

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**LE RÔLE D'UL24 DANS LA RÉGULATION GÉNÉRIQUE DE LA PROTÉINE
R1 DE LA RIBONUCLÉOTIDE RÉDUCTASE DU VIRUS DE
L'HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1**

par

CAROLINA SANABRIA SOLANO

Mémoire présenté
pour l'obtention du grade de *Maître es Sciences*, M. Sc.
Programme : Maîtrise en virologie et immunologie

Février, 2012.

©Droits réservés de CAROLINA SANABRIA SOLANO, 2012.

Ce mémoire intitulé

**LE RÔLE D'UL24 DANS LA RÉGULATION GÉNÉRIQUE DE LA PROTÉINE
R1 DE LA RIBONUCLÉOTIDE RÉDUCTASE DU VIRUS DE L'HERPÈS
SIMPLEX DE TYPE 1**

Est présenté par

CAROLINA SANABRIA SOLANO

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :

Peter Tijssen, PhD.

INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe :

Laurent Poliquin, PhD.

Département des sciences biologiques

Université de Québec à Montréal (UQAM)

Directrice de recherche :

Angela Pearson, PhD.

INRS-Institut Armand Frappier

Co-directeur de recherche :

Yves Langelier, PhD.

Centre de Recherche du Centre
Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) est un virus neurotrope qui affecte environ 80 % de la population mondiale. Il peut causer des feux sauvages, des kératites et parfois des encéphalites virales. Chez des patients immunosupprimés et les nouveau-nés, la maladie est souvent très sévère. Le gène codant pour la protéine virale UL24 est conservé parmi tous les *Herpesviridae*. Cette protéine possède des domaines d'homologie hautement conservés dans sa partie N-terminale. En culture cellulaire, un virus déficient en UL24 (UL24X) démontre une diminution des titres viraux dans les cellules Vero et HeLa, entre autres. *In vivo*, il y a une diminution drastique des titres viraux dans les ganglions trigéminaux (TG) ainsi qu'une réduction sévère de l'efficacité de réactivation virale à partir de la latence. UL24 est donc un déterminant de la pathogenèse virale. Des études sur l'orthologue d'UL24, UL76 du cytomégalovirus humain, ont montré une fonction de régulation génique de cette protéine mais les mécanismes impliqués sont méconnus. Des résultats préliminaires du laboratoire ont suggéré que dans un contexte de transfection, l'expression d'UL24 corrélait avec une réduction de l'expression de la grande sous-unité de la Ribonucléotide Réductase virale (R1). Cette protéine est impliquée dans la synthèse d'ADN viral en réduisant les ribonucléotides en deoxyribonucléotides (dNTP). Notre hypothèse était qu'UL24 régule les niveaux de la protéine R1 en intervenant à divers stades de l'expression génique. Nous avons démontré en contexte de co-transfection que l'expression de la protéine virale UL24 inhibe l'expression de la protéine R1. L'effet d'UL24 sur la protéine GST-R1 semble dépendre seulement de la partie R1 ; l'inhibition a été observée dans les cellules humaines (293T) et des cellules de singe (COS-7). Par ailleurs, à l'aide d'immunobuvardage de type Western nous avons montré que ce phénomène était dépendant de la dose de plasmide exprimant UL24. Des expériences de transfection utilisant des versions mutantes d'UL24 portant des substitutions des résidus hautement conservés (E99, K101 et G121), particulièrement dans le domaine putatif d'endonucléase PD-(D/E)-XK, ont montré un rétablissement de l'expression de R1. Ainsi, on a observé que ces résidus et possiblement le domaine d'endonucléase sont importants pour la diminution de l'expression de R1 en présence d'UL24. Par ailleurs ces résultats suggèrent que c'est la protéine et non le transcrit d'UL24 qui est responsable de cette fonction. Par qRT-PCR, nous avons observé en présence de la protéine virale UL24 une diminution de cinquante pourcent de la quantité de transcrits de R1 en contexte de co-transfection comparativement aux niveaux obtenus avec un vecteur vide. Quoique, ces résultats n'expliqueraient pas la très grande diminution des niveaux de R1 où la protéine n'est souvent plus détectée en présence

d'HA-UL24. Par ailleurs, nous avons démontré que la diminution de la quantité de R1 était indépendante de la dégradation protéique via le protéasome ainsi que via le lysosome. Ces résultats dévoilent un impact d'UL24 de HSV-1 au niveau de la régulation génique.

ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is neurotropic and affects almost 80% of the world population. It can cause skin lesions known as cold sores, viral keratitis and sometimes viral encephalitis. Among immunosuppressed patients and newborns, the disease is often more severe. The gene that codes for the viral protein UL24 is conserved among all herpesviridae. The N-terminal part of this protein has homology domains that are highly conserved. In cell culture, a virus deficient for UL24 (UL24X) exhibits a reduction in viral titers following viral replication on Vero and Hela cells. UL24 is thus considered to be a determinant of viral pathogenesis. *In vivo*, viral titers are drastically decreased in the trigeminal ganglia (TG); the efficiency of the reactivation from latency is highly reduced as well. Studies of the UL76 protein of human cytomegalovirus, an ortholog of UL24, showed that this protein is involved in the regulation of gene expression; however, the mechanisms involved are still unknown. In our laboratory, preliminary results suggested that in transient transfection experiment, the expression of UL24 correlated with a reduction of the expression of R1 and the large subunit of the ribonucleotide reductase enzyme (R1) by transfection. This protein promotes viral DNA synthesis by reducing ribonucleotides to deoxyribonucleotides (dNTP). Our hypothesis was that UL24 is important in the regulation of the protein R1 at different levels. In co-transfection and Western blotting experiments, we discovered that the expression of the protein UL24 inhibits expression of the protein R1. Furthermore, we showed that the inhibition was specific and independent of the GST tag of the R1 protein both in human and monkey cells (293T and COS-7 respectively). Moreover, the observed effect of UL24 was dose-dependent. An assay testing variants of UL24 that contain substitutions of highly conserved residues some involved in the UL24 PD-(D/E)-XK endonuclease domain (E99A, K101A), and some not (G121A), revealed diminished the inhibition of R1 expression. Therefore, these residues seem to be important for the reduction of the expression of R1 in the presence of UL24. Furthermore, these results suggest that it is the protein UL24 and not its transcripts that is important for the observed effect. We found, by qRT-PCR, that in the presence of UL24, the amount of R1 transcripts were reduced by 50% compared to the levels found in the absence of UL24. Interesting, this reduction alone cannot explain the drastic reduction in levels of R1 protein, often below the limits of detection observed in the presence of UL24. Finally, we found that the reduction observed does not involve the degradation of R1 protein by the proteasome or the lysosome degradation pathways. These results reveal a role for UL24 of HSV-1 in gene regulation.

REMERCIEMENT

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, qui en m'acceptant dans son laboratoire a rendu ce travail possible. Son encadrement m'a permis une rencontre avec le domaine de la virologie. L'expérience acquise au sein d'une équipe exceptionnelle m'a donné le goût de faire mon PhD. Elle m'a aussi donné 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.

Je voudrais aussi souligner l'apport de mon co-directeur, Yves Langelier, qui fut une importante référence scientifique pour mon travail au laboratoire ainsi que pour l'écriture de mon mémoire. Merci aussi à mes examinateurs Laurent Poliquin et Peter Tijssen.

J'aimerais remercier les membres du laboratoire, passé et présent particulièrement Luc Bertrand, pour son temps consacré à m'apprendre, à répondre à mes questions et surtout pour sa patience et sa capacité à me soutenir dans les périodes difficiles de ma maîtrise. J'aimerais remercier à Pierre-Alexandre Rochette et Annie Rochette pour leurs bons humours et leur aide précieuse ; Nawel Ben Abdeljelil merci d'être la meilleure voisine de bureau, grâce aux rires et aux bavardages, et bien sûr aux nombreux échanges scientifiques, ont rendu les journées moins pénibles. J'aimerais remercier aussi Carolina P. Gomez pour sa patience et surtout pour être une excellente amie. Un merci particulier pour Ginette Denis : grâce à elle le travail au labo est plus agréable. Merci aussi à d'autres étudiants de l'institut, sans ordre particulier : Maxime A., Romain G., Ronan R., Mathieu D. et Sihem D.

Plusieurs employés de l'institut m'ont aussi beaucoup aidé lors de mes études, spécialement 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 biosciences.

Me gustaría mucho agradecer a mi madrecita, Isabel E. Solano, mi ágüela Addy S. Fajardo y mi hermano Alfredo J. Sanabria, su apoyo incondicional me ha permitido llegar hasta este punto y me ha dado fuerzas para sobrellevar cada etapa del camino. Gracias a Angela Maria Paula Bayona por ser esa persona que recuerda que la vida es hermosa y aun más hermosa porque ella está en mi vida, ella me enseñó que caminante no hay camino, se hace camino al andar. Gracias a todos aquellos familiares y amigos que no puedo mencionar por falta de espacio.

Enfinement je tiens à remercier Julien Fays qui a partagé avec moi cette expérience. Merci d'avoir enduré mes moments difficiles et partager les meilleurs. Merci de me faire sourire même dans les moments les plus stressants (L'incroyable Dr J Virol). Aussi pour sa patience et sa compréhension. Merci de m'avoir encouragé à donner le petit effort supplémentaire et d'avoir rendu cette étape aussi agréable.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	v
Remerciement.....	vi
Table de matières	vii
Liste des figures.....	1
Liste des abréviations et des sigles	2
Chapitre 1 : Introduction	4
Virus Herpès.....	4
Famille des virus herpès humains.....	4
La pathogenèse du HSV-1.....	5
Structure du HSV-1.....	7
Cycle de réplication du HSV-1	7
La régulation de l'expression des gènes viraux.....	11
Régulation transcriptionnelle des gènes du HSV-1	11
Régulation de la transcription virale	12
Régulation post-transcriptionnelle.....	12
Polyadénylation	13
L'export nucléaire des ARNm et l'épissage de l'ARNm.....	13
Dégradation des ARNm cellulaires et viraux.....	14
MicroARN	15
Régulation traductionnelle et post-traductionnelle.....	16
Dégradation protéique	16
La protéine UL24	19
UL24 du HSV-1	19
Phénotype UL24-déficient en culture cellulaire et <i>in vivo</i>	20
Expression de la protéine UL24	21
Domaines conservés d'UL24	22

Orthologues d'UL24.....	23
UL24 du HSV-2	23
ORF35 du VZV	24
UL24 du virus de l'herpès bovin 1.....	25
ORF37 du virus de l'herpès équin 1	25
U49 du virus de l'herpès humain 6 et du virus de l'herpès humain 7.....	25
ORF20 du virus du sarcome de Kaposi	26
ORF20 du gamma herpès virus 68 murine	26
UL76 d'HCMV.....	27
La protéine R1 de HSV.....	28
Activité réductase	28
Phénotype du virus déficient en R1	29
Activité antiapoptotique.....	29
Chapitre 2 : Problématique.....	31
Hypothèse de travail	31
Chapitre 3 : Méthodologie	32
Culture cellulaire.....	32
Plasmides.....	32
Transfection et production de lysats cellulaires.....	32
Traitement avec les inhibiteurs du protéasome et du lysosome	33
Inhibiteurs du protéasome	33
Inhibiteur du lysosome.....	33
Lyse de cellules.....	33
Immunobuvardage de type Western	34
Anticorps	34
Extraction d'ARN	35
RT- qPCR.....	35

Synthèses d'ADNc.....	35
Amorces	35
PCR quantitative.....	36
Chapitre 4 : Résultats.....	37
Caractérisation de l'effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 en contexte de transfection transitoire.....	37
Effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 dans les cellules COS-7	38
Effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 dans les cellules 293T	39
Effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1	40
Effet d'HA-UL24 sur l'étiquette GST de R1	41
Effet des mutations dans HA-UL24 sur l'expression de GST-R1.....	42
Étude du mécanisme impliqué dans l'effet d'HA-UL24 sur l'accumulation de GST-R1	43
Effet d'UL24 sur l'accumulation des transcrits de R1	44
Étude de l'effet d'HA-UL24 sur la régulation génique de R1 virale	48
Effet de l'inhibition de la voie du protéasome sur la réduction dans les niveaux de GST-R1 en présence d'HA-UL24	49
Effet de l'inhibition de la voie du lysosome sur la réduction dans les niveaux de GST-R1 en présence d'HA-UL24	51
Chapitre 5 : Discussion	53
Effet d'HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1 du HSV-1.....	54
Caractérisation de l'effet d'HA-UL24 sur la protéine GST-R1.....	54
Effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1	55
Effet de substitutions en HA-UL24 sur la régulation génique de GST-R1 virale	55
Effet d'HA-UL24 sur la régulation génique de GST-R1 virale au niveau des transcrits.....	57
Effet d'HA-UL24 sur la régulation génique de GST-R1 virale au niveau de l'expression de protéines.....	58
Contribution du protéasome sur la régulation de GST-R1 par HA-UL24	58

Contribution du lysosome sur la dégradation GST-R1 par HA-UL24.....	59
Chapitre 6 : Conclusion.....	60
Références bibliographiques.....	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La réplication du HSV-1 dans les muqueuses et dans les neurones.....	6
Figure 2 : La structure du virion de HSV-1.....	7
Figure 3 : Le cycle lytique de réplication du HSV-1.....	11
Figure 4 : La voie de dégradation du protéasome.....	17
Figure 5: La voie de dégradation du lysosome.....	19
Figure 6 : Les transcrits d'UL24 du HSV-1.....	22
Figure 7: L'effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1.....	39
Figure 8: L'effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HAUL24 sur la protéine GST-R1.....	40
Figure 9: L'effet d'HA-UL24 sur l'étiquette GST	41
Figure 10: Représentation graphique des substitutions d'acides aminées en UL24 du HSV-1.....	42
Figure 11: L'effet de substitutions en HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1.....	43
Figure 12: Schéma indiquant la position des amorces conçus afin d'amplifier les ADNc.....	45
Figure 13 La spécificité des amorces pour les transcrits d'UL24, de R1 et de GAPDH.....	46
Figure 14: La quantification par PCR en temps réel des ADNc de R1 générés par transfection transitoires de cellules COS-7.....	47
Figure 15: La quantification par PCR en temps réel des ADNc d'UL24 générés par transfection transitoires de cellules COS-7.....	48
Figure 16: L'effet de l'inhibition du protéasome sur l'accumulation de GST-R1 en présence d'UL24.....	50
Figure 17: L'effet de l'inhibiteur de l'acidification du lysosome sur l'accumulation de GST-R1 en présence d'UL24.....	52

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ARNpol	Polymérase d'ARN
CMV	Cytomégalovirus
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dNTP	Déoxyribonucléotides
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EHV	Virus herpès équin 1
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-transférase
GTF	General Transcription Factor
HA	Hémagglutinine
HD	Domaine d'homologie
HDAC	Histone Déacetylase
HHV6	Herpès virus humain 6
HHV7	Herpès virus humain 7
HHV8	Herpès virus humain 8
HVEM	Médiateur de l'entrée des virus herpès
<i>Inr</i>	Element «Initiator»
IP ou α	Immédiat précoce
IRES	Internal Ribosome Entry Site
KSHV	Herpès virus associé au sarcome de Kaposi
Kbp	Kilopaires de bases
LAT	Transcrits associés à la latence
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
MIE	Protéines immédiats-précoces
MIEP	Région régulatrice de MIE
MOI	Multiplicity of infection
NADP+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCS	Newborn Calf Serum
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NM2A	Myosine de type IIa
NTPs	Ribonucléotide 5' triphosphate
ORF	Open Reading Frame
P ou β	Précoce
PGPH	Hydrolase de peptides peptidyl-glutamyl
PKR	RNA-Dependent Protein Kinase
PML	Promyelocytic Leukemia
PVDF	Membrane de polyvinylidene fluoride
R1	Sous-unité 1 de la ribonucléotide réductase

RIP1	Protéine d'interaction du récepteur 1
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Ribonucléotide réductase
SR	Facteur d'épissage
SV40	Virus de singe 40
T ou γ	Tardif
TAF	Facteur associé à TBP
TBP	Protéine de liaison à la boîte TATA
TF	Transcription Factor
TG	Ganglions trigéminaux
TK	Thymidine kinase
TNFs	Tumoral Necrosis Factor
U _L	Long segment unique du génome
UL24X	Virus déficient en UL24
U _S	Court segment unique du génome
USP7	Protéase spécifique d'ubiquitine
HSV-1	Virus de l'herpès simplex de type 1
HSV-2	Virus de l'herpès simplex de type 2
VZV	Virus de la varicelle et du zona

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Virus Herpès

1.1 Famille des virus herpès humains

Les virus herpès humains font partie de l'ordre des *Herpesvirales* et de la famille des *Herpesviridae*. Les virus herpès sont largement distribués dans la nature, infectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles (Davison et al., 2008). Ce sont des virus à ADN double brin dont le génome est contenu dans une capsidie icosaédrique. Cette dernière est entourée d'un tégument protéique, qui est à son tour entouré d'une enveloppe bilipidique parsemée de glycoprotéines à sa surface (Roizmann et al., 1992).

La famille des *Herpesviridae* se divisent en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. Les huit virus herpès qui infectent l'humain sont : le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et 2 (HSV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV) dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, le cytomégalovirus (CMV), les herpès virus humain 6 et 7 (HHV6 et HHV7) appartenant au *Betaherpesvirinae*, et le virus d'Epstein-Barr (EBV) et l'herpès virus humain 8 (HHV8) ou virus associé au Sarcome de Kaposi (KSHV) dans la sous famille des *Gammaherpesvirinae* (Davison et al., 2008).

Les membres des *Alphaherpesvirinae* ont un cycle de réplication court, une propagation rapide en culture cellulaire, une capacité de lyse de la cellule hôte, et la capacité d'établir la latence dans les neurones des ganglions sensoriels. Les virus appartenant au *Betaherpesvirinae* ont un spectre d'hôtes plus restreint que les virus appartenant à la sous-famille alpha (les virus capables d'infecter des cellules humaines ne peuvent pas infecter des cellules d'autres espèces) ; et ils possèdent un cycle de réplication plus long. Ils peuvent rentrer en latence principalement dans les leucocytes et les cellules endothéliales (Jarvis and Nelson, 2002). Les virus appartenant à la famille des *Gammaherpesvirinae* infectent préférentiellement les lymphocytes B ou T mais ils peuvent aussi infecter des cellules endothéliales. Leur cycle de réplication est long; la latence est établie principalement dans les cellules B et ils peuvent être oncogéniques (Wen and Damania, 2010).

1.2 La pathogenèse du HSV-1

Le HSV-1 est très répandu dans la population mondiale. Sa prévalence varie dépendamment de l'âge, de la race, de la localisation géographique et de la position socio-économique (Whitley and Roizman, 2001 ; revue par Fatahzadeh and Schwartz, 2007). L'incidence de ce virus n'est pas saisonnière (Whitley and Roizman, 2001). La transmission se fait principalement par exposition des muqueuses aux sécrétions d'une personne infectée (Kleymann, 2003).

Après la première exposition, le virus se réplique activement dans les cellules épithéliales au site d'infection initial, suivi par l'infection des axones des neurones sensitifs qui innervent le tissu. Ensuite, via ces axones, il migre jusqu'aux corps cellulaires situés dans les ganglions trigéminaux (infections oropharyngées) ou les ganglions de la racine dorsale (infection génitales) (revue par Steiner et al., 2007 ; revue par Corey et al., 1983). Là, le virus entre dans un état de latence. Suite à certains stress, le virus peut se réactiver de manière récurrente et migrer jusqu'au site d'infection initial où il infecte des cellules épithéliales et se réplique à nouveau (figure 1).

La sévérité de l'infection varie avec des symptômes qui s'étendent d'un malaise minimal, à des lésions visibles sur différents sites incluant les lèvres, les joues, le nez et le septum nasal jusqu'à des encéphalites qui peuvent être mortelles (Fatahzadeh and Schwartz, 2007). L'infection au niveau des yeux peut causer des ulcérations oculaires et mener à des kératoconjunctivites et même à la cécité. Par ailleurs, il existe des risques de complications chez les nouveaux nés et les personnes immunosupprimées. Chez les nouveaux nés, les complications peuvent inclure l'encéphalite néonatale et la dissémination de la maladie au poumon, au foie et aux autres organes vitaux (Whitley and Roizman, 2001). La prévalence du virus chez l'hôte augmente avec l'âge, une étude aux États-Unis en 2006 montre qu'environ 25% des enfants de 6 à 7 ans, 36% des enfants entre 12 et 13 ans et 90% des personnes âgées de plus de 70 ans sont infectées par le HSV-1 (Chayavichitsilp et al., 2009).

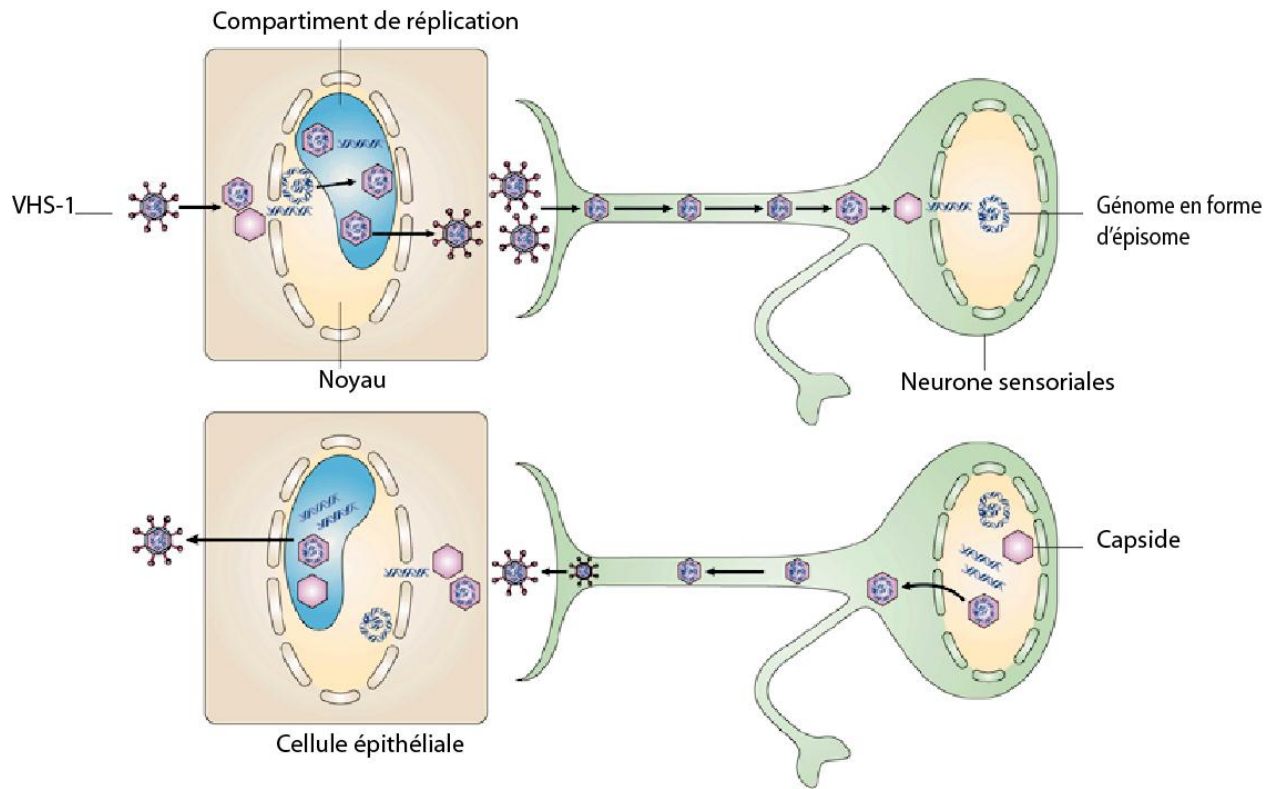


Figure 1. La réplication du HSV-1 dans les muqueuses et dans les neurones. Lors de l'infection initiale, le virus infecte une muqueuse où il se réplique. Par la suite, le virus infecte les neurones innervant cette région. Les flèches foncées représentent la direction de migration des capsides entre les corps neuronaux et les terminaisons des axones jusqu'aux noyaux des neurones sensoriels. Le génome viral persiste sous forme d'épisome pendant la latence (panneau du haut). Suite à certains stress, il y a enclenchement du cycle de réplication (panneau du bas) caractérisé par l'expression des gènes viraux et la formation de nouvelles capsides. Les virions sont transportés le long de l'axone jusqu'au site d'infection initial où ils infectent des cellules épithéliales et se répliquent à nouveau, résultant en des infections récurrentes. Modifié de Knipe and Cliffe, 2008.

