

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

RÉORGANISATION NUCLÉOLAIRE DES NEURONES SUITE À UNE INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX 1

Par

Amélie BOURGET

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de *Magister Scientiæ*, M.Sc
en sciences de **virologie et immunologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Nom : Pierre Talbot
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Nom : Éric Rassart
Université du Québec

Directeur de recherche

Nom : Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) infecte les cellules épithéliales des muqueuses buccales causant des lésions. Le VHS-1 infecte aussi les neurones du ganglion trijumeau (TG) et y entre en latence. À la suite d'un stress, le virus se réactive et se réplique dans les neurones du TG permettant ainsi sa dissémination. Par conséquent, les neurones sont critiques à la pathogenèse du VHS-1.

La protéine UL24 du VHS-1 est importante pour la réplication virale en culture cellulaire, ainsi que dans un modèle murin d'infection pour de hauts titres viraux dans les TGs et pour la réactivation. Au cours du cycle viral, UL24 se localise au noyau, au nucléole ainsi qu'au cytoplasme. La partie N-terminale de la protéine est conservée avec cinq domaines d'homologies (HDs) contenant des acides aminés hautement conservés qui sont importants pour la pathogenèse.

Au cours de l'infection des fibroblastes, le VHS-1 induit plusieurs modifications au nucléole. Les protéines B23, nucléoline, fibrillarine et des composantes de la machinerie de transcription de l'ARN pol I (UBF et RPA194) sont relocalisées durant l'infection. Certains de ces phénomènes sont dépendants d'UL24 comme pour la nucléoline et de B23, contrairement à la relocalisation de la fibrillarine, d'UBF et de RPA194 qui sont indépendants d'UL24. Notre hypothèse de départ était qu'UL24 perturbe le nucléole des neurones pour ainsi faciliter la réplication du VHS-1.

Pour tester cette hypothèse, l'étude de la réplication virale et l'effet d'UL24 sur le nucléole dans les neurones ont été effectués en utilisant deux modèles neuronaux : les cellules humaines LA-N-5 et les cultures primaires neuronales de souris. Nous avons déterminé qu'UL24 était important pour la réplication virale dans les neurones humains LA-N-5 et les neurones de culture primaire, puisqu'en son absence une réduction 1 log₁₀ des titres viraux a été observée. Néanmoins, cette diminution n'est pas suffisante pour expliquer la réduction importante des titres viraux dans les TGs observée dans un modèle murin d'infection oculaire.

L'impact d'UL24 sur le nucléole des neurones humains du modèle LA-N-5 a été étudié. Nous avons observé que la redistribution de la nucléoline était dépendante d'UL24 contrairement à la délocalisation de B23 et d'UBF qui étaient des phénomènes indépendants de cette protéine. Par ailleurs, nous avons déterminé que la réplication

virale est nécessaire pour induire des modifications au nucléole autant dans les fibroblastes que dans les neurones; puisqu'un virus UV-inactivé n'induit pas de changements dans la localisation des protéines du nucléole. Nous avons observé qu'UBF est recruté aux compartiments de réplication viraux suggérant que cette protéine aurait un rôle dans le cycle du VHS-1 dans les neurones. Finalement, les changements observés au nucléole n'ont pas été accompagnés de changements drastiques dans les niveaux des protéines nucléolaires. Nos résultats supportent un rôle pour le nucléole dans la réplication du VHS-1 dans les neurones.

Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, pour son appui et son encadrement durant mes études. Je suis reconnaissante de la confiance, de l'encouragement et de la compréhension donnés pour m'aider à me surpasser. Merci également pour le congrès international auquel j'ai eu l'opportunité de présenter mes résultats.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire passés et présents pour leur aide et support. Grâce à eux, Luc Bertrand, Maria Lymberopoulos, Alexandre Rochette-Legros, Huda Hyjazie, Gabriel Ouellet, Carolina Sanabria, Nawel Ben Abdeljelil, Annie Rochette et Ginette Denis, ces années ont été très agréables. Merci pour vos encouragements.

Merci également à Marcel Desrosiers pour l'entraînement en microscopie confocale. J'aimerais remercier Suzanne Lemieux de m'avoir donné la chance de participer au programme Apprentis en Bioscience; ce fut une expérience enrichissante. Merci aussi à Dominique Favreau et Hélène Jacomy du laboratoire de Pierre Talbot pour leur aide avec les cultures de neurones.

J'aimerais aussi remercier, Mohamed Hijri, Jean Rivoal et Daniel Philippe Matton, professeurs à l'Université de Montréal, pour m'avoir initié à la recherche et m'avoir transmis le goût de poursuivre en recherche.

J'aimerais remercier ma famille pour m'avoir encouragé durant toutes ces années à poursuivre mes études et à me dépasser. Finalement, merci à Jean-François Caouette avec qui j'ai partagé ma vie durant ces années. Sans son appui, son encouragement et son écoute, je ne serais pas là où j'en suis maintenant! Tu as rendu ces années très belles!

Abréviations

ADNr : ADN ribosomal

ARNm : ARN messenger

ARN pol I : ARN polymérase I

ARNr: ARN ribosomal

BHV-1 : « *bovine herpes virus 1* »

Brn-3.0 : « *Brain-specific homeobox 3.0* »

CBs : « *cajal bodies* » ou corps de cajal

CDC : « *Center for disease control and prevention* » ou Centre de contrôle des maladies et de prévention

CDK : « *cyclin-dependant kinase* » ou kinase dépendante de cyclines

CK-II : « *casein kinase II* »

CMV: Cytomégalovirus

CRE : « *cAMP-responsive element* » ou élément AMPc réponse

DFC : « *dense fibrillar center* » ou centre fibrillaire dense

DRG : « *dorsal root ganglion* » ou ganglion de la racine dorsale

EBV: Epstein-Barr virus

FC : « *fibrillar center* » ou centre fibrillaire

GC : « *granular center* » ou centre granulaire

HCF : « *host cell factor* » ou facteur de la cellule hôte

HD : « *homology domains* » ou domaines d'homologie

hpi: heures post-infection

HS : héparine sulfate

HHV : « *human herpes viruses* » ou virus herpès humain

HVEM : « *herpes virus entry mediator* » ou médiateur d'entrée aux herpèsvirus

ICP : « *Infected cell protein* » protéine de la cellule infectée

ICTV : « *International Committee on Taxonomy of Viruses* » ou Comité international de la taxonomie des virus

KSHV: « *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* »

LAP : « *latency-active promoter* » ou promoteur actif de la latence

LATs: « *latency associated-transcripts* » ou transcrits associés à la latence

LSD1 : « *lysine-specific demethylase* » ou déméthylase lysine spécifique

MOI : multiplicité d'infection

MuHV4 : « *murine herpes virus 4* »

NES : « *nuclear export signal* » ou signal d'export nucléaire

ND-10: « *Nuclear domain 10* » ou domaine nucléaire 10

NDF: « *nucleolus-derived foci* »

NGF : « *nerve growth factor* » ou facteur de croissance neuronal

NLS : « *nuclear import signal* » ou signal d'import nucléaire

NoLS : « *nucleolar import signal* » ou signal d'import nucléolaire

N-Oct 3: « *neuron octamer transcription factor 3* »

NORs : « *Nucleolar organizer regions* » ou régions organisatrices nucléolaires

Oct-1 : « *octamer binding protein-1* »

Olf-1: « *olfactory neuron-specific transcription factor-1* »

ORF : « *open reading frame* » ou cadre de lecture ouvert

PML : « *promyelocytic leukemia* » ou leucémie promyélocytaire

PNBs: « *prenucleolar bodies* » ou corps périnucléolaire

siRNA : « *small interference RNA* » ou petit ARN interférant

RNP : « *ribonucleoprotein* » ou ribonucléoprotéine

snRNPs ou snoRNPs : « *small nucleolar ribonucleoproteins* » ou petite ribonucléoprotéine nucléolaire

TG : ganglion trijumeau

UBF: « *upstream binding factor* »

UCE : « *upstream control element* »

U_L : région unique longue

U_S : région unique courte

vhs : « *virion host shut-off* »

VHS-1 : Virus herpès simplex 1

VHS-2 : Virus herpès simplex 2

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VP: « *virion protein* » ou protéine du virion

VRCs: « *viral replication compartments* » ou compartiments de réplication viraux

VZV: Varicella zoster virus

Table des matières

Résumé	II
Remerciements	IV
Abréviations	V
Table des matières	VIII
Liste des figures	XII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Le virus de l'herpès simplex	2
1.1.1 La taxonomie des virus herpès.....	2
1.1.2 La pathogenèse du virus de l'herpès simplex 1	2
1.1.3 La structure du virus de l'herpès simplex.....	4
1.1.4 Le cycle de réplication.....	6
1.1.5 La latence et la réactivation du virus de l'herpès simplex	10
1.1.5.1 Résumé du cycle de latence/réactivation	10
1.1.5.2 Contrôle de la latence	11
1.1.5.3 Les transcrits LATs.....	13
1.1.6 L'infection neuronale par le virus de l'herpès simplex 1	14
1.2. Le nucléole.....	16
1.2.1 La morphologie du nucléole	16
1.2.2 Les diverses fonctions du nucléole	17
1.2.2.1 Le rôle du nucléole dans le cycle cellulaire	17
1.2.2.2 Régulation du cycle cellulaire	18
1.2.2.3 La biogenèse des ribosomes.....	19
1.2.3 Les protéines majeures du nucléole	20
1.2.3.1 Nucléoline (C23).....	21

1.2.3.2 B23 (Nucléophosmine /NPM1).....	22
1.2.3.3 Machinerie de transcription de l'ARN polymérase I.....	24
1.2.4 Le nucléole et les neurones	26
1.2.5 Les modifications du nucléole par les virus	27
1.3. La protéine virale UL24.....	30
1.3.1 La conservation d'UL24 chez les herpèsvirus.....	30
1.3.2 Les caractéristiques d'UL24.....	30
1.3.2.1 L'expression de la protéine UL24	30
1.3.2.2 Le motif d'endonucléase d'UL24.....	32
1.3.3 L'importance d'UL24 en culture cellulaire et dans la pathogenèse.....	33
1.4. Modèles neuronaux pour l'infection virale.....	34
1.4.1 Les lignées cellulaires	34
1.4.1.1 Les cellules PC12.....	34
1.4.1.2 Les cellules NT2	35
1.4.1.3 Les cellules SK-SY5Y	36
1.4.1.4 Les cellules LA-N-5	37
1.4.2 Cultures primaires.....	37
1.4.2.1 Culture de neurones d'hippocampe.....	37
1.4.2.2 Culture de neurones de ganglions dorsaux.....	38
2. Problématique.....	39
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	40
2.1 Cellules	41
2.1.1 Lignées cellulaires	41
2.1.2 Processus de différenciation neuronale des cellules LA-N-5	42
2.1.2.1 Préparation de la solution d'acide rétinoïque	42

2.1.2.2 Préparation pour la différenciation de neurones LA-N-5.....	42
2.1.2.3 Différenciation neuronale de cellules LA-N-5.....	42
2.1.4 Cultures primaires neuronales de souris.....	43
2.2 Virus	44
2.2.1 Origine des souches virales et production de stocks viraux	44
2.2.2 Détermination des titres viraux	45
2.2.3 Production du virus KOS UV-inactivé	46
2.3 Cinétique d'infection	46
2.3.1 Cinétique d'infection dans les cellules LA-N-5 différenciées en neurones	46
2.3.2 Cinétique d'infection dans les neurones en culture primaire	47
2.4 Immunofluorescence indirecte	47
2.4.1 Infection	47
2.4.2 Technique d'immunomarquage	48
2.4.3 Anticorps pour les expériences de microscopie confocale	49
2.4.4 Microscopie confocale.....	50
2.5 Immunobuvardage de type Western.....	50
2.5.1 Infection et lyse des cellules	50
2.5.2 Précipitation au TCA.....	51
2.5.3 Immunobuvardage de type Western.....	52
2.5.4 Anticorps pour les expériences d'immunobuvardage de type Western	52
CHAPITRE 3: RÉSULTATS.....	54
3.1 Caractérisation du modèle LA-N-5	55
3.2 Effet de la protéine virale UL24 sur la réplication dans les neurones.....	57
3.3 La réplication virale dans les cultures primaires neuronales de souris	59

3.3.1 Expression des protéines virales est retardée dans les cultures primaires neuronales de souris.....	59
3.3.2 La réplication virale dans les neurones en culture primaire et l'effet d'UL24 ...	61
3.3.3 Impact d'UL24 sur l'expression génique des différentes classes cinétiques de gènes viraux dans les cultures primaires neuronales de souris.....	62
3.4 La réorganisation du nucléole des neurones en contexte d'infection.....	64
3.4.1 La réplication virale est nécessaire pour induire des modifications au nucléole.....	64
3.4.2 La localisation de la protéine UL24 en contexte d'infection.....	68
3.4.3 L'effet d'UL24 sur le nucléole.....	70
3.4.4 UBF est recruté dans les compartiments de réplication viraux.....	71
3.4.5 Les niveaux des protéines nucléolaires.....	73
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	75
4.1 L'impact de la protéine virale UL24 sur la réplication virale dans les neurones.....	76
4.1.1 Le modèle LA-N-5.....	76
4.1.2 Le modèle des cultures primaires neuronales de souris.....	77
4.2 Le VHS-1 affecte le nucléole des neurones lors de l'infection.....	79
4.2.1 La réplication virale est nécessaire pour induire des modifications au nucléole.....	79
4.2.2 Effet du VHS-1 sur le nucléole des neurones et le rôle d'UL24 dans ces modifications.....	80
CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	83
Références.....	86
Annexe I.....	111

Liste des figures

Figure 1. Schéma montrant la structure du virion de VHS-1	5
Figure 2. Cycle de réplication du VHS-1.....	9
Figure 3. Schéma résumant le cycle d'infection du VHS-1.....	10
Figure 4. Schéma illustrant la biogenèse des ribosomes.....	19
Figure 5. Représentation schématique de la nucléoline	20
Figure 6. Schéma représentant les domaines de la protéine B23	22
Figure 7. Complexe de préinitiation de la transcription de l'ARN pol I	24
Figure 8. Représentation schématique de la protéine UBF	25
Figure 9. Schéma représentatif des transcrits du gène <i>UL24</i> du VHS-1	32
Figure 10. Schéma démontrant la méthode utilisée pour générer les neurones (NT2-N) à partir des cellules NT2 par un traitement à l'acide rétinoïque et d'inhibiteurs mitotiques.....	35
Figure 11. Caractérisation des neurones du modèle LA-N-5.....	56
Figure 12. Effet d'UL24 sur la réplication virale dans les neurones.....	58
Figure 13. Les cultures primaires de neurones de souris.....	60
Figure 14. Expression de protéines virales lors de l'infection de neurones en culture primaire de souris par le VHS-1.....	61
Figure 15. UL24 affecte la réplication virale dans les neurones en culture primaire de souris.....	62
Figure 16. L'expression des protéines virales dans les neurones en culture primaire de souris.....	64
Figure 17. La réplication virale est nécessaire pour les modifications nucléolaires induites par le VHS-1 dans les fibroblastes et des neurones.....	66

Figure 18. Localisation cellulaire de HA-UL24 au cours de l'infection des neurones	68
Figure 19. Effet d'UL24 sur le nucléole des neurones.....	70
Figure 20. UBF est recruté aux VRCs au cours de l'infection dans les neurones.....	71
Figure 21. Niveaux d'expression des protéines du nucléole dans les neurones lors d'une infection.....	72
Figure 22. La redistribution de B23 survient tardivement au cours de l'infection par le virus herpès simplex 1.....	109
Figure 23. L'impact d'UL24 sur la distribution de B23.....	110
Figure 24. Quantification du patron de distribution de B23 dans les cellules cos-7 transfectées transitoirement par les différents variants de HA-UL24.....	111

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le virus de l'herpès simplex

1.1.1 La taxonomie des virus herpès

La classification des herpèsvirus a été modifiée dernièrement par le « *International Committee on Taxonomy of Viruses* » (ICTV) [68]. L'ordre des *Herpesvirales* comprend trois familles : la famille des *Herpesviridae* qui inclut des virus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles; la famille des *Alloherpesviridae* qui comprend des virus de grenouilles et de poissons; la famille des *Malacoherpesviridae* qui contient un virus de bivalve. Ensuite, trois sous-familles qui tiennent compte de la génétique composent la famille des *Herpesviridae* [69-71]: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*. Il existe huit herpès virus humains. Les *Alphaherpesvirinae* sont des virus neurotropes ayant un cycle de réplication court. Cette sous-famille comprend les virus de l'herpès simplex 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2) et varicella zoster virus (VZV). Les *Betaherpesvirinae* ont un tropisme lymphoïde et leur cycle de réplication est long. Cette sous-famille contient le cytomégalovirus (CMV), les herpèsvirus humains 6 et 7 (HHV-6 et 7). Enfin, les *Gammaherpesvirinae* se répliquent lentement dans les cellules épithéliales et ils ont aussi un tropisme lymphoïde, cependant ils sont oncogéniques [103]. Les *Gammaherpesvirinae* incluent le virus Epstein-Barr (EBV) et le « Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus » (KSHV).

1.1.2 La pathogenèse du virus de l'herpès simplex 1

Les infections par le VHS-1 sont répandues dans le monde entier autant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement [370]. Il est estimé qu'environ 60 % à 95 % des adultes sont infectés par le VHS-1 (revue [51]). L'âge, la situation géographique et socioéconomique des personnes sont des facteurs qui influencent la fréquence des infections herpétiques. La prévalence aux infections par le VHS-1 augmente avec l'âge passant de 40 % chez les jeunes personnes de 15 ans à 60-90 % chez les personnes âgées (revue [51]). L'humain est le seul réservoir pour le VHS-1.

La transmission du virus se fait par contact direct résultant à une infection primaire où le virus se réplique et cause des lésions. L'infection peut être soit asymptomatique [369] ou avec des symptômes d'intensité moyenne comme la fièvre,

des lésions ulcéreuses et vésiculaires, de l'inflammation; mais l'infection est rarement mortelle [103]. En fonction de la région affectée, la personne peut développer des lésions buccales (feux sauvages) ou des lésions oculaires (kératites). Le VHS-1 peut aussi causer des infections cutanées connues sous le nom d'eczéma herpétique qui est plus fréquent chez les dentistes. Il existe aussi une forme d'herpès, *herpes gladiatorum*, chez les personnes pratiquant un sport de contact comme la lutte (revue [51, 365]). Lors de l'infection primaire, le virus peut aussi infecter les terminaisons axonales des neurones situés dans le ganglion trijumeau (TG) pour établir une latence, mais le virus peut aussi se répliquer et causer une encéphalite. En absence de traitement, l'encéphalite herpétique est mortelle dans 70 % des cas. Les personnes ayant eu une encéphalite peuvent avoir des séquelles neurologiques graves. Le Centre de contrôle des maladies et prévention (CDC) aux États-Unis estime environ 40 à 50 cas d'encéphalite reliés au VHS-1 par an [371]. Lorsque la personne subit un stress physique ou émotionnel, le virus peut se réactiver. Le virus se réplique causant des infections récurrentes au site primaire d'infection qui sont accompagnées de douleurs, brûlements, picotements ou démangeaisons six heures avant l'apparition de vésicules [326]. La guérison est complète entre huit à dix jours suivant le début des symptômes. Des kératites récurrentes sont une des causes infectieuses importantes de cécité dans les pays développés [204, 347].

Les infections chez les nouveau-nés peuvent être acquises durant la grossesse (*in utero*) ou après la naissance (*intrapartum* ou postnatale). La route de transmission la plus fréquente survient lors d'un accouchement par voie naturelle lorsque le fœtus entre en contact avec les sécrétions maternelles infectées [40, 162, 242]. L'infection néonatale est variable en symptômes et est fréquemment mortelle. L'infection peut rester localisée aux yeux, à la peau et à la bouche dans 40 % des cas. Cependant, 35 % des nouveau-nés vont développer une encéphalite qui peut être accompagnée d'infections cutanées ou non [125, 160-161, 216]. Sans traitement, 50 % des enfants meurent et ceux qui survivent à l'encéphalite peuvent avoir des séquelles neurologiques importantes telles qu'un retard psychomoteur, de la cécité, une paralysie spasmodique [85, 217, 367-368]. L'infection peut aussi se répandre à d'autres organes tels que le système nerveux central, le foie, les glandes surrénales, les organes du système respiratoire, la rate, le pancréas et le cœur [215, 370]. Dans 60 % à 75 % des cas, les nouveau-nés

développent une encéphalite à la suite d'une infection systémique et la mortalité est élevée en absence de traitement.

