. Margolis, J. L. Meier, D. P. Paar, S. F. Adair, D. Dina, and et al.** 1993. Induction and enhancement of immune responses to herpes simplex virus type 2 in humans by use of a recombinant glycoprotein D vaccine. *J Infect Dis* **167**:1045-52.
584. **Strunze, S., L. C. Trotman, K. Boucke, and U. F. Greber.** 2005. Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell* **16**:2999-3009.
585. **Subramanian, R. P., and R. J. Geraghty.** 2007. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2903-8.
586. **Suenaga, T., T. Satoh, P. Somboonthum, Y. Kawaguchi, Y. Mori, and H. Arase.** 2010. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:866-71.
587. **Suomalainen, M., M. Y. Nakano, S. Keller, K. Boucke, R. P. Stidwill, and U. F. Greber.** 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* **144**:657-72.
588. **Suter, D. M., and K. E. Miller.** 2011. The emerging role of forces in axonal elongation. *Prog Neurobiol* **94**:91-101.
589. **Szczepaniak, R., J. Nellisery, A. M. Makhov, A. Kosinski, J. F. Conway, and S. K. Weller.** 2011. Disulfide Bond formation contributes to Herpes Simplex Virus Capsid Stability and Retention of Pentons. *J Virol*.
590. **Sze, P., and R. C. Herman.** 1992. The herpes simplex virus type 1 ICP6 gene is regulated by a 'leaky' early promoter. *Virus Res* **26**:141-52.
591. **Takahashi, K.** 1984. Cilia and flagella. *Cell Struct Funct* **9 Suppl**:s87-90.
592. **Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de The.** 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* **23**:2819-24.
593. **Tanaka, E., T. Ho, and M. W. Kirschner.** 1995. The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* **128**:139-55.
594. **Tanenbaum, M. E., and R. H. Medema.** 2010. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell* **19**:797-806.
595. **Tang, Q., L. Li, A. M. Ishov, V. Revol, A. L. Epstein, and G. G. Maul.** 2003. Determination of minimum herpes simplex virus type 1 components necessary to localize transcriptionally active DNA to ND10. *J Virol* **77**:5821-8.
596. **Tengelsen, L. A., N. E. Pederson, P. R. Shaver, M. W. Wathen, and F. L. Homa.** 1993. Herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation require the product of the UL28 gene: isolation and characterization of two UL28 deletion mutants. *J Virol* **67**:3470-80.

597. **Thiry, E., F. Meurens, B. Muylkens, M. McVoy, S. Gogev, J. Thiry, A. Vanderplasschen, A. Epstein, G. Keil, and F. Schynts.** 2005. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol* **15**:89-103.
598. **Thiry, M., and D. L. Lafontaine.** 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* **15**:194-9.
599. **Thurlow, J. K., M. Murphy, N. D. Stow, and V. G. Preston.** 2006. Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J Virol* **80**:2118-26.
600. **Thurlow, J. K., F. J. Rixon, M. Murphy, P. Targett-Adams, M. Hughes, and V. G. Preston.** 2005. The herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL17 is a virion protein that is present in both the capsid and the tegument compartments. *J Virol* **79**:150-8.
601. **Tiwari, V., C. Clement, D. Xu, T. Valyi-Nagy, B. Y. Yue, J. Liu, and D. Shukla.** 2006. Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J Virol* **80**:8970-80.
602. **Tognon, M., R. Guandalini, M. G. Romanelli, R. Manservigi, and B. Trevisani.** 1991. Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res* **18**:135-50.
603. **Tollefson, A. E., A. Scaria, T. W. Hermiston, J. S. Ryerse, L. J. Wold, and W. S. Wold.** 1996. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* **70**:2296-306.
604. **Toropova, K., J. B. Huffman, F. L. Homa, and J. F. Conway.** 2011. The Herpes Simplex Virus 1 UL17 Protein Is the Second Constituent of the Capsid Vertex-Specific Component Required for DNA Packaging and Retention. *J Virol* **85**:7513-22.
605. **Tran, E. J., and S. R. Wentz.** 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* **125**:1041-53.
606. **Trizenberg, S. J., R. C. Kingsbury, and S. L. McKnight.** 1988. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* **2**:718-29.
607. **Trinkle-Mulcahy, L., J. Chusainow, Y. W. Lam, S. Swift, and A. Lamond.** 2007. Visualization of intracellular PP1 targeting through transiently and stably expressed fluorescent protein fusions. *Methods Mol Biol* **365**:133-54.
608. **Trus, B. L., F. L. Homa, F. P. Booy, W. W. Newcomb, D. R. Thomsen, N. Cheng, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 1995. Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *J Virol* **69**:7362-6.
609. **Trus, B. L., W. W. Newcomb, N. Cheng, G. Cardone, L. Marekov, F. L. Homa, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2007. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell* **26**:479-89.
610. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
611. **Turner, A., B. Bruun, T. Minson, and H. Browne.** 1998. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* **72**:873-5.
612. **Uprichard, S. L., and D. M. Knipe.** 1996. Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. *J Virol* **70**:1969-80.
613. **Vagnarelli, P., D. F. Hudson, S. A. Ribeiro, L. Trinkle-Mulcahy, J. M. Spence, F. Lai, C. J. Farr, A. I. Lamond, and W. C. Earnshaw.** 2006. Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol* **8**:1133-42.