Il n'existe pas de vaccin commercial contre le HSV-1. Le traitement principal pour contrôler l'étendue de l'infection est l'acyclovir, un agent antiviral qui permet d'inhiber la réplication virale par inhibition de l'ADN polymérase dans les cellules infectées. Néanmoins, chez les personnes immunosupprimées, il peut y avoir émergence de souches virales résistantes à cette drogue (Kleymann, 2003 ; Davis and McLaren, 1983; revue par Arvin, 2007).

1.3 Structure du virion de HSV-1

La capside du HSV-1 est entourée par les protéines du tégument et cette structure est à son tour enveloppée par une membrane bilipidique appelée enveloppe. L'enveloppe contient au moins onze différentes glycoprotéines virales qui forment des structures en pics de longueurs variables, importantes entre autres pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Grunewald, 2003) (figure 2).

Le génome de HSV-1 est composé de 152 kilopaires de bases (kbp), avec un pourcentage en résidus G et C de 68 % (Whitley and Roizman, 2001). Il contient 89 cadres de lecture ouverts ou ORFs. À date 84 des ORFs ont été prouvés expérimentalement de leur capacité à coder pour des polypeptides (Arvin, 2007). Le génome possède une architecture particulière qui inclut deux segments uniques accompagnés par des segments inversés répétés de longueur variable. Les segments uniques sont appelés longs (U_L) et courts (U_S) (Baines and Pellet, 2007).

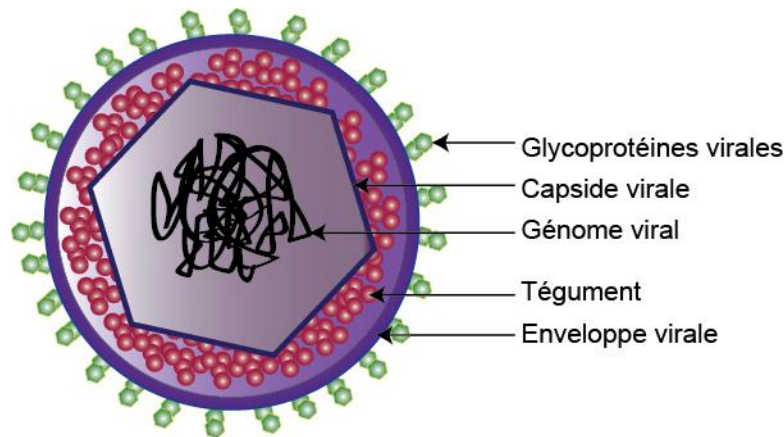


Figure 2 : Structure du virion de HSV-1. Schéma représentant une particule du HSV-1. Les différentes parties formant le virion sont identifiées dans la figure par des flèches.

1.4 Cycle de réplication du HSV-1

Le HSV-1 peut infecter différents types de cellules incluant les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones et les lymphocytes B. Les glycoprotéines multifonctionnelles de l'enveloppe virale sont responsables de l'entrée du virus dans la cellule. Elles interagissent avec

des récepteurs cellulaires et d'autres glycoprotéines, et peuvent subir des changements conformationnels pour induire la fusion avec la membrane cellulaire. Deux mécanismes principaux sont impliqués dans l'entrée du virus dans la cellule, soit par fusion avec la membrane plasmique ou par endocytose pH dépendante ou indépendante (Clement et al., 2006 ; Connolly et al., 2011). Les récepteurs de la cellule utilisés par le virus ont une affinité soit élevée ou soit faible. Les glycoprotéines gB et gC, par leur interaction avec l'héparine sulfate, permettent l'attachement du virus à la surface de la cellule (Shieh et al., 1992 ; Pertel et al., 2001). Ensuite la protéine gD interagit avec ses récepteurs cellulaires. Il y a trois classes de récepteurs pour gD: 1) le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM), un membre de la famille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (Montgomery et al., 1996) ; 2) la nectine 1 et 2, des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines ; et 3) l'héparan 3-O-sulfate (Shukla et al., 1999 ; Laquerre et al., 1998). L'interaction entre gD et ses récepteurs permet une interaction forte avec la membrane plasmique qui active la machinerie de fusion. gD interagit avec HVEM, l'héparine 3-O et la nectine 1 et 2 grâce à son domaine N-terminal. Le domaine de « pro-fusion » inclus dans la partie N-terminale de gD est responsable de recruter et activer d'autres glycoprotéines afin de déclencher la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (Cocchi et al., 2004). En présence de gD, la glycoprotéine gB peut induire la fusion grâce à son interaction avec la chaîne lourde de la myosine de type IIa (NM2a) ou la glycoprotéine associée à la myéline (Arii et al., 2010; Suenaga et al., 2010). Le complexe gH/gL est requis pour l'attachement du virus aux intégrines, en présence de gB, mais il n'est pas essentiel pour la fusion avec la membrane plasmique de la cellule (Chowdary et al., 2010).

L'entrée du virus par endocytose ou par fusion avec la membrane plasmique est dépendant du type cellulaire, comme observé chez EBV (Milne et al., 2005). Chez les cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert africain) le virus fusionne avec la membrane plasmique de la cellule. Chez des cellules CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois) et les cellules HeLa (cellules dérivé de cancer cervical humain) le virus est internalisé par endocytose. L'acidification de l'endosome est nécessaire pour permettre la libération de la capsid au cytoplasme de la cellule. Néanmoins, dans les cellules C10 (cellules de mélanome murin) l'internalisation du virus se fait par endocytose pH indépendant (Milne et al., 2005).

Suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, la capsid du virus et les protéines du tégument sont libérées dans le cytosol. Là, les microtubules emmènent la

capside jusqu'au noyau (Enquist et al., 1998 ; revue par Döhner and Sodeik, 2005). La capsid libère le génome du virus dans le noyau. Le génome se circularise et les gènes viraux sont exprimés de façon séquentielle, avec trois phases principales : 1) la phase immédiate précoce ou alpha (IP ; α), 2) la phase précoce ou beta (P ; β) et 3) la phase tardive ou gamma (T ; γ). La transcription du génome est faite par l'ARN polymérase II de la cellule. Les ARNm viraux produits dans chaque phase sont exportés du noyau au cytoplasme pour être traduits par la machinerie de traduction cellulaire (Hones and Roizman, 1975).

Dans le noyau, la réplication commence au niveau de l'origine de réplication et le génome forme une structure de type θ . Peu après le début de la synthèse, la structure change en une forme de type « tapis roulant » où des monomères du génome sont coupés et encapsidés (Hay and Ruyechan, 2007). Une copie du génome viral nouvellement synthétisée est injectée dans une capsid préformée. La précapsid est formée de plusieurs protéines : VP5, VP19C, VP23, VP26 majoritairement et UL6, UL15, UL17, UL25, UL28 et UL33 minoritairement (Baines, J. and Weller S., 2005). Quand l'ADN viral entre dans la précapsid, cette dernière subit des changements conformationnels qui lui donnent sa structure finale icosaédrique (Cockrell et al., 2008).

Le virion en formation dégrade la lamina nucléaire puis est enveloppé par la membrane nucléaire interne (enveloppement primaire), ce qui amène à son bourgeonnement entre les membranes nucléaires. L'enveloppe virale primaire va ensuite fusionner avec la membrane externe du noyau et libérer la particule virale non enveloppée dans le cytoplasme. Là, la particule est recouverte par une couche de 16 à 35 protéines qui forment le tégument (revue par Mettenleiter, 2002 ; Loret et al., 2008). Ensuite, elle subit un deuxième processus d'enveloppement dans les membranes cytoplasmiques au niveau de l'appareil de Golgi ou les endosomes. Dans ces vésicules, le virion acquiert sa maturité infectieuse. Les vésicules cellulaires qui contiennent les virions sont transportées à la surface de la cellule où elles fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer les virions (Johnson and Baines, 2011) (figure 3).

L'infection primaire par le HSV-1 résulte dans une infection lytique au site d'infection. Par la suite, le virus entre dans les neurones sensitifs et est transporté de manière rétrograde jusqu'aux corps neuronaux situés dans les ganglions sensoriels. Le virus peut se répliquer dans certains neurones, mais après quelques jours une infection latente s'établit où on ne détecte plus de virus infectieux. Cette phase de latence est caractérisée par la présence d'épisomes

viraux, ainsi qu'une répression de l'expression des gènes viraux lytiques (Steiner et al., 2007). Le génome viral persiste sous forme d'hétéro-chromatine dans les neurones pendant la vie de l'hôte et périodiquement, sous certaines conditions de stress, le virus peut se réactiver (Preston, and Efstathiou, 2007). Seule la région du génome qui code pour les transcrits associés à la latence (LAT) reste active. Elle est contenue dans les régions répétées flanquant le segment U_L. Pendant cette phase, les promoteurs des LAT sont enrichis en histones H3 acétylées à la différence des promoteurs lytiques pour lesquels l'association avec les histones H3 est plus faible (Kubat et al., 2004).

Il y a trois transcrits principaux associés à la latence. Le premier, appelé LAT mineur ou LAT_m, est transcrit de manière antisens du gène qui code pour ICP0 et s'étend jusqu'au site de polyadénylation de la région courte répétée. Le deuxième transcrit, appelé majeur, est dérivé du LAT_m par épissage alternatif. C'est un segment très abondant et stable, non polyadénylé, de 2,0 kb. Finalement, il existe un troisième transcrit stable de 1,5 kb, dérivé du transcrit LAT majeur par épissage alternatif (Zabolotny et al., 1997). Ces transcrits s'accumulent dans les ganglions mais leur traduction n'a pas encore été démontrée même s'ils s'associent à des polyribosomes (Steiner et al., 2007). L'expression des transcrits LAT corrèle avec le remodelage de l'ADN et les microARN synthétisés (Voir section 2.3 de l'introduction), ils permettent la surveillance et la dégradation des transcrits viraux exprimés à des niveaux basaux. Ainsi les transcrits LAT et les microARN surveillent la synthèse spontanée de transcrits viraux afin d'empêcher la réactivation et la destruction des neurones.

Le virus peut être maintenu dans un état de latence par la rétention de VP16 et HCF1 au cytoplasme, ce qui évite leur transport au noyau où ces protéines agiraient pour promouvoir l'expression des gènes α , particulièrement ICP0. L'absence d'ICP0 prévient l'expression des gènes β et γ . Cette inhibition de l'expression des gènes permet au virus de maintenir son état de latence sans entrer dans un cycle de réplication lytique (revue par Roizman et al., 2011).

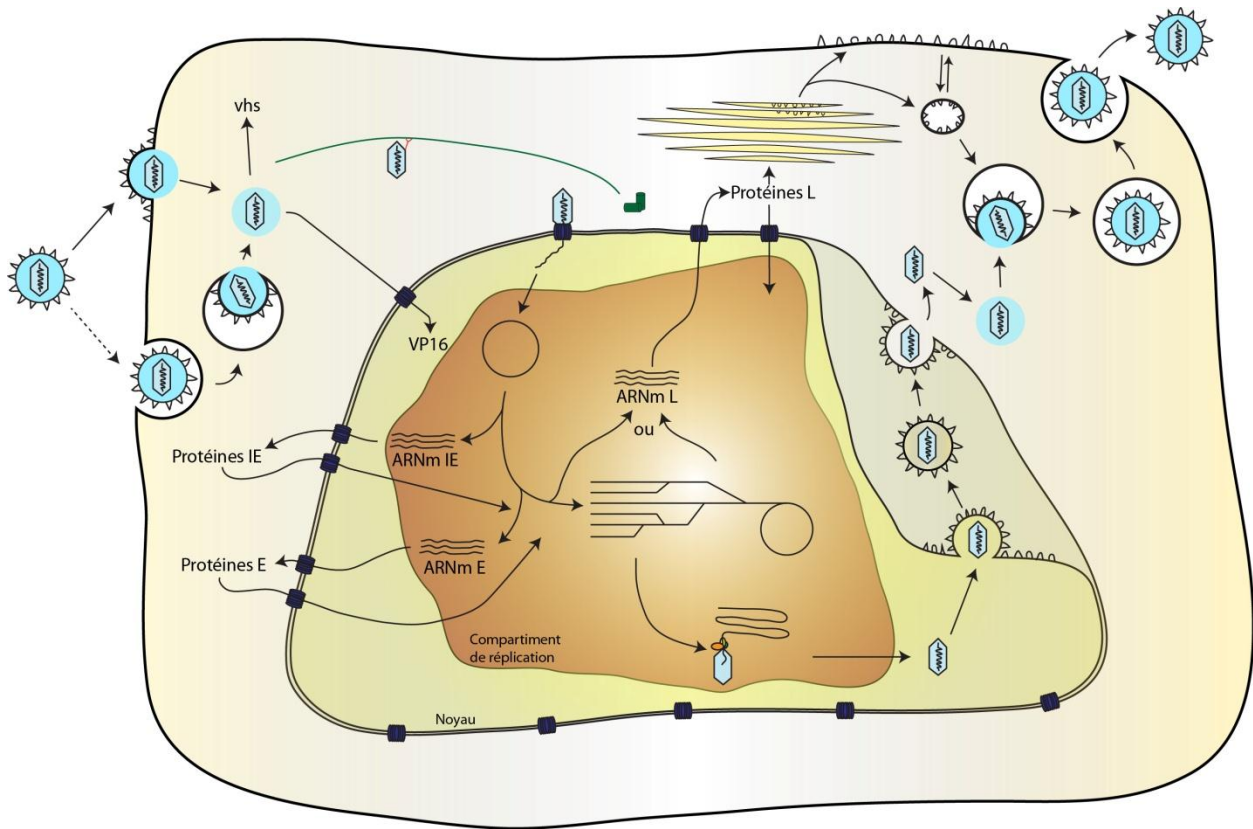


Figure 3. Cycle lytique de réplication du HSV-1. Le virus entre dans la cellule soit par fusion avec la membrane plasmique ou par endocytose. La capside est libérée dans le cytoplasme ou elle va se diriger vers le noyau grâce aux microtubules (en vert). Le génome viral va être relâché au noyau et va se circulariser. Par la suite, l'expression des gènes et leur traduction se fait de manière séquentielle : l'expression des gènes immédiats précoces (IE) est suivie de l'expression des gènes précoces (E) et des gènes tardifs (L). La réplication commence au niveau de l'origine de réplication et le génome forme une structure de type thêta. Peu après le début de la synthèse, la réplication change en une forme de type « tapis roulant » où des monomères du génome sont coupés et emballés. Les ADN viraux nouvellement synthétisés sont injectés dans des capsides préformées. Suite à plusieurs étapes d'enveloppement et désenveloppement les capsides se rendent au cytoplasme. Ensuite, elles subissent un deuxième processus d'enveloppement dans les membranes cytoplasmiques de l'appareil de Golgi ou des endosomes. Dans ces vésicules, le virion acquiert sa maturité infectieuse puis bourgeonne de la cellule. Image créée par Luc Bertrand, thèse de doctorat.

2. La régulation de l'expression des gènes viraux

2.1 Régulation transcriptionnelle des gènes du HSV-1

Pendant l'infection lytique du HSV-1, l'expression des gènes viraux se fait sous forme séquentielle en utilisant la machinerie de transcription de la cellule hôte. La transcription de ou

des gènes viraux ainsi que l'entrée en latence du virus sont des étapes de la réplication strictement régulées. Cette régulation peut être effectuée à différents niveaux, incluant le recrutement de l'ARN polymérase aux gènes d'intérêt, l'initiation de la transcription, l'élongation des transcrits, l'épissage, la polyadénylation, l'export du noyau, la stabilité des ARNm dans le cytoplasme et la traduction en protéines (Thomas and Chiang, 2006).

2.2.1 Régulation de la transcription virale

Les transcriptions cellulaire et virale ont plusieurs similitudes, le virus exploitant la machinerie de transcription cellulaire pour son propre bénéfice. Les gènes viraux possèdent des régions promotrices aux alentours du site d'initiation de la transcription, permettant le recrutement de la machinerie de transcription ainsi que son orientation sur l'ADN. Les deux séquences promotrices les plus connues pour le HSV-1 sont la boîte TATA et l'élément *Inr* (McGeoch, 1987). Un des points majeurs de la régulation virale est le recrutement et la stabilisation de l'ARN polymérase aux promoteurs grâce à la formation du complexe de préinitiation ou PIC (de l'acronyme Preinitiation Complex en anglais).

L'expression des gènes viraux est contrôlée par des interactions dynamiques entre les facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la transcription et la traduction. Les ORF viraux sont exprimés grâce à des promoteurs similaires à ceux de la cellule (Wagner et al., 1995). Une des différences permettant de séparer chaque classe cinétique est la variation dans la structure générale des promoteurs viraux. Ces modifications structurales font de ces segments de gènes des sites de contrôle importants (Alwine, 1974). Au niveau de la transcription, des points centraux de régulation incluent : les modifications dans la chromatine, le recrutement de la machinerie de transcription, ainsi que sa stabilisation, la pause de l'élongation et la terminaison de la transcription.

2.2.2 Régulation post-transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle est un mécanisme important utilisé par le virus afin de contrôler l'expression de ses gènes. Cependant, d'autres niveaux de régulation interviennent aussi. Lors de la synthèse des transcrits cellulaires, les pré-ARNm vont acquérir une structure en forme de coiffe ou « CAP » dans la partie 5'. La partie 3' va être clivée et l'on verra l'ajout d'une queue polyA. En plus, les ARNm cellulaires doivent souvent subir un processus d'épissage afin d'éliminer les séquences d'introns (Cooper, Geoffrey and Hausman, 2009). Tout

comme la cellule, le virus régule ces processus ; on parle alors de régulation post-transcriptionnelle des ARNm produits. La section suivante présente un aperçu général des processus de régulation post-transcriptionnelle affectés par le virus.

2.2.2.1 Polyadénylation

HSV-1 forme des transcrits qui ont une coiffe et qui sont polyadénylés grâce à l'activité de la machinerie cellulaire. Certains sites de polyadénylation des transcrits tardifs sont mal reconnus par la machinerie cellulaire et sont donc définis comme étant des sites faibles de polyadénylation (Arvin et al., 2007). La protéine ICP27 facilite le recrutement du facteur stimulant de clivage Cst64, qui est important pour la reconnaissance de sites poly(A), à certains sites de polyadénylation faibles (McGregor et al., 1996). Mais le rôle d'ICP27 dans la reconnaissance de ces sites est encore peu connu. ICP27 n'est cependant pas important pour l'utilisation de tous sites faibles, de clivage et polyadénylation (Pearson et al, 2004).

2.2.2.2 Épissage et export nucléaire des ARNm

La protéine ICP27 agit au niveau de l'épissage, une autre étape de la maturation des ARNm. Les transcrits cellulaires sont reconnus pour subir des multiples événements d'épissage. Dans les cellules, ce phénomène est fortement lié à l'export des ARNm du noyau, puisque le complexe de liaison d'exons reste lié aux transcrits qui viennent de subir l'épissage pour les transporter jusqu'aux récepteurs d'export nucléaire (Reed, 2003). Lors de l'infection, les transcrits viraux, qui majoritairement ne possèdent pas d'introns, rivalisent avec les transcrits cellulaires pour l'exportation au cytoplasme (Cullen, 2000 ; Bryant et al., 2001). ICP27 inhibe la machinerie d'épissage cellulaire ce qui a pour effet de promouvoir l'exportation nucléaire des transcrits viraux (Sciabica et al., 2003). ICP27 recrute la protéine kinase SRPK1 au noyau des cellules infectées où elle phosphoryle des facteurs d'épissage (SR), ce qui empêche la formation du complexe d'épissage. De cette manière, l'épissage des ARNm cellulaires est arrêté ce qui favorise l'exportation des transcrits viraux hors du noyau (Sciabica et al., 2003 ; Bryant et al., 2001).

L'export des ARNm fait intervenir trois classes de facteurs: les protéines adaptatrices qui s'attachent directement à l'ARN, les protéines réceptrices qui reconnaissent et forment des liaisons avec les protéines adaptatrices et les nucléoporines qui sont des composantes du complexe de pore nucléaire responsable de l'export à travers la membrane nucléaire (Zenklusen and Stutz, 2001). La protéine ICP27 promeut l'export nucléaire et l'accumulation cytoplasmique de plusieurs transcrits viraux (Chen et al., 2002; Pearson et al., 2004). Elle est capable de recruter et d'exporter des protéines adaptatrices aux sites de transcription virale, tel Aly/REF qui fait partie du complexe de liaison aux exons (Chen et al., 2002). La protéine ICP27 forme des liaisons avec les ARNm grâce à son motif RGG dans la partie N-terminale de la protéine. Le complexe ICP27/Aly/REF/ARNm forme un autre complexe avec des récepteurs nucléaires et les transcrits du HSV-1 sont exportés au cytoplasme au travers des pores nucléaires (Chen et al., 2005). La fonction d'ICP27 dans l'export des ARNm est plus tardive que sa fonction dans l'épissage.