Il existe des thérapies antivirales contre le VHS-1 qui comprend les analogues de la guanosine (acyclovir, valacyclovir, ganciclovir et famciclovir) qui sont les plus efficaces [103, 379]. Ces analogues de nucléosides sont phosphorylés par la thymidine kinase du VHS-1 pour ensuite être utilisé par l'ADN polymérase virale entraînant une inhibition de la réplication virale.

La recherche sur le développement d'un vaccin se concentre sur deux stratégies : vaccin sous-unitaire et vaccin composé d'un virus atténué. Des essais cliniques avec un vaccin contenant le virus atténué n'ont pas donné les résultats attendus puisque deux doses du vaccin n'ont pas livré assez d'antigènes pour obtenir une réponse immunitaire suffisante [44, 379]. Par contre, les essais avec un vaccin sous-unitaire de la glycoprotéine virale D (gD) développé par Glaxo SmithKline ont démontré de meilleurs résultats quant à la prévention de l'herpès génital chez la femme séronégative pour le VHS-1 et le VHS-2, mais ce vaccin n'est pas efficace chez l'homme [328]. Des études récentes sur un vaccin sous-unitaire contre gC et gD du VHS-2 ont démontré une réponse en lymphocytes T CD4 efficace chez la souris et le cochon d'Inde, en plus de protéger le ganglion de la racine dorsale lors de l'infection aiguë chez la souris [14]. Ce vaccin diminue le taux d'infection récurrente au VHS-2 chez un modèle de cochon d'Inde comparativement à un vaccin sous-unitaire contre gD uniquement. Cependant, ce vaccin n'élimine pas complètement la présence de virus au niveau des muqueuses vaginales [14].

1.1.3 La structure du virus de l'herpès simplex

Le virion se compose de quatre éléments : un coeur opaque qui contient le génome viral, une capside icosaédrique, une couche de protéine nommée le tégument, et une enveloppe bilipidique où les glycoprotéines virales sont insérées (Figure 1).

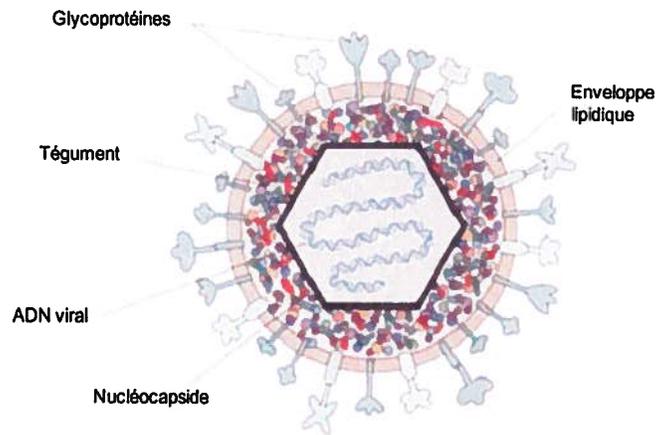


Figure 1 : Schéma montrant la structure du virion de VHS-1. Les différentes parties sont indiquées sur le schéma. Adapté de *The Microbial Word: A look at all things small* [267].

Le génome viral est composé d'un ADN double brin linéaire (dsADN) d'une longueur de 152 kb contenant des résidus G+C à 68 % et qui codent environ 80 protéines. Le génome est organisé d'une région unique longue (U_L) et d'une région unique courte (U_S) encadrées par des régions inversées. U_L et U_S peuvent être inversés pour former quatre isomères linéaires. Dans des cellules infectées, les quatre isomères sont retrouvés en concentrations équimolaires.

Le tégument est une couche protéique non structurée. Il est composé d'environ 20 protéines virales telles que la protéine transactivatrice, VP16, la protéine « *virion host shut-off* » (vhs) qui semble être impliquée dans la transmission entre les cellules et la protéine VP1-2 qui joue un rôle dans la relâche de l'ADN viral au pore nucléaire (revue [19, 103]).

La capsid est composée de 162 capsomères arrangés selon une symétrie icosaédrique $T=16$. Des études de microscopie électronique ont démontré la présence de deux couches au niveau de la capsid, une couche externe et une couche intermédiaire, qui sont reliées par des canaux. Ces canaux permettraient la communication entre le génome et l'extérieur [103]. La capsid est composée de quatre protéines virales : VP5 qui est la protéine majeure, VP26, VP23 et VP19C. De plus, un portail composé des protéines UL6 et VP24 se retrouve à la surface de la capsid ce qui permet l'encapsidation du génome.

L'enveloppe virale est acquise de la cellule hôte. La composition lipidique est similaire à celle des membranes cytoplasmiques de cellules non infectées [355]. L'enveloppe contient plusieurs glycoprotéines virales différentes telles que la glycoprotéine B (gB), gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM, gJ, et gK [103]. Aussi, l'enveloppe contient au moins deux protéines de membranes non glycosylées : UL20 [362] et Us9 [39].

1.1.4 Le cycle de réplication

Tout d'abord, le virion doit s'attacher à la surface de la cellule cible par des récepteurs spécifiques. D'abord, gC se lie aux héparines sulfates (HS) à la surface cellulaire [134, 310]. La présence de gC n'est pas obligatoire puisqu'en absence de gC, gB lie les héparines sulfates [133]. En absence des HS, l'efficacité d'infection est réduite de 10 à 20 fois d'où l'importance de ces sites [186]. Par la suite, gD peut lier trois récepteurs : Nectin-1, le médiateur d'entrée aux herpèsvirus (HVEM) [236] ou une héparine sulfate modifiée par une 3-O-sulfotransférase (3-O-HS) [312]. Cette étape est essentielle pour l'entrée du virus. Précédemment, on pensait que gD agissait comme le récepteur et gB comme la protéine de fusion permettant l'entrée du virus. Des études récentes ont démontré que gB pouvait agir comme récepteur en plus d'être une protéine de fusion. Une équipe en 2008 a démontré que gB lie PILR α (« *paired immunoglobulin-like type 2 receptor- α* ») puisque des cellules exprimant PILR α devenaient susceptibles à l'infection par le VHS-1, ainsi PILR α agirait comme co-récepteur [298]. Dernièrement, une étude a identifié que la chaîne lourde de NM2A, « *non-muscle myosin IIA* », interagit avec gB [12] au niveau des radeaux lipidiques [198, 247] à la surface cellulaire [262] permettant au virus d'entrer dans la cellule. À la suite de l'attachement du virus, l'enveloppe virale et la membrane cellulaire fusionnent grâce au complexe de fusion composé de gB et de l'hétérodimère gH/gL relâchant ainsi la capsid et les protéines du tégument dans le cytoplasme. Une autre voie d'entrée possible dans la cellule est par endocytose pH-dépendante [80].

La capsid virale est transportée au pore nucléaire par le réseau des microtubules pour injecter le génome viral dans le noyau et le génome se circularise [177, 323, 350]. La transcription, la réplication du génome et l'assemblage des nouvelles capsides ont lieu entièrement dans le noyau ce qui implique un remodelage du noyau.

Tout d'abord, des sites de pré-réplication sont formés pour éventuellement fusionner et former des compartiments de réplication viraux (VRCs) [171, 324, 340]. Certains facteurs cellulaires sont recrutés aux VRCs pour faciliter la réplication virale et inhiber les processus cellulaires dans lesquels ces facteurs sont impliqués [103]. Les protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN comme RPA, Rad51 et Nbs1 sont des exemples de protéines cellulaires recrutées aux VRCs [43, 205, 311, 377]. L'ARN polymérase de type II (ARN pol II) est aussi recrutée aux VRCs ce qui inhibe l'expression des protéines cellulaires [321]. La formation des VRCs induit la marginalisation de la chromatine cellulaire en périphérie du noyau [237, 305] et ultérieurement, la lamina nucléaire est perturbée [314]. Aussi, l'infection par le VHS-1 affecte d'autres structures nucléaires tels le nucléole [305] et les structures ND-10 [92, 223].

La transcription des gènes viraux est faite séquentiellement [139] et les produits sont transportés au cytoplasme pour être traduits en protéines. La transcription du génome est réalisée par l'ARN pol II cellulaire [6, 63] avec la participation de facteurs viraux. Premièrement, il y a transcription des gènes immédiats-précoces ou alpha (α). Le complexe d'activation formé de VP16, Oct-1 (« *octamer binding protein-1* ») et HCF (« *host cell factor* ») va lier la séquence TAATGARAT située au niveau des promoteurs des gènes α [84]. HCF est important puisqu'il coordonne l'interaction entre les diverses composantes du complexe d'activation. De plus, la localisation nucléaire de VP16 est directement reliée à son interaction avec HCF [111, 155, 178, 378, 384]. Les gènes α sont transcrits *de novo* c'est-à-dire que ces gènes ne requièrent pas de synthèse protéique virale préalable puisque la protéine VP16 qui fait partie du tégment stimule la transcription des gènes α [103]. Des protéines résultantes, plusieurs sont impliquées dans l'activation de l'expression des gènes précoces et tardifs. Deuxièmement, il y a la transcription des gènes précoces ou bêta (β), dont plusieurs codent des enzymes et des protéines liant l'ADN impliquées dans la réplication du génome viral et dans le métabolisme des nucléotides. Par la suite, la réplication du génome viral est effectuée selon un mécanisme de cercle roulant produisant des concatémères de génome viral. Finalement, il y a transcription des gènes tardifs ou gamma (γ) qui sont divisés en deux groupes : les partiellement tardifs (γ_1 ou « *leaky late* ») et les tardifs (γ_2 ou « *true late* »). L'expression des gènes γ_1 est stimulée par la synthèse de l'ADN viral tandis que les gènes γ_2 ne sont pas exprimés lorsque la réplication virale est inhibée (revue [103]).

Ces protéines incluent les protéines dites structurales puisqu'elles participent à l'assemblage des capsides. Les capsides vides sont remplies d'une seule copie de génome par un complexe protéique viral qui clive le long concatémère à une séquence spécifique (revue [363]).

L'acquisition de l'enveloppe virale est un sujet controversé. Pour expliquer l'enveloppement du virus, trois modèles existent. Le premier modèle prédit que le virion acquiert son enveloppe à la membrane nucléaire interne et le virion enveloppé sort de la cellule par exocytose [88]. Le second modèle prédit deux phénomènes d'enveloppement. La capside bourgeonne à la membrane nucléaire interne, et se retrouve entre les deux membranes nucléaires [103, 230]. Ensuite, la nucléocapside enveloppée fusionne avec la membrane nucléaire externe pour être relâchée libre dans le cytoplasme (désenveloppement) [230-232, 320]. Les nucléocapsides acquièrent leur tégument et l'enveloppe finale en bourgeonnant de vésicules de l'appareil de Golgi [128, 333, 353] et sont transportées jusqu'à la membrane cellulaire où elles seront sécrétées à l'extérieur de la cellule (Figure 2) [230]. Le troisième modèle suggère que la capside sort du noyau par les pores nucléaires et l'enveloppement du virus se fait au niveau de vésicules du Golgi [376]. Le second modèle de l'acquisition de l'enveloppe virale est préféré.

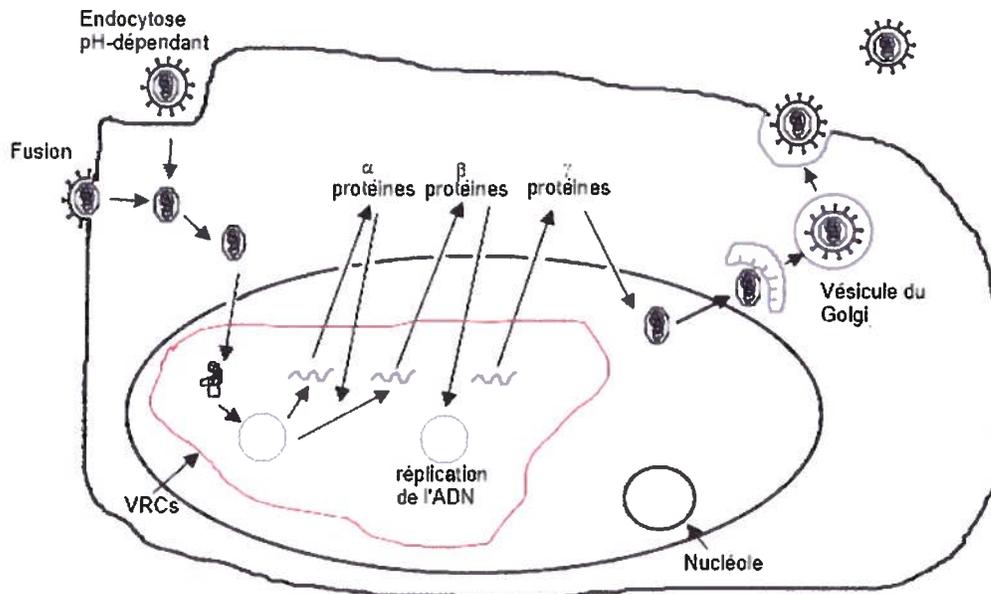


Figure 2. Figure illustrant le cycle de réplication du VHS-1. Le virion entre dans la cellule hôte par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire ou par endocytose pH-dépendant. La capside et le tégment sont relâchés dans le cytoplasme et la capside est transportée jusqu'aux pores nucléaires pour y relâcher le génome viral dans le noyau. L'ADN viral se circularise et la transcription des gènes viraux est effectuée selon une cascade temporelle par la machinerie transcriptionnelle de l'ARN pol II cellulaire dans les compartiments de réplication viraux (VRCs) qui sont formés. L'étape d'encapsidation est faite dans le noyau et le virion obtient son enveloppe finale au niveau de l'appareil de Golgi à la suite de plusieurs phénomènes d'enveloppement et de désenveloppement pour finalement sortir de la cellule. Inspiré du Fields Virology 5th ed [103].

1.1.5 La latence et la réactivation du virus de l'herpès simplex

1.1.5.1 Résumé du cycle de latence/réactivation

Les virus herpétiques ont la caractéristique d'entrer en latence chez l'hôte et de se réactiver pour se disséminer. Le cycle de latence-réactivation est divisé en trois étapes : établissement de la latence, le maintien de la latence et la réactivation. Conséquemment à l'infection primaire causant une lésion buccale typique nommée feux sauvages, le virus peut entrer en latence au niveau des corps neuronaux situés dans les ganglions trijumeaux. En fusionnant aux terminaisons nerveuses des axones, le virus libère la nucléocapside qui voyage jusqu'au noyau des neurones par les microtubules. L'ADN viral persiste dans le noyau sous forme d'épisome circulaire [228, 285-286] associé à des nucléosomes [74]. Durant la latence, l'expression des gènes viraux est inhibée à l'exception de certains ARN qui peuvent être facilement détectés, nommés « *latency-associated transcripts* » ou LATs. Par conséquent, aucune particule virale n'est produite. Lors d'un épisode de stress physique ou émotionnel, le virus peut se réactiver et de nouveaux virions sont produits. La réactivation du virus cause des infections récurrentes au site primaire d'infection et permet aussi la dissémination du virus (Figure 3).

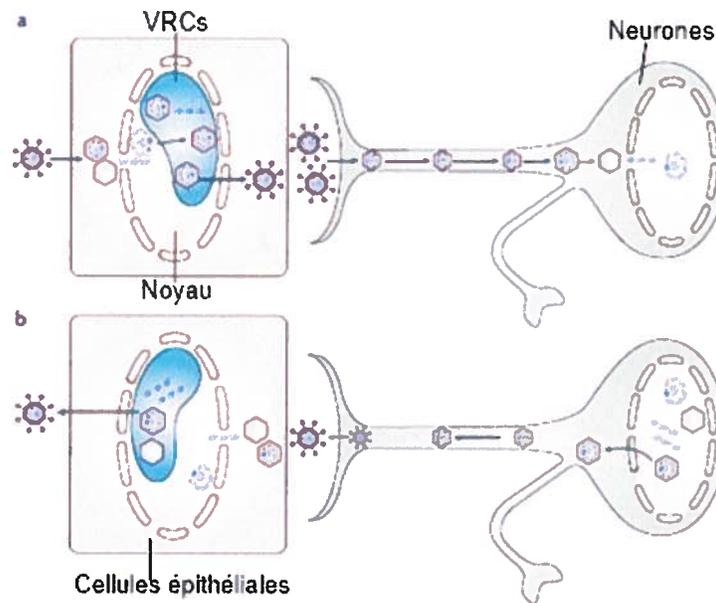


Figure 3. Schéma résumant le cycle d'infection du VHS-1. **(a)** Représentation du cycle de réplication lytique au site primaire de l'infection. Le virus se réplique dans les cellules épithéliales des muqueuses buccales. Les nouveaux virions produits peuvent infecter les cellules épithéliales voisines des muqueuses causant des lésions typiques de l'infection. Les virions peuvent aussi infecter les axones des neurones sensoriels qui sont situés dans les ganglions trijumeaux. Les capsides voyagent jusqu'au corps neuronal pour injecter l'ADN viral dans le noyau. Le génome se circularise et entre en latence au niveau du noyau du neurone du ganglion trijumeau. **(b)** Lors de la réactivation du virus, le virus entre dans un cycle de réplication lytique productif où de nouvelles particules virales seront produites au niveau des neurones sensoriels. Les nouveaux virions sont relâchés aux terminaisons axonales et vont infecter les cellules épithéliales causant des infections récurrentes. Modifié de la revue de Knipe DM et Cliffe A., 2008 [167].

1.1.5.2 Contrôle de la latence

Comme mentionnée plus haut, l'expression des gènes viraux est inhibée pendant l'infection latente. Deux changements sont observés au niveau de l'organisation de la structure du génome viral. Premièrement, le génome est sous forme d'épisome circulaire [285-286]. Deuxièmement, le génome viral est associé à des histones cellulaires sous forme de chromatine [74]. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine ont

démontré que les promoteurs des gènes α et β sont faiblement associés à des histones acétylées, contrairement au promoteur des gènes associés à latence (LATs) [181-182]. L'acétylation des résidus lysine 9 et 14 sur l'histone H3 et une déméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 sont communément retrouvées au niveau de l'euchromatine (forme active pour la transcription). Ces mêmes modifications post-traductionnelles des histones ont été retrouvées sur le locus *LAT*; [181-182, 249] suggérant que le virus utilise un mécanisme similaire à la cellule pour contrôler l'expression génique. Aussi, ceci semble suggérer que le contrôle de la latence s'effectue au niveau de l'organisation de la chromatine.

Pendant l'infection latente, l'ADN viral peut être détecté en plusieurs copies au niveau des neurones infectés. Sawtell NM (1997) [299] a déterminé que le nombre de copies de génome viral pouvait varier entre 1 à 1000 copies par neurones infectés. Ce nombre est influencé par la quantité de virus inoculés et la capacité du virus à se répliquer [299]. Des études subséquentes ont démontré une corrélation entre le nombre de copies de génome et l'efficacité du virus à se réactiver [300, 344]. Des virus n'ayant pas les protéines activatrices de la transcription des gènes viraux (VP16, ICP0 et ICP4) ne peuvent se répliquer dans les neurones, mais ils peuvent entrer en latence dans les neurones [220] ce qui suggère que la latence peut être établie en absence des protéines immédiates-précoces et que la protéine VP16 n'est pas requise pour l'établissement de la latence [220, 279].