614. **van Genderen, I. L., R. Brandimarti, M. R. Torrisi, G. Campadelli, and G. van Meer.** 1994. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* **200**:831-6.
615. **van Leeuwen, H., G. Elliott, and P. O'Hare.** 2002. Evidence of a role for nonmuscle myosin II in herpes simplex virus type 1 egress. *J Virol* **76**:3471-81.
616. **Van Minnebruggen, G., H. W. Favoreel, L. Jacobs, and H. J. Nauwynck.** 2003. Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol* **77**:9074-80.
617. **Vandekerckhove, J., and K. Weber.** 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* **126**:783-802.
618. **Varmuza, S. L., and J. R. Smiley.** 1985. Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell* **41**:793-802.
619. **Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, 2nd, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**:10960-6.
620. **Visa, N., and P. Percipalle.** 2010. Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a000620.
621. **Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon.** 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**:709-18.
622. **Vittone, V., E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2005. Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **79**:9566-71.
623. **von Delius, M., and D. A. Leigh.** 2011. Walking molecules. *Chem Soc Rev* **40**:3656-76.
624. **Vreugde, S., C. Ferrai, A. Miluzio, E. Hauben, P. C. Marchisio, M. P. Crippa, M. Bussi, and S. Biffo.** 2006. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **23**:749-55.
625. **Wacker, I., C. Kaether, A. Kromer, A. Migala, W. Almers, and H. H. Gerdes.** 1997. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* **110 (Pt 13)**:1453-63.
626. **Wadsworth, S., R. J. Jacob, and B. Roizman.** 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol* **15**:1487-97.
627. **Waggoner, S., and P. Sarnow.** 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* **72**:6699-709.
628. **Wagner, E. K., and B. Roizman.** 1969. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**:36-46.
629. **Wagner, M. J., and J. R. Smiley.** 2011. Herpes simplex virus requires VP11/12 to activate Src family kinase-phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling. *J Virol* **85**:2803-12.
630. **Wang, S. K., C. Y. Duh, and T. T. Chang.** 2000. Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**:2407-16.
631. **Wang, S. K., C. Y. Duh, and C. W. Wu.** 2004. Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J Virol* **78**:9750-62.
632. **Ward, P. L., G. Campadelli-Fiume, E. Avitabile, and B. Roizman.** 1994. Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **68**:7406-17.

633. **Warner, M. S., R. J. Geraghty, W. M. Martinez, R. I. Montgomery, J. C. Whitbeck, R. Xu, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and P. G. Spear.** 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246**:179-89.
634. **Warrick, H. M., and J. A. Spudich.** 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* **3**:379-421.
635. **Weber, P. C., M. D. Challberg, N. J. Nelson, M. Levine, and J. C. Glorioso.** 1988. Inversion events in the HSV-1 genome are directly mediated by the viral DNA replication machinery and lack sequence specificity. *Cell* **54**:369-81.
636. **Weidman, M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta.** 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res* **95**:75-85.
637. **Weinmann, R., and R. G. Roeder.** 1974. Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:1790-4.
638. **Weitgasser, H.** 1977. [Controlled clinical study of the herpes antigens LUPIDON H and LUPIDON G]. *Z Hautkr* **52**:625-8.
639. **Wen, K. W., and B. Damania.** 2010. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett* **289**:140-50.
640. **Wessels, D., D. R. Soll, D. Knecht, W. F. Loomis, A. De Lozanne, and J. Spudich.** 1988. Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium* amebae lacking myosin heavy chain. *Dev Biol* **128**:164-77.
641. **Whitbeck, J. C., W. C. Lawrence, and L. J. Bello.** 1994. Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* **200**:263-70.
642. **Whiteley, A., B. Bruun, T. Minson, and H. Browne.** 1999. Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *J Virol* **73**:9515-20.
643. **Whitley, R. J., E. R. Kern, S. Chatterjee, J. Chou, and B. Roizman.** 1993. Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. *J Clin Invest* **91**:2837-43.
644. **Whittaker, G. R., and A. Helenius.** 1998. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* **246**:1-23.
645. **Wiche, G., C. Oberkanins, and A. Himmler.** 1991. Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol* **124**:217-73.
646. **Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther.** 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**:1071-83.
647. **Wild, P., C. Senn, C. L. Manera, E. Sutter, E. M. Schraner, K. Tobler, M. Ackermann, U. Ziegler, M. S. Lucas, and A. Kaech.** 2009. Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy. *J Virol* **83**:408-19.
648. **Wileman, T.** 2007. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu Rev Microbiol* **61**:149-67.
649. **Wilkinson, D. E., and S. K. Weller.** 2004. Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *J Virol* **78**:4783-96.
650. **Wilkinson, D. E., and S. K. Weller.** 2003. The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life* **55**:451-8.