2.2.2.3 Dégradation des ARNm cellulaires et viraux

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes viraux et cellulaires ne se limite pas exclusivement aux transcrits nouvellement synthétisés. Le gène *UL41* code pour la protéine vhs d'HSV qui fait partie des protéines du tégument (Strom and Frenkel, 1987). Durant l'infection, cette protéine prépare la cellule pour faire un changement de l'expression de gènes cellulaires vers l'expression de gènes viraux. La fonction de vhs est de détruire les ARNm cellulaires et viraux soit par la désagrégation de la structure des polyribosomes qui inhibe leur traduction (Read and Frenkel, 1983) ainsi que la dégradation directe ou en complexe avec le facteur d'initiation eIF4H des transcrits (revue par Strom and Frenkel, 1987 ; Cotter et al., 2011; Everly et al., 2002). Cette protéine est fonctionnelle même en absence d'autres protéines virales (Jones et al., 1995). Vhs qui reconnaît d'abord la partie 5' des transcrits s'associe ensuite à la séquence polyadénylée de la partie 3' (Karr and Read, 1999). Son activité optimale requiert de l'ATP et le clivage des ARNm se fait entre 30 et 40 nucléotides en aval de la structure 5' CAP (Lu et al., 2001). Vhs cible et dégrade aussi les ARNm qui contiennent des IRES (de l'acronyme anglais Internal Ribosome Entry Site) (Elgadi et al., 1999). Par ailleurs, durant les étapes intermédiaires et tardives de l'infection, la protéine VP16 interagit avec la protéine vhs pour réguler à la baisse son activité et permettre ainsi la traduction des ARNm viraux (Lam et al., 1996).

Malgré sa fonction dans la dégradation des ARNm, cette protéine n'est pas essentielle pour le virus. Néanmoins, les virus mutants pour le gène qui code pour vhs possèdent un patron d'expression des gènes viraux altéré et ils sont déficients pour l'établissement et la réactivation de la latence (Read et al., 1993; Geiss et al., 2000).

2.3 microARN

Un autre mécanisme de régulation post-transcriptionnelle est l'action des microARNs sur les transcrits. Les microARNs (miARNs) sont des molécules d'ARN non codantes d'une taille de 21 à 25 nucléotides qui possèdent des fonctions importantes de régulation génique dans le développement des organismes entre autres (Bartel, 2004). Les microARNs sont dérivés d'un ARN plus long (pri-miRNA). Dans le noyau, cet ARN va être traité pour former le précurseur pri-miRNA d'une longueur moyenne de 60 à 80 nucléotides. Le pré-miARN possède une structure en tige-boucle qui va permettre son exportation au cytoplasme où il va être reconnu par l'enzyme RNase III (DICER) qui va cliver le transcrit pour former des petits fragments d'ARN double brin ou siARN (Ambros, 2004). Le brin énergétiquement favorable du siARN va être ensuite reconnu par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Ce complexe régule l'expression génique en se liant aux ARNm. Cette liaison va mener soit à leur dégradation, si la complémentarité entre le siARN et l'ARNm est parfaite, ou soit à l'inhibition temporaire de leur traduction s'il y a des mésappariements entre le microARN et de l'ARNm (Bartel, 2004 ; revue par Ambros, 2004).

Les virus herpès utilisent les microARN comme mécanisme de régulation de la transcription des gènes viraux et cellulaires (Pfeffer et al., 2005 ; Samols et al., 2005). HSV-1 possède des séquences qui codent pour des microARN principalement dans la région LAT du génome (Cui et al., 2006 ; Jurak et al., 2010). Parmi les microARN présents, le microARN miR-H2, qui possède une séquence antisens au transcrit pour ICP0, est capable d'inhiber l'expression de cette protéine. Le microARN miR-H6 montre une similarité de séquence avec le transcrit de la protéine ICP4 et régule à la baisse l'expression de celle-ci (Umbach et al., 2008). Comme décrit auparavant, les microARN produits pendant la latence régulent à la baisse l'expression de protéines importantes pour la réplication lytique du virus. Néanmoins, des expériences avec des virus qui possèdent des délétions dans le promoteur des gènes LAT montrent une diminution de l'expression des microARN mais ces virus sont toujours capables d'établir et maintenir la latence. Les microARN, tout comme les LAT, semblent avoir comme fonction de surveiller et dégrader les transcrits viraux produits spontanément mais ils ne sont pas responsables de l'établissement de la latence (Kramer et al., 2011).

2.4 Régulation traductionnelle et post-traductionnelle

Les cellules et les virus régulent la quantité de protéines produites au niveau de la traduction et au niveau post-traductionnel. Pendant l'infection, le virus doit surmonter plusieurs obstacles afin de se répliquer ; entre autres, il doit éviter la réponse antivirale innée de la cellule

à l'infection. Plusieurs stratégies de régulation post-traductionnelle interviennent à ce niveau. Il existe quatre catégories de fonctions « anti-hôte » : le blocage de la synthèse de nouvelles protéines cellulaires (décrit auparavant section 2.2.2), le blocage des fonctions des protéines préexistantes dans la cellule, la dégradation sélective de protéines cellulaires et le blocage de la réponse antivirale innée de la cellule (Roizman et al., 2007).

2.4.1 Dégradation protéique

Une des voies de dégradation de protéines cellulaires la plus connue est la voie de dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Ce système dégrade les protéines en deux étapes : la première inclut une cascade de signalisation qui permet de faire des modifications covalentes du substrat afin d'ajouter une queue de poly-ubiquitine. Cette poly-ubiquitination va servir comme signal indiquant que la protéine doit être dégradée. La deuxième étape est la reconnaissance et dégradation des protéines poly-ubiquitine par le protéasome 26S (de Bettignies and Coux, 2010). Le protéasome 26S est composé par le protéasome 20S et le protéasome 19S. Le protéasome 20S ou la particule core est un complexe protéique en forme de cylindre composé de 28 sous-unités organisées en forme d'anneaux. On retrouve sept sous-unités α qui forment l'anneau externe, sept sous-unités β qui forment l'anneau interne. Trois sous-unités β induites par l'INF- γ peuvent remplacer trois des sous-unités β normalement présentes dans la structure du protéasome pour former l'immunoprotéasome. Ce complexe a plusieurs activités catalytiques: 1) une activité chymotrypsine qui permet de cliver après les résidus hydrophobes volumineux, 2) une activité trypsine qui permet de cliver des résidus basiques 3) une activité d'hydrolase de peptides peptidyl-glutamyl qui permet de couper après les résidus acides, 4) une activité de clivage de chaînes d'acides aminés qui forment des branches, et 5) une activité de clivage d'acides aminés neutres (Meng, 1999; de Bettignies and Coux, 2010). Le protéasome 19S se lie au protéasome 20S pour permettre la formation du complexe 26S. Le protéasome 19S est un complexe formé de 19 sous-unités. Sa partie basale inclut six homologues AAA-ATPases qui forment un anneau et quatre sous-unités non ATPases. Le couvercle de ce complexe est composé d'au moins neuf sous-unités non ATPases. Le protéasome 19S permet d'ouvrir l'entrée au protéasome 20S, maintenir le substrat déplié et faciliter le déplacement du substrat au différentes chambres catalytiques (de Bettignies and Coux, 2010).

La découverte de multiples inhibiteurs du protéasome ont permis l'étude de la dégradation protéique par le système de dégradation ubiquitine-protéasome. L'epoxomicine est un des

inhibiteurs du protéasome qui permet une liaison irréversible avec les sous-unités β du protéasome. Cet inhibiteur est spécifique et inhibe principalement la fonction similaire à la chymotrypsine. MG132, est un autre inhibiteur spécifique au protéasome. Il agit de manière réversible grâce à son attachement à la sous-unité β_5 du protéasome. Il inhibe la protéase cystéine intracellulaire (Maher, 2008; de Bettignies and Coux, 2010) (figure 4).

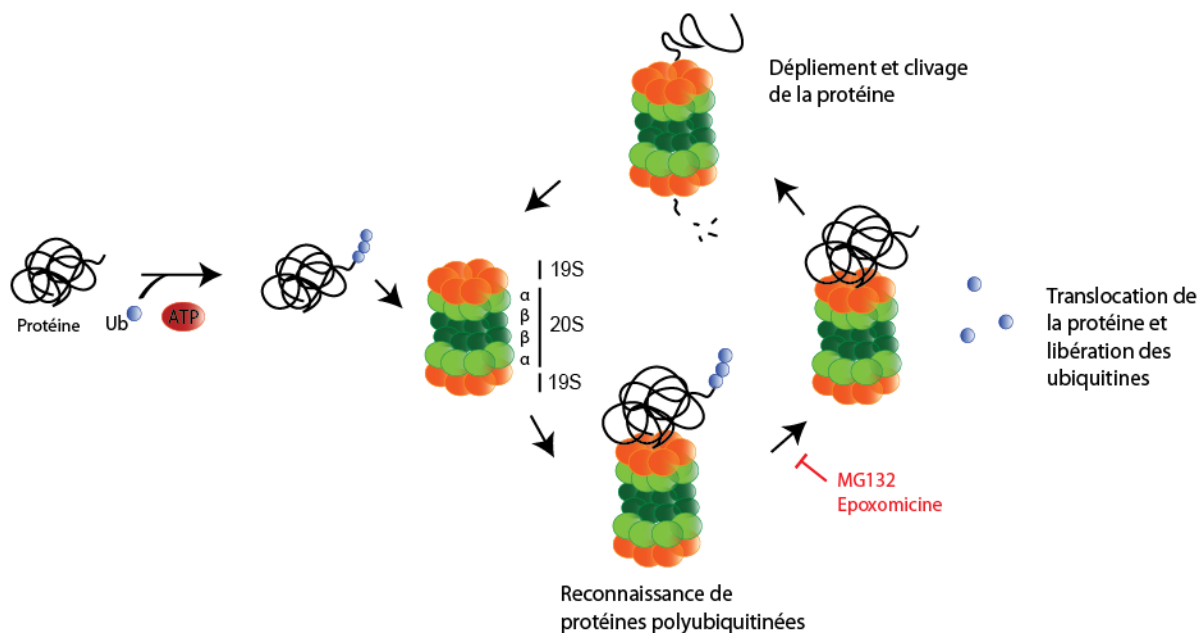


Figure 4 : Voie de dégradation du protéasome. Les protéines polyubiquitinées sont recrutées au protéasome 26S. Le protéasome 26S est constitué de deux structures coiffes 19S à chaque extrémité et une structure centrale 20S en forme de tonneau composé de sous-unités α et β . La structure 19S possède une activité isopeptidase qui permet d'enlever les ubiquitines et une activité ATPase qui permet le dépliement de la protéine pour être clivée dans la partie 20S du protéasome. MG132 et epoxomicine sont deux inhibiteurs des fonctions catalytiques du protéasome. L'epoxomicine se lie et inhibe la fonction des sous-unités β : LMP7, X, Z et MECL1 du protéasome 20S. MG132 inhibe la fonction de sous-unité β_5 du 20S de manière réversible et n'affecte pas la fonction isopeptidase ni ATPase du 19S (Meng, 1999 et Maher, 2008).

Une autre voie de dégradation protéique utilisée par la cellule est le système d'endosomes/lysosomes de la voie endosomale. La voie endosomale est responsable de l'internalisation de fluide, solutés, macromolécules, particules et composants de la membrane plasmique par invagination de la membrane et formation de vésicules. Les différentes fonctions de cette voie permettent aussi de renouveler et de dégrader les membranes : donc c'est le système principal de recyclage de membrane. La dégradation par le lysosome est limitée à une fraction du matériel qui est transporté par la voie endosomale et la sélection de ces matériaux est hautement régulée (Huotari and Helenius, 2011). Les vésicules qui sont ciblées pour la

dégradation subissent une acidification graduelle du milieu interne (de 6 à 4,8 dans les endosomes tardifs) jusqu'à la fusion avec le lysosome qui va diminuer le pH jusqu'à une valeur d'entre 4 et 5. Cette acidification active des réactions hydrolytiques qui vont permettre de dégrader le contenu de ces vésicules. L'acidification du milieu se fait principalement grâce à une pompe de proton la V-ATPase. L'inhibition de cette acidification, permet de diminuer l'action hydrolase du lysosome et ainsi arrêter cette voie de dégradation (Huotari and Helenius, 2011) (figure 5). Comme pour le protéasome, des inhibiteurs du lysosome ont facilité l'étude de cette voie de dégradation. La bafilomycine A1 est un antibiotique dérivé de *Streptomyces griseus* qui par une interaction avec les V-ATPases bloque l'entrée des protons. Cet inhibiteur de V-ATPase empêche l'acidification des endosomes et du lysosome ainsi que la fusion entre ces deux vésicules (Yamamoto et al., 1998).

Chez HSV-1, la protéine multifonctionnelle ICP0 possède une activité ubiquitine ligase. La fonction de cette protéine est différente dans le noyau et le cytoplasme de la cellule. ICP0 possède une structure « RING finger » (structure particulière de doigt de zinc) (Poon et al., 2002). Cette structure lui permet d'interagir avec la protéase spécifique d'ubiquitine (USP7), la protéine EF-1δ, le facteur de transcription BMAL et la protéine p60 (Lopez et al., 2001). La protéine possède aussi deux domaines ubiquitine ligase (Hagglund and Roizman, 2004). Dans la phase précoce d'infection, cette protéine se localise dans le noyau, où elle va dégrader les structures ND10 ; ces structures sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, telles la transactivation ou la répression de gènes cellulaires (Roizman et al., 2007). Les composantes PML (promyelocytic leukemia) et Sp100 des structures ND10 sont responsable de la répression de gènes viraux et elles sont des cibles d'ICP0 pour la dégradation (Lukashchuk and Everett, 2010). Par la suite, ICP0 va être transloquée au cytoplasme de la cellule où elle va s'agréger aux alentours des protéasomes et dégrader les protéines cdc34, PML, SP100 et des protéines kinases dépendantes d'ADN. Ces dégradations sélectives sont importantes pour la régulation de la transcription, la réplication ainsi que le mouvement de la protéine ICP0 dans la cellule (Hagglund and Roizman, 2002).

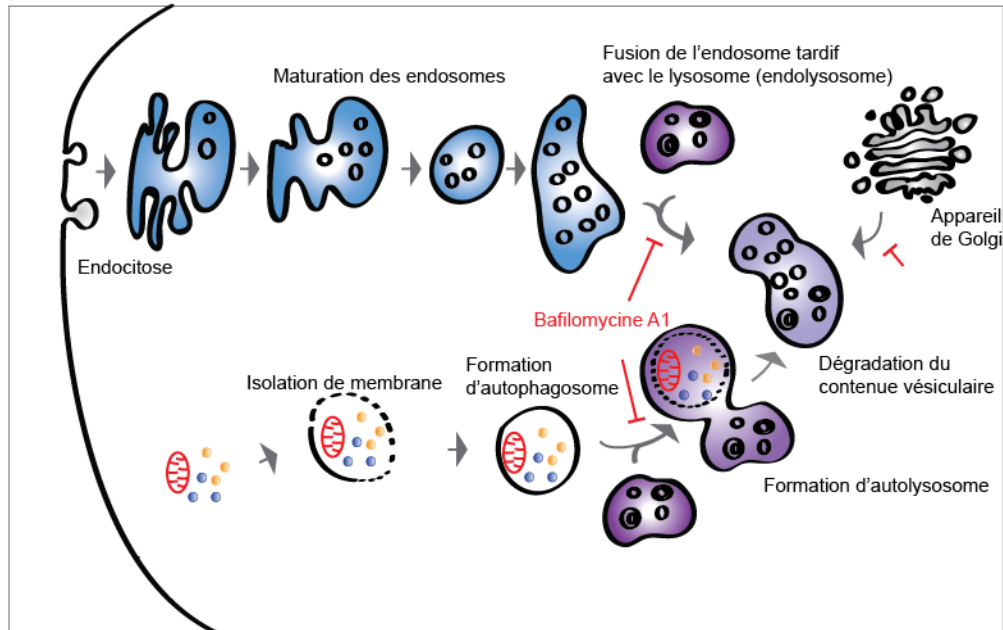


Figure 5: Voie de dégradation du lysosome. Les vésicules qui sont ciblées pour la dégradation subissent une acidification graduelle du milieu interne jusqu'à la fusion avec le lysosome qui va diminuer le pH. L'acidification du milieu se fait principalement grâce à une pompe de proton la V-ATPase (Huotari and Helenius, 2011). La bafilomycine A1 agit comme un inhibiteur de V-ATPase ce qui permet une inhibition de l'acidification des endosomes et du lysosome ainsi que la fusion entre ces deux vésicules (Yamamoto et al., 1998). Les lignes rouges indiquent les étapes sur lesquelles la bafilomycine A1 agit. Figure inspirée de Huotari and Helenius, 2011 et Yamamoto et al., 1998.

3. La protéine UL24

3.1 UL24 du HSV-1

Le gène *UL24*, situé dans la région unique longue du génome viral, est conservé dans la famille des *Herpesviridae*. Des orthologues d'*UL24* du HSV-1 chez les *Alphaherpesvirinae* incluent *UL24* de HSV-2 et du virus de l'herpès bovin 1, et ORF35 du VZV. Chez les *Betaherpesvirinae*, on retrouve entre autres U49 des herpès humains 6 et 7, et *UL76* de HCMV. Finalement, chez les *Gammaherpesvirinae*, on retrouve entre autre *Bxf1* d'EBV, ORF20 de l'herpès murin68, ORF20 du virus du sarcome de Kaposi (KSHV) et ORF37 de l'herpès équin 1 (EHV) (McGeoch et al., 1995 ; Nascimento et al., 2009). La protéine chez HSV-1 contient 269 acides aminés dont une grande proportion dans la partie C-terminale sont des résidus basiques.

3.2 Phénotype UL24-déficient en culture cellulaire et *in vivo*

Le gène qui code pour la protéine UL24 se localise tête-à-tête avec celui de la thymidine kinase (TK). La TK phosphoryle les nucléosides déoxyrimidines et les analogues de nucléosides comme l'acyclovir. La TK n'est pas essentielle pour la réplication lytique du virus mais elle est importante pour la réplication dans les neurones et la réactivation (Coen et al., 1989). Les cadres ouverts de lecture et les régions promotrices d'UL24 et de TK se chevauchent partiellement, ce qui rend l'étude des fonctions de chacune de ces protéines compliquée (Coen et al., 1986). Afin d'étudier l'effet de mutation dans le gène d'UL24 sans affecter le gène *tk* (Jacobson et al., 1998), deux virus mutants (UL24XG et UL24XB) portant des codons stops, un pour chaque cadre de lecture ont été isolés. Ils codent pour une protéine tronquée de 43 résidus, quoiqu'à ce jour cette protéine n'a pas été détectée dans des cellules infectées (Jacobson et al., 1998).

Des études avec les virus UL24XB et UL24XG ont d'abord montré un phénotype de formation de plages syncytiales de lyse (fusion des cellules infectées pour former des cellules géantes avec plusieurs noyaux), phénomène qui n'est pas commun chez le virus de type sauvage. La formation des syncytiums est plus marquée à des températures de 39°C. Par la suite, des essais ont montré l'importance de cette protéine pour l'efficacité de la réplication virale (Jacobson et al., 1989). Trois autres protéines de HSV-1 sont associées avec des plages syncytiales de lyse: gB, gK et UL20 (Ruyechan et al., 1979 ; Foster et al., 2008; Avitabile et al., 2004). Chez la protéine gB, des mutations ponctuelles ou des délétions dans le domaine cytoplasmique de la protéine entraînent une formation exacerbée de syncytiums. La protéine gK, codée par le gène *UL53*, a une fonction qui inhibe la formation de plages syncytiales. Une substitution dans le premier domaine externe de gK montre une diminution du blocage de la fusion entre cellules (Avitabile et al., 2003). Finalement chez UL20, une mutation dans le gène qui n'affecte pas le gène adjacent UL20.5 résulte en une formation de plages syncytiales virales de taille plus petite chez des cellules Vero (Foster et al., 2004).

L'étude *in vitro* des virus UL24X a montré que ces mutants se répliquaient de manière moins efficace (différence d'entre un demi et un \log_{10}) que le virus de type sauvage (Jacobson et al., 1989), démontrant l'importance de cette protéine pour la réplication du virus en culture cellulaire. Aussi, une étude récente a montré qu'UL24 pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M en inhibant la formation du complexe cycline B/Cdc2 (Nascimento et al., 2009).

In vivo, les virus UL24XB et UL24XG se répliquent de manière moins efficace que KOS, le virus de type sauvage. Une différence d'un \log_{10} au niveau des muqueuses dans les larmes de souris CD-1 est observée et cette différence est exacerbée au niveau des ganglions trigéminaux avec une diminution de plus de 4 \log_{10} en comparaison avec le virus de type sauvage. Ces mutants montrent aussi une réduction de plus de 80% de la réactivation *ex vivo* après l'entrée en latence (Jacobson et al., 1998). De plus, les signes cliniques de la maladie sont réduits chez les souris infectées avec un virus déficient en UL24 (Leiva-Torres et al., 2010). UL24 semble donc être important pour la pathogenèse du HSV-1, surtout au niveau des neurones et pour la réactivation du virus à partir de la latence.

3.3 Expression de la protéine UL24

Trois sites d'initiation de la transcription ont été décrits pour le gène ainsi que deux sites de polyadénylation. Les trois sites d'initiation de la transcription du gène *UL24* se localisent aux positions 47402, 47666 et 48076 dans la séquence du génome d'HSV-1. Six transcrits sont produits à partir du cadre ouvert de lecture d'UL24 : trois transcrits courts (0,9 ; 1,2 et 1,4 kb) sont produits avec une cinétique d'expression précoce et trois transcrits longs (5,2; 5,4 et 5,6 kb) sont produits avec une cinétique d'expression tardive (Cook and Coen, 1996). Les transcrits de 5,6 et 1,4 kb sont produits à partir du premier site d'initiation, les transcrits de 5,4 et 1,2 kb sont produits à partir du deuxième site d'initiation et les transcrits de 5,2 et 0,9 kb sont produits à partir du troisième site d'initiation. Le premier site de polyadénylation se trouve à environ 1400 paires de bases en aval du premier site d'initiation et le deuxième est partagé avec UL26 à environ 5,6 kb. Les transcrits produits à partir du troisième site d'initiation n'incluent pas l'ORF complet d'UL24 et leur traduction en protéine n'a pas encore été prouvée. Seulement les deux transcrits longs de 5,4 kb et 5,6 kb semble être traduits en protéine (Pearson et al., 2004) (figure 6). Le site de polyadénylation inclus dans *UL24* démontre une activité faible. En conséquence, à cause de la modulation des deux sites de polyadénylation, les transcrits de 1,4 et 5,4 kb ont différents sites de terminaison (Hann et al., 1998).

UL24 est une protéine à cinétique tardive dans le cycle de réplication du virus (Pearson and Coen, 2002). La protéine ICP27 est importante pour l'expression d'UL24, en partie dû à sa contribution à l'accumulation cytoplasmique des transcrits longs (Pearson et al., 2004). La distribution de la protéine dans la cellule a été étudiée avec une protéine UL24 liée à une étiquette d'hémagglutinine (HA). Au début de l'infection on observe une portion d'UL24 dans le

nucléole où elle induit la redistribution de la nucléoline; plus tard dans l'infection, UL24 se situe dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme de la cellule (Lymberopoulos and Pearson, 2007).