La réactivation semble être liée au remodelage du génome viral par les histones, car une hyperacétylation des histones est associée à l'activation de la transcription. Lors de la réactivation, le promoteur du gène α ICP0 est activé puisque les histones sont hyperacétylées [13], tandis que le promoteur du gène *LAT* est déacétylé [7]. Aussi, l'histone déméthylase LSD1, une composante du complexe de modification formé de HCF, semble être impliquée lors de la réactivation virale, puisque son inhibition résulte en une suppression de la réactivation [202]. Contrairement à d'autres types de cellules où HCF est localisé au noyau, HCF est séquestré au cytoplasme dans les neurones sensoriels suggérant que HCF [179] ne pourrait pas former le complexe de modifications au niveau des promoteurs pour stimuler l'expression génique. Cependant, certaines études ont démontré que lors d'un stimulus, le facteur HCF est transporté rapidement au noyau [170, 179] pour être recruté aux promoteurs des gènes α provoquant une

augmentation des transcrits viraux α [372]. En plus de jouer un rôle au niveau de la réplication lytique, HCF pourrait contrôler le remodelage de la chromatine des promoteurs α durant la réactivation. D'autres facteurs de transcription cellulaires tels que Zhangfei et Luman peuvent lier HCF [208]. Il a été suggéré que si Zhangfei et Luman sont présents en grande quantité, HCF n'est plus libre pour lier VP16 ce qui résulte en une diminution de l'expression des gènes viraux. Aussi, Luman peut activer le promoteur du gène *LAT* [208].

À la suite de la réplication du génome, de nouvelles particules virales sont produites. Il existe deux modèles expliquant le transport antérograde du VHS-1. Le premier modèle est nommé « marié » et le second « séparé ». Le modèle « marié » propose que les virions enveloppés voyagent jusqu'aux terminaisons axonales pour y être relâchés par exocytose [10, 50, 73, 143]. Le modèle « séparé » propose que les nucléocapsides voyagent indépendamment des glycoprotéines. L'acquisition de l'enveloppe virale contenant les glycoprotéines se fait dans des vésicules au niveau de l'axone et les virions sont relâchés par exocytose au niveau des terminaisons axonales [87, 138, 188-190, 233, 257-258, 270, 275, 293, 322, 348-349]. Dernièrement, des analyses sur des neurones de rat et des cellules SK-N-SH infectés par VHS ont démontré que les capsides sont transportées par les deux modèles [248, 380]. Rarement lors de la réactivation, le virus peut voyager dans le sens contraire et rejoindre le système nerveux central causant ainsi une encéphalite [77].

1.1.5.3 Les transcrits LATs

Durant la latence, la transcription des gènes viraux lytiques est régulée à la baisse tandis que le gène *LAT* est transcrit [103]. Le locus du gène *LAT* est situé dans la région répétée du génome viral entre U_L et U_S . Dans une unité à l'inverse de celle de *LAT*, on retrouve le gène *ICP0* qui chevauche partiellement le gène *LAT*. Le promoteur se divise en deux régions, LAP1 et LAP2, qui est activé dans les neurones. La boîte TATA située dans LAP1 et le motif CRE [« *(cAMP)-responsive element* »] sont importants pour l'expression des LATs dans les neurones [152]. L'expression de *LAT* génère un transcrit polyadénylé de 8,5 kb qui est épissé pour donner un transcrit de 2,0 kb stable qui s'accumule dans les neurones sensoriels [99, 180, 218, 325]. Aussi, le transcrit de 2,0 kb peut être épissé pour générer des transcrits de 1,4 et 1,5 kb [214].

La fonction de ces transcrits n'est pas encore très bien connue. Plusieurs études ont démontré que les LATs peuvent promouvoir l'établissement de la latence [344], peuvent diminuer l'expression des gènes viraux dans les neurones sensoriels durant l'infection aiguë [107, 213]. Durant la latence [56], les transcrits LATs peuvent promouvoir la réactivation [193]. Des études récentes ont mis en évidence que l'absence des LATs résulte en une diminution des marqueurs associés à l'hétérochromatine sur les promoteurs des gènes viraux lytiques, ce qui suggère que les transcrits LATs pourraient rendre leur transcription silencieuse [60, 360]. Plus précisément, des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs) sur des ganglions infectés en période de latence ont démontré de hauts niveaux de la triple méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 au niveau des gènes viraux lytiques [60]. Au niveau du génome cellulaire, cette modification est associée à l'hétérochromatine facultative ce qui inactive la transcription. Le promoteur de *LAT* et la région 5' sont associés à des histones acétylées qui sont une marque de l'euchromatine [181-182]. Tout ceci renforce l'hypothèse que les transcrits LATs semblent inhiber l'expression des gènes viraux lytiques en modifiant la structure du génome.

De plus, les transcrits LATs semblent avoir un effet antiapoptotique sur les neurones [3, 31, 36, 271]. Branco et al. ont démontré que la protection contre l'apoptose est située dans la région 3' de l'exon 1 de *LAT*, puisque la délétion de cette région augmente significativement le nombre de neurones apoptotiques [36].

1.1.6 L'infection neuronale par le virus de l'herpès simplex 1

La neurovirulence du virus implique une neuroinvasion et une capacité de se répliquer dans les neurones.

Subséquentement à une infection au niveau des muqueuses buccales, le virus peut infecter les neurones du ganglion trijumeau. La réplication du virus au niveau des neurones peut entraîner des maladies sévères au système nerveux central tel que l'encéphalite. L'entrée du virus est accomplie par la liaison des glycoprotéines virales à une protéine cellulaire de surface, telle que Nectin1/HveC [284]. L'ARNm de Nectin-1 est détecté à de hauts niveaux dans le système nerveux central humain [61], dans des lignées cellulaires neuronales [110] et dans les neurones sympathiques,

parasymphatiques et sensoriels de souris [121]. De plus, Nectin-1 est retrouvé en grande quantité dans les neurones sensoriels de rat, mais pas au niveau des neurones moteurs de rat [221]. Dans un modèle d'infection murin, le virus entre dans un cycle de réplication lytique; il y a donc expression des gènes viraux (α , β , γ et LATs) durant les 24-72 heures suivant l'infection [172, 174, 354]. Dans un modèle animal d'infection, l'expression des gènes viraux et la réplication peuvent être détectées jusqu'à une semaine après l'infection [169, 174].

L'initiation de l'expression des gènes viraux semble être retardée dans les neurones comparativement aux cellules Vero par exemple. Entre 4-6 hpi, les transcrits précoces sont détectés dans les neurones de rat en culture primaire, tandis que les mêmes transcrits sont détectés à 3 hpi dans les cellules Vero. De plus, les transcrits tardifs sont détectés seulement à 12 hpi contrairement aux cellules Vero où ces transcrits tardifs peuvent être détectés dès 4 hpi. Ainsi, l'expression des gènes viraux est retardée dans les neurones de rat en culture primaire et ce retard est plus visible dans le cas des transcrits tardifs [250]. Une explication possible du retard dans l'expression des gènes tardifs semble pointer vers la réplication du génome viral. La réplication du génome viral semble être l'étape critique qui délimite la latence d'une infection lytique productive. Des études ont proposé comme modèle que l'infection lytique des neurones commence par une expression faible des transcrits α et β ; lorsque les protéines β sont produites, la réplication du génome débute et ceci sert de signal pour augmenter l'expression génique. Donc, si la synthèse du génome viral n'a pas lieu, la latence est établie dans les neurones [173, 250]. Cependant, Sawtell et al., (2006) [302] ont des résultats qui suggèrent que la synthèse de l'ADN viral n'est pas le point critique entre l'infection latente et l'infection lytique [302]. Les mécanismes contrôlant l'entrée en infection lytique au lieu de l'infection latente dans les neurones demeurent nébuleux.

La régulation des promoteurs des gènes viraux diffère dans les neurones contrairement aux autres types cellulaires. Par exemple, le promoteur du gène α ICP4 est actif dans les cellules de Schwann, mais pas dans les neurones du TG [339] contrairement aux gènes viraux ICP0 et ICP27 qui sont actifs dans les neurones [207]. Une étude a démontré qu'ICP0 ne s'accumule pas dans le noyau des neurones infectés [57] ce qui pourrait favoriser l'établissement de la latence dans les neurones à la suite d'une infection. Le facteur de transcription neuronal Olf-1 (« *olfactory neuron-specific*

transcription factor-1 ») peut lier le promoteur du gène ICP0 suggérant qu'Olf-1 peut activer la transcription d'ICP0 [75]. D'autres facteurs exprimés dans les neurones sensoriels tels que Brn 3.0 (« *brain-specific homeobox* ») et N-Oct 3 (« *neuron octamer transcription factor* ») peuvent réguler les promoteurs des gènes α [123]. Il a été proposé que le virus utilise les composantes du complexe répresseur HDAC1 ou HDAC2/cREST/LSD1/Rest pour activer l'expression des gènes α comme ICP0. Par la suite, ICP0 supprime ce complexe répresseur dans le but d'inhiber l'expression des gènes α . Dans les neurones, ce même complexe répresseur est utilisé pour établir la latence. Ainsi, la suppression du complexe répresseur semble jouer un rôle dans la réactivation du virus [289].

1.2. Le nucléole

Le noyau est une structure cellulaire délimitée par une membrane et qui contient des sous-compartiments non délimités par des membranes comme les corps PML, le corps de Cajal et le nucléole. Chez les mammifères, les cellules contiennent plus de 100 copies de gènes de l'ADN ribosomal (ADNr) qui sont répétés en tandem dans une organisation « tête-à-queue » [319]. Les régions sur les chromosomes contenant les gènes ribosomiaux sont nommées « *nucleolus organizer region* » (NORs). Les cellules diploïdes humaines possèdent environ 400 gènes ribosomiaux localisés dans cinq paires de chromosomes (13, 14, 15, 21 et 22) et ceux-ci coopèrent à la formation du nucléole [132].

1.2.1 La morphologie du nucléole

Chez les eucaryotes, le nucléole est un sous-compartiment hautement conservé du noyau non délimité par une membrane [33]. Son organisation est maintenue principalement par des interactions protéines-protéines [342]. Il est dynamique et est facilement visible en microscopie à contraste de phase. De plus, le nucléole peut aussi être facilement marqué pour être visualisé à l'aide de la fluorescence. Ce sous-compartiment se divise en trois sous-régions. Tout d'abord au centre, il y a un ou plusieurs centres fibrillaires (FC), une région claire qui est entourée partiellement ou complètement par la composante dense fibrillaire (DFC). Finalement, la composante

granulaire (GC) qui est composée de granules de 15-20 nanomètres de diamètre se retrouve en périphérie [33, 122, 319]. Ces trois sous-régions sont délimitées par leur composition protéique différente reliée à la biogenèse des ribosomes. La région FC est principalement composée d'ADN (dans une structure active pour la transcription), des transcrits naissant d'ARNr et la machinerie de transcription (ARN pol I, UBF, topoisomérase ADN I). Quant à la région DFC, elle contient des pré-ARNr et des protéines impliquées dans la maturation des ARNr. La sous-région GC correspond à environ 75 % de la masse du nucléole puisqu'elle contient les pré-ribosomes [342]. Plusieurs études protéomiques ont été réalisées sur le nucléole et l'étude la plus récente a dénombré plus de 50 000 peptides contenus dans plus de 4500 protéines humaines [2]. Le nombre de nucléoles dans la cellule peut varier en fonction de l'activité métabolique de celle-ci. En général, une cellule ayant une biogenèse de ribosomes élevée a plusieurs petits centres fibrillaires. Dans le cas contraire, les cellules ayant une faible activité métabolique et de transcription possèdent de petits nucléoles avec un seul centre fibrillaire [319].

1.2.2 Les diverses fonctions du nucléole

Le nucléole est un sous-compartiment dynamique contenant plusieurs protéines. Environ 30 % de ces protéines ont une fonction reliée à la biogenèse des ribosomes [33]. Au cours des années, plusieurs autres fonctions ont été attribuées au nucléole qui seront discutées plus bas.

1.2.2.1 Le rôle du nucléole dans le cycle cellulaire

Le nucléole est un sous-compartiment dynamique subissant des cycles de désassemblages et d'assemblages au cours des mitoses. Plusieurs événements surviennent lors des différentes étapes de la mitose.

La production des ribosomes débute en fin de mitose, augmente durant la phase G1 et est maximale en phase G2 pour s'arrêter durant la prophase [131, 165, 319]. Lors de la division cellulaire, le nucléole se désassemble et la transcription est interrompue [33]. Il est estimé que la transcription diminue de 30 % durant le début de la prophase et

s'arrête à la fin de la prophase [109, 276]. Au début de la prophase, les niveaux de B1-CDK1 augmentent et par conséquent certaines composantes de la machinerie de transcription de l'ARN pol I (SL1 et TFF-1) sont phosphorylées ce qui a pour effet d'inhiber la transcription des gènes ribosomiaux [130, 317]. La phosphorylation de SL1 empêche son interaction avec UBF inhibant ainsi la formation du complexe de préinitiation de la transcription [263]. À la fin de la prophase, la transcription de l'ADNr est arrêtée, mais la machinerie de transcription de l'ARN pol I demeure associée à l'ADNr dans les NORs [131-132, 303]. Durant la métaphase, les sous-unités de l'ARN pol I peuvent se dissocier des NORs [54, 197]. Durant l'anaphase, certaines composantes pour le traitement des ARNr sont redistribuées au cytoplasme pour former des « *nucleolus-derived foci* » (NDF) [263], tandis que d'autres restent attachées aux chromosomes au niveau des régions périchromosomales (Ki67, PM-Scl 100, nucléoline, fibrillarine, B23, Nop52, Bep1) [9, 78, 108]. En fin de mitose, l'inhibition de l'activité de B1-CDK1 par les phosphatases PP1 et PP2A [351] permet de restaurer la transcription de l'ADNr dans les NORs [130, 290, 317-318]. Les protéines du nucléole redistribuées se regroupent pour former les corps prénucléolaires (« *pre-nucleolar bodies* », PNBs) [319] leur permettant ainsi de rejoindre le nucléole.

En phase G1, il y a assemblage des nucléoles et ceci dépend de la reprise de la transcription de l'ADNr ainsi que de la restauration du traitement de l'ARNr. En plus, une activité des kinases dépendantes des cyclines (CDK) semble être importante pour promouvoir la formation d'un nucléole fonctionnel et actif [316, 318]. Aussi, UBF devient actif à la suite d'une déphosphorylation et d'une nouvelle phosphorylation à différents sites [263]. Pendant l'assemblage des nucléoles, les différentes composantes sont relâchées progressivement et séquentiellement des corps prénucléolaires (PNBs). Ainsi, les protéines impliquées tôt dans la maturation des ARNr sont relâchées en premier, suivies des protéines jouant un rôle plus tardivement dans les étapes de maturation [319].

1.2.2.2 Régulation du cycle cellulaire

Durant l'interphase, les nucléoles demeurent dynamiques. Ils répondent aux divers changements dans la cellule pour maintenir un consortium de ribosomes adéquat.

Plusieurs protéines s'associent au nucléole à différents stades du cycle cellulaire ce qui suggère un rôle dans la régulation de celui-ci [33].

Les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la sumoylation sont des changements dynamiques qui peuvent réguler une variété d'activités faite par le nucléole. Par exemple, une nouvelle protéase SUMO-spécifique a été identifiée (SENP5) et elle est retrouvée au nucléole [116]. Il a été démontré qu'une diminution d'expression de SENP5 par des petits ARN interférant (siRNA) cause un défaut au niveau de la division cellulaire [76]. Un autre mécanisme employé par la cellule pour contrôler le cycle cellulaire est la séquestration de protéines au nucléole. Par exemple, la transcriptase inverse de la télomérase (RNP) est séquestrée au nucléole par son interaction avec une protéine du nucléole (nucléoline) [159] jusqu'à ce que les télomères soient répliqués à la fin de la phase S du cycle cellulaire [381].

1.2.2.3 La biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes se situe dans les trois sous-régions du nucléole dont le but est de maintenir le consortium des sous-unités ribosomales suffisant pour que la cellule puisse synthétiser des protéines (Figure 4). L'emplacement exact de la transcription des gènes ribosomiaux demeure non résolu. Certains la situent dans la région FC et d'autres en bordure des régions FC et DFC [144, 278, 342]. Par contre dans les neurones, la transcription de l'ADNr s'effectue dans la région DFC qui a une organisation réticulée autour du FC [49]. Brièvement, l'ARN pol I effectue la transcription de l'ADNr ce qui donne naissance à un transcrit précurseur polycistronique qui contient les séquences d'ARNr 18S, 5,8S et 28S en plus de séquences d'espacement interne et externe [101, 282]. De plus, l'ARN pol III transcrit l'ARNr 5S. L'ARNr précurseur subit des étapes de maturations et de modifications par les petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNPs) et par des protéines non ribosomales pour générer les ARNr matures 18S, 5,8S et 28S. Les séquences d'espacement non-codantes sont enlevées par des enzymes endonucléases et exonucléases avant ou pendant l'assemblage des sous-unités ribosomales petites (40S) et larges (60S). Un processus complexe impliquant 80 protéines ribosomales permet l'assemblage des ARNr en ribosomes matures. La sous-unité 40S est formée de l'ARNr 18S; tandis que la sous-unité 60S est formée des ARNr 28S, 5,8S et 5S [101].

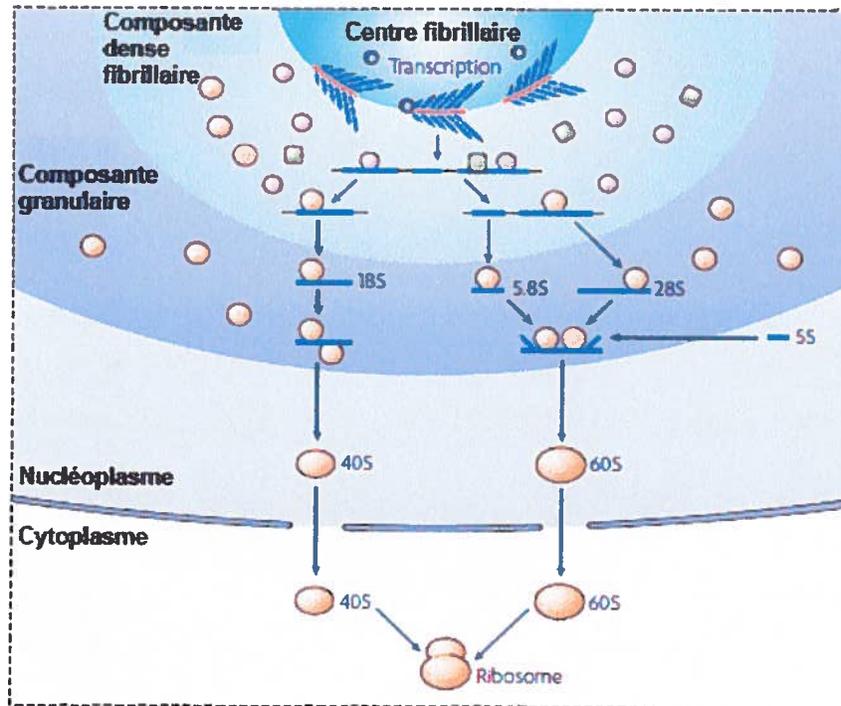


Figure 4. Schéma illustrant la biogenèse des ribosomes. La transcription de l'ADN ribosomal est effectuée par la machinerie transcriptionnelle de l'ARN pol I (représenté par les ronds bleus) à la bordure du centre fibrillaire et de la composante dense fibrillaire. Plusieurs étapes de maturation et d'épissage des pré-ARNr ont lieu au niveau de la composante dense fibrillaire par des petites ribonucléoprotéines (snoRNPs) et « *protein-processing factor* » (représentés par les ronds mauves et verts respectivement). L'assemblage des sous-unités a lieu au niveau de la composante granulaire. Les ARNr 5,8S et 28S s'assemblent avec l'ARNr 5S et des protéines ribosomales (représenté par les petits ronds oranges) pour former la sous-unité ribosomale 60S; l'ARNr 18S avec des protéines ribosomales forme la sous-unité ribosomale 40S. Les sous-unités sont transportées au cytoplasme pour s'assembler en ribosomes matures au niveau des ARNm. Adapté de la revue de Boisvert FM et al, 2007 [33].