651. **Williams, P., J. Verhagen, and G. Elliott.** 2008. Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. *J Virol* **82**:10946-52.
652. **Wilson, S. S., E. Fakioglu, and B. C. Herold.** 2009. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**:559-68.
653. **Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-37.
654. **Wolontis, S., and S. Jeansson.** 1977. Correlation of herpes simplex virus types 1 and 2 with clinical features of infection. *J Infect Dis* **135**:28-33.
655. **Wong, J. M., L. Kusdra, and K. Collins.** 2002. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* **4**:731-6.
656. **Wsierska-Gadek, J., and M. Horky.** 2003. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci* **1010**:266-72.
657. **Wu, C. A., N. J. Nelson, D. J. McGeoch, and M. D. Challberg.** 1988. Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *J Virol* **62**:435-43.
658. **WuDunn, D., and P. G. Spear.** 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* **63**:52-8.
659. **Wylie, S. R., P. J. Wu, H. Patel, and P. D. Chantler.** 1998. A conventional myosin motor drives neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12967-72.
660. **Xie, P.** 2010. Mechanism of processive movement of monomeric and dimeric kinesin molecules. *Int J Biol Sci* **6**:665-74.
661. **Xing, J., F. Wu, W. Pan, and C. Zheng.** 2010. Molecular anatomy of subcellular localization of HSV-1 tegument protein US11 in living cells. *Virus Res* **153**:71-81.
662. **Yamauchi, Y., T. Daikoku, F. Goshima, and Y. Nishiyama.** 2003. Herpes simplex virus UL14 protein blocks apoptosis. *Microbiol Immunol* **47**:685-9.
663. **Yamauchi, Y., K. Kiriya, N. Kubota, H. Kimura, J. Usukura, and Y. Nishiyama.** 2008. The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 is required for efficient nuclear transport of the alpha transinducing factor VP16 and viral capsids. *J Virol* **82**:1094-106.
664. **Yamauchi, Y., K. Wada, F. Goshima, T. Daikoku, K. Ohtsuka, and Y. Nishiyama.** 2002. Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions. *J Cell Sci* **115**:2517-27.
665. **Yamauchi, Y., K. Wada, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Daikoku, M. Yamada, and Y. Nishiyama.** 2001. The UL14 protein of herpes simplex virus type 2 translocates the minor capsid protein VP26 and the DNA cleavage and packaging UL33 protein into the nucleus of coexpressing cells. *J Gen Virol* **82**:321-30.
666. **Yang, M. R., S. R. Lee, W. Oh, E. W. Lee, J. Y. Yeh, J. J. Nah, Y. S. Joo, J. Shin, H. W. Lee, S. Pyo, and J. Song.** 2008. West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol* **10**:165-76.
667. **Ying, G. G., P. Proost, J. van Damme, M. Bruschi, M. Introna, and J. Golay.** 2000. Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity. *J Biol Chem* **275**:4152-8.
668. **Yoder, A., D. Yu, L. Dong, S. R. Iyer, X. Xu, J. Kelly, J. Liu, W. Wang, P. J. Vorster, L. Agulto, D. A. Stephany, J. N. Cooper, J. W. Marsh, and Y. Wu.** 2008. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* **134**:782-92.
669. **Zabierowski, S. E., and N. A. Deluca.** 2008. Stabilized binding of TBP to the TATA box of herpes simplex virus type 1 early (tk) and late (gC) promoters by TFIIA and ICP4. *J Virol* **82**:3546-54.