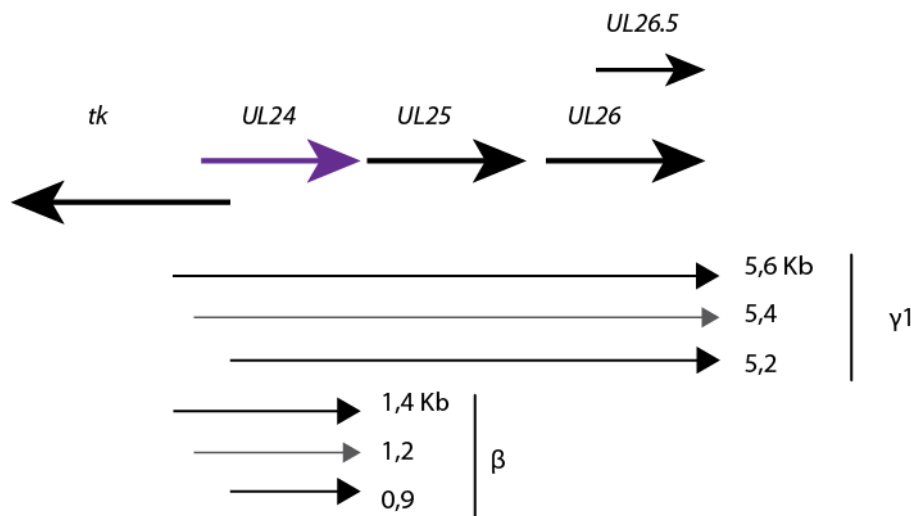


Figure 6 : Représentation graphique de la région génomique d'UL24 d'HSV-1 et de ses transcrits. *UL24* est représenté par la flèche de couleur violet. Les différents gènes entourant *UL24* sont représentés par des grosses flèches de couleur noire. Les transcrits d'UL24 produits lors de l'infection sont représentés par des flèches fines noires et grises. Les transcrits longs ont une cinétique d'expression tardive (γ 1) et les transcrits courts ont une cinétique précoce (β). Les transcrits moins abondants sont représenté par des flèches plus fines et grises. Figure inspiré de Pearson and Coen, 2002.

3.4 Domaines conservés d'UL24

Des études comparatives de séquences d'UL24 d'HSV-1 avec les gènes orthologues chez d'autres de la famille des *Herpesviridae* (HSV-2, VZV, EBV) ont permis l'identification de cinq domaines hautement conservés, nommés domaines d'homologie (HD), où l'on retrouve 65% d'identité des résidus. La partie N-terminale de la protéine plus conservée que la partie C-terminale contient ces cinq domaines (Jacobson et al., 1989). Par ailleurs, des analyses de bioinformatique suggèrent que la portion N-terminale d'UL24 est hautement structurée contrairement à la partie C-terminale (Kosinski et al., 2005). Un domaine d'endonucléase de type PD-(D/E)-XK a aussi été identifié par bioinformatique dans la région N-terminale d'UL24 (Knizewski et al., 2006). Néanmoins, la fonction de ce domaine n'a pas encore été démontrée expérimentalement. Ce type de domaine est présent dans plusieurs protéines qui ont un rôle

dans la recombinaison ou dans la réparation de l'ADN et chez des enzymes de restrictions. Le domaine PD-(D/E)-XK a été identifié aussi dans le domaine ribonucléase de la protéine L du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) de la famille *Arenaviridae*. Cette ribonucléase est responsable du mécanisme de « Cap-Snatching » de ce virus. Ce mécanisme permet au virus d'enlever les coiffe des ARNm de la cellule et de les utiliser comme amorces pour la transcription de ses propres ARNm (Morin et al., 2010). Chez UL24, le domaine d'endonucléase se retrouve dans les domaines II et III hautement conservés (Kosinski et al., 2005; Knizewski et al., 2006)

Un virus qui possède des mutations ponctuelles ciblant les résidus du domaine putatif d'endonucléase d'UL24 (vUL24-E99A/K101A) démontre une réduction dans la réplication en culture cellulaire tout comme le virus déficient en UL24 (Bertrand et al., 2010). *In vivo*, ce virus montre une diminution des titres dans les yeux de souris de 10 fois par rapport au virus KOS, et sa réactivation dans les ganglions trigéminaux est significativement réduite. La réduction observée suggère une grande importance du domaine PD-(D/E)-XK pour le rôle d'UL24 lors de l'infection *in vivo* (Leiva-Torres et al., 2010).

3.5 Les orthologues d'UL24

3.5.1 UL24 d'HSV-2

La protéine UL24 d'HSV-2, composée de 282 acides aminés, a un poids moléculaire de 32 kDa (McGeoch et al., 1991). Elle montre une identité de séquence de 75% avec UL24 d'HSV-1. Elle possède un signal de localisation nucléaire, est exprimée de manière tardive au cours de l'infection (à partir de 9 heures post-infection) et son expression est dépendante strictement de la réplication virale, comparativement à UL24 d'HSV-1 qui appartient à la classe cinétique $\gamma 1$. Il n'y a pas d'information disponible sur les transcrits d'UL24 d'HSV-2. Au début de l'infection, UL24 d'HSV-2 se localise en périphérie du noyau et plus tard dans l'infection elle se déplace au noyau (Blakeney et al., 2005). À différence d'UL24 d'HSV-1 (Loret et al., 2008), il a été rapporté qu'UL24 d'HSV-2 peut être détecté dans le tégument des virions (Hong-Yan et al., 2001).

Un virus déficient en UL24 chez HSV-2 a été créé par insertion d'une cassette de β -glucuronidase dans le gène et la protéine produite résulte en une délétion des 100 derniers acides aminés (Blakeney et al., 2005). Cette délétion n'affecte pas l'activité de TK. *In vitro*, ce virus produit des plages syncytiales mais les titres viraux ne varient pas par rapport au virus de type sauvage en culture cellulaire. Néanmoins, dans un modèle d'infection intra-vaginale murin,

le virus déficient en UL24 montre une réduction de plus de 70% des titres viraux, une réduction de la sévérité des symptômes et un retard de la progression de la maladie par rapport au virus sauvage. Dans un modèle de cochon d'Inde le virus déficient en UL24 induit la formation de plaques herpétiques suite à l'établissement de la latence mais en nombre réduit par rapport au virus sauvage, ce qui montre que le virus déficient en UL24 est capable de se réactiver avec une efficacité réduite (Blakeney et al., 2005b).

3.5.2 ORF35 du VZV

L'ORF35, un orthologue d'UL24 chez VZV, est une protéine de 285 acides aminés. Tout comme *UL24* d'HSV-1, *ORF35* se trouve tête-à-tête avec *tk* mais les cadres ouverts de lecture ne se chevauchent pas. La protéine ORF35 se localise dans le noyau et un virus qui possède une délétion du gène qui code pour ORF35 présente des plages de lyses plus petites. L'effet sur les titres viraux est dépendant des cellules et est plus prononcé chez des cellules épithéliales que dans des cellules de mélanome (diminution d'un \log_{10}). VZV est connu pour former des plages syncytiales appelés des polykaryocytes pendant l'infection (Cole and Grose, 2003; revue par Besser et al., 2004). *In vitro*, un virus déficient en ORF35 forme des polykaryocytes aberrants. Les noyaux ainsi que l'appareil de Golgi sont affectés chez les cellules infectées par ce virus. La protéine gE est importante pour la formation des syncytiums; chez le virus déficient en ORF35, on observe un changement de la distribution de cette protéine d'une localisation très distincte dans le cytoplasme et à la membrane cellulaire à une localisation diffuse (Ito et al., 2005).

In vivo, des études sur des souris SCIDhu (souris C.B-17 scid/scid ayant subi des transplantations soit de thymus ou foie fœtaux humains soit de peau fœtale humaine), montrent que l'infection avec VZV déficient en ORF35 est atténuée dans des cellules différenciées de la peau et des cellules T humaines. Dans la peau transplantée de ces animaux, Une diminution des titres viraux (1 à 2 \log_{10}) est observée ce qui est également le cas chez les cellules T où la diminution est moins importante (1 \log_{10}) (Ito et al., 2005). *In vivo*, la délétion d'*ORF35* montre une formation de plages syncytiales aberrante et une diminution de la répllication du virus dans les cellules de l'épiderme humaine (Ito et al., 2005).

3.5.3 UL24 du virus de l'herpès bovin 1

Ce virus de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, code pour un orthologue d'*UL24*, qui se localise tête-à-tête avec *tk* chevauchant ce dernier sur deux nucléotides au niveau des cadres ouverts de lecture. La déficience de cette protéine n'entraîne pas d'impact dans la croissance du virus ou la formation de plages de lyse *in vitro* (Whitbeck et al., 1994). L'absence d'un effet sur la croissance du virus peut être due au type cellulaire utilisé.

3.5.4 ORF37 du virus herpès équin 1 (EHV-1)

Ce virus appartenant au genre *Varicellovirus* a été montré comme étant responsable de certaines infections respiratoires et peut entraîner des avortements spontanés (Allen and Bryans, 1986). Tout comme les autres orthologues d'*UL24* décrits jusqu'à présent, ORF37 d'*EHV-1* se localise tête-à-tête avec le gène *tk*, mais leurs cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas. ORF37, composé de 272 acides aminés, a un poids moléculaire de 29,2 kDa. En culture cellulaire, un virus déficient en ORF37 ne montre pas de différences dans les titres viraux ni dans les plages de lyse par rapport au virus de type sauvage. Néanmoins *in vivo*, dans un modèle murin, un virus déficient en ORF37 présente une diminution dans les symptômes neuronaux et une diminution de la pathogénèse, par rapport au virus de type sauvage (Kasem et al., 2010).

3.5.5 U49 d'HHV6 et HHV7

HHV6 et HHV7 appartiennent au genre *Roseolovirus*. L'homologue d'*UL24* chez ces virus s'appelle U49 et code pour une protéine de 252 acides aminés avec poids moléculaire de 29,3 kDa chez HHV6, et pour une protéine de 239 acides aminés et de poids moléculaire de 28,6 kDa chez HHV7. La similitude de séquence avec *UL24* du HSV-1 est de 23% (Dominguez et al., 1999). Contrairement aux autres virus herpès humains, le gène qui code pour U49 de HHV6 se trouve tête-à-tête avec le gène U48 qui code pour la gH virale. Leurs cadres ouverts de lecture ne se chevauchent pas. Cependant, il y a chevauchement entre la partie C-terminale du gène U49 et la partie N-terminale d'U50 qui code pour une protéine du tégument. Le gène qui code pour U49 d'HHV7 se retrouve dans un contexte génomique semblable à celui d'HHV6 (Megaw et al., 1998).

3.5.6 ORF20 du virus du sarcome de Kaposi

Ce virus qui appartient à la sous-famille des *Gammapherpesvirinae* possède comme orthologue d'UL24 la protéine ORF20. Le gène qui code pour cette protéine se localise aussi tête-à-tête avec le gène qui code pour TK mais leurs cadres ouverts de lecture ne se chevauchent que de deux nucléotides. ORF20, d'un poids moléculaire de 28,5 kDa, peut induire l'arrêt cellulaire en phase G₂/M suite à l'inactivation du complexe cycline B/Cdc2 tout comme ORF20 du gamma herpès virus murin 68 (Nascimento et al., 2009).

3.5.7 ORF20 du gamma herpès virus 68 murin.

Le gamma herpès virus 68 murin est un virus proche d'EBV et KSHV (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus). Les similitudes entre ces trois virus font du virus murin un bon modèle d'étude (McGeoch, 1995). L'orthologue d'UL24 chez ce virus s'appelle ORF20. Cette protéine a un poids moléculaire de 28 kDa et se localise dans le noyau de la cellule. Parmi les fonctions décrites en culture cellulaire, mentionnons le blocage de la progression du cycle cellulaire dans l'étape G₂/M et le déclenchement de l'apoptose. Chez des lignées de cellules qui expriment cette protéine de manière stable, il y a une accumulation de la forme inactive de cycline B, c'est-à-dire la forme phosphorylée qui entraîne une accumulation du complexe cycline B/Cdc2 (Nascimento and Parkhouse, 2007). La déficience dans cette protéine ne semble pas entraîner de différences dans les titres viraux par rapport au virus sauvage, ni en culture cellulaire, ni *in vivo*. Néanmoins, un délai de quatre jours dans l'élimination du virus déficient en ORF20 par rapport au virus sauvage a été observé (Nascimento et al., 2011).

3.5.8 UL76 d'HCMV

HCMV appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. Il est un des virus les plus grands dans la famille des virus herpès. HCMV de la souche de laboratoire AD169 possède un génome d'environ 230 kb d'ADN double brin. Parmi ses caractéristiques particulières, il démontre une gamme limitée d'hôtes ainsi qu'un long cycle de réplication (Chee et al., 1990). L'homologue d'UL24 chez HCMV est la protéine UL76 qui possède 325 acides aminés et a un poids moléculaire de 38 kDa. Il y a 27% d'identité entre les séquences d'UL24 d'HSV-1 et UL76. Deux transcrits de 4,5 et 5,5 kb, générés à partir de deux sites différents d'initiation de la transcription, sont exprimés pour cette protéine avec une cinétique tardive: le transcrit de 5,5 kb est un transcrit polycistronique qui contient l'ORF d'UL76, UL77 et UL78 et le transcrit de 4,2 kb

est un transcrit qui contient l'ORF d'UL76. La transfection de cellules avec un plasmide qui exprime UL76 attachée à la GFP (Green Fluorescent Protein) montre que cette protéine qui possède des signaux de localisation nucléaire a une localisation nucléaire (Wang et al., 2004). La protéine, qui est détectée dès 2 heures post-infection, atteint un niveau maximum après 24 heures; par la suite, elle se maintient à un niveau constant tout au long de la phase tardive du cycle de réplication du virus (Wang et al., 2000). Dans cette même étude, il a été montré qu'UL76 se retrouve aussi dans les virions d' HCMV possiblement dans l'enveloppe et la couche interne du tégument. À cause de son contenu riche en résidus chargés positivement et sa localisation dans le virion, il a été proposé que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la formation des structures du virion et sa maturation. Elle pourrait entre autres contribuer à neutraliser les charges négatives des phosphoprotéines pUL83 et pUL99 contenues dans le tégument (Wang et al., 2004).

3.5.8.1 Activité régulatrice d'UL76 d'HCMV

En 2000, pour identifier des protéines capables de réguler l'expression des protéines immédiates-précoces (MIE) Wang et al. ont criblé des sous-librairies génomiques afin de trouver des protéines capables de réguler l'expression d'un plasmide rapporteur exprimant la chloramphenicol acétyltransférase (pCAT) sous contrôle de la région régulatrice de MIE (MIEP). Les différentes sous librairies ont été co-transfectées avec le plasmide repporteur et 48 heures post-transfection les protéines ont été récoltées afin de quantifier l'activité CAT. Afin de voir l'effet d'UL76 sur la régulation de promoteur, ils ont testé l'effet d'UL76 sur les promoteurs de MIEP, du gène régulateur UL112-113, de l'ADN polymérase virale (UL54) et, comme témoin d'un autre virus, le promoteur des gènes précoces du SV40. Leurs résultats montrent qu'à faible dose d'UL76, l'activité de MIEP et du gène régulateur UL112-113 augmente. Au fur et à mesure que la quantité d'UL76 augmente, l'activité des promoteurs MIEP et U112 diminue, ce qui montre un effet répressif d'UL76 sur ces deux promoteurs. Aucun de ces effets n'est observés pour les promoteurs de SV40 et d'UL54. Ces résultats montrent un effet régulateur d'UL76 sur l'expression de gènes immédiats précoces (Wang et al., 2000).

Une autre étude du même groupe a montré que la production de particules virales était inhibée dans des cellules qui expriment la protéine UL76 de manière stable. De plus, une inhibition de l'expression des protéines immédiates précoces, précoces et tardives et un retard de l'accumulation d'ADN viral ont été observés (Wang et al., 2004). Dans ces mêmes cellules,

des études sur l'intégrité de l'ADN ont montré que la présence d'UL76 induit des dommages à l'ADN formant des aberrations chromosomiques. La protéine UL76 forme des foyers dans le noyau par activation de la réponse initiale à ces dommages. Cette réponse se fait, entre autres, par la phosphorylation des membres de la famille des histones H2A, particulièrement l'histone γ -H2AX (Siew et al., 2009).

Une autre étude sur l'effet direct d'UL76 sur la régulation de la protéine UL77 montre qu'UL76 régule à la baisse l'expression d'UL77. Des mutations et un changement dans le cadre de lecture du gène qui code pour la protéine UL76 montrent une augmentation de la quantité de transcrits et de la protéine UL77. Les auteurs proposent que cette régulation soit faite par un mécanisme de ré-initiation de la transcription qui permettrait au virus de contrôler l'accumulation de la protéine UL77. Les auteurs suggèrent que cette régulation permettrait une réplication efficace du virus dans les cellules hôtes (Isomura et al., 2010).

4. La protéine R1 de HSV

La ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme essentielle pour la synthèse d'ADN. Chez les eucaryotes et plusieurs procaryotes, cette enzyme est un complexe formé de deux sous-unités non identiques qui catalysent la réduction des ribonucléotides diphosphates en deoxyribonucléotides (dNTP) (Stubbe, 1990).

4.1 Activité réductase

Les HSV produisent leur propre RR composée de deux sous-unités non identiques comme la RR des cellules de mammifères. Parmi les différences entre l'enzyme herpétique et la RR de mammifères, on remarque que la RR d'HSV n'a pas besoin de Mg^{2+} pour sa fonction réductase et qu'elle n'est pas inhibée par les dTTP et dATP. La grande sous-unité de la RR d'HSV-1 est connue comme ICP6 ou R1. C'est une protéine de 1137 acides aminées avec un poids moléculaire apparent de 140 kDa qui est codée par un transcrit de 5,0 kb. La petite sous-unité de la RR (R2) est une protéine de 38 kDa qui elle est codée par un ARNm de 1,2 kb. La partie 3' du gène qui code pour cette protéine chevauche avec celle de la R1 (Goldstein and Weller, 1988).

Une caractéristique de la R1 de HSV-1 et -2 est de posséder une extension dans la partie N-terminale d'environ 350 acides aminés comparativement à la protéine R1 retrouvée chez la

plupart des autres virus herpes. La R1 virale est un bon substrat pour des protéines kinases de la cellule hôte (Langelier et al., 1998). La synthèse de cette sous-unité débute dans les étapes immédiates précoces de l'infection lytique et de la réactivation. Et elle s'accumule dans la cellule à des niveaux plus élevés que nécessaire pour la réplication de l'ADN viral (Langelier et al., 2002), ce qui suggère que la protéine R1 posséderait d'autres fonctions que son activité réductase.

4.2 Phénotype des virus déficient en R1

Les virus déficients en R1 ne montrent pas une capacité réduite de synthétiser l'ADN si les cellules sont en croissance exponentielle ; cependant, dans des cellules qui ne sont pas en division la synthèse d'ADN est sévèrement diminuée (Goldstein and Weller, 1988). Des souris BALB/c infectées par scarification de l'œil avec des virus déficients en R1 montrent une réduction dans la formation des kératites, des vascularisations de la cornée et des rétinites par rapport aux souris infectés par le virus de type sauvage KOS. Cet effet n'est pas dépendant du type de souris utilisé puisque les effets sont les mêmes chez les souris CD-1, ce qui montre que la protéine R1 est importante pour la pathogenèse du virus dans l'œil de la souris (Brandt et al., 1991 ; Brandt et al., 1997). Les virus déficients en R1 montrent aussi une déficience dans la réactivation de la latence dans des souris BALB/c. Les niveaux d'ADN présent dans les ganglions trigéminaux de ces souris sont 50 fois plus bas que ceux de souris infectées par le virus de type sauvage, KOS (Brandt et al., 1991). Ces résultats montrent que la RR est importante pour l'établissement de la latence ainsi que pour la réactivation de la latence du virus.

4.3 Activité anti apoptotique

La sous-unité R1 d'HSV-2 est capable d'empêcher l'apoptose déclenchée par la voie de la caspase-8 induite par l'activation des récepteurs de mort. Elle interagit directement avec la caspase-8, ce qui empêche sa dimérisation (Dufour et al., 2011b) ainsi qu'avec la protéine d'interaction du récepteur 1 (RIP1) (Dufour et al., 2011a). Des expériences faites avec la partie N-terminale de R1 montrent que ce domaine n'est pas responsable en lui-même de l'activité anti-apoptotique de R1. La présence de R1 dans l'infection lytique et l'expression à des niveaux plus hauts que nécessaires pour la réplication de l'ADN pourrait aider à réduire la réponse aux cytokines de la familles des TNFs (Tumoral Necrosis Factor) (Langelier et al., 2002).

Le domaine NH2 de la protéine R1 d'HSV-2 possède entre les résidus 300 à 400 une similitude avec le domaine α -crystallin de la protéine de choc thermique Hsp27 (Chabaud et al., 2003). Afin de déterminer si ce domaine est important pour l'activité anti-apoptotique de R1 des expériences avec des protéines R1 qui possèdent des délétions de segments du domaine NH2 de R1 ont été faites. Des délétions de la partie C-terminale qui contient le domaine RR de R1 ont été aussi réalisées. Les résultats montrent que la plus grande partie du domaine NH2 n'est pas nécessaire pour l'activité anti-apoptotique de R1 ; par contre, le domaine α -crystallin est lui important pour cette fonction, possiblement par son rôle potentiel dans l'oligomérisation et le repliement de la protéine. Les expériences sur la partie C-terminale flexible de R1 montrent que cette partie n'est pas importante en elle-même pour la fonction anti-apoptotique. L'expression de la protéine R2, indispensable pour la fonction réductase, n'affecte pas la fonction anti-apoptotique de R1, ce qui indique que les résidus de la surface de R1 qui interagissent avec R2 ne sont pas importants pour la fonction anti-apoptotique. L'ensemble de ses résultats montrent que l'intégrité de la structure du domaine RR est importante pour l'activité anti-apoptotique de R1 (Chabaud et al., 2007).

CHAPITRE 2 : PROBLÉMATIQUE

Hypothèse de travail

Dans le laboratoire, nous nous sommes intéressés au gène viral *UL24* d'HSV-1, hautement conservé chez la famille de *Herpesviridae*. Un virus déficient en *UL24*, *UL24X*, démontre une diminution des titres viraux d'un demi- \log_{10} en culture cellulaire. *In vivo*, il y a une diminution de plus de 4 \log_{10} dans les ganglions trigéminaux (TG) et une réduction sévère de l'efficacité de réactivation virale. *UL24* est donc un déterminant de la pathogenèse virale. Ce gène qui code pour une protéine à cinétique tardive possède cinq domaines d'homologie et un domaine putatif d'endonucléase dans la partie N-terminale dont la fonction n'a pas encore été décrite.

UL76 du cytomégalo virus humain, un orthologue d'*UL24*, est capable de réguler soit à la hausse ou à la baisse l'expression de promoteurs viraux. La différence dans la régulation est dépendante de la quantité de protéine *UL76* présent dans les cellules (Wang et al., 2000). Par ailleurs, une autre étude a montré qu'*UL76* est capable de réguler à la baisse la transcription du gène adjacent, *UL77* (Isomura et al., 2010). Ces résultats démontrent une fonction régulatrice de cette protéine mais les mécanismes impliqués sont encore méconnus.