1.2.3 Les protéines majeures du nucléole

Le nucléole est formé de plusieurs protéines et depuis quelques années, des études protéomiques démontrent que ce sous-compartiment est composé de centaines

de protéines différentes. Quelques-unes des protéines les plus abondantes seront discutées plus bas.

1.2.3.1 Nucléoline (C23)

Une des protéines majeures et ubiquitaires du nucléole est la nucléoline. Elle a été décrite pour la première fois en 1973 par Orrick et al. [264] et a été nommée C23 à cause de sa mobilité sur un gel bidimensionnel [277]. Cette protéine est hautement conservée parmi les vertébrés et a plusieurs homologues chez les plantes et les levures [114]. Chez les humains, le gène qui code la nucléoline est présent en une copie par génome haploïde. La nucléoline se divise en trois domaines structuraux (Figure 5). Le domaine N-terminal est composé de résidus hautement acides espacés par des régions basiques. Plusieurs sites de phosphorylation ciblés par la « *casein kinase 2* » (CK2) et la kinase cycline-dépendante (CDK1) sont présents. Le domaine central est formé de quatre domaines liant l'ARN (RBD ou RRM). Finalement, le domaine C-terminal est riche en résidus glycine, arginine et phénylalanine formant le motif RGG [114].

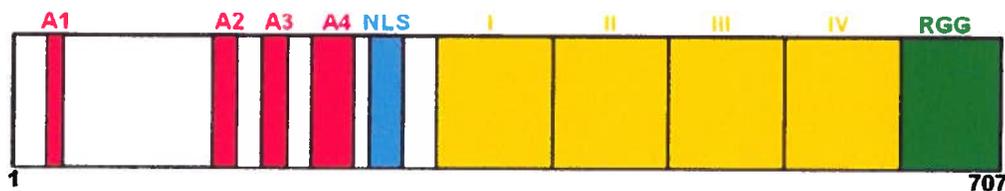


Figure 5. Représentation schématique de la nucléoline. Les boîtes rouges représentent les régions hautement acides numérotées de A1 à A4 qui sont séparées par des régions basiques. L'encadré bleu est le signal d'import nucléaire (NLS). Le domaine central contient quatre domaines de liaison à l'ARN représenté par les boîtes jaunes (I à IV). Le domaine C-terminal est composé de résidus glycines, arginine et phénylalanine (RGG) et est représenté par la boîte verte. Inspiré de Nisole S et al, 2002 [254].

Il a été suggéré que la nucléoline possède une activité d'autoclivage [53, 97] et des sites d'autoclivage ont été identifiés dans le domaine N-terminal. Cependant, les produits de clivages ne sont pas encore bien caractérisés. De plus, cette protéine peut-être phosphorylée, méthylée et ADP-ribosylée [114]. La nucléoline se localise

principalement au niveau des DFCs, mais elle peut être détectée dans les GCs. Aussi, quelques publications indiquent la présence de la nucléoline à la surface cellulaire [114]. Il a été démontré que la nucléoline à la surface cellulaire peut lier la lamine-1 par un site « *neurite-promoting IKVAV* » et cette liaison semble promouvoir la différenciation des neurones en culture primaire en plus d'une variété de lignées cellulaires neuronales [166].

La localisation intracellulaire de la nucléoline et les quatre domaines liant l'ARN fournissent des indices quant au rôle qu'elle joue dans la biogenèse des ribosomes. Cette protéine régule plusieurs aspects du métabolisme de l'ADN et l'ARN. Les domaines de liaison à l'ARN permettent à la nucléoline d'interagir avec les pré-ARN suggérant un rôle dans la régulation de la transcription et la formation des complexes RNP [112]. En plus d'interagir avec l'histone H1, elle module la structure de la chromatine [89-90, 234]. Aussi, il a été suggéré que la nucléoline joue un rôle dans la maturation des pré-ARNr [114], dans l'assemblage et le transport des ribosomes [234]. La nucléoline peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme [251] lui permettant ainsi de transporter les sous-unités ribosomales au cytoplasme [34, 304, 386]. Par ailleurs, la nucléoline est impliquée au niveau de la régulation du cycle cellulaire. Durant l'interphase, la nucléoline est phosphorylée par la kinase CK-II au niveau des sérines pour ainsi contrôler la transcription de l'ADNr [327]; tandis que la kinase cdc2 phosphoryle les thréonines du motif TPKK au niveau du domaine C-terminal. La phosphorylation des thréonines est liée à la condensation de la chromatine dans le nucléole [327].

1.2.3.2 B23 (Nucléophosmine /NPM1)

B23 est un membre de la famille des protéines nucléoplasmine. B23 est aussi connu sous le nom de nucléophosmine, NO38, numatrine et NPM1. Il existe deux isoformes de B23 soit B23.1 et B23.2 dont la seule différence est 35 acides aminés au niveau de la région C-terminale. B23.1 est localisé au nucléole et au centrosome, tandis que B23.2 est retrouvé au cytoplasme et au nucléoplasme. B23 est une protéine ubiquitaire et multifonctionnelle abondante de la région GC du nucléole. B23 se divise en trois domaines (Figure 6). Le domaine N-terminal est conservé et est important pour l'oligomérisation en pentamère [105] ce qui est critique pour sa fonction de chaperonne

[4, 259]. De plus, le domaine N-terminal contient une région acide (A1) et deux signaux d'export nucléaire (NES) riche en leucines [206]. Par la suite, il y a deux domaines hautement acides (A2 et A3) séparés par un signal d'import nucléaire (NLS). Ces régions acides sont requises pour une liaison efficace des histones et pour l'assemblage du nucléosome [260]. En C-terminal de la protéine, il y a un domaine de liaison à l'ARN. Ce domaine est intimement lié à la localisation nucléolaire de B23 ce qui suggère que le domaine est important pour effectuer son rôle dans la biogenèse des ribosomes [259]. La présence du NLS et des NES permet à cette protéine de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme permettant l'exportation des sous-unités ribosomales [34].

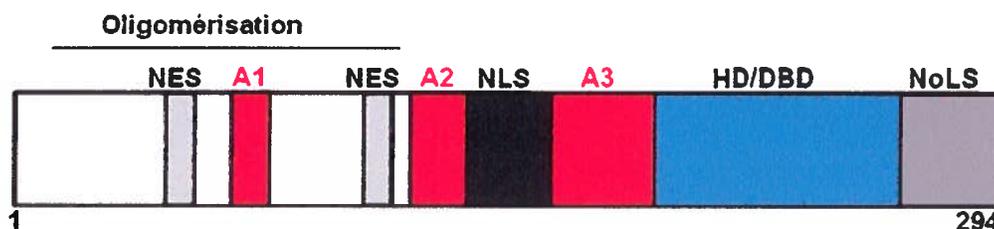


Figure 6. Schéma représentant les domaines de la protéine B23. La protéine contient trois régions acides nommées A1, A2 et A3 (boîtes rouges). Deux signaux d'export nucléaire (NES) (boîtes gris pâle), un signal d'import nucléaire (boîte noire) et un signal d'import nucléolaire (boîte gris foncée). En C-terminal, il y a un domaine de liaison à l'ARN nommé HD/DBD (boîte bleue). Les chiffres représentent le nombre d'acides aminés. Inspiré de Lindström, 2011 et Okuwaki 2008 [206, 259].

En plus de l'exportation des sous-unités ribosomales, B23 joue un rôle dans le traitement des pré-ARNr en ARNr mature [206]. B23 est impliqué dans d'autres processus tels que la réplication, la recombinaison, la transcription et la réparation de l'ADN dû à un dommage dans la chromatine [206]. Une surexpression de B23 peut promouvoir la division et la croissance cellulaire en ayant des effets stimulants sur la transcription de l'ADNr, sur l'export des sous-unités ribosomales et sur la réplication de l'ADN. En parallèle, de hauts niveaux de la protéine B23 sont détectés dans des cellules cancéreuses contrairement à des cellules normales ce qui suggère que B23 pourrait être impliqué dans la croissance et la division des cellules cancéreuses [206].

B23 peut être régulé à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'oligomère B23 est une cible de régulation. La forme variante B23.2 lie B23.1 au niveau du domaine de liaison à

l'ARN en formant des hétérodimères ce qui semble inhiber son activité [259]. L'équilibre entre les deux est critique pour la fonction du domaine C-terminal. Aussi, il a été démontré qu'ARF, un suppresseur tumoral, s'associe avec B23 au niveau du domaine N-terminal ce qui induit une déstabilisation de l'oligomère [86]. B23 peut aussi être régulé par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la poly-(ADP-ribosyl)ation [280], l'acétylation [334], la sumoylation [336] et l'ubiquitination [146, 296]. Durant le cycle cellulaire, plusieurs résidus ont été identifiés comme phosphorylés dans les cellules. Par exemple, la thréonine en position 199 (T199) est phosphorylée par le complexe cdk2/cycline E durant la phase G1 ce qui induit une dissociation de B23 des centrosomes permettant ainsi d'entreprendre la duplication des centrosomes [259]. Durant la mitose, quatre résidus thréonines (T199, T219, T234 et T237) sont phosphorylés par la cdc2 ce qui abolit l'activité du domaine de liaison à l'ARN [261]. Durant l'interphase, la sérine 125 (S125) est phosphorylée par la kinase caséine 2 (CK2) ce qui réduit sa fonction dans la biogenèse des ribosomes [55].

1.2.3.3 Machinerie de transcription de l'ARN polymérase I

L'ADNr contient tous les éléments nécessaires à la transcription soit les promoteurs proximaux, les « *spacers promoter* » et les terminateurs. Au niveau du promoteur, il y a deux éléments qui sont le « *CORE element* » et le « *upstream control element* » (UCE) qui permettent le recrutement du complexe d'initiation de la transcription [319]. La machinerie de transcription de l'ARN pol I est composée de la polymérase I (ARN pol I), du « *upstream binding factor* » (UBF) et du complexe « *selectivity factor SL1* » (Figure 7) [240]. Tout d'abord, UBF lie le promoteur ce qui permet le recrutement du complexe SL1 liant ainsi le UCE et le « *core element* » [239]. L'étape critique pour l'assemblage d'un complexe de transcription actif est le recrutement de PAF53 par UBF et ceci permet le recrutement de l'ARN pol I [124, 308]. UBF peut se lier n'importe où sur le locus des gènes ribosomiaux puisqu'il possède une activité de liaison à l'ADN qui est séquence indépendante sélective de liaison [256], ainsi cette protéine pourrait avoir plusieurs rôles. Donc, UBF peut autant agir au niveau de l'activation des gènes en contribuant à la formation d'une chromatine ouverte [295] qu'au niveau de la formation du complexe de préinitiation.

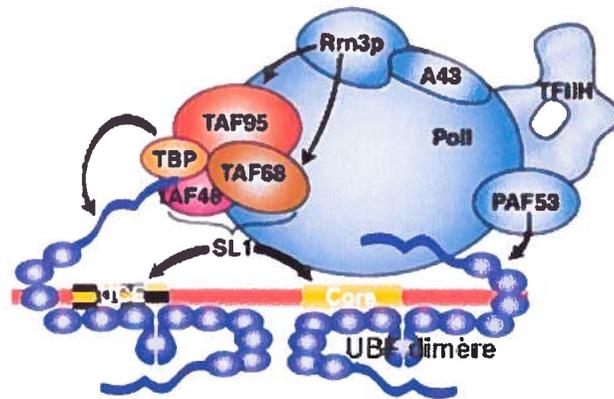


Figure 7. Complexe de préinitiation de la transcription de l'ARN pol I. Le promoteur de l'ADNr mammalien est composé de la séquence UCE et du « *core element* ». L'initiation de la transcription est stimulée par UBF qui recrute le complexe SL1 et l'ARN pol I qui forme le complexe de préinitiation. Le complexe SL1 est formé de la protéine liant la boîte TATA (TBP) et de trois facteurs associés au TBP (TAF95, TAF68 et TAF48). L'ARN pol I est affilié au facteur associé à la polymérase (PAF53), au facteur d'initiation de la transcription spécifique à l'ARN pol I (Rrn3p ou TIF-IA). PAF53 permet le recrutement de l'ARN pol I par UBF et Rrn3p permet de relier l'ARN pol I au complexe SL1. Le complexe de préinitiation comprend aussi le facteur de transcription II H (TFIID). Modifié de Moss T. et Stefanovsky V.Y. (2002) [239].

UBF se divise en trois domaines (Figure 8). En N-terminal, UBF possède un domaine de dimérisation [227]. Une partie du dimère lie le « *core element* » et l'autre l'UCE ce qui semble fournir une surface suffisante pour la liaison du complexe SL1 ou de deux complexes SL1 [330]. Ensuite, la protéine contient six boîtes HMG qui lui permettent de lier l'ADN. Il a été démontré que seulement les trois premières boîtes HMG sont importantes pour la formation d'un « *enhancesome* » qui est une structure d'environ 140pb d'ADNr tournée sur 360° [20]. Cet arrangement d'UBF suggère la formation de deux « *enhancesome* » sur le promoteur [330]. Le domaine de transactivation d'UBF interagit directement avec le complexe SL1 et la phosphorylation du domaine joue un rôle important dans l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription au niveau du promoteur de l'ADNr [352].

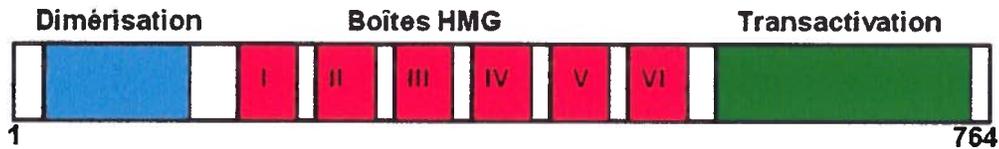


Figure 8. Représentation schématique de la protéine UBF. En N-terminal, un domaine de dimérisation est représenté par la boîte bleue. Le domaine central contient six boîtes HMG numérotées de I à VI (boîtes rouges). En C-terminal, la boîte verte représente le domaine de transactivation. Les chiffres représentent le nombre d'acides aminés de la protéine. Inspiré de Stow ND et al, 2009 [332].

Des modifications post-traductionnelles des composantes de la machinerie de l'ARN pol I peuvent survenir pour contrôler la transcription des gènes ribosomiaux. Durant la phase G1, les CDK2/cycline E/A et CDK4/cycline D1 phosphorylent UBF aux sérines 388 [357] et sérine 484 [358] respectivement. Pendant la mitose, UBF perd cette phosphorylation [357]. De plus, la phosphorylation d'UBF au niveau du domaine C-terminal augmente sa liaison avec le complexe SL1. En N-terminal, deux domaines HMG peuvent être phosphorylés par ERK1/2 ce qui stimule la transcription des gènes ribosomiaux [331], cependant cette phosphorylation inhibe la liaison d'UBF à l'ADNr. Ceci suggère que la stimulation de la transcription nécessite un cycle de phosphorylation dynamique par la voie des kinases ERK. D'ailleurs, UBF peut aussi être régulé négativement. Le suppresseur tumoral rétinoblastome (pRb) cible UBF en liant les domaines HMG 1 et 2 ce qui empêche UBF de lier le complexe SL1 [127]. Ceci entraîne une répression de la transcription par l'ARN pol I en plus d'inhiber la croissance cellulaire [119]. Aussi, le suppresseur tumoral p53 empêche la liaison d'UBF et du complexe SL1 au promoteur ce qui induit une inhibition de la transcription par l'ARN pol I [387].

1.2.4 Le nucléole et les neurones

Le nucléole des neurones est semblable au nucléole des cellules non neuronales. Cependant, certaines différences existent puisque les neurones sont continuellement dans la phase G₀ du cycle cellulaire. Des études ont démontré que la taille du noyau des neurones peut être reliée positivement à l'activité de transcription de

la cellule [24, 269, 297]. Comme le nucléole est le site de biogenèse des ribosomes, le nucléole peut refléter le taux de transcription de la cellule sous certaines conditions physiologiques. Par exemple lors d'une hyperosmolarité, la taille du nucléole des neurones et le taux de transcription augmentent. De plus, l'organisation du FC et GC est affectée c'est-à-dire une ségrégation partielle des FC et GC, une perturbation des FC et la formation de microstructure de DFC en périphérie du nucléole [24, 309]. Des analyses de microscopie sur des neurones ayant une haute activité de transcription ont démontré que 72 % des neurones ont un nucléole; tandis que 22 % des neurones ont deux nucléoles et seulement 6 % ont plus de trois nucléoles [184]. Ceci renforce l'hypothèse que le nombre de nucléoles varie en fonction de l'activité de transcription de la cellule [269]. Néanmoins, les neurones sympathiques et sensoriels ont une forte activité de biogenèse des ribosomes, mais ils ont seulement un énorme FC accompagné de plusieurs petits FCs démontrant que la présence d'un seul FC ne corrèle pas nécessairement avec une baisse d'activité de biogenèse [49].

Un autre sous-compartiment du noyau qui est bien connu dans les neurones est les Corps de Cajal (CBs). Les CBs sont aussi des sous-compartiments non délimités par une membrane et sont dynamiques. Le nombre de CBs semble être relié à l'activité transcriptionnelle de la cellule [238]. Néanmoins, certaines cellules ne possèdent pas de CBs telles que les cellules musculaires, les cellules de l'épithélium et du derme et les cellules du parenchyme de la rate [238]. Ils sont impliqués dans le traitement des « *small nuclear ribonucleoproteins* » et des « *small nucleolar ribonucleoproteins* » (snRNPs et snoRNPs) qui eux jouent un rôle dans le traitement des pré-ARNm et des pré-ARNr respectivement [59, 106, 329].

1.2.5 Les modifications du nucléole par les virus

Plusieurs virus animaux et de plante ciblent le nucléole. Plusieurs virus à ADN se répliquent au noyau leur permettant d'avoir un accès facile au nucléole. Contrairement aux virus à ARN dont la majorité se réplique au cytoplasme, ceux-ci doivent user de stratégies pour faire le transit de leurs protéines au noyau [137].

La localisation des protéines virales au nucléole peut être due à un signal d'import nucléolaire (NoLS) [129] dont le motif riche en résidus arginine/lysine est le plus

reconnu, mais aucune séquence consensus n'a été identifiée. La protéine de la nucléocapside (N) du coronavirus IBV contient un motif de huit acides aminés localisés dans la région N-terminale de la protéine qui est nécessaire et suffisant pour la localisation nucléolaire de la protéine N [283]. Comme solution alternative au NoLS, des interactions avec des protéines cellulaires du nucléole peuvent permettre une localisation nucléolaire. Par exemple, la protéine B23 peut voyager entre le noyau et le cytoplasme; ainsi des protéines virales du VIH et HTLV vont profiter de B23 pour faire la navette entre le noyau, le nucléole et le cytoplasme [1, 98, 243, 335]. Dans le cas du VIH, la protéine virale, Tat, va interagir avec la protéine nucléolaire B23 et cette interaction est nécessaire pour sa localisation nucléolaire [201].

Lors d'infections virales, le nucléole peut subir d'importantes modifications morphologiques qui peuvent être impliquées dans différentes étapes du cycle viral. Il a été démontré que la nucléoline peut se retrouver à la surface membranaire et ainsi participer aux étapes précoces d'attachement du VIH [47, 83, 176, 187, 252-254, 327] et du virus coxsackie B [72]. Dans le cas d'une infection par le poliovirus, la nucléoline est redistribuée au cytoplasme [359]. Cette délocalisation aux sites de réplication permet à la nucléoline d'avoir un rôle de chaperonne dans la formation du complexe de préinitiation et ainsi favoriser la traduction des ARNm viraux par les sites internes de liaisons aux ribosomes (IRES) [147]. En parallèle, le poliovirus va inactiver la protéine UBF et le complexe SL-1 ce qui a pour conséquence d'arrêter l'activité de l'ARN pol I [16]. Lors d'une infection par l'adénovirus, la protéine virale V redistribue la nucléoline et B23 au cytoplasme sans perturber la synthèse d'ARNr [222]. Pour augmenter la réplication de l'ADN de l'adénovirus, les protéines B23 et UBF sont séquestrées dans les centres de réplifications viraux qui servent à la transcription et à l'épissage des ARNm viraux [191, 260, 288].