670. **Zeng, Y., L. Ye, S. Zhu, H. Zheng, P. Zhao, W. Cai, L. Su, Y. She, and Z. Wu.** 2008. The nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus inhibits B23 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **369**:287-91.
671. **Zenner, H. L., S. Yoshimura, F. A. Barr, and C. M. Crump.** 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**:8012-21.
672. **Zhang, Y.** 2011. Cargo transport by several motors. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **83**:011909.
673. **Zhong, S., P. Salomoni, and P. P. Pandolfi.** 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* **2**:E85-90.
674. **Zhou, Z. H., D. H. Chen, J. Jakana, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 1999. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **73**:3210-8.
675. **Zhou, Z. H., M. Dougherty, J. Jakana, J. He, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 2000. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* **288**:877-80.
676. **Zhou, Z. H., J. He, J. Jakana, J. D. Tatman, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 1995. Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nat Struct Biol* **2**:1026-30.
677. **Zhou, Z. H., B. V. Prasad, J. Jakana, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 1994. Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. *J Mol Biol* **242**:456-69.
678. **Zhu, F. X., J. M. Chong, L. Wu, and Y. Yuan.** 2005. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:800-11.
679. **Zirwes, R. F., A. P. Kouzmenko, J. M. Peters, W. W. Franke, and M. S. Schmidt-Zachmann.** 1997. Topogenesis of a nucleolar protein: determination of molecular segments directing nucleolar association. *Mol Biol Cell* **8**:231-48.
680. **Zsak, L., F. Zuckermann, N. Sugg, and T. Ben-Porat.** 1992. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J Virol* **66**:2316-25.

Annexe I

Introduction

La protéine UL24 est hautement conservée dans l'ordre des *herpevirales* mais peu est connu sur sa fonction lors de l'infection. Chez le VHS-1, son absence résulte en la formation de plages syncytiales et une réduction de l'efficacité de la réplication virale en culture cellulaire. Dans un modèle murin, une réduction de la réplication a été observée dans les muqueuses et une réduction encore plus importante a été observée dans les neurones. De plus, on observe une réduction importante de la réactivation virale et de la pathogenèse (9, 10, 13). Nous avons démontré qu'UL24 est importante pour la relocalisation d'une protéine du nucléole, la nucléoline. De plus, la portion N-terminale seule est capable d'accomplir rôle et certains résidus importants pour cette fonction font partie d'un motif putatif endonucléase (2, 3, 11). Notre laboratoire a également démontré des résultats semblables pour une autre protéine du nucléole, B23 (14).

Lors des essais d'identification de protéines interagissantes avec UL24, nous avons précédemment rapporté une interaction avec la protéine NM2a. Une autre protéine a également été identifiée, il s'agit de la grande sous-unité de la Ribonucléotide réductase 1 virale (RR1). Cette protéine a comme rôle principal la réduction de ribonucléotides en desoxyribonucléotides, un substrat essentiel dans la synthèse de l'ADN, rôle qui est dispensable dans les cellules en division, mais est important pour les cellules quiescentes et les neurones (1, 8, 18). Elle a également été impliquée dans plusieurs autres processus lors de l'infection. RR1 joue un rôle dans le repliement de protéines par une activité chaperone similaire à celle des « heat shock proteins » (HSP) (4). Elle peut également stimuler la traduction en promouvant l'assemblage du complexe eIF4F en interagissant avec eIF4G (19). Par ailleurs, la protéine RR1 du VHS-2 a été démontrée comme jouant un rôle dans l'inhibition de l'apoptose des voies mitochondriales via l'activation de MAPKK/ERK et PI3K/AKT (7). Autant pour VHS-1 et VHS-2, RR1 inhibe l'apoptose stimulée par les récepteurs de mort Fas et TNF ainsi que par le poly(I C) par une interaction constitutive avec la caspase 8 (5-7, 12). Nos expériences ci-dessous présentent l'identification d'une interaction entre UL24 et la protéine RR1 lors de l'infection.

Résultats

UL24 interagit avec la protéine RR1 virale

Pour identifier les protéines interagissant avec UL24, nous avons fait une immunoprécipitation (IP) sur des lysats de cellules infectées en parallèle par les virus KOS ou vHA-UL24 (15). Ces deux virus ont comme seule différence la présence d'une étiquette hémagglutinine (HA) fusionnée à la partie N-terminale d'UL24, ce qui nous permet d'avoir un témoin pour les interactions non spécifiques lors des IPs. Des cellules Vero ont été infectées et lysées à 18 hpi utilisant le tampon PA et soumis à une digestion à la DNase micrococcale dans le tampon de lyse PA à 4°C, condition non-optimales pour la digestion de l'ADN, mais qui prévient la dégradation des protéines. Par la suite, les lysats ont été incubés avec une matrice d'affinité contre l'étiquette HA. Les protéines isolées ont été séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant et coloré à l'argent. Nous avons observé la présence d'une bande forte correspondant à une masse moléculaire d'environ 150 kDa qui était spécifique à la présence de l'étiquette HA (Figure 1A). Utilisant la spectrométrie de masse, un peptide a été identifié avec la séquence « AITSNVSAILAR » et un score de 67. Il correspond à une protéine virale de 136 kDa, la RR1. Cette protéine a été identifiée à trois reprises dans des expériences d'IP indépendantes. Pour confirmer l'interaction, l'immunoprécipitation a été refaite, mais cette fois en analysant les protéines migrées par immunobuvardage de type western. Utilisant un anticorps contre la protéine RR1, nous avons détecté la présence de la RR1 dans les lysats de cellules infectées par les virus KOS et vHA-UL24. Par contre, une bande correspondant à RR1 a été observée seulement dans le lysat de cellules infectées par le virus vHA-UL24 (Figure 1B). Ce résultat confirme la spécificité de l'interaction puisqu'en absence de l'étiquette, RR1 n'était pas précipitée.