Des expériences préliminaires ont montré qu'*UL24* d'HSV-1 avait un effet sur la protéine R1: en contexte de transfection transitoire, la protéine *UL24* semblait diminuer l'accumulation de la protéine R1 (Luc Bertrand, résultats non publiés). À partir de ces informations, nous avons proposé comme hypothèse de travail qu'*UL24* d'HSV-1 régulerait l'expression de protéines virales, particulièrement R1.

L'objectif général de ce projet était de comprendre les mécanismes par lesquels *UL24* pourrait réguler l'expression de R1. Afin de tester notre hypothèse, nous avons proposé trois objectifs spécifiques:

- I) Déterminer l'impact d'*UL24* sur l'expression de la protéine R1 en contexte de transfection transitoire.
- II) Déterminer l'impact de mutations en *UL24* sur la régulation génique de la protéine R1.
- II) Déterminer l'impact d'*UL24* sur l'expression des transcrits de R1 en contexte de transfection transitoire.

CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

1. Culture cellulaire

Les cellules COS-7 sont des fibroblastes provenant de reins de singe vert d'Afrique. Les cellules ont été cultivées dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) enrichi avec 5% de sérum de veau nouveau-né (NCS, New Born Calf) et 50 mg/ml de pénicilline et 50 unité/ml de streptomycine (P/S). Au moment où les cellules ont atteint une confluence entre 85% et 90%, le milieu a été enlevé et de la trypsine/EDTA a été ajouté (2,5 g/L de trypsine et 0,38 g/L d'EDTA). Elles ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 5 minutes pour que les cellules soient totalement décollées du flacon. Ensuite, les cellules ont été passées 1:8 dans un flacon et conservées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules 293T sont des cellules embryonnaires de rein humain. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM enrichi avec 8% de sérum de fœtus bovin (FBS de l'acronyme en anglais Fetal Bovine Serum) et 50 mg/ml de pénicilline et 50 unité/ml de streptomycine (P/S). Des passages des cellules ont été faits quand elles ont atteint une confluence de 85%.

1.1 Les plasmides

Afin d'étudier l'effet d'UL24 sur la protéine R1 en contexte de transfection transitoire dans des cellules mammifères, des vecteurs d'expression mammifère des gènes d'*UL24*, *R1* et *UL24* muté ont été utilisés, notamment les plasmides pLBPfl HAUL24, pLBPfl HAUL24 CTerm et pLBPfl Nterm (Bertrand and Pearson, 2008) ainsi que le plasmide pLBPfl-GST-R1 qui code pour la protéine R1 de HSV-1 (Dufour et al., 2011a).

Les plasmides contenant des versions d'UL24 avec des substitutions simples ou doubles ont été utilisés notamment pLBPfl HAUL24 E99A/K101A et pLBPfl HAUL24 G121A (Leiva-Torres et al., 2010).

2. Transfection et production de lysats cellulaires

Un jour avant la transfection, des plaques de 6 puits ont été préparées avec $3,5 \times 10^5$ cellules COS-7 par puits pour permettre une confluence de 60%. Le jour de la transfection, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 et différents plasmides soit, le vecteur vide pLBPfl, le vecteur pLBPfl HAUL24, le vecteur pLBPfl HAUL24 N-Term ou le vecteur pLBPfl HAUL24 C-Term. La Lipofectamine (Invitrogen) a été utilisée comme agent de transfection, à un

ratio de 1:6 d'ADN/Lipofectamine dilué dans 1 ml de milieu DMEM sans antibiotique ni sérum (2 µg du plasmide pLBPfl-GST-R1 et 2 µg du deuxième plasmide utilisé pour 24 µl de Lipofectamine total). Après 5 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu a été changé pour 4 ml de milieu DMEM avec 5% de NCS et du P/S. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant le temps indiqué.

Dans l'essai pour étudier l'effet de différentes doses d'UL24 sur R1, les cellules ont été transfectées avec 2 µg du plasmide pLBPfl-GST-R1 et des quantités croissantes de pLBPfl HAUL24 (0,01 ; 0,1 ; 1 ou 2 µg) puis complété avec le plasmide pLBPfl jusqu'à atteindre 2 µg d'ADN pour 24 µl de Lipofectamine.

2.1 Traitement avec les inhibiteurs du protéasome et du lysosome

2.1.1 Inhibiteurs du protéasome

24 heures post-transfection, les cellules COS-7 ont été traitées avec 5 µM de MG132 (Sigma Aldrich) comme décrit auparavant (Pagano et al., 2008), ou avec 0,5 µM d'epoxomicine (Sigma Aldrich) comme décrit auparavant (Dalet et al., 2011) ou avec du DMSO comme témoin, dilués dans du milieu DMEM. Les cellules ont été traitées avec les inhibiteurs du protéasome pendant 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Ensuite les cellules ont été lysées et les protéines ont été récoltées pour faire des immunobuvardages de type Western.

2.1.2 Inhibiteur du lysosome

24 heures post-transfection, les cellules COS-7 ont été traitées avec 1 µM de bafilomycin A1 (Sigma Aldrich) dans 2 ml de milieu DMEM avec 5% de NCS et P/S comme décrit auparavant (Williams et al., 2008) ; les cellules témoins ont été traitées avec du DMSO. Le traitement a été maintenu pendant 24 heures, puis les cellules ont été lysées et les protéines récoltées pour faire des immunobuvardages de type Western.

2.2 Lyse de cellules

Suite aux transfections, les cellules ont été lavées avec du PBS (200 mg de chlorure de potassium, 200 mg/L de phosphate de potassium monobasique, 8 g/L chlorure de sodium et 2160 mg/L de phosphate de sodium dibasique à un pH de 7.4) et incubées sur glace pendant 10 min, puis le milieu a été enlevé. Ensuite, 300 µl du tampon de charge 2X ont été ajoutés (0,16% de bromophénole bleu, 1% de SDS et 3,3% de β-mercaptoéthanol) et après une incubation de 15 min à 4°C, les cellules ont été grattées pour récolter les protéines. Par la suite,

les lysats ont été centrifugés à 13 000 rpm dans une micro centrifugeuse pendant 40 min à 4°C, et le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube puis chauffé à 100°C pendant 1 min. Les échantillons ont été conservés à -20°C pour utilisation rapide ou à -80°C pour une plus longue durée de conservation.

3. Immunobuvardage de type Western

Les échantillons de lysats cellulaires ont été chargés dans un gel dénaturé d'acrylamide à 10%, (au sodium dodécyl sulfate : SDS) et migrés par électrophorèse dans un tampon de migration (3 g de Tris, 14,4 g de glycine dans un litre d'eau double distillé à 0,1% SDS) pendant 90 min à 100 volts. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) par un transfert humide dans un tampon de transfert (3 mg/ml de Tris base, 14,4 mg/ml de glycine, 20% de méthanol). Les ampérages utilisés étaient : 0,45 A pendant 15 min, 0,6 A pendant 30 min, 0,75 A pendant 15 min, 0,85 A pendant 15 min et 1 A pendant 15 min. La membrane a ensuite été incubée dans une solution de TTBS (10 mM de Tris-HCL, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween pour un litre d'eau double distillé et à un pH de 7,4 avec 5% de lait déshydraté « Blotting Grade Blocker Non Fat » (Biorad) pendant 1 heure.

La membrane a été lavée deux fois avec du TTBS pendant 5 minutes, puis ensuite a été incubée avec l'anticorps primaire (dilué dans 10 ml de TTBS avec 0,05% de gélatine) pendant une heure et demi. Après trois lavages de cinq minutes au TTBS, l'anticorps secondaire été ajouté qui lui est lié à la peroxydase de raifort (HRP). Le deuxième anticorps a été dilué dans 10 ml de TTBS avec 5% de lait. La membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure, puis lavée avec du TTBS cinq fois pendant 5 minutes. On a révélé la membrane par chemiluminescence à l'aide des solutions Immun-Star HRP Substrate (Biorad) et des films Biomax XAR (Kodak).

3.1 Les anticorps

Afin de marquer la protéine GST-R1, un anticorps primaire polyclonal contre GST (Glutathion-S-Transférase) de lapin à une dilution de 1 :2000 a été utilisé (Invitrogen). Un IgG de chèvre dirige contre les Ig de lapin et conjugué à la peroxydase (Bethyl) à une dilution de 1 :5000 dans une solution de TTBS à 5% de lait a été utilisé comme anticorps secondaire. Pour marquer la protéine HA-UL24, on a utilisé l'anticorps primaire monoclonal IgG de souris HA-11 (dilué à 1:500, Covance) et un anticorps secondaire de chèvre contre souris, conjugué à la

peroxydase (dilué à 1 :2500, Sigma). Un anticorps primaire de lapin dirigé contre l' α -tubuline a été utilisé (dilué à 1 :2000, Abcam) et un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les Ig de lapin et conjugué à la peroxydase (dilué 1 :7500, Bethyl) ont servis lors de l'immunobuvardage dirigé contre le témoin de charge α -tubuline.

4. Extraction d'ARN

L'ARN total des cellules transfectées a été extrait grâce à la trousse de RNeasy mini kit de Qiagen. La concentration des échantillons a été déterminée par le Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer de Thermo Scientific. L'intégrité de l'ARN total a été évaluée par électrophorèse sur un gel de BPTe (10X BPTe est composé de 100 mM PIPES, 200mM Bis-Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 dans de l'eau) avec 1% d'agarose.

5. RT- qPCR

5.1 Synthèses de l'ADNc

L'ARN total des cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1+ pLBPfl ou les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl HAUL24 a été extrait comme décrit auparavant dans la section 4. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été faite dans un volume de 20 μ l d'une réaction contenant 0,25 μ g d'ARN total, 4 μ l du mélange de réaction iScript 5X (Biorad) et 1 μ l de l'enzyme iScript reverse transcriptase (Biorad). Le mélange a été incubé 5 min à 25°C, ensuite 30 min à 42°C et finalement 5 min à 85°C pour arrêter la réaction dans un thermocycleur. Pour l'essai de PCR quantitative, les échantillons ont été dilués 1 :10 dans de l'eau dépourvu d'ARNase.

5.2 Les amorces

L'amplification des ADNc de R1 a été faite avec les amorces 5' CTA CGC CAG AGC ATG ATG AAA C et 5'GCT AAA CGT GCG TTC CAG TTC ainsi que pour les transcrits d'UL24 les amorces utilisées sont 5' GAA GCC ATA CGC GCT TCT AC et 5' CGA ATT CGA ACA CGC AGA TG (par Integrated DNA Technologie : IDT), ils produisant des fragments de 201 pb et 198 pb respectivement. Un fragment de 238 pb a été amplifié comme témoin interne correspondant à la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) avec les amorces 5' CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC et 5' GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG comme décrit auparavant (Masuda et al., 2004) .

5.3 PCR quantitative

Les ADNc correspondant aux transcrits de R1, UL24 et GAPDH ont été quantifiés dans une réaction de 10 µl contenant 1 µl de cDNA de chaque échantillon, 5 µl du master mix (ADN polymérase activée par chaleur, dNTPs Ultra pure, MgCl₂ à 6 mM et SYBR® Green I) provenant de la trousse SensiMix™ SYBR No-Rox (Bioline), 0,4 µl de chaque amorce à 50 ng/µL et 3,2 µL d'eau. L'enzyme a été activée pendant 10 min à 95°C. Par la suite la réaction a continué pendant 40 cycles. Chaque cycle consistait en une étape de dénaturation (95°C pendant 15 secondes), une étape d'hybridation d'amorces (55°C pendant 15 secondes) et une étape d'élongation (72°C pendant 15 secondes). L'élongation finale a été effectuée pendant 5 min pour permettre de compléter la synthèse des nouveaux ADNc. Les réactions ont été faites dans la machine Rotor-Gene 6 de Corbette Research. Les résultats ont été analysés avec le programme Rotor-Gene 6. L'expérience a été répétée 6 fois et un test « two way ANOVA » a été réalisé pour valider les résultats de manière statistique utilisant le logiciel PRISM.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

Le but de cette étude a été d'élucider le possible rôle d'UL24 dans la régulation de l'expression de gènes viraux. Des études préliminaires ont montré que la protéine UL24 interagissait avec la protéine R1 virale dans un contexte d'infection en culture cellulaire (Luc Bertrand, résultats non publiés). En contexte de transfection transitoire, la protéine UL24 semblait diminuer la quantité de protéine R1 exprimée. Afin de confirmer ce résultat, une étude plus approfondie de l'effet d'UL24 sur la protéine R1 a été effectuée.

Pour caractériser l'effet d'UL24 sur la protéine R1 dans un contexte de transfection transitoire, des plasmides contenant le gène qui code pour UL24 attaché à une étiquette d'hémagglutinine (HA), le plasmide qui contient le gène qui code pour la protéine R1 attaché à une étiquette de glutathion-S-transférase (GST), le plasmide qui contient uniquement l'étiquette GST et le plasmide vide ont été utilisés. Afin d'identifier la région de la protéine UL24 responsable de cet effet, des plasmides qui contiennent des mutations ciblant des résidus hautement conservés dans UL24 ont été co-transfectés avec le plasmide qui code pour R1 et leurs effets ont été comparés à ceux de la protéine UL24 de type sauvage. Finalement, afin de caractériser le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la diminution de l'expression de R1, des analyses sur la quantité de transcrits présents sous différentes conditions ont été réalisées de même que des expériences avec des inhibiteurs spécifiques pour certaines des voies principales de dégradation protéique.

1. Caractérisation de l'effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 en contexte de transfection transitoire

Des expériences préliminaires de co-transfection dans des cellules COS-7 avec un plasmide contenant le gène qui code pour la protéine R1 attachée à la protéine GST et un plasmide contenant le gène qui code pour la protéine UL24 attachée à une étiquette hémagglutinine (Dufour et al., 2011a ; Bertrand and Pearson, 2008) avaient suggéré un effet négatif de la protéine UL24 sur l'expression de la protéine R1 (Luc Bertrand, résultats non publiés). De plus, des études sur la protéine UL76, l'homologue d'UL24 chez CMV, avaient démontré un rôle régulateur de cette protéine sur l'expression de gènes viraux. Ces observations nous ont mené à investiguer plus en détail la capacité d'UL24 de moduler l'expression de gènes viraux.

1.1 Effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 dans les cellules COS-7

Afin de valider l'effet d'UL24 sur les niveaux de R1 observés précédemment, des cellules COS-7 (cellules dérivées de rein de singe vert d'Afrique) ont été transfectées soit par le plasmide pLBPfl-GST-R1 seul, soit par les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl vide ou les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl HA-UL24 (figure 7A). Les protéines ont été récoltées 48 heures post-transfection et analysées par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre GST. Une bande d'un poids moléculaire apparent d'environ 170 kDa, soit la taille attendue pour la protéine GST-R1, a été détectée pour les échantillons transfectés avec le vecteur pLBPfl-GST-R1. La protéine R1 sans étiquette migre avec un poids moléculaire apparent de 140 kDa malgré le fait que son poids moléculaire soit de 125 kDa. Cette anomalie s'explique par la présence de régions acides dans son domaine NH₂. On observe dans cette expérience que la quantité de GST-R1 produite dans les cellules transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 seul est plus grande que pour les cellules transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl vide. Ce phénomène a été observé dans les différentes expériences réalisées. Cette variation pourrait être due à une quantité totale de plasmides dans les cellules transfectées avec les deux plasmides deux fois plus grande que dans les cellules transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 seul, ce qui aurait pu mener à une compétition pour la machinerie de transcription. Pour le reste des expériences dans les figures qui suivent la même quantité de plasmide total a été transfectée pour chaque condition testée. Il faut noter que la légère différence dans la migration de GST-R1 entre les échantillons provenant d'une transfection avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 seul et avec les plasmides pLBPfl-GST-R1+ pLBPfl vide n'était pas reproductible. Tel que le montre la figure 7A, un changement prononcé sur les niveaux de GST-R1 a été obtenu lors de la co-transfection avec HA-UL24, la protéine R1 n'étant plus détectée. Ces résultats démontrent que dans les cellules COS-7, la quantité de GST-R1 produite en présence d'HA-UL24 est largement inférieure à la quantité observée en son absence et confirment les résultats des expériences préliminaires.

1.2 Effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1 dans les cellules 293T

Afin de déterminer si l'effet d'UL24 sur l'accumulation de R1 était spécifique au type cellulaire, des cellules 293T (dérivées de cellules embryonnaires de rein humain et transformées par des gènes de l'adénovirus et qui exprime SV40 large T antigen) ont été co-transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 combiné avec le plasmide pLBPfl vide ou avec le plasmide pLBPfl HA-UL24 (figure 7B). Le plasmide pLBPfl HA-UL24 a aussi été co-transfecté avec le plasmide pLBPfl afin de déterminer si l'expression de la protéine UL24 était influencée par la présence de GST-R1. Les résultats présentés montrent qu'en présence d'HA-UL24 la quantité de GST-R1 est diminuée comme dans les cellules COS-7. Cependant, la quantité d'HA-UL24 n'est pas affectée par la présence de GST-R1. Ces données suggèrent que la diminution de la quantité de R1 causée par l'expression d'UL24 n'est pas spécifique au type cellulaire utilisé.

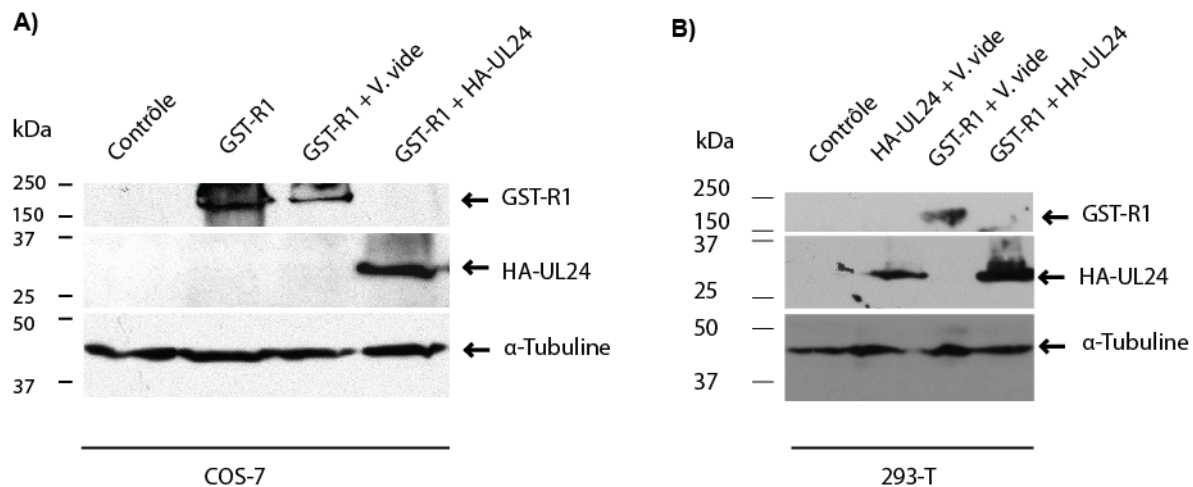


Figure 7: Effet d'HA-UL24 sur l'expression de la protéine GST-R1. A) Analyse par immunobuvardage des protéines récoltées de cellules COS-7 transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-GST-R1, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 ou non transfectées (contrôle). 50 μ l de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkuée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l' α -tubuline (panneau du bas). B) Analyse par immunobuvardage des protéines récoltées de cellules 293T transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-HA-UL24 + pLBPfl-, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 ou non transfectée (contrôle). La membrane a été immunomarkuée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l' α -tubuline (panneau du bas). La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des

panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Ces expériences ont été réalisées au moins trois fois.

1.3 Effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1

Ayant observé une diminution de la quantité de GST-R1 dans les cellules co-transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl HAUL24, nous avons voulu déterminer si l'effet sur GST-R1 était dépendant de la quantité d'HA-UL24. Pour ce faire, nous avons co-transfecté des cellules COS-7 avec des doses égales du plasmide qui contient le gène codant pour R1 et des doses croissantes du plasmide pLBPfl HAUL24, puis on a complété avec le plasmide vide (pLBPfl) afin de conserver les mêmes quantités d'ADN transfectés dans chaque cellule (figure 8). Entre 0 et 0,1 µg de plasmide pLBPfl HAUL24 nous avons constaté qu'une augmentation de la quantité d'UL24 entraînait une diminution de la quantité de R1 accumulée dans les cellules. Cependant, lorsque la quantité de plasmide pLBPfl HAUL24 est supérieure au seuil de 0,1 µg l'augmentation de la concentration n'a plus d'effet sur la diminution de l'accumulation de R1. Ce résultat montre que l'effet d'UL24 sur R1 est dépendant de la quantité de pLBPfl HAUL24 transfectée.

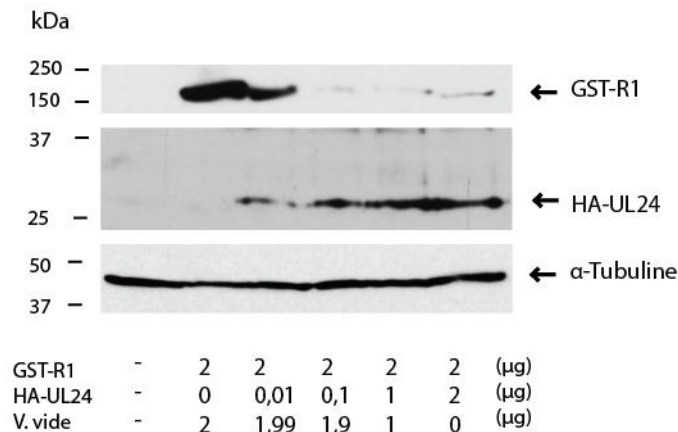


Figure 8: Effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HAUL24 sur les niveaux de GST-R1.

Analyse par immunobuvardage des protéines récoltées de cellules COS-7 transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-HA-UL24 et pLBPfl avec des proportions différentes de chaque plasmide comme décrit dans le tableau ou non transfectées (contrôle). 50 µl de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkuée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l'α-tubuline (panneau du bas). La

position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Ces expériences ont été réalisées deux fois.

1.4 Effet d'HA-UL24 sur l'étiquette GST de R1

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'effet d'HA-UL24 sur GST-R1 pouvait représenter un effet d'HA-UL24 sur l'expression des protéines en général. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules COS-7 avec les combinaisons suivantes de plasmides : pLBPfl-GST + pLBPfl, pLBPfl-GST + pLBPfl-HAUL24, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl ou pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HAUL24 (figure 9). Comme pour les expériences précédentes, les cellules ont été lysées 48 heures post-transfection. Nous avons observé que l'expression de GST en présence ou en absence d'HA-UL24 était similaire, à la différence de GST-R1 qui elle en présence d'HA-UL24 n'était plus détectée. Les niveaux d'expression d'HA-UL24 se maintenaient constants en présence de la protéine GST-R1 ou de son étiquette GST. Ces résultats montrent que l'effet d'HA-UL24 sur la protéine GST-R1 semble dépendre de la partie R1 et que ça ne représenterait donc pas un effet général d'UL24 sur l'expression des protéines.