Le VHS cible aussi le nucléole causant ainsi plusieurs modifications. Au cours de l'infection, la structure des nucléoles subit d'énormes changements. Ils deviennent allongés, leur diamètre augmente, les centres fibrillaires diminuent en nombre et, sont partiellement entourés de la composante dense fibrillaire [27]. Des études en microscopie électronique ont démontré que l'ARNr est retenu au nucléole [27-28]. Malgré une diminution de synthèse des protéines cellulaires, la synthèse des protéines ribosomales est maintenue, mais le taux d'assemblage des protéines ribosomales en

ribosomes matures est affaibli [313]. Une étude récente a démontré que l'activité de l'ARN pol I n'est que légèrement diminuée tandis que la synthèse des ribosomes est diminuée. Ceci suggère que durant l'infection par le VHS-1, la biogenèse des ribosomes n'est pas reliée à l'activité de la polymérase, mais aux changements importants dans la voie de maturation des ARNr [22]. Notre laboratoire et d'autres ont démontré que la protéine UBF est recrutée partiellement aux compartiments de répliquons viraux très tôt au cours de l'infection [212, 332]. Cette délocalisation dépend des trois premiers domaines de dimérisation d'UBF [332], mais la redistribution d'UBF est indépendante de la protéine virale UL24 [212] qui sera discutée dans la section suivante. Stow et al. ont démontré que la phosphorylation à la sérine 388 qui est essentielle au recrutement de l'ARN pol I est diminuée au cours de l'infection [332], mais la transcription de l'ADNr semble continuée [212]. La fonction accomplie par UBF lors de l'infection reste à déterminer, mais tous ces résultats suggèrent qu'UBF semble continuer son rôle dans la biogenèse des ribosomes.

Notre laboratoire et d'autres ont déterminé d'autres modifications au nucléole lors de l'infection par le VHS-1. La nucléoline, la fibrillarine et B23 sont redistribués au cours de l'infection [46, 210-212]. Notre laboratoire a démontré que la protéine virale UL24 est suffisante pour induire la redistribution de la nucléoline et de B23 dans les fibroblastes et lignées épithéliales [26, 210], contrairement à la redistribution de la fibrillarine qui est indépendante de la protéine UL24 [211]. Certains aspects de ces études font partie des travaux de mémoire et seront traités en détail dans les sections qui suivent.

En 2008, une équipe a démontré que la nucléoline est requise pour l'infection par le VHS-1 [46]. Lorsque l'expression de la nucléoline est diminuée par des ARN interférant (siRNA), une diminution des titres viraux d'environ 10 à 23 fois est observée comparativement à des cellules infectées, mais non-traitées aux ARN interférant [46]. Par ailleurs, la nucléoline semble être requise pour la sortie des capsides du noyau [292]. L'inhibition de l'expression de la nucléoline par des ARN en structure « d'épingle à cheveux » perturbe le bourgeonnement des nucléocapsides du noyau vers le cytoplasme sans nuire au processus d'encapsidation [292]. Leurs résultats démontrent que 35 % du virus est retrouvé au cytoplasme et dans le milieu extracellulaire lorsque les cellules infectées expriment la nucléoline; contrairement à des cellules infectées dont les

niveaux de la nucléoline sont drastiquement perturbés, seulement 12 % de virus est retrouvé au cytoplasme et dans le milieu extracellulaire [292].

1.3. La protéine virale UL24

1.3.1 La conservation d'UL24 chez les herpesvirus

La protéine virale UL24 est conservée parmi les trois sous-familles des *Herpesviridae*. La présence des homologues d'UL24 chez des virus infectant différents hôtes tels que les humains, les souris et les oiseaux indiquent un gène ancestral commun avant la formation des sous-familles; ce qui veut dire approximativement 180-220 millions d'années [224, 226]. Ceci suggère que la protéine accomplit une fonction importante pour le virus. Un alignement de la séquence d'UL24 d'origines différentes a démontré cinq régions de forte similarité ($\approx 65\%$) au niveau du domaine N-terminal de la protéine [149], tandis que le domaine C-terminal est plus variable [149, 168]. Les régions de fortes similarités sont nommées domaine d'homologie (HD) et contiennent des acides aminés hautement conservés entre homologues d'UL24.

1.3.2 Les caractéristiques d'UL24

1.3.2.1 L'expression de la protéine UL24

Le gène *UL24* chevauche partiellement le gène *tk* dans une orientation tête-à-tête [115, 225]. Le patron de transcription du gène *UL24* est complexe; six transcrits sont exprimés au cours de l'infection par le VHS-1 (Figure 9). Les transcrits 5,6; 5,4; 1,4 et 1,2 kb contiennent le cadre de lecture complet, mais les transcrits traduits en protéine demeurent inconnus. Les transcrits 5,2 et 0,9 kb ont le potentiel d'encoder une forme tronquée de la protéine, car leur transcription débute à l'intérieur du cadre de lecture ouvert. Les transcrits 5,4 et 1,2 kb sont transcrits à partir du second site de départ et ils sont moins abondants. Les transcrits courts (1,4; 1,2 et 0,9 kb) utilisent le signal de polyadénylation du gène *UL24* et ont une cinétique précoce; contrairement aux transcrits longs (5,6; 5,4 et 5,2 kb) qui utilisent le signal de polyadénylation du gène *UL26* situé en aval et qui ont une cinétique tardive [62, 126]. L'inhibition de la réplication virale à l'aide de l'acide phosphocétique (PAA) perturbe les niveaux des transcrits longs

d'approximativement six fois, cependant l'inhibition de la réplication n'a pas d'effet sur les niveaux des transcrits courts [268]. Ceci suggère que les transcrits longs sont traduits en protéine. Il n'existe aucune évidence que les transcrits courts sont traduits et leurs fonctions demeurent inconnues.

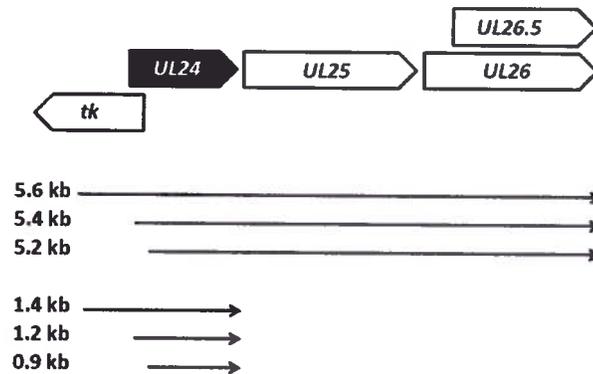


Figure 9. Schéma représentatif des transcrits du gène *UL24* du VHS-1. *UL24* est représenté par la boîte noire et les gènes l'entourant sont représentés par les boîtes blanches. Les différents transcrits sont représentés par les flèches noires. Les chiffres indiquent la longueur des transcrits. Adapté de Pearson A et Coen DM, 2002 [268].

Des études de l'homologue d'UL24 chez le cytomégalovirus humain (HCMV) démontrent que cette protéine, nommée UL76 chez HCMV, a une fonction répressive sur la réplication virale [361]. Un autre rôle possible pour la famille du gène *UL24* est suggéré par l'observation que ORF20, l'homologue chez le « *murine herpesvirus 4* » ou MuHV4, un *gammaherpesvirinae* du genre *Rhadinovirus*, induit un arrêt du cycle cellulaire suivi de l'apoptose lorsque la protéine est exprimée dans des cellules de mammifères [246]. Dernièrement, il a été rapporté que plusieurs homologues d'UL24 du VHS-1, HCMV et KSHV induisent un arrêt du cycle cellulaire en inactivant le complexe mitotique cycline B/Cdc2 suivi de l'apoptose; [245] ce qui corrèle avec les résultats précédents sur ORF20.

Des mutations au niveau des acides aminés hautement conservés affectent la réplication virale *in vitro* [25, 149]. En plus, notre laboratoire a établi l'importance des

HDs quant à la localisation d'UL24 en culture cellulaire, de leurs effets sur le nucléole [26, 210] et sur la réplication virale *in vivo* [196].

La protéine virale UL24 est composée de 269 aa et possède un poids moléculaire d'environ 29,5 kDa. À 9 hpi, UL24 se localise au noyau, au cytoplasme, et de manière transitoire au nucléole [211]. Des expériences de transfection transitoire ont aussi démontré qu'UL24 se localise au nucléole dans une minorité de cellules et autour du noyau dans 64 % des cellules transfectées [26]. Il a été démontré que cette localisation périnucléaire concordait avec le *trans*-Golgi [26]. Entre 9 et 15 hpi, 50 % à 70 % de la protéine UL24 se retrouve au noyau [268]. Vers les 18 hpi, UL24 se localise au cytoplasme avec une localisation périnucléaire plus intense [211, 268]. En inhibant la réplication virale, les niveaux de la protéine sont diminués d'environ six fois ce qui est compatible avec la cinétique « *leaky-late* », car son expression dépendant largement de la réplication de l'ADN viral [268].

1.3.2.2 Le motif d'endonucléase d'UL24

Une étude bio-informatique a identifié dans UL24 un domaine d'endonucléase du style PD-(D/E)XK entièrement conservé [168]. Ce motif appartient à une grande famille d'endonucléases dont la classification regroupe plusieurs familles telles que les endonucléases de restriction (*EcoRI*, *BamHI*, etc), des enzymes de réparation de l'ADN (*MutH* et *Vsr*), des résolvases de jonction de type Holliday (« *Holliday junction resolvases* ») et des enzymes de « *nucleotide-cleaving* » [241]. Ces enzymes ont des fonctions biologiques importantes. Le motif PD-(D/E)XK [11, 41-42, 163] forme le site actif responsable du clivage de divers substrats d'acides nucléiques. La découverte de ce motif apporte d'autres informations quant au rôle qu'UL24 pourrait accomplir au cours de l'infection, quoiqu'aucune activité d'endonucléase n'a été démontrée pour la protéine. Un autre gène viral du VHS-1, *UL12*, contient ce motif d'endonucléase PD-(D/E)XK [42]. Comme UL24, *UL12* n'est pas essentiel pour la réplication virale [364], mais en absence d'*UL12* la synthèse et le traitement de l'ADN viral sont diminués. L'identification du motif et la localisation nucléaire d'UL24 suggèrent qu'UL24 pourrait participer dans la recombinaison homologue de l'ADN viral, un processus intimement lié à la réplication et à l'évolution du virus [341].

1.3.3 L'importance d'UL24 en culture cellulaire et dans la pathogénèse

Chez le VHS-1, UL24 n'est pas requis pour la réplication virale, mais des mutations dans les régions conservées ou une absence d'UL24 réduisent les titres viraux en culture cellulaire de 1 log₁₀ [149]. En absence d'UL24 dans les cellules infectées par le VHS-1, un phénotype de plaque syncytiale (cellules multinucléées) est observé dans certains types cellulaires tels que Hep-2, Vero, BHK et HEL [149, 268, 294, 346]. L'homologue d'UL24 chez le virus de l'herpès bovin (BHV-1) a un profil similaire à la protéine UL24 du VHS-1. L'absence du cadre de lecture d'UL24 du BHV-1 a peu d'effet sur la réplication virale *in vitro*. De plus, la formation de syncytia dans les cellules bovines infectées est absente [366] ce qui suggère que la formation de syncytia dépend du type cellulaire. Un mutant d'UL24 du VHS-2 dont le domaine C-terminal est tronqué forme des plaques syncytiales suggérant que le domaine C-terminal est important pour moduler les événements de fusion [30]. Dans un gradient de saccharose, UL24 du VHS-2 est détecté dans les mêmes fractions que celles contenant la capsid suggérant qu'UL24 serait une composante du tégument et aurait un rôle dans la maturation du virion [140]. Des analyses protéomiques ont été réalisées chez les différents membres des *alpha*herpesvirinae, *beta*herpesvirinae et *gamma*herpesvirinae comme le pseudorabies virus (PRV), le cytomégalovirus humain (HCMV), le cytomégalovirus murin (MCHM), le virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), le gammaherpèsvirus murin 68 (MHV68), le rhadinovirus de singe rhésus (RRV), l'herpèsvirus alcelaphine 1 (AIHV-1) et le virus Epstein-Barr (EBV) [15, 21, 35, 82, 151, 156, 175, 255, 356, 361, 388]. Les résultats de ces études ont démontré que l'homologue d'UL24 chez le MHV68 (ORF20) et HCMV (UL76) est une protéine associée aux virions [35, 361].

Dans un modèle murin d'infection, des substitutions d'acides aminés dans la protéine UL24 du VHS-1 suggèrent qu'UL24 est important pour une réplication au niveau de la cornée, une réplication virale aiguë dans les TGs, une réactivation virale efficace dans des explants de TGs et la sévérité de la maladie [148, 195]. La protéine UL24 du VHS-2 est un déterminant de la pathogénèse dans un modèle d'infection murin et de cochon d'Inde même si la protéine n'est pas requise pour la réplication virale *in vitro* [30], puisqu'un mutant d'UL24 dont le domaine C-terminal est tronqué est avirulent. Les auteurs ont démontré un retard dans la cinétique et une faible progression de la maladie incluant la formation de lésions. Pareillement à UL24 du VHS-1, un mutant d'UL24 du VHS-2 n'est plus neurovirulent et aucune mortalité ou paralysie n'a été observée. Par

contre, un mutant en UL24 du VHS-2 peut établir une latence et se réactiver au niveau du ganglion de la racine dorsale, mais à des taux plus bas que le virus parental [30]. Des études sur la protéine ORF37 du equine herpesvirus ont démontré son importance dans la neuropathogénèse, mais la protéine n'est pas essentielle pour la réplication virale *in vitro* [154]. Tous ces résultats suggèrent que les gènes *UL24* de virus appartenant à la sous-famille *Alphaherpesvirinae* semblent être importants au niveau de la pathogénèse dans le système nerveux.

1.4. Modèles neuronaux pour l'infection virale

Pour étudier l'effet de l'infection virale sur les neurones, plusieurs modèles neuronaux existent. Il y a des modèles utilisant des lignées cellulaires qui ont le potentiel de se différencier en neurones à l'aide de traitement; d'autres modèles utilisent les cultures primaires de neurones.

1.4.1 Les lignées cellulaires

1.4.1.1 Les cellules PC12

La lignée cellulaire PC12 est une lignée clonale neuronale phéochromocytome de rat [118]. Les cellules sont différenciées en neurones (ND-PC12) par le facteur de croissance neuronal (« *nerve growth factor* », NFG) pendant environ sept jours [120]. Cependant, le processus est réversible puisque 24 heures après l'ajout d'un milieu sans NGF environ 75 % des cellules perdent leurs caractéristiques neuronales [118]. Les cellules ND-PC12 possèdent plusieurs propriétés similaires aux neurones sympathiques tels que l'arrêt du cycle cellulaire et la survie dans un milieu sans sérum [100]. De plus, les cellules développent des prolongements axonaux promus par les protéines Tau et MAP2 [81] et peuvent synthétiser, emmagasiner et relâcher des catécholamines [117-118]. Ce modèle neuronal est permissif à l'infection par le VHS-1 [32, 287, 291]; la régulation et l'expression génique du virus ont été étudiées dans ce système [104, 153, 194, 383]. L'équipe de Miller a développé un modèle d'étude de latence et de réactivation du VHS-1 dans les cellules ND-PC12 [67]. Pour établir une infection non productive similaire à la latence *in vivo*, les cellules ND-PC12 sont infectées par le virus VHS-1 en présence d'acycloguanosine (ACV) qui est un inhibiteur de la réplication

virale. L'ACV doit être maintenu dans la culture neuronale jusqu'à 9 jours post-infection, et l'enlèvement de l'ACV ne résulte pas à une réactivation du virus [65, 375]. La réactivation du virus est obtenue en traitant les cellules avec la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase). Dans un modèle de latence, les gènes *LAT* sont exprimés et aucun virus infectieux n'est détecté [66-67].

1.4.1.2 Les cellules NT2

Des cellules humaines embryonnaires pluripotentes issues d'un carcinome de testicule (NTERA-2) ont été clonées pour donner la lignée cellulaire NTERA-2 cl.D1 (NT2) [8]. Ces cellules peuvent être différenciées en neurones à la suite d'un traitement à l'acide rétinoïque. La figure 10 résume le processus de différenciation. Premièrement, les cellules NT2 sont traitées pendant quatre semaines avec une solution de 10 μ M d'acide rétinoïque suivi d'une dilution des cellules (*replate 1*). À cette étape, environ 5 % des cellules ont une morphologie similaire à celle des neurones [192]. Deuxièmement, les cellules sont traitées avec des inhibiteurs mitotiques (cytosine araboside, fluorodeoxyuridine et uridine) pour éliminer les cellules non différenciées. Ce traitement permet d'obtenir une culture neuronale (NT2-N) à environ 95 % pure après deux semaines. Les NT2-N sont viables pour environ dix semaines. Lorsque le processus de différenciation est terminé, les NT2-N expriment divers marqueurs neuronaux tels que les trois classes de neurofilaments (NF-L, NF-M et NF-H) [192, 273], une molécule retrouvée à la membrane exprimée par les neurones et les tumeurs neuronales nommées NCAM [273], et des marqueurs démontrant de l'activité sécrétrice (synaptophysine et chromogranine) [273]. De plus, les cellules NT2-N sont polarisées c'est-à-dire que les NT2-N possèdent des dendrites et des axones fonctionnels [273]. Le modèle neuronal NT2 est susceptible et supporte une réplication productive du coronavirus [102]. Cependant, les NT2-N ne supportent pas très bien la réplication virale du VHS-1 [142, 157]. À faible MOI (0,01 à 1), les titres viraux dans les NT2-N sont réduits entre 10 et 1000 fois comparativement aux titres viraux obtenus dans les cellules fibroblastiques HFL [142].

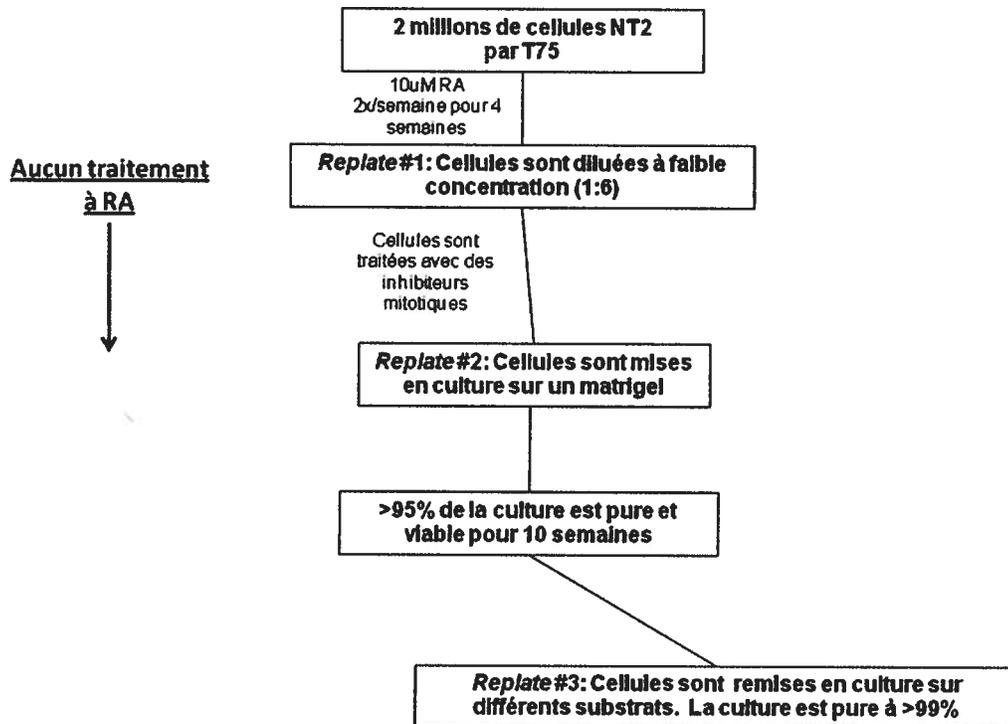


Figure 10. Schéma démontrant la méthode utilisée pour générer les neurones (NT2-N) à partir des cellules NT2 par un traitement à l'acide rétinoïque et d'inhibiteurs mitotiques. Adapté de Pleasure SJ, Page C., Lee V M.-Y., 1992 [273].