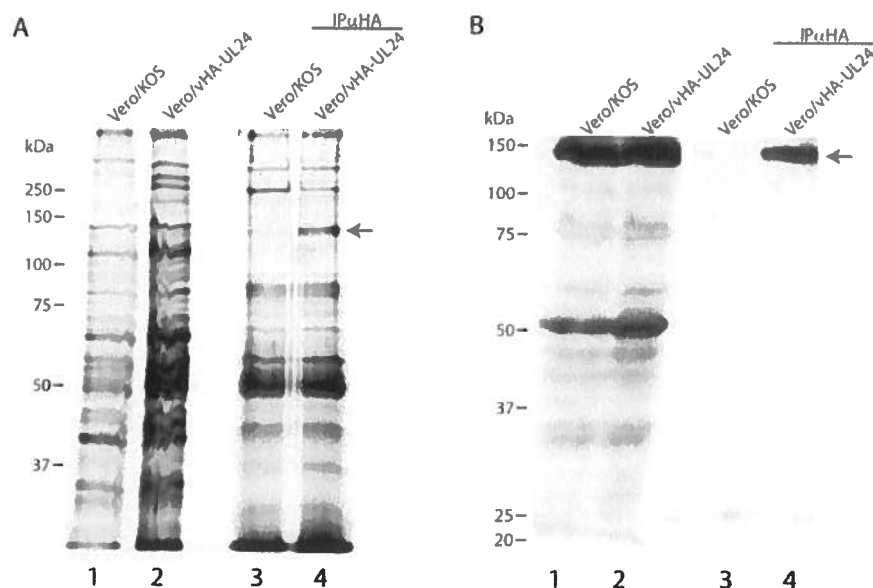


Figure 1. Co-immunoprécipitation de RR1 avec UL24. (A) Gel de protéines coloré à l'argent. Les puits 1 et 2 sont les lysats utilisés pour faire les immunoprécipitations. Les puits 3 et 4 sont les protéines isolées suite à l'immunoprécipitation. La flèche indique la bande analysée par spectrométrie de masse. (B) Immunobuvardage de type western des lysats (1,2) et des protéines immunoprécipitées (3,4). La flèche indique la position de RR1. Les bandes et les chiffres à gauche indiquent la position des marqueurs de poids moléculaires.

Plasmide GST-RR1

Pour aider dans notre caractérisation de l'interaction entre RR1 et UL24, nous avons construit un plasmide d'expression mammifère exprimant RR1 fusionnée avec une étiquette glutathion S-transférase (GST) en N-terminale. Nous avons amplifié le gène de la grande sous-unité de RR1 à partir de l'ADN viral du virus de type sauvage KOS et il a été inséré dans un vecteur TOPO. Le gène a été séquencé puis excisé avec les enzymes PacI et PmeI pour être inséré dans le vecteur pLB-GST, résultant en le vecteur pLB-GST-RR1 (Figure 2A). La séquence de l'étiquette GST et du gène de RR1 ont été vérifiées par séquençage. Nous avons confirmé l'expression de la protéine GST-RR1 par immunobuvardage de type western à partir de lysats de cellules COS-7 transfectées (figure 2B).