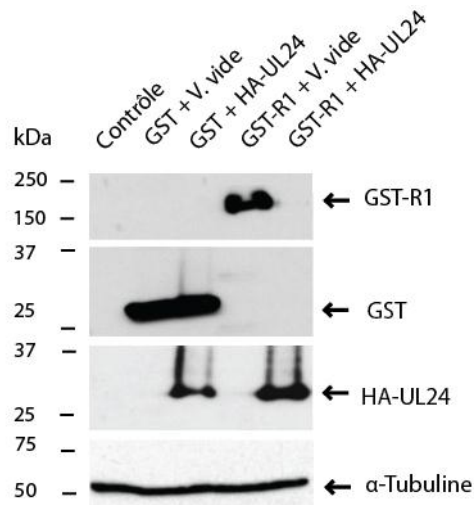


Figure 9: Effet d'HA-UL24 sur l'étiquette GST. Analyse par immunobuvardage des protéines récoltées de cellules COS-7 transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-GST + pLBPfl, pLBPfl-GST + pLBPfl-HA-UL24, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 ou non transfectées (contrôle). 50 µl de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (deux panneaux du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (troisième panneau en partant du haut) ou un anticorps monoclonal de souris contre l'α-tubuline (panneau du bas). La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Cette expérience a été réalisée deux fois.

1.5 Effet de mutations dans HA-UL24 sur l'expression de GST-R1

La protéine UL24 possède cinq domaines d'homologie dans sa partie N-terminale qui sont caractérisés par la présence de plusieurs résidus hautement conservés ainsi qu'un domaine putatif d'endonucléase PD-(D/E)-XK (Knizewski et al., 2006; Jacobson et al., 1989). Dans notre laboratoire deux virus qui expriment une protéine UL24 avec des substitutions dans certains résidus, un avec les substitutions E99A et K101A appartenant au domaine PD-(D/E)-XK et le deuxième avec une substitution G121A ont été créés. La position de ces mutations est illustrée à la figure 10. Les virus vUL24 G121A et vUL24 E99A/K101A présentent un phénotype de formation de plaques syncytiales qui est exacerbé à des températures de 39 °C en culture cellulaire (Leiva-Torres et al., 2010, Bertrand, et al 2010). Par ailleurs, le mutant vUL24 E99A/K101A est atténué en culture cellulaire et dans un modèle murin d'infection oculaire. Afin de déterminer si ces substitutions pouvaient avoir un effet sur la diminution de l'accumulation de GST-R1 en présence d'HA-UL24, nous avons transfecté des cellules COS-7 avec les combinaisons suivantes de plasmides: pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HAUL24 comme témoins de l'effet observé et avec pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HAUL24-E99AK101A, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HAUL24-G121A. Les protéines ont été récoltées après 48 heures post-transfection. L'immunobuvardage présenté à la figure 11 montre qu'en présence des deux protéines HA-UL24 mutées, E99A/K101A et G121A, la protéine R1 s'accumule dans les cellules au même niveau que dans les cellules co-transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1+ pLBPfl vide. Ces résultats montrent non seulement que ces résidus sont importants pour l'effet d'HA-UL24 sur l'accumulation de GST-R1, mais aussi suggèrent fortement que cet effet est dépendant de l'expression de la protéine UL24 et non seulement les transcrits.

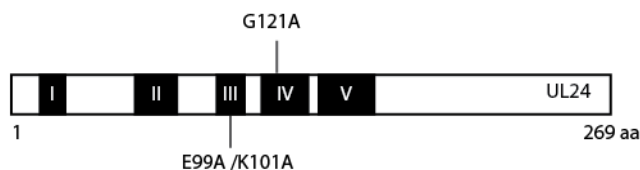


Figure 10: Représentation graphique des substitutions d'acides aminés dans UL24 d'HSV-1. Le grand rectangle représente la protéine UL24, les carrés noirs représentent les domaines d'homologie conservés numérotés de I à V. Les substitutions d'acides aminés introduites dans la protéine sont indiquées par leurs noms et leurs positions. Figure modifiée de Bertrand, et al., 2010.

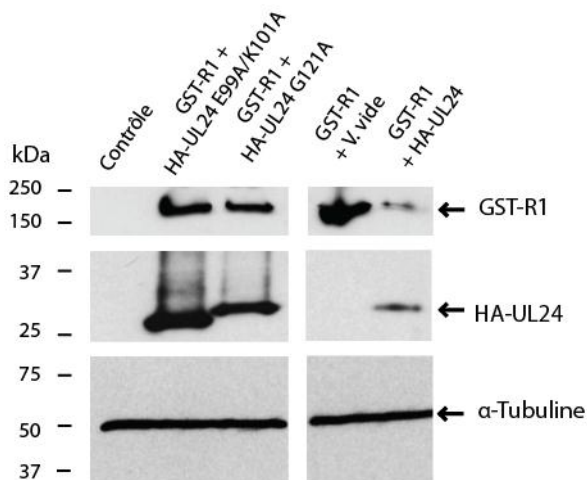


Figure 11: Effet de substitutions dans HA-UL24 sur l'accumulation de la protéine GST-R1. Analyse par immunobuvardage des protéines récoltées de cellules COS-7 transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 E99AK101A, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 G121A, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 ou non transfectées (contrôle). 50 μ l de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l' α -tubuline (panneau du bas). La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Ces expériences ont été répétées trois fois.

2. Étude du mécanisme impliqué dans l'effet d'HA-UL24 sur l'accumulation du GST-R1 virale

Les résultats précédents suggèrent que la protéine HA-UL24 régule à la baisse l'expression de la protéine GST-R1. Dans la littérature, le domaine PD-(D/E)-XK est présent dans un domaine ribonucléase important pour un mécanisme de « Cap Snatching » du virus LCMV qui permet de cibler les ARNm cellulaires afin de pouvoir exciser leurs coiffes et les utiliser comme amorce pour la synthèse des ARNm viraux. De cette manière le virus est capable d'inhiber la transcription cellulaire et favoriser la sienne (Morin et al., 2010). Les résultats de la section précédente montrent que des mutations dans des résidus hautement conservés (E99, K101 ou G121) préviennent la diminution de l'accumulation de GST-R1. Les résidus E99 et K101 font partie du domaine putatif d'endonucléase PD-(D/E)-XK de la protéine UL24. Ce résultat supporte donc l'hypothèse que l'activité nucléase putative de la protéine UL24 pourrait être

impliquée dans son effet sur la R1. De plus, chez HSV-1, plusieurs protéines virales, comme par exemple VP16 et ICP4, sont capables de réguler l'expression d'autres gènes viraux en intervenant à l'étape de transcription.

2.1 Effet d'UL24 sur l'accumulation des transcrits de R1

Afin de déterminer si UL24 pouvait intervenir au niveau de la transcription de R1, nous avons comparé les quantités de transcrits de R1 produits lors de la transfection en présence ou en absence d'UL24. Des cellules COS-7 ont été transfectées avec soit les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, soit pLBPfl-HAUL24 + pLBPfl ou soit pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HAUL24. L'ARN total a été récolté 24 heures post-transfection pour déterminer les quantités de transcrits de R1 et d'UL24 produites dans les différentes conditions par PCR en temps réel (qPCR).

Les amorces spécifiques pour UL24 et R1 du HSV-1, on été conçus grâce au programme Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) puis un « BLAST » des amorces contre la base de données de nucléotides de NCBI a été fait afin de vérifier la spécificité des amorces pour les transcrits de UL24 et R1 d'HSV-1 (Altschul et al., 1990) (figure 12). La spécificité des amorces a été testée par PCR traditionnelle sur les échantillons d'ADNc synthétisés. Nous avons observé l'amplification d'une seule bande de la taille attendue pour les transcrits de R1, UL24 et GAPDH (figure 13A). Les échantillons d'ADNc à 250 µg ont été dilués 1 :10 afin d'éviter la saturation du laser. Pour chaque expérience, la spécificité des amorces, le contrôle que les amorces n'amplifient qu'un seul amplicon et qu'ils ne forment pas de dimères d'amorce, ont été vérifiés par les courbes de dissociation sur chaque réaction de qPCR (figures 13B, 13C et 13D).

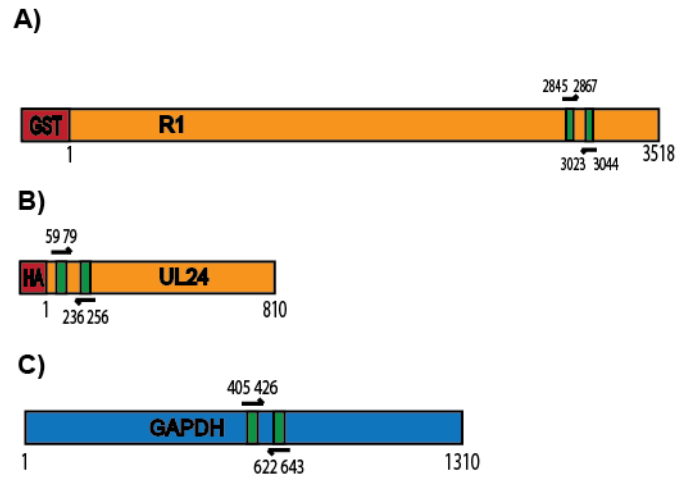


Figure 12: Schéma indiquant la position des amorces conçus afin d'amplifier les ARNm qui codent pour A) la protéine R1 de HSV-1 et B) La protéine UL24 de HSV-1. C) Amorces correspondant au gène qui code pour la protéine Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) décrit par Masuda et al., 2004.

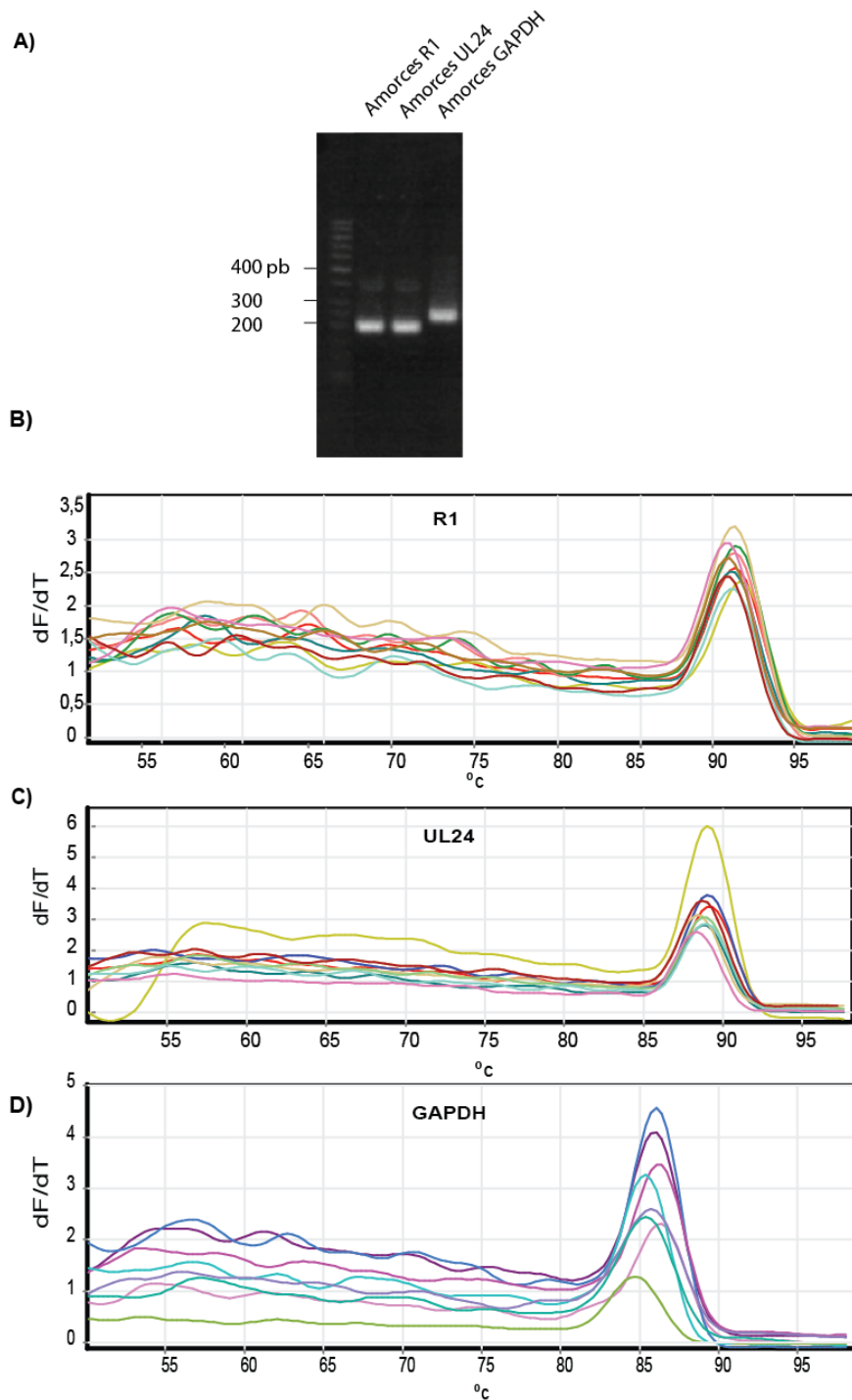


Figure 13: Spécificité des amorces pour les transcrits d'UL24, de R1 et de GAPDH. A) Amplification par PCR de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN total isolé de cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24. B) Courbe de dissociation de la réaction pour quantifier les transcrits de R1. Le pic représente la dissociation spécifique du produit formé par la qPCR. Les différentes courbes représentent la dissociation de l'ADNc de R1 dans les échantillons isolés de chaque type de transfection testés en triplicata. C) Courbe de dissociation de la réaction spécifique pour les transcrits d'UL24 testés en triplicata. D) Courbe de dissociation de la réaction spécifique pour les transcrits de GAPDH. Les

différentes quantités d'ARN cellulaires ont été testées en triplicate. L'abscisse représente les températures en °C et les ordonnées représentent la variation de la fluorescence (dF/dT).

Nous avons utilisé la méthode de quantification relative $\Delta\Delta C_T$ pour analyser les résultats de ces qPCR. Cette méthode permet de quantifier les changements dans l'expression des transcrits étudiés comparativement à un groupe contrôle (Livak, 2001). Dans ce cas, nous avons utilisé les échantillons d'ADNc des cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl comme groupe contrôle et nous avons analysé les changements dans la quantité des transcrits de R1 dans les échantillons extraits des cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24 par rapport au contrôle. Afin de normaliser les quantités de plasmides transfectés par rapport au nombre de cellules présentes dans l'échantillon, nous avons comparé la quantité de transcrits de R1 par rapport à celle d'un gène cellulaire exprimé de manière constitutive, GAPDH. Les résultats de six expériences différentes présentés à la figure 14 montrent que la quantité de transcrits de R1 est réduite de plus de 50% en présence d'UL24. Une analyse par un test two way ANOVA montre que cette différence est hautement significative ($P < 0,0001$).

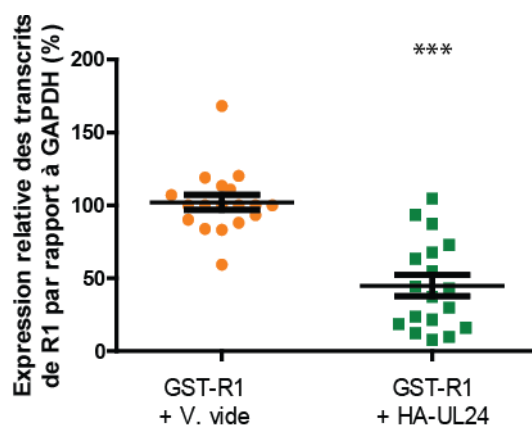


Figure 14: Quantification par PCR en temps réel des ADNc de R1. Les ADNc ont été générés par transfection transitoires de cellules COS-7 avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 + le plasmide pLBPfl ou les plasmides pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24. Le nombre de transcrits de R1 a été calculé par rapport au nombre de transcrits du Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), un transcrite témoin produit de manière constitutive dans les cellules. Les résultats présentés représentent les moyennes et l'écart type de six expériences indépendantes. Le test « two ways ANOVA » montre une différence statistiquement significative de la quantité des transcrits de R1 en présence d'UL24 $p < 0,0001$.

Les transcrits d'UL24 ont été aussi étudiés. Les échantillons récoltés des cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-HAUL24 et pLBPfl ont été utilisés comme groupe contrôle. Comme pour R1, six expériences différentes ont été réalisées et les résultats montre que la quantité des transcrits d'UL24 ne varie pas en présence ou en absence de R1 (figure 15).

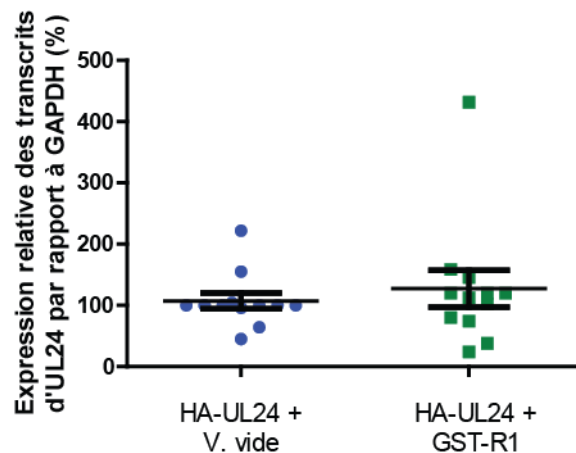


Figure 15: Quantification par PCR en temps réel des ADNc de UL24. Les ADNc sont générés par transfection transitoire de cellules COS-7 avec les plasmides pLBPfl-HAUL24 + pLBPfl ou les plasmides pLBPfl-HA-UL24 + pLBPfl-GST-R1. Le nombre de transcrits d'UL24 a été calculé par rapport au nombre de transcrits du Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), un transcrit témoin produit de manière constitutive dans les cellules. Les résultats présentés représentent les moyennes et l'écart type de six expériences indépendantes. Le test « two ways ANOVA » ne montre pas une différence statistiquement significative de la quantité des transcrits d'UL24 en présence ou en absence de R1.

3. Étude de l'effet d'UL24 sur la dégradation de R1 virale

Les résultats précédents montraient une diminution de 50% de la quantité de transcrits de R1 en présence d'UL24. Néanmoins, les résultats au niveau de la protéine R1 montraient une diminution plus importante la protéine qui n'était souvent plus détectée en présence d'HA-UL24. La diminution au niveau des transcrits de R1 semblait donc moins grande que la diminution au niveau de la protéine suggérant que la diminution au niveau transcriptionnel pourrait ne pas être

le seul mécanisme par lequel UL24 régulerait à la baisse l'expression de R1. Une possibilité serait que la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24 pourrait être due à une induction de la dégradation protéique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier deux voies de dégradation protéique cellulaire, le protéasome et le lysosome.

3.1 Effet de l'inhibition de la voie du protéasome sur la réduction dans les niveaux de GST-R1 en présence d'HA-UL24

Pour tester si l'effet observé de diminution de R1 en présence d'UL24 résultait d'une dégradation induite par la voie du protéasome, le fonctionnement du protéasome a été inhibé avec l'epoxomicine ou le MG132. Différentes concentrations des inhibiteurs ont été testées afin de trouver les concentrations optimales pour l'expérience. Les expériences présentées ont été faites avec 0,5 μ M d'epoxomicine ou 5 μ M de MG132. Dans les premiers essais, des cellules COS-7 ont été transfectées comme décrit auparavant et les inhibiteurs ont été ajoutés après cinq heures, lorsque le milieu de transfection a été changé. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures additionnelles à 37°C. On a observé qu'après 48 heures, il y avait une forte mortalité des cellules qui étaient en présence des inhibiteurs par rapport aux cellules contrôles, traitées avec le DMSO seulement (de l'acronyme en anglais Dimethyl sulfoxide). En conséquence, nous avons décidé de récolter les protéines 24 heures après l'ajout des inhibiteurs. Par contre, nous avons trouvé que dans ces conditions, la quantité de protéine produite par les plasmides était faible (résultats non montrés). Ces résultats nous ont suggéré que les cellules n'avaient pas eu suffisamment de temps pour produire les protéines à partir des plasmides.

Nous avons déterminé empiriquement, que pour augmenter le temps d'expression des protéines sans augmenter le temps d'exposition aux drogues, les inhibiteurs devraient être ajoutés 24 heures post-transfection, puis incubés les cellules avec les inhibiteurs pendant 24 heures additionnelles (figure 16). Nous avons observé qu'on ne détectait plus la protéine R1 en présence d'UL24 en comparaison avec les cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl. De plus, nous avons observé que même présence de l'inhibiteur MG132, la protéine R1 n'a pas été détectée dans les échantillons de cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24. Tout comme pour MG132 et le témoin DMSO, les cellules en présence d'epoxomicine présentaient une diminution de la quantité de R1 en présence d'UL24 qui n'a pas été observée chez les cellules transfectées avec pLBPfl-GST-R1

et pLBPfl. Nous avons aussi observé une variation dans les quantités d'α-tubuline mais ces différences n'expliquaient pas la diminution de la quantité de R1 en présence d'UL24. Cette variation dans les niveaux d'α-tubuline n'était pas maintenue dans les différentes expériences réalisées. Également, une augmentation de la quantité d'UL24 en présence d'epoxomicine a été observée par rapport à la quantité d'UL24 présente dans le témoin et les cellules incubées avec MG132. Cette augmentation était peut-être due à des variations intrinsèques de l'expérience puisqu'elle n'était pas reproductible. Les résultats de cette expérience nous suggèrent que la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24 n'est pas due à une dégradation de la protéine R1 par la voie du protéasome.

La membrane analysée à la figure 16 a été incubée avec un anticorps dirigé contre l'ubiquitine comme témoin de l'inhibition de cette voie de dégradation. Nous avons observé qu'en présence des inhibiteurs, il y avait une accumulation de protéines ubiquitylées qui n'étaient pas dégradées (résultats non montrés). Ce résultat confirme que les cellules traitées avec les inhibiteurs ont subi une inhibition du protéasome.

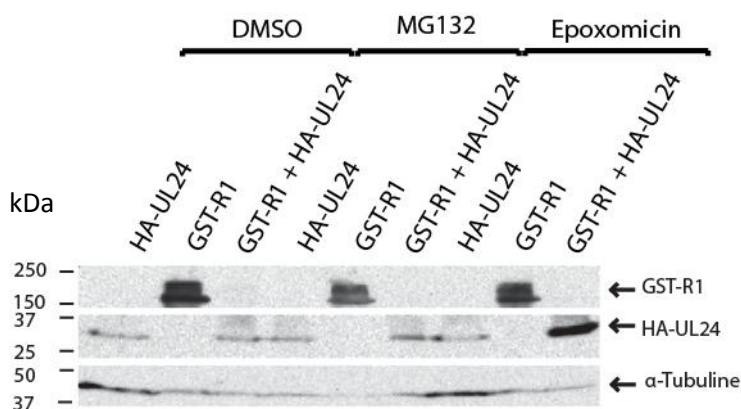


Figure 16: Effet de l'inhibition du protéasome sur l'accumulation de GST-R1 en présence d'HA-UL24. Les protéines ont été récoltées à partir de cellules COS-7 co-transfectées pendant 48h avec les plasmides pLBPfl-GST-R1, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24. Chaque série de cellules transfectées ont été traitées soit avec le DMSO (véhicule seulement) ou avec les inhibiteurs du protéasome MG132 et epoxomicine. 50 µl de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l'α-tubuline (panneau du bas). La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Ces expériences ont été répétées trois fois.