1.4.1.3 Les cellules SK-SY5Y

La lignée cellulaire neuroblastome humaine SK-SY5Y est un sous-clone de la lignée cellulaire SK-N-SH [385]. Ces cellules peuvent être différenciées en neurones par plusieurs agents chimiques tels que l'acide rétinoïque [315], le phorbol ester 12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) [265], le dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) [183]. Selon le milieu et les conditions de différenciation, les cellules SH-SY5Y peuvent acquérir le phénotype de neurones cholinergiques (synthétise l'acétylcholine), adrénergiques (synthétise l'adrénaline) ou dopaminergiques (synthétise la dopamine) [385]. Cependant, le traitement à l'acide rétinoïque induit préférentiellement des neurones cholinergiques [266]. À la suite de la différenciation, les cellules possèdent les caractéristiques classiques des neurones telles que l'expression des protéines GAP-43, MAP, Tau et les neurofilaments [58, 113]. Ce modèle neuronal est surtout utilisé pour

l'étude de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. En ce qui concerne leur permissivité aux infections virales, peu est encore connu.

1.4.1.4 Les cellules LA-N-5

Les cellules humaines LA-N-5 sont une lignée cellulaire établie à partir de métastases de la moelle osseuse d'un jeune garçon atteint d'un neuroblastome [307]. Les cellules LA-N-5 non différenciées ont une morphologie similaire à des fibroblastes. Plusieurs produits chimiques tels que l'interféron- γ (γ -IFN), la cytosine arabinoside (ARA-C), le facteur de croissance neuronal (NGF), le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'acide rétinoïque (RA) peuvent induire partiellement ou complètement la différenciation en neurones [185]. À la suite d'un traitement à l'acide rétinoïque, les cellules LA-N-5 développent de longs prolongements cytoplasmiques caractéristiques des neurones [135]. De plus, les cellules LA-N-5 différenciées expriment des marqueurs neuronaux caractéristiques tels que les sous-unités des neurofilaments (NF-200 et NF-160), la molécule d'adhésion NCAM, la protéine membranaire associée à la croissance axonale (GAP-43) et l'enzyme acétylcholinestérase caractéristique des neurones cholinergiques [135]. Cependant, les cellules différenciées en neurones entrent en apoptose après 14 jours de culture [135, 274]. Peu est connu sur leur permissivité et leur susceptibilité aux virus. Dernièrement, le modèle neuronal LA-N-5 a été utilisé pour étudier l'effet d'un coronavirus. Ils ont démontré que la réplication virale était productive dans les LA-N-5 différenciées et dans le modèle neuronal NT2 [102].

1.4.2 Cultures primaires

1.4.2.1 Culture de neurones d'hippocampe

La culture primaire de neurones d'origine embryonnaire est relativement facile à réaliser comparativement à la culture primaire de neurones adultes [17, 38]. Il existe des différences entre les deux cultures sur le plan de la pharmacologie, leur développement et leur régénération [37]. Pour les cultures primaires de neurones embryonnaires, des fœtus (entre 16 et 20 jours de gestation) de rat ou de souris peuvent être utilisés. Une fois les neurones des hippocampes isolés, le temps de différenciation en neurones

matures prend environ une semaine [18, 164]. Après une semaine en culture, les neurones en culture primaire possèdent des dendrites et des axones en plus d'exprimer la protéine MAP2 au niveau de ses prolongements [164]. Par contre, ces cultures primaires neuronales ne sont pas pures à 100 %. Il est possible de retrouver des astrocytes [164], mais en maintenant les cultures dans un milieu sans sérum la croissance des astrocytes est inhibée [219]. De plus, les neurofilaments sont détectables après trois semaines de culture [18]. Au début, ce modèle neuronal a surtout été utilisé pour l'étude du système nerveux central. Par la suite, les cultures primaires ont été utilisées pour l'étude des effets de virus neurotropes comme le virus de l'herpès [200] et le coronavirus [150].

1.4.2.2 Culture de neurones de ganglions dorsaux

Le ganglion de la racine dorsale (DRG) est un nodule contenant les corps cellulaires neuronaux. Le nombre de neurones par DRG chez le rat a été estimé à 16 000 [337] et ils sont décrits comme des neurones pseudounipolaires [45, 79, 203, 281]. Les neurones peuvent être d'origine embryonnaire [382], postnatale [141] ou adulte [306]. L'avantage des neurones provenant d'animaux adultes est leur indépendance aux neurotrophines pour leur survie en plus d'être des neurones matures contrairement aux neurones d'origine embryonnaire qui nécessitent les neurotrophines pour leur survie [229]. Une neurotrophine essentielle est le facteur de croissance neuronal (NGF) qui a pour rôle de différencier et de maintenir les fonctions normales des neurones [343]. Lorsque les cellules sont différenciées, le marqueur GAP-43 permet d'identifier les neurones puisqu'il existe une corrélation entre la croissance des axones et l'expression de GAP-43 [145]. GAP-43 est détectable en haute concentration au niveau des axones et des terminaisons axonales [23, 29]. Ce modèle neuronal a été utilisé très tôt dans la recherche pour étudier la latence du VHS-1. L'équipe de Johnson [373] a démontré la nécessité du facteur de croissance NGF dans le maintien de la latence du virus. De plus, les cultures de DGR sont utilisées pour l'étude de maladie du système nerveux central comme les maladies neurodégénératives et les complications liées au VIH [229].

2. Problématique

Les mécanismes entourant l'infection des neurones demeurent nébuleux. Il est connu que le VHS-1 cible les neurones et que le virus peut se répliquer dans les neurones. Plusieurs protéines semblent jouer un rôle dans le cycle latence/réactivation, dont la protéine UL24. Celle-ci est hautement conservée dans la famille des *Herpesviridae*. Il est connu que la protéine virale UL24 du VHS-1 est importante pour la réplication dans les fibroblastes et lignées épithéliales en culture cellulaire. Par ailleurs, UL24 est important pour de hauts titres viraux dans les TGs et pour la réactivation du virus dans un modèle d'infection murin. Cette protéine cause aussi des modifications au nucléole de fibroblastes et de cellules d'origine épithéliale; notamment, elle induit la redistribution de la nucléoline et la protéine B23 (Annexe I) dans le noyau au cours de l'infection. De plus, certains acides aminés hautement conservés dans le domaine N-terminal d'UL24 affectent la pathogenèse et le nucléole. La mutation E99A/K101A qui cible le domaine d'endonucléase réduit la gravité de la maladie dans un modèle murin d'infection oculaire en plus d'affecter le patron de distribution de la nucléoline et de B23 (Annexe I) dans les fibroblastes et cellules épithéliales. Ces importantes modifications causées par UL24 suggèrent un lien entre les modifications au nucléole et la pathogenèse.

Malgré l'importance d'UL24 dans la neuropathogenèse, aucune étude n'a été faite sur le rôle d'UL24 dans l'infection de neurones en culture. Nous avons posé comme hypothèse que la protéine virale UL24 va perturber le nucléole des neurones pour ainsi favoriser la réplication virale.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons généré deux modèles de cultures neuronales, un modèle *in vitro* et des cultures primaires neuronales de souris. Nous avons regardé la capacité du virus à se répliquer en présence et en absence de la protéine virale UL24. Nous avons aussi caractérisé les modifications au nucléole dans les neurones en contexte d'infection.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cellules

2.1.1 Lignées cellulaires

Les cellules Vero sont des cellules fibroblastiques rénales de singe vert d'Afrique immortalisées. Elles ont été maintenues en culture dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) enrichi de 5 % (v/v) de sérum de veau nouveau-né (NCS) et de 0,5 U/mL de pénicilline et 0,5 µg/mL de streptomycine (P/S). Lorsque les cellules avaient atteint une confluence de 80 %, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec 10 mL de *phosphate buffer saline* (PBS) et ensuite, 2 mL de trypsine/EDTA (2,5 g/L de trypsine et 0,38 g/L d'EDTA) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant 5 minutes pour favoriser le détachement des cellules. Ensuite, 4 mL de DMEM 5 % NCS et P/S ont été ajoutés aux cellules pour les diluer et 1 mL de cellules a été remis en culture dans du DMEM 5 % NCS et P/S. De ce fait, un passage 1 dans 6 a été effectué. Les cellules ont été remises dans l'incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂.

Les cellules LA-N-5 sont des cellules issues d'un neuroblastome humain [307]. Elles ont été maintenues en culture dans du milieu *RPMI medium* 1640 complet c'est-à-dire contenant du sodium pyruvate (NaPu, 1 mM), des acides aminés non essentiels (NEAA, 0,1 mM), de l'HEPES (0,01 M) enrichi de 15 % (v/v) de sérum de bovin foetal (FBS). Lorsque les cellules avaient atteint une confluence de 70-80 % dans un flacon de 75 cm² (T75), le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec 5 mL de PBS suivi de l'ajout de 3 mL de trypsine sans EDTA (2,5 g/L de trypsine). À la suite d'une incubation d'environ 1 minute à la température de la pièce sous l'enceinte biologique, 5 mL de milieu RPMI complet enrichi de 15 % FBS préchauffé ont été ajoutés aux cellules et 2 mL de cellules ont été remis en culture dans du milieu RPMI complet enrichi de 15 % FBS. Ainsi, un passage 1 dans 4 a été effectué. Le lendemain, le milieu devait être changé, car il y avait beaucoup de mortalité. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂.

2.1.2 Processus de différenciation neuronale des cellules LA-N-5

2.1.2.1 Préparation de la solution d'acide rétinoïque

Des solutions stocks d'acide rétinoïque (RA) ont été faites. L'acide rétinoïque est offert sous forme de poudre dans des fioles de verre contenant 50 mg d'acide rétinoïque (Sigma-Aldrich). Pour préparer une solution de RA à une concentration de 10 mM, les 50 mg ont été resuspendus dans 16,7 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO). La solution a été filtrée à l'aide d'un filtre conçu pour le DMSO (Millex LG 0,20 µm, Millipore, SLLG025SS). Finalement, la solution de RA a été aliquotée et conservée à -80 °C pour six semaines maximum.

2.1.2.2 Préparation pour la différenciation de neurones LA-N-5

Pour promouvoir l'attachement cellulaire, la vaisselle utilisée a été traitée avec une solution de gélatine. D'abord, la gélatine (gelatin from cold water fish skin solid, G1393, Sigma-Aldrich) a été diluée dans H₂O_{dd} pour une concentration finale de 1 % (p/v) et stérilisée à l'autoclave. Cette solution servait de solution stock. La journée précédente du processus de différenciation, la vaisselle (Pétri, plaque de 6 puits, lamelles de microscope, etc.) a été traitée avec une solution de gélatine 0,1 % (à partir de la solution stock) diluée dans de H₂O_{dd} stérile. La vaisselle a été entreposée à 4 °C toute la nuit, le lendemain la solution de gélatine a été aspirée. Des plaques de 6 puits qui sont prétraitées nommées Cell + (Sarstedt, produit numéro 83.1839.300) ont aussi été utilisées.

2.1.2.3 Différenciation neuronale de cellules LA-N-5

Les cellules LA-N-5 ont été ensemencées à une densité cellulaire déterminée (4x10⁴ cellules/puits pour une plaque de 6 puits; 1,5x10⁴ cellules/puits pour une plaque de 24 puits) dans du milieu *RPMI medium* 1640 complet enrichi de 15 % FBS préchauffé ce qui correspond au jour 0. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec une solution d'acide rétinoïque de 10 µM (à partir de la solution stock) diluée dans du milieu *RPMI medium* 1640 complet contenant 10 % FBS préchauffé. Aux deux jours, soit le jour 3, 5 et 7, le milieu contenant l'acide rétinoïque a été remplacé par du nouveau milieu. Les cellules ont été complètement différenciées dans les sept jours suivant le premier

traitement. Au jour 8, les expériences pouvaient être effectuées. Les neurones différenciés peuvent être conservés en culture pour 14 jours [135, 274].

2.1.4 Cultures primaires neuronales de souris

Afin de promouvoir l'attachement cellulaire, la vaisselle utilisée a été traitée avec une solution de poly-D-lysine (P7280, Sigma- Aldrich) qui apporte une charge positive à la surface. D'abord, la poly-D-lysine a été resuspendue dans 50 mL H₂O_{dd} stérile pour une concentration finale de 0,1 mg/mL. Ensuite, la solution a été rediluée à une concentration de 0,05 mg/mL et environ 0,15 mL/cm² ont été déposés dans chaque puits (1,4 mL pour les plaques de 6 puits et 0,5 mL pour les plaques de 24 puits). La vaisselle a été entreposée à 4 °C toute la nuit. Le lendemain, la solution de poly-D-lysine a été aspirée et la vaisselle a été lavée à H₂O_{dd} stérile pour être ensuite séchée au moins deux heures sous l'enceinte biologique.

Des souris CD-1 femelles aux 16^e-18^e jours de gestation (Charles River ou Jackson Laboratories) ont été utilisées pour générer les cultures primaires neuronales de souris [37]. Les expériences ont été faites au Centre de Biologie Expérimentale de l'INRS conformément aux normes du comité institutionnel pour la bonne pratique de soins aux animaux. Pour commencer, la souris a été anesthésiée par une injection intrapéritonéale d'une solution saline de kétamine/xylazine (kétamine à 10 mg/kg de souris et xylazine à 10 mg/kg de souris). Lorsque la souris ne démontrait pas de réflexes, elle a été sacrifiée par dislocation cervicale. Les embryons ont été prélevés. Par la suite, la tête de chaque embryon a été récoltée et déposée dans un tube de 50 mL contenant du *Hank's Balanced Salt solution* (HBSS) sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (14175-145, Invitrogen) enrichis de sodium pyruvate (NaPu, 0,1 mM), HEPES (10 mM) et P/S. Les hémisphères cérébraux ont été isolés et les méninges ont été enlevées. Les hémisphères ont été centrifugés à basse vitesse (100 rpm (215 x g) durant 1 minute, « *swinging bucket rotor* » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT) dans des tubes de 50 mL pour changer le HBSS par du HBSS frais. Cette étape a été répétée trois fois afin de nettoyer les hémisphères. Les hémisphères isolés ont été triturés à l'aide d'une pipette Pasteur dont la pointe avait été rodée par la flamme. À la suite de la trituration, les cellules non dissociées se déposaient dans le fond du tube et les cellules dissociées (neurones) restaient en suspension dans le milieu. Le surnageant contenant

les cellules dissociées a été récolté et, transféré dans un nouveau tube de 50 mL. La trituration a été répétée de quatre à cinq fois. Ensuite, le tube de 50 mL contenant la solution de neurones a été centrifugée à basse vitesse (1000 rpm (215 x g, « *swinging bucket rotor* » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT) pendant 2 minutes, et le culot a été délicatement resuspendu dans 1 mL de HBSS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ enrichis de NaPu, HEPES et P/S par cerveau. Les neurones ont été comptés à l'aide d'un hématocrite. Finalement, les cellules neuronales ont été diluées à la concentration désirée soit 640 cellules/mm² ou 400 cellules/mm² pour les expériences d'immunofluorescence dans du milieu Neurobasal sans glutamate (10888-022, Invitrogen) enrichi de L-glutamine (2,5 mM) et supplément B27 (17504-044, Invitrogen) (dilué à 1/50). La moitié du milieu a été changée après 4 jours par du milieu Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine (2,5 mM) et supplément B27 (dilué à 1/50) et changée régulièrement une fois par semaine.

2.2 Virus

2.2.1 Origine des souches virales et production de stocks viraux

Les souches virales du virus de l'herpès simplex 1 KOS (type sauvage) et UL24X (déficient en la protéine UL24) [148] ont été fournies par Donald M. Coen (*Harvard Medical School*, Boston). De plus, le virus vHA-UL24 est un virus recombinant avec une étiquette d'hémagglutinine (HA) ajoutée en position N-terminale de la protéine virale UL24 [211]. Ce virus démontre un phénotype de type sauvage [211]. Tous les stocks viraux ont été générés à partir de flacons 175 cm² (T175) contenant 3x10⁷ cellules Vero infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans 10 mL de milieu DMEM 2 % NCS et P/S. Les flacons ont été incubés à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant une heure et agités toutes les 15 minutes pendant cette heure. Ensuite, 15 mL de DMEM 5 % NCS et P/S ont été ajoutés aux flacons. Ceux-ci ont été remis dans l'incubateur pour une période de deux à trois jours. Lorsque toutes les cellules démontraient des effets cytopathiques et que 20 % des cellules étaient décollées, les flacons ont été frappés légèrement pour décoller le restant des cellules suivi d'une centrifugation à 1500 rpm (484 x g) de 10 minutes à 4 °C (« *swinging bucket rotor* » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT). Le culot de cellules infectées a été resuspendu dans 2 mL de DMEM 5 % NCS et P/S par flacon et transféré dans un nouveau tube. Après, les

cellules ont été lysées par trois cycles de congélation/décongélation et soniquées pendant 30 secondes (Digital Sonifier de Branson, amplitude de 50 %, pulsations de 0,5 seconde) avec une sonde de type gobelet. Par la suite, les débris cellulaires ont été enlevés par une centrifugation à 1500 rpm (484 x g) pendant 10 minutes à 4 °C (« *swinging bucket rotor* » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT). Le surnageant contenant les particules virales a été récolté et aliquoté dans des cryotubes vissés de 1,5 mL. Les stocks viraux ont été conservés à -80 °C.

2.2.2 Détermination des titres viraux

Les titres viraux ont été déterminés par essai de plages de lyses. La journée précédente, des plaques de 12 puits contenant 3×10^5 cellules Vero par puits ont été préparées. Des dilutions en série (10^{-1} à 10^{-8}) des échantillons à titrer ont été faites en duplicata dans un volume de 1 mL de DMEM 2 % NCS et P/S. Le milieu des plaques de 12 puits a été changé pour 300 μ L de DMEM 2 % NCS et P/S. Par la suite, les cellules ont été infectées avec 100 μ L des dilutions 10^{-3} à 10^{-8} . Les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant une heure avec agitation toutes les 15 minutes durant cette heure. Après cette incubation, 1 mL de DMEM 2 % NCS, P/S et à 0,6 % de méthylcellulose a été ajouté à chaque puits. L'ajout de méthylcellulose empêche la diffusion passive des particules virales ce qui permet de compter des plages de lyse isolées et issues d'une particule virale infectieuse. Les plaques ont été remises en incubation à 37 °C avec 5 % CO₂ pour trois jours. Trois jours postinfection (jpi), les cellules ont été fixées par l'ajout de 1 mL de fix (solution d'acide acétique glacial et de méthanol à une proportion de 1 pour 3) par puits et les plaques ont été incubées à la température de la pièce pendant une heure. Ensuite, la solution de fix a été enlevée des puits et les cellules ont été colorées à l'aide d'une solution de crystal violet (250 mL de méthanol, 750 mL d'H₂O_{dd} et 0,5 % (p/v) de crystal violet) pour au moins 1 heure. Les puits ont été lavés à l'eau et séchés. Les titres viraux sont exprimés par unité formatrice de plage (PFU) par mL.

2.2.3 Production du virus KOS UV-inactivé

Tout d'abord, un stock viral de KOS a été produit comme décrit précédemment. De ce nouveau stock, la moitié a été utilisée pour produire le virus KOS UV-inactivé. Le virus a été réparti dans une plaque de 6 puits à raison de 0,5 mL de virus par puits. L'incubation de la plaque sous les UVs a été réalisée dans une boîte contenant une lampe ultra-violette (254 nm, 115 volts, 60 Hz) pour 20 minutes. Pour maximiser l'inactivation, le couvercle de la plaque a été retiré et la plaque a été située à 10 cm de la lampe UV. Finalement, le virus a été titré et les aliquots ont été conservés à -80 °C. L'inactivation du virus résulte en une diminution des titres viraux d'au moins 3 log₁₀ comparativement aux titres viraux de KOS non traité.