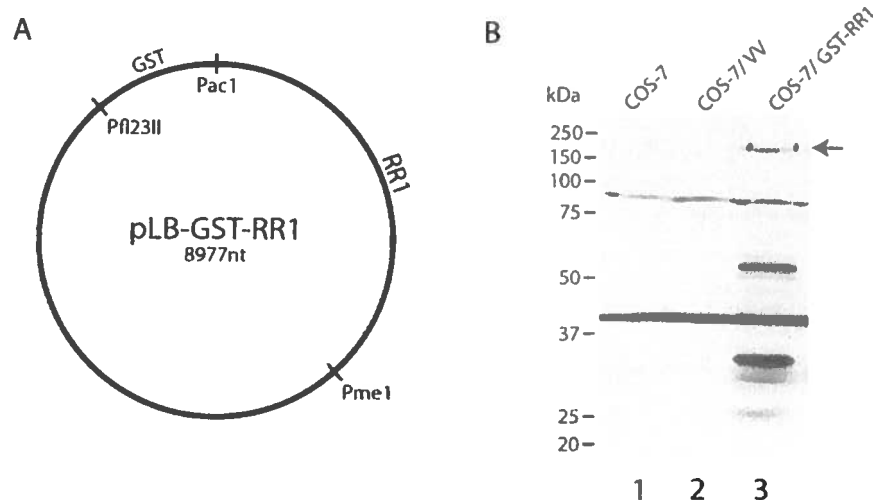


Figure 2. Plasmide et expression de GST-RR1. (A) Schéma du plasmide d'expression de la protéine RR1 fusionnée en N-terminale à une étiquette GST. (B) Immunobuvardage de type western démontrant l'expression de GST-RR1. Le puits 1 contient un lysat de cellules non-transfectées. Le puits 2 et 3 sont des lysats de cellules transfectées avec le vecteur pLB-Pfl et pLB-GST-RR1 respectivement. La flèche indique la position de GST-RR1. Les bandes inférieures indiquent une possible dégradation partielle de GST-RR1 (5)

Co-localisation partielle entre UL24 et RR1 en contexte de transfection transitoire et en infection

Pour confirmer si l'interaction entre UL24 et RR1 vue précédemment était possible dans la cellule, nous voulions nous assurer que les deux puissent se retrouver dans les mêmes compartiments cellulaires. En premier lieu, nous avons utilisé le plasmide d'expression pLB-GST-RR1 de concert avec le plasmide pLB-HA-UL24 pour voir la localisation des deux protéines hors du contexte d'infection. Nous avons pu voir une co-localisation forte entre les deux en périphérie du noyau, possiblement au Golgi, où UL24 se retrouve en partie en transfection transitoire (3) (Figure 3A). Nous avons également testé la localisation en utilisant les vecteurs exprimant les parties N- et C-terminales d'UL24. RR1 se retrouve toujours au niveau du cytoplasme avec ces deux versions d'UL24 (Figure 3B et C). La portion N-terminale d'UL24 est presque exclusivement nucléaire, et son absence du Golgi corrèle avec une perte du marquage concentré de RR1 en périphérie du noyau (Figure 3B). En contexte d'infection, nous avons observé également une localisation cytoplasmique pour RR1. La co-localisation avec UL24 est observée sous forme de points au niveau du cytoplasme (Figure 3D). Ces résultats nous indiquent que les protéines UL24 et RR1 se retrouvent du moins partiellement

aux mêmes endroits dans la cellule autant lors d'expression en transfection transitoire qu'en infection.

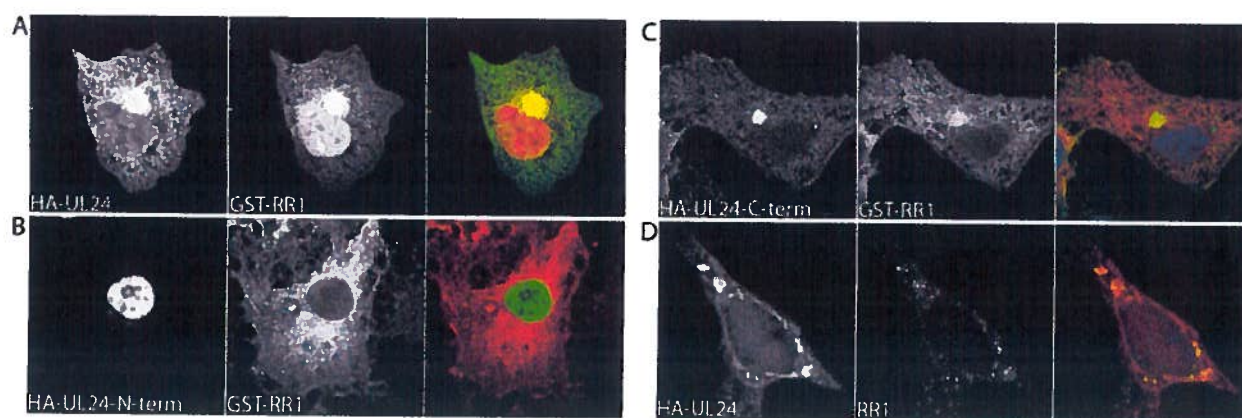


Figure 3. Co-localisation de UL24 et RR1. Essai de transfection transitoire pour tester la co-localisation des protéines GST-RR1 et HA-UL24 (A) ou sa portion C-terminale (C). Aucune co-localisation n'a été détectée pour la portion N-terminale d'UL24 (B). En infection, une co-localisation cytoplasmique n'a été observée pour HA-UL24 et RR1 (D). Le signal pour l'étiquette HA est démontré en vert et celui pour GST ou RR1 est en rouge. Le noyau est représenté en bleu par un marquage au Draq5.