3.2 Effet de l'inhibition de la voie du lysosome sur la réduction dans les niveaux de GST-R1 en présence d'HA-UL24

Afin de tester si la voie de dégradation du lysosome était responsable de la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24, nous avons utilisé un inhibiteur de l'acidification des endosomes et des lysosomes, la bafilomycine A1. Des cellules COS-7 ont été transfectées avec pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl ou avec pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24. Après 24 heures, l'inhibiteur des lysosomes a été ajouté au milieu à une concentration de 1 μ M (comme décrit par Yamamoto et al., 1998). Par inspection visuelle le traitement avec la bafilomycine A1 ne semblait pas induire une mortalité cellulaire. 24 heures plus tard, les protéines ont été récoltées (figure 17). Nous avons observé une diminution de la quantité de GST-R1 en présence d'HA-UL24 dans les cellules témoins (traitées avec DMSO) par rapport à la quantité de GST-R1 produit dans les cellules transfectées avec le plasmide qui contient le gène qui code pour GST-R1 et le vecteur vide. Chez les cellules traitées avec de la bafilomycine A1, il y avait moins de R1 dans les cellules transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 et le plasmide pLBPfl-HAUL24 par rapport à celles qui ont été transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 et le plasmide pLBPfl. Les résultats étaient semblables à ceux pour les cellules traitées au DMSO, suggérant que la voie de dégradation par le lysosome n'était pas responsable de la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24.

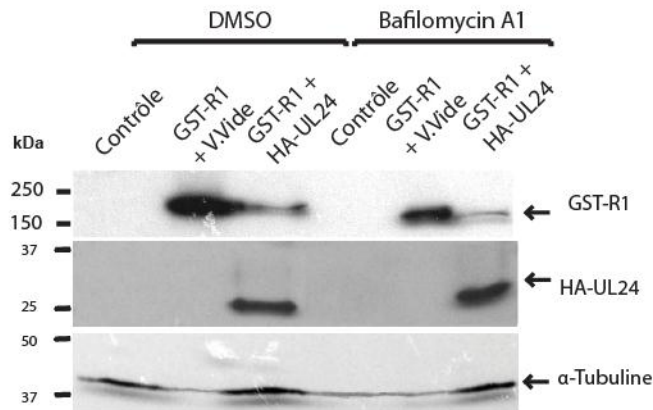


Figure 17: Effet de l'inhibiteur de l'acidification du lysosome sur l'accumulation de GST-R1 en présence d'HA-UL24. Les protéines ont été récoltées à partir de cellules COS-7 co-transfectées pendant 48h avec des plasmides pLBPfl-GST-R1, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl, pLBPfl-GST-R1 + pLBPfl-HA-UL24 ou non transfectée (contrôle). Chaque série de cellules transfectées ont été traitées soit avec le DMSO (véhicule seulement) ou avec l'inhibiteur de l'acidification du lysosome bafilomycine A1. 50 μ l de chaque lysat cellulaire ont subi une électrophorèse sur gel. La membrane a été immunomarkée successivement avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GST (panneau du haut), un anticorps monoclonal anti-HA de souris (panneau du milieu) ou un anticorps monoclonal de souris contre l' α -tubuline (panneau du bas). La position des marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux et les protéines sont indiquées par une flèche à droite des panneaux. Cette expérience a été réalisée deux fois.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un possible rôle d'UL24 sur la régulation de l'expression de la protéine R1. Des études préliminaires avaient montré que la protéine UL24 interagissait avec la protéine R1 virale dans un contexte d'infection en culture cellulaire (Luc Bertrand, résultats non publiés). En contexte de transfection transitoire, la protéine UL24 semblait diminuer la quantité de protéine R1 exprimée. Afin de confirmer ce résultat, la caractérisation de l'effet d'UL24 sur R1 a été faite.

Nos expériences ont montré que la co-expression d'HA-UL24 avec la GST-R1 causait une baisse des niveaux de GST-R1 détectés aussi bien dans une lignée cellulaire de singe que dans une lignée humaine. La baisse dans la quantité de GST-R1 était dépendante de la dose de plasmide codant pour HA-UL24 transfecté. Cette baisse d'expression n'a pas été observée pour l'expression de la protéine étiquette GST. Finalement, en présence de la protéine UL24 portant des substitutions de résidus hautement conservés (E99, K101 et G121), les niveaux d'expression de GST-R1 étaient rétablis ce qui montre que non seulement ces résidus sont importants pour l'effet d'UL24 sur l'accumulation de GST-R1, mais aussi que cet effet nécessite l'expression de la protéine UL24 native. Comme deux résidus importants pour l'effet d'UL24 sur GST-R1 font partie du domaine d'endonucléase putatif d'UL24 (Knizewski et al., 2006), cela suggère un rôle pour la fonction potentielle d'endonucléase d'UL24 dans cet effet. Cette hypothèse est supportée par notre observation que l'expression d'HA-UL24 cause une réduction de 50% de la quantité de transcrits de R1. L'ampleur de cette différence ne semblant pas suffisante pour expliquer la diminution très importante de la quantité de protéine GST-R1 observé en présence d'HA-UL24, nous avons voulu déterminer si l'effet d'UL24 pouvait impliquer d'autres mécanismes. Afin de tester si l'effet d'UL24 sur R1 pouvait être médié via un mécanisme de dégradation de la protéine, des études sur l'implication potentielles de deux voies de dégradations protéiques ont été effectuées. Les résultats ont montré que ni la voie du protéasome ni la voie du lysosome n'étaient impliquées dans la diminution de la quantité de GST-R1 en présence d'UL24.

1. Effet d'UL24 sur l'accumulation de la protéine R1 du HSV-1

1.1 Caractérisation de l'effet d'UL24 sur la protéine R1

Afin de caractériser l'effet d'UL24 sur la protéine R1, les expériences préliminaires ont été refaites avec des témoins additionnels (figure 7A et B). Nous avons observé qu'il y avait une diminution de la quantité de protéine GST-R1 détectée quand les cellules ont été co-transfectées avec le vecteur qui code pour R1 et le vecteur vide par rapport à celles transfectées seulement avec le vecteur pLBPfl-GST-R1. Cette diminution ne peut pas être expliquée par une compétition de la machinerie de transcription pour le promoteur puisque les plasmides pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24 ont le même promoteur CMV et que la quantité totale de plasmides utilisée a été la même dans les deux cas de co-transfection.

Les cellules COS-7 utilisées dans ces expériences sont des cellules immortalisées de rein de singe vert Africain dérivées de la lignée CV-1 et transformées par un mutant du virus de singe 40 (SV40) défectueux pour l'ORF qui code pour l'antigène « large T » de type sauvage (Gluzman, 1981). Cette lignée cellulaire est connue pour être facilement transfectable. Afin de tester si l'effet observé était dépendant du type cellulaire utilisé, des co-transfections des vecteurs pLBPfl-GST-R1 et pLBPfl-HAUL24, ainsi que leurs témoins correspondants, ont été faites dans des cellules 293T. Les cellules 293T, tout comme les cellules COS-7 sont facilement transfectables, mais proviennent d'une lignée de cellules de rein humaines immortalisées par des gènes de l'adénovirus. Elles expriment constitutivement l'antigène « large T » du SV40 (Pear et al., 1993). Les quantités d'UL24 étaient similaires dans les cellules qui ont été co-transfectées avec les plasmides pLBPfl-HAUL24 et pLBPfl-GST-R1 ou avec pLBPfl-HAUL24 et pLBPfl. Ainsi on a observé que la protéine GST-R1 n'était plus détectée quand la protéine HA-UL24 était co-exprimée, à différence des cellules qui produisent uniquement R1. Ces résultats sont similaires à ceux observés chez les cellules COS-7, ce qui confirme qu'il y a une diminution de la quantité de GST-R1 en présence d'HA-UL24 et qui montre que cet effet est indépendant du type cellulaire utilisé.

Dans ces expériences, les deux protéines exprimées à partir des transfections sont des protéines qui sont traduites avec leurs étiquettes respectives. Nous avons transfecté le plasmide qui code pour HA-UL24 avec soit le plasmide qui code pour GST ou soit avec le plasmide qui code pour GST-R1 afin de déterminer si l'étiquette GST pouvait jouer un rôle dans la diminution de la quantité de GST-R1 en présence d'HA-UL24. Nous avons observé que l'expression de GST était similaire chez les cellules co-transfectées avec pLBPfl-GST + pLBPfl

et pLBPfl-GST + pLBPfl-HAUL24. Ces résultats suggèrent que la diminution de la quantité de GST-R1 en présence de la protéine HA-UL24 n'impliquerait pas l'étiquette GST. Cependant, des expériences similaires utilisant un plasmide qui code pour la protéine R1 sans l'étiquette devront être réalisées pour définitivement conclure que l'effet est indépendant de GST.

1.2 Effet de différentes quantités de plasmide pLBPfl HAUL24 sur l'accumulation de la protéine R1

Afin de confirmer que la réduction des niveaux de R1 observée était dépendante d'HA-UL24, des cellules COS-7 ont été transfectées avec le plasmide pLBPfl-GST-R1 et des doses croissantes de pLBPfl-HA-UL24. Les résultats de cette expérience montrent qu'il y a une diminution croissante de la quantité de R1 qui corrèle avec une augmentation de la quantité d'HA-UL24 présent dans les cellules, et donc que la diminution de la quantité de GST-R1 est dépendante de la présence d'HA-UL24. Lorsque nous avons transfecté le plasmide qui code pour HA-UL24 et le plasmide qui code pour GST-R1 à un ratio de 1 :20, nous avons observé une diminution de la quantité de GST-R1 produit similaire à celle vue dans les expériences précédentes où les quantités de plasmide codant pour HA-UL24 utilisées étaient plus hautes. Il semblerait que l'effet d'UL24 sur R1 ne nécessite pas des quantités stœchiométriques d'UL24 par rapport à R1, des expériences supplémentaires devront se faire afin de confirmer cette idée. Cette expérience montre que la diminution de l'accumulation de GST-R1 est spécifique à la présence d'HA-UL24, puisque la diminution de R1 est dépendante de la quantité d'UL24 produite. Malgré ces résultats la possibilité que l'ARN d'UL24 soit responsable de l'effet observé n'est pas écartée.

1.3 Effet de substitutions en UL24 sur la régulation génique de R1 virales

UL24 possède un domaine d'endonucléase de type PD-(D/E)-XK dans sa portion N-terminale. La fonction de ce domaine n'a pas encore été démontrée expérimentalement pour UL24 mais le rôle essentiel du motif PD-(D/E)-XK pour l'activité enzymatique des nucléases qui possèdent ce domaine est bien connu (Knizewski et al., 2006). Un HSV-1 qui possède des mutations dans deux résidus conservés (E59A et K101A) du motif PD-(D/E)-XK d'UL24 présente un phénotype de formation de syncytiums à 39°C ainsi qu'une réduction de la réplication virale et de la réactivation dans les ganglions trigéminaux (Leiva-Torres et al., 2010b). Ces résultats montrent que ce motif est important pour la pathogenèse du virus. Nos résultats montrant qu'en présence de la protéine UL24 porteuse de ces deux mutations la protéine R1 est exprimée presque au même niveau que celui obtenu avec le témoin positif GST-

R1 + vecteur vide suggèrent que ce motif est aussi important pour l'effet d'UL24 sur les niveaux d'expression de R1. Le fait que les résidus mutés sont connus comme étant essentiels à l'activité nucléasique de plusieurs des membres de cette famille suggère qu'une telle activité pourrait être impliquée dans l'effet d'UL24 sur R1. La majorité des activités nucléasiques rapportées pour les membres de la famille PD-(D/E)-XK ont comme substrats des molécules d'ADN. Les coupures effectuées par ces enzymes très diversifiées ont des fonctions très variées tels que la protection contre l'envahissement par des ADN étrangers, la réparation de l'ADN, la résolution des jonctions de Holliday et la recombinaison de l'ADN. Cependant, des endonucléases capables d'utiliser comme substrat l'ARN et ayant des structures semblables aux endonucléases de restriction de type 2 ont été décrites pour certains virus tels les arenavirus, les bunyavirus, et l'influenza. Ainsi, la partie N-terminale de la protéine L du LCMV, un virus de la famille *Arenaviridae*, possède un domaine PD-(D/E)-XK. Cette protéine est capable d'enlever la structure coiffe des ARNm cellulaires permettant le recyclage de cette structure pour la synthèse des ARNm viraux. Cette fonction implique le domaine PD-(D/E)-XK (Morin et al., 2010). Des études devront être effectuées pour d'une part démontrer qu'UL24 possède une activité nucléasique et pour déterminer quel type de substrat elle peut cliver. Cela contribuera à la compréhension du mécanisme impliqué dans l'effet d'UL24 sur R1. Nous présenterons à la section suivante diverses hypothèses sur le sujet.

La mutation G121A située dans le motif IV du domaine putatif d'endonucléase produit un virus mutant avec un phénotype de formation de syncytiums. Cependant, cette substitution ne semble pas affecter la réplication du virus comme celle ciblant le motif PD-(D/E)-XK (Leiva-Torres et al., 2010b). Pourtant, nous avons trouvé que la quantité de protéine R1 produite en présence de la protéine mutée UL24 G121A est similaire à la quantité de R1 produite dans les cellules qui ne contiennent pas d'UL24, suggérant que ce résidu aussi est important pour la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24. Dans plusieurs des endonucléases de type PD-(D/E)-XK, le motif IV qui possède une structure secondaire d'hélice alpha contient des résidus impliqués dans le site catalytique. Il est donc plausible que la mutation G121A à l'instar de la double mutation E59A/K101A affecte l'activité nucléasique d'UL24. Il est aussi possible que la mutation de ce résidu affecte la structure de la protéine. Il est difficile de spéculer davantage sur l'impact des mutations d'UL24 tant que leurs effets sur l'activité nucléasique de la protéine n'auront pas été déterminés. De même, il nous apparaît prématuré de discuter d'un éventuel lien entre le phénotype de formation de syncytiums et la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24 tant que cet effet d'UL24 n'aura pas été démontré dans des cellules

infectées par HSV. Néanmoins, les résultats présentés dans cette étude montrent clairement l'importance des résidus conservés E99/K101 et G121 pour l'effet d'UL24 sur l'expression de R1 dans un contexte de transfection transitoire.

2. Effet d'UL24 sur la régulation génique de R1 virale au niveau des transcrits

HSV-1 régule hautement l'expression de ses gènes ainsi que leur traduction. Par exemple, la protéine virale ICP4 en se liant à des promoteurs spécifiques régule, à la hausse ou à la baisse, l'expression de gènes immédiats précoces et précoces. La protéine virale vhs dégrade les transcrits cellulaires et viraux. Les microARN codés par le virus inhibent la traduction de certains ARNm. Ces mécanismes agissent à chaque étape de la réplication virale en régulant non seulement la transcription *per se* des gènes mais aussi la quantité de transcrits de façon post transcriptionnelle. Nos résultats montrant qu'il y a une diminution de 50% de la quantité de transcrits de R1 en présence d'UL24 suggèrent que cette protéine pourrait exercer son effet via de tels mécanismes. Cette diminution pourrait expliquer en partie l'effet observé au niveau de la protéine R1. Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure que c'est uniquement au niveau de la transcription qu'UL24 régule à la baisse la quantité de protéine R1 dans nos expériences ce qui sera discuté dans la section suivante.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet d'UL24 sur la quantité de transcrits de R1 en contexte de transfection transitoire ainsi que la spécificité observée. Les deux premiers mécanismes que nous proposons sont basés sur nos résultats qui suggèrent que cet effet requiert une activité nucléasique. Les comparaisons de séquences qui ont mené à l'identification du domaine endonucléase dans UL24 suggère que cette nucléase aurait comme substrat l'ADN (Knizewski et al., 2006). La localisation nucléaire de la protéine appuie cette hypothèse. Le premier mécanisme serait qu'UL24 clive spécifiquement le plasmide pLBPfl-GST-R1 au début de la séquence nucléotidique de la R1 à la suite de la reconnaissance soit d'un site spécifique comme un enzyme de restriction ou du haut contenu en GC de ce segment d'ADN viral. Une telle coupure interromprait la transcription de la séquence codante de la R1 mais non celle de la GST. La non détection de GST dans le puits GST-R1 + HA-UL24 à la figure 9 pourrait s'expliquer par le fait que les ARNm tronqués produits dépourvus de sites de polyadénylation n'auraient pas de queue polyA et seraient donc très instables. Ce mécanisme a pour avantage d'expliquer l'absence d'effet d'UL24 sur l'expression de la GST à partir du plasmide contrôle pLBPfl-GST, ce dernier ne contenant pas de séquences cibles pour son

activité nucléase. Le deuxième mécanisme serait semblable au premier sauf que la cible de l'activité enzymatique serait l'ARNm en cours de transcription. Cette possibilité est plus improbable étant donné qu'à notre connaissance une telle activité n'a jamais été décrite pour les membres de la famille des nucléases à motif PD-(D/E)-XK.

D'autres mécanismes n'impliquant pas obligatoirement une activité nucléasique pour UL24 sont plausibles. Certains de ces mécanismes s'appuient sur les résultats de la littérature sur UL76 d'HCMV, un homologue d'UL24 qui serait capable de réguler l'expression de gènes viraux en diminuant ou en augmentant l'expression de promoteurs viraux (Wang et al., 2000). Ainsi, UL24, comme UL76, pourrait réguler l'expression du gène qui code pour la protéine R1 en agissant négativement au niveau du promoteur. Cependant, dans notre étude les gènes de la GST-R1 et de la GST seul étant sous le contrôle du même promoteur exogène, il est hautement improbable qu'UL24 puisse exercer un effet négatif sur R1 sans affecter GST en agissant exclusivement sur le promoteur. Il est donc hautement improbable qu'une action au niveau du promoteur soit à l'origine de l'effet d'UL24 observé dans nos expériences. De plus en contexte d'infection, UL24 étant une protéine à cinétique tardive, un effet d'UL24 au niveau des promoteurs immédiat-précoces ou précoces comme celui de la R1 n'est pas évident. Finalement, une dernière série de mécanismes peut être énumérée pour expliquer l'effet d'UL24 sur les transcrits de R1 en contexte de transfection transitoire ainsi que la spécificité observée tels que des effets sur l'élongation ou la stabilité des transcrits. Pour expliquer la spécificité, la présence de structures particulières dans l'ARNm de la R1 pourrait être évoquée. Cependant, ces mécanismes n'étant appuyés présentement par aucune donnée expérimentale nous ne spéculerons pas davantage sur le sujet.

3. Etude de l'effet d'UL24 sur la régulation du niveau de R1 virale au niveau de l'expression de protéines

La dégradation des protéines cellulaires est hautement régulée par différents mécanismes. La voie de dégradation par le protéasome est en charge de dégrader les protéines qui ont accompli leur fonction dans la cellule et sont donc ciblées pour la dégradation, ainsi que les protéines qui ont des défauts de repliement. La voie de dégradation du lysosome est en charge du recyclage des membranes, de la dégradation de

macromolécules ainsi que de la dégradation d'organelles cellulaires par la formation d'autophagosomes (autophagie).

3.1 Etude de la contribution du protéasome sur la dégradation de R1 par UL24

HSV-1 est capable d'influencer la dégradation des protéines par la voie du protéasome. La protéine ICP0 en s'associant avec des ubiquitines ligases peut cibler des protéines pour leur dégradation par la voie du protéasome (voir introduction, partie 2.4.1). Les expériences décrites dans ce mémoire ont montré que la présence d'UL24 diminue la quantité de R1 dans les cellules. Tout comme ICP0, UL24 pourrait cibler la protéine R1 pour sa dégradation par la voie du protéasome. Afin de tester cette hypothèse, on a inhibé la fonction du protéasome avec deux inhibiteurs spécifiques, le MG132 et l'epoxomicine. Les résultats ont montré qu'en présence de MG132 ou d'epoxomicine les cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST et pLBPfl-HAUL24 présentent toujours moins de R1 que les cellules transfectées avec les plasmides pLBPfl-GST et pLBPfl. Puisque les inhibiteurs du protéasome n'ont pas empêché la réduction dans les niveaux de R1, ça suggère que la voie de dégradation du protéasome n'intervient pas dans ce phénomène.

3.2 Contribution du lysosome sur la dégradation de R1 par UL24

Le protéasome ne semble pas être le responsable de la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24. Néanmoins cette diminution pourrait être due à une dégradation accélérée de la protéine par la voie du lysosome. Afin de tester cette hypothèse, on a utilisé un inhibiteur de l'acidification du lysosome, la bafilomycine A1. Nos résultats avec la bafilomycine A1 montrent que la diminution de la quantité de GST-R1 en présence d'HA-UL24 est similaire dans les cellules traitées et non traitées. Donc, la diminution de l'accumulation de R1 dans les cellules en présence d'UL24 ne semble pas être due à une dégradation par la voie du lysosome.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, un effet d'UL24 sur l'expression de la protéine R1 du HSV-1 a été investigué. Des co-transfections de plasmides qui contiennent le gène codant pour la protéine UL24 attaché à une étiquette d'hémagglutinine et pour la protéine R1 attachée à une étiquette de GST ont été réalisées chez deux types cellulaires différents. Dans les cellules de singe autant que dans les cellules humaines, la quantité de protéine R1 exprimée en présence d'UL24 était inférieure à celle produite quand le plasmide qui code pour GST-R1 a été transfecté seul ou avec le vecteur vide. Afin de caractériser ce phénomène des tests sur la spécificité de l'effet d'UL24 sur R1 ont été réalisés. Ces tests ont montré qu'UL24 diminue l'accumulation de R1 dans les cellules d'une manière dépendante de la dose, et que l'étiquette de GST attachée à la R1 ne semble pas impliquée dans cet effet. Ces résultats montrent que la protéine UL24 d'HSV-1 affecte l'accumulation de R1 dans un contexte de transfection transitoire. Deux plasmides qui contiennent des mutations ciblant des résidus hautement conservés de la protéine UL24 ont été testés afin de voir leur influence sur l'accumulation de R1 dans les cellules. Les résultats montrent que les résidus E99, K101 et G121 sont importants pour la réduction de R1 en présence d'UL24. Les mutations E99 et K101 ciblent le domaine putatif d'endonucléase. Ces résultats prouvent aussi que la protéine UL24 native est importante pour l'effet observé, et suggèrent que le domaine endonucléase est important dans la réduction des niveaux de R1. Néanmoins, d'autres parties de la protéine pourraient aussi être impliquées dans cet effet.