2.3 Cinétique d'infection

2.3.1 Cinétique d'infection dans les cellules LA-N-5 différenciées en neurones

Pour étudier la réplication des virus dans les cellules neuronales, des cinétiques d'infection ont été réalisées. Des plaques de 6 puits Cell+ ont été préparées une semaine avant avec 4x10⁴ cellules LA-N-5 par puits afin d'obtenir environ 1x10⁶ cellules neuronales par puits à la fin du processus de différenciation. Le compte des cellules d'un puits témoin a été effectué à l'aide d'un hématocrite avant l'infection. Les cellules ont été infectées à une MOI de 10 dans 2 mL de *RPMI medium* 1640 complet enrichi de 1 % (v/v) FBS préchauffé. Les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant une heure avec agitations toutes les 15 minutes. Ensuite, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS par puits pour ensuite ajouter 2 mL de *RPMI medium* 1640 complet enrichi de 2,5 % FBS préchauffé. Les plaques ont été remises à 37 °C avec 5 % CO₂ pour 1, 6, 12, 18 et 24 heures. Aux heures postinfection (hpi) convenues, les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir. Les cellules et le surnageant ont été mis dans des tubes de polypropylène de 15 mL pour être congelées à -80 °C. Avant de procéder au titrage, les cellules ont été soumises à trois cycles de congélation/décongélation et soniquées (Digital Sonifier de Branson, amplitude de 50 %, pulsations de 0,5 seconde) en utilisant une sonde de type goblet suivie d'une centrifugation à 1500 rpm (484 x g) pour 5 minutes à 4 °C (« *swinging bucket rotor* » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT) afin d'éliminer les débris

cellulaires. Pour cet essai, le nombre de particules virales totales produites (intracellulaires et extracellulaires) lors de l'infection a été déterminé.

2.3.2 Cinétique d'infection dans les neurones en culture primaire

Afin de vérifier la réplication des virus dans les cultures primaires neuronales de souris, des cinétiques d'infection ont été réalisées. Les neurones en culture primaire isolés ont été mis en culture à une densité cellulaire de 640 cellules/mm² par puits dans du milieu Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine et supplément B27. Les cellules ont été infectées à une MOI de 0,1 dans 2 mL de milieu Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine et supplément B27. Les cellules infectées ont été incubées à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant une heure et agitées gentiment toutes les 15 minutes. Après, le milieu a été retiré. Les cellules ont été lavées délicatement avec 1 mL de PBS et par la suite, 2 mL de milieu Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine et supplément B27 a été ajoutés à chaque puits. Les cellules ont été remises dans un incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂. Les cellules ont été incubées pour un nombre d'heures désiré soit 1, 12, 24, 36, 48, 72 et 168 hpi. À chaque temps postinfection, les cellules ont été récoltées à l'aide d'un grattoir. Les cellules et le surnageant ont été mis dans des tubes de polypropylène de 15 mL pour être congelées à -80 °C. Avant de réaliser le titrage, les cellules ont été soumises à trois cycles de congélation/décongélation et soniquées (Digital Sonifier de Branson, amplitude de 50 %, pulsations de 0,5 seconde), suivi d'une centrifugation à 1500 rpm (484 x g) pour 5 minutes à 4 °C (« *swinging* bucket rotor » 7500 6441, centrifugeuse modèle Sorvall legend RT) afin d'éliminer les débris cellulaires. Pour cet essai, les virus produits totaux (intracellulaires et extracellulaires) lors de l'infection ont été titrés.

2.4 Immunofluorescence indirecte

2.4.1 Infection

Les cellules LA-N-5 ont été mises en culture sur des lamelles de microscope numéro 1 (Canlab) une semaine avant l'expérience pour effectuer la différenciation par l'acide rétinoïque. Les cellules ont été non infectées (mock) ou infectées à une MOI de 10 avec les virus (KOS, UL24X ou le virus KOS UV-inactivé) ou à une MOI de 5 avec le

virus vHA-UL24 dans 200 μ L de *RPMI medium* 1640 complet enrichi de 1 % (v/v) FBS préchauffé. Les cellules ont été incubées pendant une heure à 37 °C avec 5 % CO₂ en plus d'être agitées toutes les 15 minutes. Ensuite, le milieu a été retiré délicatement et les cellules ont été lavées avec 0,5 mL de PBS pour remettre ensuite 1 mL de *RPMI medium* 1640 complet enrichi de 2,5 % FBS préchauffé. Les cellules non infectées et infectées ont été remises en incubation à 37 °C avec 5 % CO₂ pour un nombre d'heures déterminé. Par la suite, les cellules ont été fixées à l'aide de 200 μ L d'une solution 4 % (p/v) de paraformaldéhyde diluée dans du PBS pendant 20 minutes sous l'enceinte biologique. Les cellules ont été lavées avec 0,5 mL de PBS et conservées dans 1 mL de PBS toute la nuit à 4 °C.

Pour les expériences d'immunofluorescence sur des cellules Vero, les cellules ont été mises en culture sur des lamelles de microscope numéro 1 (Canlab) à une densité de 1×10^5 cellules/mL à raison de 0,5 mL par puits la journée précédente. Le jour de l'infection, les cellules ont été non infectées (mock) ou infectées avec le virus KOS ou KOS UV-inactivé dans 200 μ L de DMEM 2 % NCS et P/S. Elles ont été incubées pendant une heure à 37 °C avec 5 % CO₂ avec une agitation toutes les 15 minutes. Ensuite, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec 0,5 mL de PBS pour ensuite remettre 0,5 mL de DMEM 5 % NCS et P/S. Les cellules ont été remises dans l'incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂. À 18 heures postinfection (hpi), les cellules ont été fixées avec une solution de 2 % (p/v) paraformaldéhyde diluée dans du PBS pendant 10 minutes sous l'enceinte biologique et lavées avec 0,5 mL de PBS.

2.4.2 Technique d'immunomarquage

Les neurones fixés ont été perméabilisés avec 200 μ L de méthanol prérefroidi pendant 5 minutes à -20 °C suivi de deux lavages au PBS. En fonction des anticorps utilisés, 200 μ L d'une solution de blocage (10 % (v/v) de sérum humain (HS) et 0,1 % de Triton X-100 dilué dans du PBS) ont été ajoutés à chaque puits pendant 30 minutes à la température de la pièce. Par la suite, les neurones ont été incubés avec l'anticorps primaire choisi dilué dans la solution de blocage ou dans le PBS si aucun blocage n'a été effectué. L'incubation de l'anticorps primaire a été réalisée à la température de la pièce sur un agitateur à faible vitesse pendant une heure. Ensuite, la solution d'anticorps primaire a été enlevée et les neurones ont été lavés au PBS trois fois 4 minutes avec

une légère agitation. Les neurones ont été incubés avec une solution d'anticorps secondaire contenant un colorant pour le noyau dilué dans la solution de blocage ou dans du PBS si aucun blocage n'a été effectué. Cette incubation a été faite à la température de la pièce sur un agitateur à faible vitesse pendant une heure. La solution d'anticorps secondaire a été retirée et les neurones ont été lavés avec du PBS trois fois 4 minutes avec une légère agitation. Finalement, les lamelles ont été immobilisées sur des lames de microscope (Fisher Scientific) à l'aide de la solution de montage « ProlongGold antifade reagent » (Invitrogen).

Pour les cellules Vero, celles-ci ont été perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0,01 % (v/v) de Triton X-100 pendant 10 minutes à la température de la pièce suivi de deux lavages au PBS. Les cellules ont été traitées avec 200 µL d'une solution de blocage (10 % (v/v) NCS, 0,01 % Tween diluée dans du PBS) pendant 30 minutes à la température de la pièce. Par la suite, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire choisi dilué dans la solution de blocage. L'incubation de l'anticorps primaire a été réalisée à 37 °C dans une chambre humide pendant une heure. Ensuite, la solution d'anticorps primaire a été enlevée et les cellules ont été lavées au PBS trois fois 4 minutes avec une légère agitation. Les cellules ont été incubées avec une solution d'anticorps secondaire contenant un colorant pour le noyau dilué dans la solution de blocage. Cette incubation a été faite à 37 °C dans une chambre humide pendant une heure. La solution d'anticorps secondaire a été retirée et les cellules ont été lavées avec du PBS trois fois 4 minutes avec une légère agitation. Finalement, les lamelles ont été immobilisées sur des lames de microscope (Fisher Scientific) à l'aide de la solution de montage « ProlongGold antifade reagent » (Invitrogen).

2.4.3 Anticorps pour les expériences de microscopie confocale

Afin de détecter les différentes protéines du nucléole dans les cellules LA-N-5 différenciées en neurones ou dans les cellules Vero, plusieurs anticorps primaires ont été utilisés. Pour le marquage de la nucléoline, un anticorps polyclonal de lapin contre la nucléoline (Abcam) à une dilution 1/100 a été utilisé. Pour la protéine B23, un anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/300 a été utilisé pour les neurones tandis qu'une dilution de 1/600 a été utilisée pour les cellules Vero. Pour détecter la protéine fibrillarine, un anticorps de souris monoclonal dirigé contre la

fibrillarine (Cederlane) a été utilisé à une dilution de 1/50. Finalement, le marquage de la protéine UBF dans les neurones a été réalisé avec un anticorps polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology) à une dilution de 1/60. Le marquage de la protéine UBF dans les cellules Vero a été réalisé avec un anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology) à une dilution de 1/100. Pour détecter HA-UL24, un anticorps monoclonal de rat dirigé contre HA (Roche) à une dilution de 1/25 a été utilisé. Pour la détection d'ICP8, un anticorps de souris monoclonal dirigé contre ICP8 à une dilution de 1/80 a été utilisé. Pour visualiser l'étendue de l'infection, un anticorps de lapin polyclonal dirigé contre le HSV-1 (Abcam) a été utilisé à une dilution de 1/500. La pureté de la culture neuronale à la suite de la différenciation des cellules LA-N-5 par l'acide rétinoïque a été déterminée par un anticorps polyclonal de lapin contre le neurofilament M (Milipore, dilution 1/200). Des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les Igs de lapin, de souris ou de rat et conjugués à un Alexa 488 (Invitrogen) ont été utilisés à une dilution de 1/500. Pour la coloration du noyau, le colorant Draq5 (Biostatus limited) a été utilisé à une dilution de 1/250. Les marquages de la nucléoline et d'UBF effectués dans les neurones ont été dilués dans la solution de blocage (10 % (v/v) HS et 0,1 % Triton X-100) afin d'éliminer la non-spécificité des anticorps.

2.4.4 Microscopie confocale

La microscopie confocale a été faite au service de confocal de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les cellules ont été visualisées à l'aide du confocal (BioRad Radiance 2000) avec un laser argon-krypton à 488 et 568 nm (diode 638) monté sur un microscope Nikon E800 (objectif 100X, N.A.1.4). Les images en format tif obtenues ont été assemblées avec le programme Adobe Photoshop.

2.5 Immunobuvardage de type Western

2.5.1 Infection et lyse des cellules

Les cellules LA-N-5 ont été mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ dans des Pétris de 100 mm préalablement traités avec une solution de 0,1 % (v/v) gélatine une semaine avant l'infection pour permettre la différenciation des cellules en neurones. Les neurones ont été non infectés (mock) ou infectés avec une MOI de 10 avec KOS ou UL24X dans

1,5 mL de *milieu RPMI medium 1640* complet enrichi de 1 % (v/v) FBS préchauffé pour une heure à 37 °C et 5 % CO₂ avec des agitations toutes les 15 minutes. Ensuite, le milieu a été retiré; les neurones ont été lavés avec du PBS et 8 mL de *milieu RPMI medium 1640* complet enrichi de 2,5 % FBS étaient ajoutés. Les neurones ont été remis dans l'incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂. À 9 hpi, les neurones ont été lavés au PBS pendant 5 minutes sur glace. Par la suite, 3 mL de RIPA Buffer (50 mM Tris, 1 % (v/v) Triton, 0,5 % DOC, 0,1 % (p/v) SDS et 500 mM NaCl dans H₂O_{dd}) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéase (Complete mini EDTA-free, Roche) ont été ajoutés à chaque Pétris. Les Pétris ont été incubés sur glace pendant 15 minutes. Les neurones ont été récoltés à l'aide d'un grattoir. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 25 minutes à 4 °C dans une microcentrifugeuse, le surnageant a été aliquoté et les lysats de protéines ont été conservés à -80 °C.

Pour les lysats de culture primaire neuronale de souris, 6,1x10⁵ cellules/puits ont été mises en culture dans des plaques de 6 puits préalablement traitées à la poly-D-lysine. Les cellules ont été non infectées (mock) ou infectées à une MOI de 1 avec le virus KOS ou UL24X dans 1 mL de Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine et supplément B27 pendant une heure à 37 °C avec 5 % CO₂ avec une légère agitation toutes les 15 minutes. Par la suite, le milieu a été retiré délicatement, les cellules ont été lavées avec du PBS et 2 mL de Neurobasal sans glutamate enrichi de L-glutamine et supplément B27 ont été ajoutés à chaque puits. À 6, 12 et 24 hpi, les lysats de protéines ont été réalisés comme décrits précédemment.

2.5.2 Précipitation au TCA

Pour concentrer les lysats de protéines issus des cultures primaires de neurones, les protéines ont été précipitées à l'aide du sodium trichloroacétate (TCA). Deux volumes d'une solution de TCA 20 % (v/v) a été ajoutés aux lysats protéiques et ce mélange a été incubé à -20 °C pendant 45 minutes suivies d'une centrifugation à 4 °C pendant 15 minutes à une vitesse de 13 000 rpm. Le surnageant a été enlevé délicatement et le culot a été lavé avec 350 µL d'acétone prérefroidi à -20 °C suivis d'une seconde centrifugation à 4 °C pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été enlevé délicatement et le culot a été séché à l'air libre pendant environ 10 minutes. Le culot a été resuspendu soit dans du RIPA Buffer avec l'inhibiteur de protéase ou dans

de« *sample buffer* » (100 mM Tris-HCl pH 8,8; 2 % (v/v) β -mercaptoéthanol; 2 % (v/v) SDS; 15 % (v/v) glycérol; 0,01 % (p/v) bleu de bromophénol) et utilisé immédiatement pour les analyses. Toutes les centrifugations ont été faites dans une microcentrifugeuse.

2.5.3 Immunobuvardage de type Western

Après avoir déterminé les volumes de lysat qui seront utilisés, les échantillons ont été préparés en ajoutant le tampon de chargement 6X (à 0,5 % (p/v) de bromophénol bleu et 10 % (v/v) de β -mercaptoéthanol). Les échantillons ont été chauffés à 100 °C pour une minute et remis sur glace. Les échantillons ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant (au SDS) et migrés par électrophorèse dans un tampon de migration (3 g de Tris, 14,4 g de glycine et 0,1 % (v/v) SDS dans 1 L H₂O_{dd}) à 100V pendant 90 minutes. À l'aide d'un transfert humide, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) dans un tampon de transfert (3 mg/mL de Tris base, 14,4 mg/mL de glycine, 20 % (v/v) de méthanol dans 1 L H₂O_{dd}). À la suite du transfert, la membrane a été incubée dans une solution de 5 % (p/v) de lait (produit Biorad) diluée dans du TTBS (2,422 g de Tris, 29,2 g de NaCl dans 1 L de H₂O_{dd} à 0,05 % (v/v) de Tween et à pH 7.5) toute la nuit à 4 °C pour ainsi bloquer les sites non-spécifiques à l'anticorps primaire. La membrane a été lavée deux fois pendant 5 minutes au TTBS et une solution d'anticorps primaire (dilué dans 10 mL de TTBS à 0,5 % (p/v) gélatine) a été ajoutée pour une incubation d'une heure, 1 h 30 ou toute la nuit à la température de la pièce avec une légère agitation. Après 4 lavages de 5 minutes au TTBS, l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP, dilué dans 10 mL de TTBS à 5 % (p/v) de solution de blocage) a été incubé pour une heure à la température de la pièce avec une légère agitation. Finalement, la membrane a été lavée 4 fois 5 minutes au TTBS et la révélation a été réalisée en utilisant l'ensemble *Immun-Star* HRP (BioRad) et des films Biomax XAR (Kodak).

2.5.4 Anticorps pour les expériences d'immunobuvardage de type Western

Afin de détecter les protéines du nucléole à l'étude, plusieurs anticorps ont été utilisés. Pour détecter la nucléoline, un anticorps polyclonal de lapin contre la nucléoline (Abcam) à une dilution de 1/2000 et un IgG de chèvre dirigé contre les Igs de lapin

conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, Béthyl) ont été utilisés. Pour la protéine B23, un anticorps monoclonal de souris dirigé contre B23 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1/5000) et un IgG de chèvre dirigé contre les Igs de souris conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, CalBiochem) ont été utilisés. Pour détecter la protéine UBF, un anticorps polyclonal de lapin contre la protéine UBF (Santa Cruz Biotechnology) à une dilution de 1/1500 et un IgG de chèvre dirigé contre les Igs de lapin conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000, Béthyl) ont été utilisés.

Pour étudier la cinétique de répllication dans les cultures primaires neuronales de souris, plusieurs anticorps ont été utilisés. La détection de la protéine virale immédiate-précoce ICP27 a été réalisée par un anticorps de souris monoclonal dirigé contre ICP27 (dilution 1/1000, Abcam) et un anticorps de chèvre dirigé contre les Igs de souris conjugué à la peroxydase (1/2000, Sigma). Pour la protéine virale précoce thymidine kinase (TK), un anticorps de lapin contre TK (Sérum donné par Bill Summers, Yale) à une dilution 1/500 et un IgG de chèvre dirigé contre les Igs de lapin conjugué à la peroxydase (dilution 1/2000, Sigma) ont été utilisés. La détection de la glycoprotéine virale gD a été réalisée avec un anticorps de souris monoclonal contre gD (dilution 1/1000, gD) et un anticorps de chèvre dirigé contre les Igs de souris conjugué à la peroxydase (1/1000, Sigma). La glycoprotéine virale gC a été détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris (dilution 1/1000, Fitzgerald) et un IgG de chèvre dirigé contre les Igs de souris conjugué à la peroxydase (1/5000, Sigma). Pour détecter la présence de protéines virales, un anticorps de lapin polyclonal contre HSV-1 (dilution 1/2000, Abcam) et un anticorps de chèvre dirigé contre les Igs de lapin conjugué à la peroxydase (dilution 1/2000, Béthyl) ont été utilisés. Pour le témoin de chargement, un anticorps polyclonal de souris monoclonal dirigé contre la gamma-tubuline (Abcam, dilution 1/2000) a été utilisé et un anticorps de chèvre dirigé contre les Igs de souris conjugué à la peroxydase (dilution de 1/2000, Sigma) a été utilisé. Tous les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de 0,5 % (p/v) gélatine dans du TTBS et les anticorps secondaires ont été dilués dans une solution de 5 % (p/v) de solution de blocage dans du TTBS.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1 Caractérisation du modèle LA-N-5

Le modèle LA-N-5 a été choisi pour faire nos analyses puisque le processus de différenciation était plus rapide (7 jours) que le processus de différenciation des cellules NT2 (3 mois). Aussi les marqueurs neuronaux des cellules différenciées LA-N-5 et NT2 sont similaires [135, 273]. Par ailleurs, une étude récente a démontré que les cellules différenciées LA-N-5 et NT2 en neurones sont susceptibles à l'infection d'un coronavirus produisant des titres viraux similaires [102].