Matériel et Méthodes

Infection, transfection et lyse de cellule

Pour les infections, les cellules Vero ont étéensemencées à 1.5×10^7 cellules par T175 et incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 24 heures. Elles ont été infectées à une MOI de 10 avec le virus KOS ou vHA-UL24 pendant 18 heures. La lyse s'est effectuée à 4°C avec tous les réactifs sur glace pour diminuer la dégradation. Les cellules ont été lysées avec 1 ml de tampon PA (120mM d'acétate de potassium, 20mM Tris pH 7.5, 5mM EDTA, 10% Glycérol, 0.1% Triton X-100 et un comprimé d'inhibiteur de protéase (Roche)) pendant 15 minutes. Pour les expériences de transfection, les cellules COS-7 ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm à une concentration de 2.5×10^6 cellules par pétris et incubées pendant 24 heures. Elles ont été transfectées utilisant la lipofectamine (Invitrogen) à un ratio 3:1 (Réactif:ADN) avec 4 µg de chaque plasmide selon les instructions du manufacturier. Le milieu de transfection a été changé 5 heures post-transfection et remplacé par du milieu 5% NCS/DMEM pour 48 heures. Les cellules ont été lysées dans 500 µl de tampon RIPA (500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% d'acide deoxycholique, 0.1% SDS, 50mM Tris pH 8.0 et une capsule d'inhibiteur de protéase) sur glace pendant 15 minutes. Les lysats ont été récoltés utilisant un grattoir et par la suite

centrifugés à 13 000 rpm dans une mini-centrifugeuse pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un eppendorf pré-refroidi et par la suite conservé si besoin à -80°C.

Immunoprécipitation

Pour un volume de 1 ml, un aliquot de 100 µl des lysats a été conservé pour les futures analyses et 900 µl a été incubé pour 1 heure avec 50 µl de billes couplées à la protéine G pour réduire les interactions non spécifiques lors des immunoprécipitations. Par la suite, les immunoprécipitations ont été réalisées utilisant 50 µl d'une matrice dirigée contre l'étiquette HA (Roche). Cette incubation s'est faite pour 3 heures à 4°C sur un inverseur et par la suite les tubes ont été centrifugés à 5000 rpm pour 5 minutes. Deux lavages de 15 minutes chaque avec 1 ml de tampon PA ont été réalisés sur l'inverseur. Par la suite, un dernier lavage a été réalisé et les protéines précipitées ont été resuspendues dans 120 µl de tampon de changement 6x contenant du beta-mercaptoéthanol.

Gels de polyacrylamide et immunobuvardage de type western

Les échantillons ont été analysés sur des gels de 10% polyacrylamide dénaturants contenant du SDS. La coloration à l'argent s'est effectuée à l'aide du kit ProteoSilver plus (Sigma). Pour les analyses par immunobuvardage de type western, le transfert s'est fait sur une membrane de PVDF (Millipore) et l'analyse s'est faite utilisant un anticorps contre la protéine RR1 (fourni par Langelier Y., Université de Montréal) à une dilution 1:1000 et un anticorps secondaire contre les anticorps de lapin (Bethyl) à une concentration 1:5000. La détection de GST-RR1 s'est faite en utilisant un anticorps contre l'étiquette GST (Invitrogen) avec une dilution 1:1000 et un anticorps dirigé contre les anticorps de souris (Sigma) à une concentration de 1:10000. La détection s'est effectuée utilisant le réactif de chimioluminescence ECL plus (GE-Amersham).

Immunofluorescence

Des lamelles de verre #1 ont été lavées à l'éthanol et par la suite déposées dans les puits d'une plaque de 24 puits. Par la suite, des cellules Vero ou COS-7 ont étéensemencées à 7.5×10^4 cellules par puits. Les cellules Vero ont été infectées à une MOI de 10 par les virus KOS ou vHA-UL24 pour 18 heures. Pour les expériences de transfection transitoire, les cellules COS-7 ont été transfectées avec 0.25 µg de plasmide par puits avec le réactif Fugene6 (Roche) à un ratio de 6:1 (Réactif:ADN) selon les instructions du manufacturier. Cinq heures post-

transfection, le milieu a été changé pour du 5% NCS/DMEM et les cellules incubées pour 48 heures additionnelles. Par la suite, les cellules ont été lavées au PBS, fixées avec une solution de 2% paraformaldehyde pour 10 minutes et lavées au PBS. L'immunofluorescence a été réalisée comme décrit précédemment (2, 3) avec les dilutions d'anticorps suivantes : GST (1/150), RR1 (1/75) et HA (1/150).