L'étude sur la quantité de transcrits de R1 dans les cellules en présence et en absence d'UL24 a montré qu'il y a une diminution de 50% de la quantité de transcrits de R1 en présence d'UL24. Des études futures seront nécessaires pour déterminer par quel mécanisme UL24 agirait pour diminuer la quantité de transcrits de R1. La diminution dans la quantité de transcrits de R1 ne semble pas être la seule raison expliquant que la quantité de protéine R1 est diminuée en présence d'UL24. Des tests pour voir si cette diminution était due à une dégradation de la protéine R1 par la voie du protéasome ont été réalisés. Les résultats montrent que cette voie de dégradation n'est pas responsable de la diminution de l'accumulation de R1 en présence d'UL24. La voie de dégradation du lysosome a été aussi testée afin de voir si la diminution de R1 en présence d'UL24 est due à une dégradation par cette voie. Les résultats suggèrent que cette voie n'est pas responsable de l'effet observé pour la protéine R1 en

présence d'UL24. D'autres formes de dégradation doivent être testées afin d'écartier l'idée qu'UL24 pourrait agir au niveau de la protéine R1 pour accélérer sa dégradation.

L'étude réalisée montre un effet de la protéine UL24 sur l'expression d'une autre protéine virale R1. Deux questions fondamentales devront être posées pour connaître l'importance de ce phénomène. Premièrement, il faudra déterminer si l'effet observé est spécifique ou non à R1 en examinant si d'autres protéines cellulaires ou virales peuvent être régulées par le même mécanisme. Deuxièmement, il faudra déterminer si en contexte d'infection on observe le même phénomène qu'en transfection transitoire. On pourrait penser que dans un contexte viral, la protéine R1 serait exprimée dans des temps précoces de l'infection où elle joue son rôle réductase, puis ensuite elle s'accumulerait dans la cellule afin de prévenir l'apoptose. La quantité de R1 présente dans les cellules infectées se maintient longtemps pendant le cycle de réplication du virus. Cependant, son accumulation pendant la phase tardive a été peu étudiée (Langelier et al., 2002) et la protéine UL24, permettrait peut-être de réguler à la baisse la quantité de protéine R1 dans cette phase. On peut aussi envisager que la protéine UL24 permettrait d'éviter une surproduction de R1 en diminuant la quantité de transcrits de R1. Une autre possibilité, étant donné l'importance de ces deux protéines dans la neuropathogénèse du HSV-1, serait que dans les cellules neuronales UL24 pourrait réguler la production de la protéine R1, afin de favoriser l'entrée en latence du virus.

Finalement, une étude plus approfondie du mécanisme par lequel UL24 peut influencer l'expression génique permettra de mieux comprendre les fonctions de cette protéine et son rôle dans la pathogénèse virale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, G.P., and Bryans, J.T. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2, 78–144.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Alwine, J. (1974). Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology* 60, 302–307.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.
- Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Imai, T., Minowa, A., Akashi, H., Arase, H., Kawaoka, Y., et al. (2010). Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467, 859–862.
- Arvin, A. (2007). *Human herpesviruses : biology, therapy, and immunoprophylaxis* (Cambridge ; New York: Cambridge University Press).
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P., Roizman, B., Whitley, R., and Yamanishi, K. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Chapter 9, Initiation of transcription and RNA synthesis, processing and transport in HSV and VZV infected cells. (Cambridge University Press).
- Avitabile, E., Lombardi, G., and Campadelli-Fiume, G. (2003). Herpes Simplex Virus Glycoprotein K, but Not Its Syncytial Allele, Inhibits Cell-Cell Fusion Mediated by the Four Fusogenic Glycoproteins, gD, gB, gH, and gL. *Journal of Virology* 77, 6836–6844.
- Avitabile, E., Lombardi, G., Gianni, T., Capri, M., and Campadelli-Fiume, G. (2004). Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *Journal of Virology*. 78, 8015–8025.
- Baines J., and Pellet P.(2007). *Genetic comparison of human alphaherpesvirus genomes - Human Herpesviruses - Chapter 5* (Cambridge University Press).
- Baines J., and Weller S.(2005). *Viral genome packaging machines : genetics, structure, and mechanism- Chapter Category: Viruses-Cleavage and Packaging of Herpes Simplex Virus 1 DNA Herpesvirus Assembly*
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bertrand L. (2011). *Identification et caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1*. Thèse de doctorat. INRS Institut Armand-Frappier.
- Bertrand, L., Leiva-Torres, G.A., Hyjazie, H., and Pearson, A. (2010). Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *Journal of Virology* 84, 109–118.

- Bertrand, L., and Pearson, A. (2008). The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *Journal of General Virology* 89, 1142–1151.
- Besser, J., Ikoma, M., Fabel, K., Sommer, M.H., Zerboni, L., Grose, C., and Arvin, A.M. (2004). Differential requirement for cell fusion and virion formation in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection in skin and T cells. *Journal of Virology*. 78, 13293–13305.
- de Bettignies, G., and Coux, O. (2010). Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie* 92, 1530–1545.
- Blakeney, S., Kowalski, J., Tummolo, D., DeStefano, J., Cooper, D., Guo, M., Gangolli, S., Long, D., Zamb, T., Natuk, R.J., et al. (2005a). Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *Journal of Virology*. 79, 10498–10506.
- Blakeney, S., Kowalski, J., Tummolo, D., DeStefano, J., Cooper, D., Guo, M., Gangolli, S., Long, D., Zamb, T., Natuk, R.J., et al. (2005b). Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *Journal of Virology*. 79, 10498–10506.
- Brandt, C.R., Imesch, P., Spencer, B., Eliassi-Rad, B., Syed, N.A., Untawale, S., Robinson, N.L., and Albert, D.M. (1997). The herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase is required for acute retinal disease. *Archives of Virology*. 142, 883–896.
- Brandt, C.R., Kintner, R.L., Pumfery, A.M., Visalli, R.J., and Grau, D.R. (1991). The herpes simplex virus ribonucleotide reductase is required for ocular virulence. *Journal of General Virology*. 72 (Pt 9), 2043–2049.
- Bryant, H.E., Wadd, S.E., Lamond, A.I., Silverstein, S.J., and Clements, J.B. (2001). Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *Journal of Virology*. 75, 4376–4385.
- Chabaud, S., Lambert, H., Sasseville, A.M.-J., Lavoie, H., Guilbault, C., Massie, B., Landry, J., and Langelier, Y. (2003). The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase has chaperone-like activity similar to Hsp27. *FEBS Lett*. 545, 213–218.
- Chabaud, S., Sasseville, A.M.-J., Elahi, S.M., Caron, A., Dufour, F., Massie, B., and Langelier, Y. (2007). The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *Journal of General Virology*. 88, 384–394.
- Chayavichitsilp, P., Buckwalter, J.V., Krakowski, A.C., and Friedlander, S.F. (2009). Herpes simplex. *Pediatr Rev* 30, 119–129; quiz 130.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., and Martignetti, J.A. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topic in Microbiology. Immunology* 154, 125–169.
- Chen, I.-H.B., Li, L., Silva, L., and Sandri-Goldin, R.M. (2005). ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *Journal of Virology*. 79, 3949–3961.

- Chen, I.-H.B., Sciabica, K.S., and Sandri-Goldin, R.M. (2002). ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *Journal of Virology*. *76*, 12877–12889.
- Chowdary, T.K., Cairns, T.M., Atanasiu, D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Heldwein, E.E. (2010). Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature Structural & Molecular Biology*. *17*, 882–888.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y.J.T., and Shukla, D. (2006). A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *Journal of Cell Biology*. *174*, 1009–1021.
- Cocchi, F., Fusco, D., Menotti, L., Gianni, T., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., and Campadelli-Fiume, G. (2004). The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A.* *101*, 7445–7450.
- Cockrell, S.K., Sanchez, M.E., Erazo, A., and Homa, F.L. (2008). Role of the UL25 Protein in Herpes Simplex Virus DNA Encapsidation. *Journal of Virology* *83*, 47–57.
- Coen, D.M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J.G., Leib, D.A., Bogard, C.L., Schaffer, P.A., Tyler, K.L., and Knipe, D.M. (1989). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A.* *86*, 4736–4740.
- Coen, D.M., Weinheimer, S.P., and McKnight, S.L. (1986). A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* *234*, 53–59.
- Cole, N.L., and Grose, C. (2003). Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Reviews in Medical Virology*. *13*, 207–222.
- Connolly, S.A., Jackson, J.O., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Natures Reviews in Microbiology*. *9*, 369–381.
- Cook, W.J., and Coen, D.M. (1996). Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 UL24 mRNA expression via differential polyadenylation. *Virology* *218*, 204–213.
- Cooper, Geoffrey M., and Hausman, R. E. (2009). *The Cell*. Chapter 7 RNA Synthesis and Processing. (Sinauer Associates Inc).
- Corey, L., Adams, H.G., Brown, Z.A., and Holmes, K.K. (1983). Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Annals of Internal Medicine*. *98*, 958–972.
- Cotter, C.R., Kim, W.-K., Nguyen, M.L., Yount, J.S., López, C.B., Blaho, J.A., and Moran, T.M. (2011). The Virion Host Shutoff Protein of Herpes Simplex Virus 1 Blocks the Replication-Independent Activation of NF- κ B in Dendritic Cells in the Absence of Type I Interferon Signaling. *Journal of Virology*. *85*, 12662–12672.

Cui, C., Griffiths, A., Li, G., Silva, L.M., Kramer, M.F., Gaasterland, T., Wang, X.-J., and Coen, D.M. (2006). Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *Journal of Virology*. *80*, 5499–5508.

Cullen, B.R. (2000). Connections between the processing and nuclear export of mRNA: evidence for an export license? *Proceedings of the National Academy of Science*. U.S.A. *97*, 4–6.

Dalet, A., Robbins, P.F., Stroobant, V., Vigneron, N., Li, Y.F., El-Gamil, M., Hanada, K. -i., Yang, J.C., Rosenberg, S.A., and Van den Eynde, B.J. (2011). PNAS Plus: An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, E323–E331.

Davis, L.E., and McLaren, L.C. (1983). Relapsing herpes simplex encephalitis following antiviral therapy. *Annals of Neurology*. *13*, 192–195.

Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., and Thiry, E. (2008). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. *154*, 171–177.

Döhner, K., and Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. *285*, 67–108.

Dominguez, G., Dambaugh, T.R., Stamey, F.R., Dewhurst, S., Inoue, N., and Pellett, P.E. (1999). Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *Journal of Virology*. *73*, 8040–8052.

Dufour, F., Bertrand, L., Pearson, A., Grandvaux, N., and Langelier, Y. (2011a). The Ribonucleotide Reductase R1 Subunits of Herpes Simplex Virus 1 and 2 Protect Cells against Poly(I {middle dot} C)-Induced Apoptosis. *Journal of Virology* *85*, 8689–8701.

Dufour, F., Sasseville, A.M.-J., Chabaud, S., Massie, B., Siegel, R.M., and Langelier, Y. (2011b). The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* *16*, 256–271.

Elgadi, M.M., Hayes, C.E., and Smiley, J.R. (1999). The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts. *Journal of Virology*. *73*, 7153–7164.

Enquist, L.W., Husak, P.J., Banfield, B.W., and Smith, G.A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances in Virus Research*. *51*, 237–347.

Everly, D.N., Jr, Feng, P., Mian, I.S., and Read, G.S. (2002). mRNA degradation by the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: genetic and biochemical evidence that Vhs is a nuclease. *Journal of Virology*. *76*, 8560–8571.

Fatahzadeh, M., and Schwartz, R. (2007a). Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* *57*, 737–763.

Fatahzadeh, M., and Schwartz, R.A. (2007b). Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 57, 737–763; quiz 764–766.

Foster, T.P., Chouljenko, V.N., and Kousoulas, K.G. (2008). Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *Journal of Virology.* 82, 6310–6323.

Foster, T.P., Melancon, J.M., Baines, J.D., and Kousoulas, K.G. (2004). The Herpes Simplex Virus Type 1 UL20 Protein Modulates Membrane Fusion Events during Cytoplasmic Virion Morphogenesis and Virus-Induced Cell Fusion. *Journal of Virology* 78, 5347–5357.

Geiss, B.J., Smith, T.J., Leib, D.A., and Morrison, L.A. (2000). Disruption of virion host shutoff activity improves the immunogenicity and protective capacity of a replication-incompetent herpes simplex virus type 1 vaccine strain. *Journal of Virology.* 74, 11137–11144.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.

Goldstein, D.J., and Weller, S.K. (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. *Journal of Virology.* 62, 196–205.

Grunewald, K. (2003). Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* 302, 1396–1398.

Hagglund, R., and Roizman, B. (2002). Characterization of the novel E3 ubiquitin ligase encoded in exon 3 of herpes simplex virus-1-infected cell protein 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 99, 7889–7894.

Hagglund, R., and Roizman, B. (2004). Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *Journal of Virology.* 78, 2169–2178.

Hann, L.E., Cook, W.J., Uprichard, S.L., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (1998). The role of herpes simplex virus ICP27 in the regulation of UL24 gene expression by differential polyadenylation. *Journal of Virology.* 72, 7709–7714.

Hay, J., and Ruyechan, W.T. (2007). *Alphaherpesvirus DNA replication.* -Human herpesvirus-Chapter 10. (Cambridge University Press).

Honess, R.W., and Roizman, B. (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 72, 1276–1280.

Hong-Yan, Z., Murata, T., Goshima, F., Takakuwa, H., Koshizuka, T., Yamauchi, Y., and Nishiyama, Y. (2001). Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* 22, 321–327.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO JOURNAL* 30, 3481–3500.

Isomura, H., Stinski, M.F., Murata, T., Nakayama, S., Chiba, S., Akatsuka, Y., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PLoS ONE* 5, e11901.

Ito, H., Sommer, M.H., Zerboni, L., Baiker, A., Sato, B., Liang, R., Hay, J., Ruyechan, W., and 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. *Journal of Virology*. 79, 4819–4827.

Jacobson, J.G., Chen, S.H., Cook, W.J., Kramer, M.F., and Coen, D.M. (1998). Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* 242, 161–169.

Jacobson, J.G., Martin, S.L., and Coen, D.M. (1989). A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *Journal of Virology*. 63, 1839–1843.

Jarvis, M.A., and Nelson, J.A. (2002). Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Current Opinion in Microbiology*. 5, 403–407.

Johnson, D.C., and Baines, J.D. (2011). Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature Reviews in Microbiology* 9, 382–394.

Jones, F.E., Smibert, C.A., and Smiley, J.R. (1995). Mutational analysis of the herpes simplex virus virion host shutoff protein: evidence that vhs functions in the absence of other viral proteins. *Journal of Virology*. 69, 4863–4871.

Karr, B.M., and Read, G.S. (1999). The virion host shutoff function of herpes simplex virus degrades the 5' end of a target mRNA before the 3' end. *Virology* 264, 195–204.

Kasem, S., Yu, M.H.H., Yamada, S., Kodaira, A., Matsumura, T., Tsujimura, K., Madbouly, H., Yamaguchi, T., Ohya, K., and Fukushi, H. (2010). The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400, 259–270.

Kleymann, G. (2003). Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opinions in Investigational Drugs* 12, 165–183.

Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N.V., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2006). Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *Journal of Virology*. 80, 2575–2577.

Kosinski, J., Feder, M., and Bujnicki, J.M. (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.

Kramer, M.F., Jurak, I., Pesola, J.M., Boissel, S., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2011). Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia. *Virology* 417, 239–247.

- Kubat, N.J., Amelio, A.L., Giordani, N.V., and Bloom, D.C. (2004). The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. *Journal of Virology*. 78, 12508–12518.
- Lam, Q., Smibert, C.A., Koop, K.E., Lavery, C., Capone, J.P., Weinheimer, S.P., and Smiley, J.R. (1996). Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *Embo Journal*. 15, 2575–2581.
- Langelier, Y., Bergeron, S., Chabaud, S., Lippens, J., Guilbault, C., Sasseville, A.M.-J., Denis, S., Mosser, D.D., and Massie, B. (2002). The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *Journal of General Virology* 83, 2779–2789.
- Langelier, Y., Champoux, L., Hamel, M., Guilbault, C., Lamarche, N., Gaudreau, P., and Massie, B. (1998). The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is a good substrate for host cell protein kinases but is not itself a protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 1435–1443.
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi, R., and Glorioso, J.C. (1998). Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of Virology*. 72, 6119–6130.
- Leiva-Torres, G.A., Rochette, P.-A., and Pearson, A. (2010). Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *Journal of General Virology*. 91, 1109–1116.
- Livak, K. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lopez, P., Van Sant, C., and Roizman, B. (2001). Requirements for the nuclear-cytoplasmic translocation of infected-cell protein 0 of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*. 75, 3832–3840.
- Loret, S., Guay, G., and Lippé, R. (2008). Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of Virology*. 82, 8605–8618.
- Lu, P., Jones, F.E., Saffran, H.A., and Smiley, J.R. (2001). Herpes simplex virus virion host shutoff protein requires a mammalian factor for efficient in vitro endoribonuclease activity. *Journal of Virology*. 75, 1172–1185.
- Lukashchuk, V., and Everett, R.D. (2010). Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx. *Journal of Virology* 84, 4026–4040.
- Lymberopoulos, M.H., and Pearson, A. (2007). Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363, 397–409.
- Maher, P. (2008). Proteasome inhibitors prevent oxidative stress-induced nerve cell death by a novel mechanism. *Biochemical Pharmacology* 75, 1994–2006.

- Masuda, H., Fukabori, Y., Nakano, K., Shimizu, N., and Yamanaka, H. (2004). Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate. *Prostate* 59, 101–106.
- McGeoch, D. (1995). Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* 247, 443–458.
- McGeoch, D.J. (1987). The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution. *Journal of Cell Science Supplements* 7, 67–94.
- McGeoch, D.J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F.E., and Telford, E.A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* 247, 443–458.
- McGeoch, D.J., Cunningham, C., McIntyre, G., and Dolan, A. (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. *Journal of General Virology*. 72 (Pt 12), 3057–3075.
- McGregor, F., Phelan, A., Dunlop, J., and Clements, J.B. (1996). Regulation of herpes simplex virus poly (A) site usage and the action of immediate-early protein IE63 in the early-late switch. *Journal of Virology*. 70, 1931–1940.
- Megaw, A.G., Rapaport, D., Avidor, B., Frenkel, N., and Davison, A.J. (1998). The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* 244, 119–132.
- Meng, L. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 10403–10408.
- Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology*. 76, 1537–1547.
- Milne, R.S.B., Nicola, A.V., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H. (2005). Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*. 79, 6655–6663.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427–436.
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., et al. (2010). The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathogenes*. 6, e1001038.
- Nascimento, R., Costa, H., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2011). MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Archives of Virology*. 156, 375–386.
- Nascimento, R., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2009). The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Archives of Virology*. 154, 1143–1149.
- Nascimento, R., and Parkhouse, R.M.E. (2007). Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *Journal of General Virology*. 88, 1446–1453.

Pagano, M., Jordan, J.D., Neves, S.R., Nguyen, T., and Iyengar, R. (2008). G α /i-stimulated proteosomal degradation of RGS20: A mechanism for temporal integration of Gs and Gi pathways. *Cellular Signalling* 20, 1190–1197.

Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 90, 8392–8396.

Pearson, A., and Coen, D.M. (2002). Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 76, 10821–10828.

Pearson, A., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2004). ICP27 selectively regulates the cytoplasmic localization of a subset of viral transcripts in herpes simplex virus type 1-infected cells. *Journal of Virology*. 78, 23–32.

Pertel, P.E., Fridberg, A., Parish, M.L., and Spear, P.G. (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, 313–324.

Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods* 2, 269–276.

Poon, A.P.W., Silverstein, S.J., and Roizman, B. (2002). An early regulatory function required in a cell type-dependent manner is expressed by the genomic but not the cDNA copy of the herpes simplex virus 1 gene encoding infected cell protein 0. *Journal of Virology*. 76, 9744–9755.

Preston C., and Efstathiou S. (2007). *Molecular basis of HSV latency and reactivation - Human Herpesviruses - Chapter 33* (Cambridge University Press).

Read, G.S., and Frenkel, N. (1983). Herpes simplex virus mutants defective in the virion-associated shutoff of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of alpha (immediate early) viral polypeptides. *Journal of Virology*. 46, 498–512.

Read, G.S., Karr, B.M., and Knight, K. (1993). Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion in the virion host shutoff gene and identification of multiple forms of the vhs (UL41) polypeptide. *Journal of Virology*. 67, 7149–7160.

Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 326–331.

Roizman, B., Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P., Whitley, R., Yamanishi, K., and Taddeo, B. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Chapter 13, The strategy of the herpes simplex virus replication and takeover of the host cell.* (Cambridge University Press).

Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., and Studdert, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology* 123, 425–449.

- Rozen, S., and Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*.
- Ruyechan, W.T., Morse, L.S., Knipe, D.M., and Roizman, B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *Journal of Virology*. *29*, 677–697.
- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L., and Renne, R. (2005). Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology*. *79*, 9301–9305.
- Sciabica, K.S., Dai, Q.J., and Sandri-Goldin, R.M. (2003). ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *Embo Journal*. *22*, 1608–1619.
- Shieh, M.T., WuDunn, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D., and Spear, P.G. (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Cell Biology*. *116*, 1273–1281.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., and Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* *99*, 13–22.
- Siew, V.-K., Duh, C.-Y., and Wang, S.-K. (2009). Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *Journal of Biomedical Science*. *Sci*. *16*, 107.
- Steiner, I., Kennedy, P.G., and Pachner, A.R. (2007). The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *The Lancet Neurology* *6*, 1015–1028.
- Strom, T., and Frenkel, N. (1987). Effects of herpes simplex virus on mRNA stability. *Journal of Virology*. *61*, 2198–2207.
- Stubbe, J. (1990). Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *Journal of Biological Chemistry* *265*, 5329–5332.
- Suenaga, T., Satoh, T., Somboonthum, P., Kawaguchi, Y., Mori, Y., and Arase, H. (2010). Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* *107*, 866–871.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. *41*, 105–178.
- Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M., and Cullen, B.R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* *454*, 780–783.
- Wagner, E.K., Guzowski, J.F., and Singh, J. (1995). Transcription of the herpes simplex virus genome during productive and latent infection. *Prog. Nucleic Acid Res. Molecular Biology* *51*, 123–165.
- Wang, S.K., Duh, C.Y., and Chang, T.T. (2000). Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* *81*, 2407–2416.

Wang, S.-K., Duh, C.-Y., and Wu, C.-W. (2004). Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *Journal of Virology* 78, 9750–9762.

Wen, K.W., and Damania, B. (2010). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett.* 289, 140–150.

Whitbeck, J.C., Lawrence, W.C., and Bello, L.J. (1994). Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* 200, 263–270.

Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357, 1513–1518.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington’s disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature Chemical Biology* 4, 295–305.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Structure and Function* 23, 33–42.

Zabolotny, J.M., Krummenacher, C., and Fraser, N.W. (1997). The herpes simplex virus type 1 2.0-kilobase latency-associated transcript is a stable intron which branches at a guanosine. *Journal of Virology*. 71, 4199–4208.

Zenklusen, D., and Stutz, F. (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* 498, 150–156.