Conclusion

Nos expériences ont démontré une interaction entre les protéines virales UL24 et RR1. Nous avons démontré par immunoprécipitation la co-précipitation spécifique de la grande sous-unité de RR1 avec UL24 puisque celle-ci n'était pas présente dans les protéines précipitées dans des conditions identiques ayant comme seule différence l'absence de l'étiquette HA sur UL24. Nous avons également construit un plasmide d'expression mammifère pour exprimer RR1 hors du contexte infectieux avec une étiquette GST. Ceci nous a permis de décrire la localisation de RR1 en absence d'autres protéines virales ou en présence d'UL24. Nous avons observé une co-localisation en contexte de transfection transitoire au niveau cytoplasmique ainsi qu'en concentration en périphérie du noyau, possiblement au Golgi. De plus, nous avons pu observer une différence dans la localisation cytoplasmique de RR1 en absence de UL24 cytoplasmique. En contexte d'infection, nous avons observé également une co-localisation entre ces deux protéines au niveau cytoplasmique.

Il est difficile de statuer sur le rôle de cette interaction avec les résultats préliminaires présentés dans cette annexe. Il a été démontré que RR1 est impliquée au niveau de la stimulation de la traduction (19). Jusqu'à présent, aucun rôle à ce niveau n'a été démontré pour UL24, mais une influence sur la stimulation de la transcription a été observée pour un de ses homologues, UL76 du CMV (20). Un rôle anti-apoptotique a également été démontré pour RR1, mais nous ne possédons pas d'indication qu'UL24 joue un rôle à ce niveau. Par contre, ORF20 du murine herpesvirus-68, homologue d'UL24, a été démontré comme induisant l'apoptose (17). Une autre étude a également démontré un rôle similaire pour UL24 du HSV-1 et ses homologues des beta et gamma-herpèsvirus (16).

La localisation cytoplasmique de cette interaction, telle que vue par immunofluorescence, et l'expression tardive d'UL24 nous suggèrent que cette relation serait plutôt importante dans les étapes tardives du cycle viral, telles que la progression des capsides dans le cytoplasme ou l'assemblage final des virions.

Références

1. **Averett, D. R., C. Lubbers, G. B. Elion, and T. Spector.** 1983. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex type 1 virus. Characterization of a distinct enzyme. *J Biol Chem* **258**:9831-8.
2. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**:109-18.
3. **Bertrand, L., and A. Pearson.** 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J Gen Virol* **89**:1142-51.
4. **Chabaud, S., H. Lambert, A. M. Sasseville, H. Lavoie, C. Guilbault, B. Massie, J. Landry, and Y. Langelier.** 2003. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett* **545**:213-8.
5. **Dufour, F., L. Bertrand, A. Pearson, N. Grandvaux, and Y. Langelier.** 2011. The Ribonucleotide Reductase R1 Subunits of Herpes Simplex Virus 1 and 2 Protect Cells against Poly(I {middle dot} C)-Induced Apoptosis. *J Virol* **85**:8689-701.
6. **Dufour, F., A. M. Sasseville, S. Chabaud, B. Massie, R. M. Siegel, and Y. Langelier.** 2011. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNFalpha- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* **16**:256-71.
7. **Gober, M. D., S. Q. Wales, and L. Aurelian.** 2005. Herpes simplex virus type 2 encodes a heat shock protein homologue with apoptosis regulatory functions. *Front Biosci* **10**:2788-803.
8. **Goldstein, D. J., and S. K. Weller.** 1988. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J Virol* **62**:196-205.
9. **Jacobson, J. G., S. H. Chen, W. J. Cook, M. F. Kramer, and D. M. Coen.** 1998. Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**:161-9.
10. **Jacobson, J. G., S. L. Martin, and D. M. Coen.** 1989. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**:1839-43.
11. **Knizewski, L., L. Kinch, N. V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski.** 2006. Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**:2575-7.
12. **Langelier, Y., S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbault, A. M. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, and B. Massie.** 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* **83**:2779-89.
13. **Leiva-Torres, G. A., P. A. Rochette, and A. Pearson.** 2010. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* **91**:1109-16.
14. **Lymberopoulos, M. H., A. Bourget, N. B. Abdeljelil, and A. Pearson.** 2011. Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* **412**:341-8.
15. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
16. **Nascimento, R., J. D. Dias, and R. M. Parkhouse.** 2009. The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch Virol* **154**:1143-9.
17. **Nascimento, R., and R. M. Parkhouse.** 2007. Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* **88**:1446-53.

18. **Wagner, E. K., and B. Roizman.** 1969. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J Virol* **4**:36-46.
19. **Walsh, D., and I. Mohr.** 2006. Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes Dev* **20**:461-72.
20. **Wang, S. K., C. Y. Duh, and T. T. Chang.** 2000. Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**:2407-16.