Avant d'entreprendre les études sur la réplication virale dans les neurones humains du modèle LA-N-5, une caractérisation du modèle LA-N-5 au niveau de la pureté de la culture neuronale a été nécessaire. Tout d'abord, une observation en microscopie à contraste de phase nous a permis d'observer comme attendu que les cellules LA-N-5 non différenciées avaient une morphologie similaire à celle des fibroblastes et que les cellules LA-N-5 différenciées avaient formé des prolongements cytoplasmiques à la suite du processus de différenciation (Figure 11A). Le processus de différenciation à l'acide rétinoïque a été vérifié à l'aide d'un immunomarquage contre le neurofilament M, un filament intermédiaire spécifique aux neurones. Il a été observé qu'au jour 5 de la différenciation, les cellules commençaient à exprimer le neurofilament M contrairement au jour 0 où le neurofilament M n'a pas été détecté. Au jour 8, le processus de différenciation étant terminé, la majorité des cellules exprimaient le neurofilament M (Figure 11B). De plus, le niveau de pureté de la culture neuronale a été évalué de manière qualitative grâce au marquage contre le neurofilament M qui nous a permis de constater que la culture neuronale avait une pureté élevée (>95 %). Donc, le processus de différenciation à l'acide rétinoïque fonctionnait et la pureté de la culture neuronale était élevée.

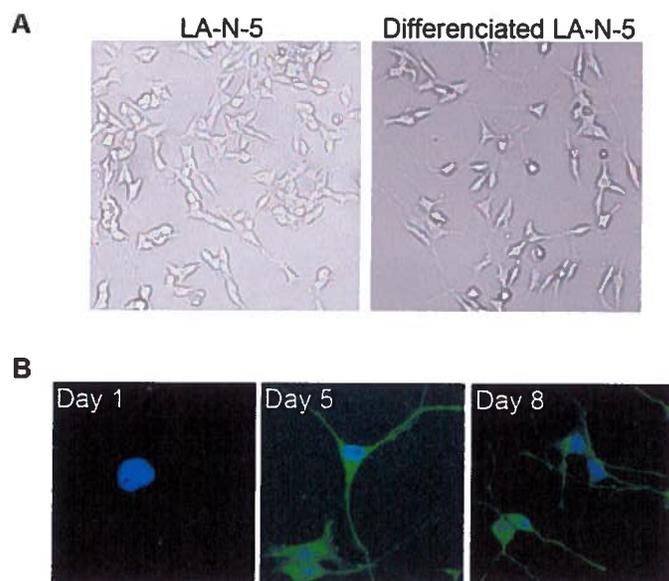


Figure 11. Caractérisation des neurones du modèle LA-N-5. **(A)** Cellules LA-N-5 non différenciées (panneau de gauche) et cellules LA-N-5 différenciées à l'acide rétinoïque (panneau de droite). Les photos ont été prises en microscopie de contraste de phase. **(B)** Aux jours 0, 5 et 8 du processus de différenciation à l'acide rétinoïque, les cellules ont été fixées et marquées pour le neurofilament M (vert) et le noyau (bleu). Les images ont été prises en microscopie confocale.

En deuxième lieu, la permissivité des neurones du modèle LA-N-5 à l'infection par le VHS-1 a été évaluée. Un indice que la réplication virale a lieu est la formation de compartiments de réplication viraux (VRCs). Les neurones non infectés (mock) ou infectés par le virus de type sauvage (KOS) ont été marqués à 9 hpi par un anticorps reconnaissant une des protéines majeures des VRCs, soit ICP8. Les images présentées sont représentatives des résultats obtenus dans trois expériences indépendantes. La figure 12A démontre que les neurones infectés par KOS avaient formé des VRCs d'apparence similaire à ce qui a été observé dans les fibroblastes [212]. Donc, comme le virus semblait se répliquer dans les neurones, une cinétique de réplication virale d'un cycle de réplication sur 24 hrs a été réalisée. Les neurones ont été infectés par le virus KOS à une MOI de 10 pour ainsi s'assurer que toutes les cellules sont infectées. Aux temps postinfection déterminés, le surnageant et les cellules ont été récoltés. La

détermination des titres viraux a été faite par essai de plages de lyse. La figure 12B (ligne noire) montre que le virus se répliquait au cours du temps atteignant des titres viraux avoisinant 1×10^7 pfu/mL. Donc, le modèle LA-N-5 peut être utilisé pour étudier l'infection de neurones par le VHS-1.

3.2 Effet de la protéine virale UL24 sur la réplication dans les neurones

La protéine virale UL24 est importante pour la réplication virale dans les fibroblastes et cellules d'origine épithéliale en culture cellulaire [149]. Par ailleurs, l'absence d'UL24 dans le modèle d'infection oculaire murin cause une diminution des titres viraux dans les TGs [148]. Donc, l'implication d'UL24 au niveau de la réplication virale dans les neurones a été étudiée. En premier, un marquage des VRCs par un anticorps dirigé contre ICP8 a été réalisé sur les neurones infectés par le virus déficient en UL24 (UL24X) à une MOI de 10 (Figure 12A). Les images présentées sont représentatives des résultats obtenus dans trois expériences indépendantes. Nous n'avons pas remarqué de différence de taille des VRCs formés dans les cellules infectées par UL24X comparée à celles infectées en parallèle par KOS.

Ensuite, l'effet de l'absence d'UL24 a été évalué par une cinétique de réplication d'une durée de 24 hrs. Les neurones ont été infectés par UL24X à une MOI de 10. À 6, 12, 18 et 24 hpi, le surnageant et les neurones ont été récoltés et la production de virus a été déterminée par essai de plages de lyses. Malgré la formation de VRCs similaires à ceux formés dans les neurones infectés par KOS, le virus déficient en UL24X possédait un défaut dans la réplication virale. Une différence d'environ $1 \log_{10}$ a été observée entre KOS et UL24X (Figure 12B). Nous avons observé des résultats similaires pour l'infection des cellules LA-N-5 non différenciées (A.Bourget données non publiées). Aussi, une cinétique d'infection de 72 hpi à faible MOI (0,01 à 0,1) a été effectuée pour regarder l'effet d'UL24 sur plusieurs cycles de réplication, mais les neurones mourraient dès 24 hpi (A.Bourget, données non publiées). Dans ces conditions, l'absence d'UL24 se reflétait par un défaut de la réplication virale dans les neurones quoique cette différence de $1 \log_{10}$ ne puisse pas expliquer la réduction de $4 \log_{10}$ des titres neuronaux observée dans un modèle murin d'infection.

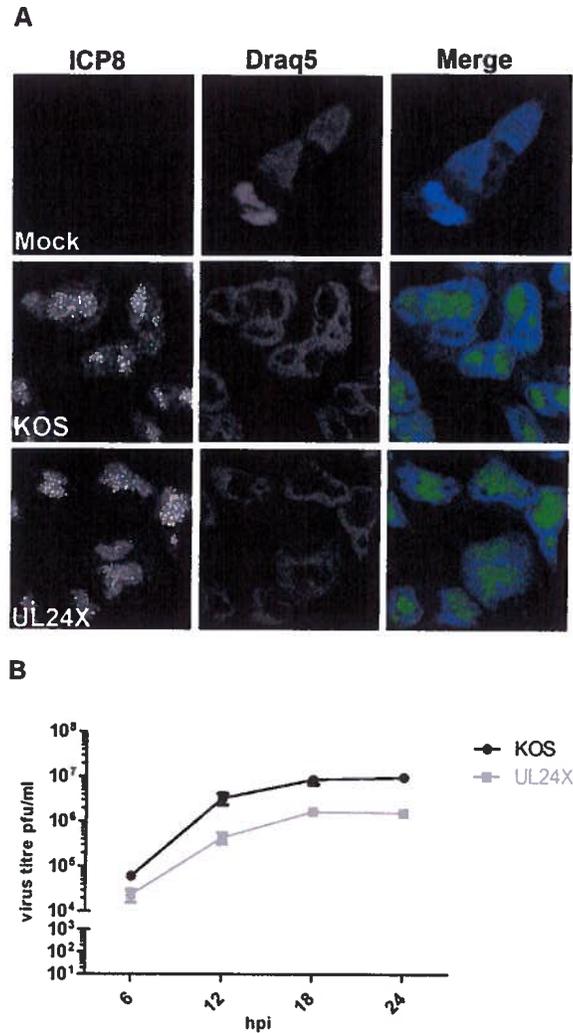


Figure 12. Effet d'UL24 sur la réplication virale dans les neurones. **(A)** Les neurones ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. À 9 hpi, les neurones ont été fixés et immunomarqués par un anticorps anti-ICP8 (colonne de gauche). Le noyau a été coloré au Draq5 (colonne centrale). La colonne de droite représente la juxtaposition des colonnes de gauche et centrales. Les images ont été prises par microscopie confocale. **(B)** Les neurones ont été infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. Aux hpi indiquées, le surnageant et les neurones ont été récoltés pour déterminer la production de particules virales infectieuses totales. Les titres viraux produits par les neurones infectés par KOS et par UL24X sont représentés par la ligne noire et grise respectivement. Les barres représentent l'écart type de la moyenne de trois expériences indépendantes

3.3 La réplication virale dans les cultures primaires neuronales de souris

Après avoir étudié la réplication virale dans un modèle neuronal *in vitro*, nos études ont été poursuivies avec un modèle de culture primaire neuronal de souris. Nous avons choisi ce modèle puisque ce sont des cellules non transformées. Aussi, ce modèle va nous permettre de valider les résultats obtenus avec le modèle LA-N-5, car comme ces cellules sont cancéreuses, certaines voies de signalisation peuvent être affectées. De plus, notre modèle d'infection *in vivo* utilise des souris de même souche que celles des cultures primaires, ce qui nous permettrait de valider nos résultats.

3.3.1 Expression des protéines virales est retardée dans les cultures primaires neuronales de souris.

Des souris CD-1 aux 16^e-18^e jours de gestation ont été utilisées pour générer les cultures primaires neuronales, car le profil génétique n'est pas un critère pour nos études. Les cultures neuronales ont été produites à partir des hémisphères cérébraux des embryons (Figure 13). La pureté de la culture en suivant ce protocole est relativement élevée (95 %) [38].

Les essais préliminaires quant à la réplication virale dans ces cellules à une haute MOI semblaient être toxique pour les cellules, puisque les titres viraux n'augmentaient pas dans le temps. De plus, les cellules mourraient. Alors, pour vérifier si le virus se répliquait dans ces cultures primaires neuronales, des lysats protéiques de neurones en culture primaire non infectés ou infectés par KOS et UL24X à une MOI de 1 ont été préparés. Les lysats de protéines ont été récoltés à 6, 12 et 24 hpi. La MOI de 1 a été choisie puisqu'une haute MOI semblait être toxique pour les cellules. À la suite des premiers essais d'immunobuvardage de type Western, nous avons trouvé que les quantités de protéines virales étaient faibles ne permettant pas la détection de celles-ci. Pour les prochaines expériences, les protéines ont donc été concentrées par précipitation au TCA avant d'être analysées par immunobuvardage de type Western. Un marquage contre l'ensemble des protéines virales à l'aide d'un anticorps contre HSV-1 avait confirmé que ces neurones en culture primaire étaient susceptibles à l'infection (Figure 14), car le niveau d'expression des protéines virales augmentait au cours de l'infection, quoique le virus semblait débiter sa réplication plus tardivement puisque la majorité des protéines virales ont été détectées qu'à 24 hpi. Aussi, la quantité de

protéines isolée des neurones en culture primaire infectés par UL24X semblait être plus basse à 24 hpi comparativement au niveau de protéines observé dans les lysats de neurones en culture primaire infectés par KOS. Bien que les expériences aient été répétées trois fois, la réduction de la quantité de protéines dans les lysats de cellules infectées par UL24X pouvait varier.

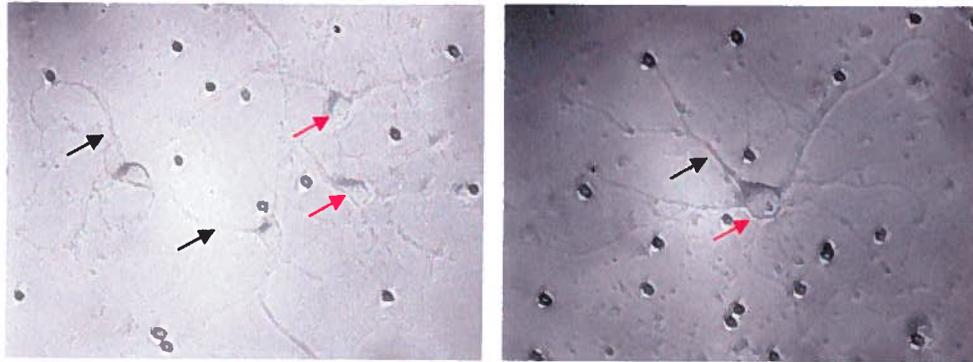


Figure 13. Les cultures primaires de neurones de souris. Les neurones ont été isolés à partir d'embryons de souris à 16^e-18^e jours de gestation. Les flèches noires indiquent des prolongements axonaux; les flèches rouges indiquent les noyaux. Les photos représentent deux champs d'observation distincts et ont été prises en microscopie de contraste de phase avec un objectif de 40X une semaine après la mise en culture.

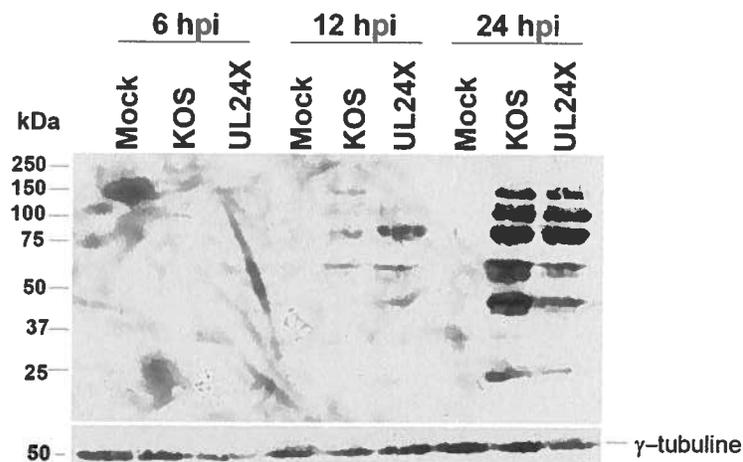


Figure 14. Expression de protéines virales lors de l'infection de neurones en culture primaire de souris par le VHS-1. Les neurones en culture primaire ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 1. Des lysats de protéines ont été récoltés à 6, 12 et 24 hpi et précipités au TCA pour être analysés par immunobuvardage de type Western. Les protéines virales ont été détectées par un anticorps contre HVS-1. Le contrôle de chargement a été analysé par un marquage de la γ -tubuline.

3.3.2 La réplication virale dans les neurones en culture primaire et l'effet d'UL24

Les neurones de souris issus de la culture primaire ont été infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 0,1 pour regarder plusieurs cycles de réplication virale. À partir de 12 hpi jusqu'à sept jours post-infection (168 hpi), le nombre de particules virales totales (intracellulaires et extracellulaires) a été analysé par essai de plages de lyses. Tout d'abord, les neurones en culture primaire étaient susceptibles à l'infection par le virus KOS, puisqu'une augmentation des titres viraux a été observée au cours du temps (Figure 15, ligne noire). Comme observés dans le modèle LA-N-5, les titres viraux produits par UL24X étaient plus bas que ceux de KOS par environ 1 \log_{10} (Figure 15, ligne grise). À partir de 24 hpi, les neurones en culture primaire infectés démontraient des effets cytopathiques tels que le corps cellulaire arrondi et réfringent, mais les prolongements axonaux demeuraient étendus (données non publiées). Ces observations sont similaires entre les neurones infectés par KOS que par UL24X. De plus, il a été observé que les titres viraux chutaient à 168 hpi autant dans les neurones en culture

primaire infectés par KOS et UL24X. Cette chute n'a pas été accompagnée d'une mort cellulaire évidente, mais les cellules démontraient des effets cytopathiques à la suite d'une observation en microscopie à contraste de phase. Donc, UL24 semblait être important pour la réplication virale autant dans les neurones en culture primaire que dans les neurones LA-N-5, puisque le virus déficient en UL24 présentait un défaut dans la réplication virale au cours du temps.

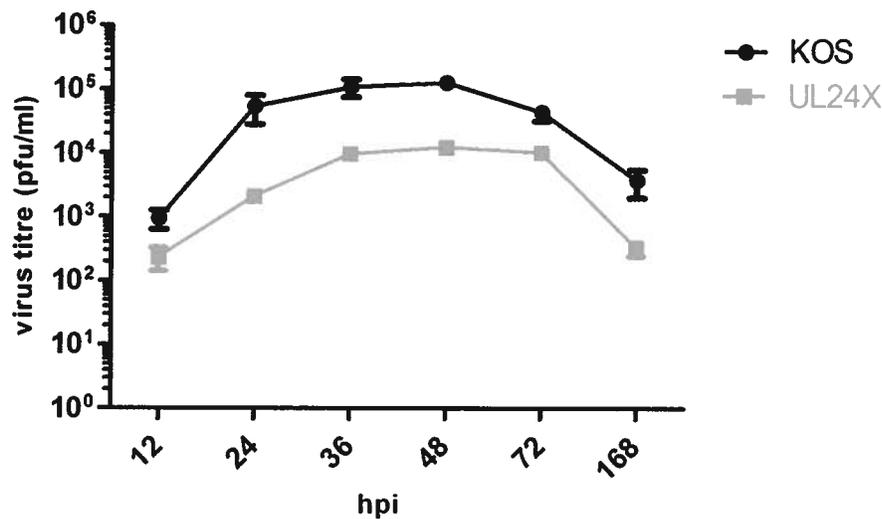


Figure 15. UL24 affecte la réplication virale dans les neurones murins en culture primaire. Les neurones en culture primaire ont été infectés par KOS et UL24X à une MOI de 0,1. À différents temps post-infection, les neurones et le surnageant ont été récoltés et le virus présent titré par essai de plages de lyse. La production virale par KOS est représentée par la ligne noire et la ligne grise représente la production virale par UL24X.

3.3.3 Impact d'UL24 sur l'expression génique des différentes classes cinétiques de gènes viraux dans les cultures primaires neuronales de souris

Afin de mieux caractériser la cinétique de réplication virale dans les neurones en culture primaire, des lysats de protéines de neurones en culture primaire non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X ont été générés à 6, 12 et 24 hpi. Pour étudier les niveaux d'expression des protéines virales, une protéine virale représentant chaque

classe cinétique a été choisie. L'analyse de l'expression virale de chaque classe cinétique va nous aider à comprendre le déroulement de l'infection dans les neurones en culture primaire. Pour la classe de protéines immédiates-précoces, ICP27 a été choisi. La thymidine kinase (TK) représentait la classe de protéines précoces. Pour la classe des protéines tardives, deux candidats ont été retenus; soit gD qui représentait les protéines tardives « *leaky-late* » ou $\gamma 1$, et gC représentait les protéines tardives dites « *true late* » ou $\gamma 2$. D'abord, pour vérifier que le niveau de protéines était similaire entre les lysats, l'expression de la γ -tubuline a été utilisée comme témoin. Les niveaux protéiques du témoin nous ont permis de noter qu'il y avait un peu moins de protéines dans les lysats de neurones infectés par UL24X à 6 hpi et à 24 hpi, ainsi que pour les lysats de KOS à 12 hpi (Figure 16); ceci a été pris en considération afin de comparer les niveaux d'expression de protéines entre les neurones infectés par KOS et UL24X. Les protéines ICP27, TK et gD ont été détectées à 12 et 24 hpi autant dans les neurones en culture primaire infectés par KOS ou UL24X. Nous avons observé que les niveaux d'expression de gD augmentent à 24 hpi. En contraste, gC a été détecté seulement à 24 hpi dans les lysats protéiques de KOS. Cette expérience a été répétée trois fois avec des lysats de protéines indépendants. Par contre, nous avons observé une variabilité dans les niveaux d'expression des protéines à 24 hpi.

Donc, les résultats démontrent que toutes les classes cinétiques de protéines virales sont exprimées dans les neurones bien que les vagues de cinétiques d'expression ne semblent pas être évidentes. Une hypothèse pour expliquer cette variabilité est l'utilisation d'une MOI de 1. Par conséquent, ce ne sont pas toutes les cellules qui ont été infectées en même temps. Ainsi, ce modèle pourrait être utilisé pour étudier l'impact du VHS-1 sur le nucléole, cependant le retard observé pourrait affecter la cinétique des modifications au nucléole.

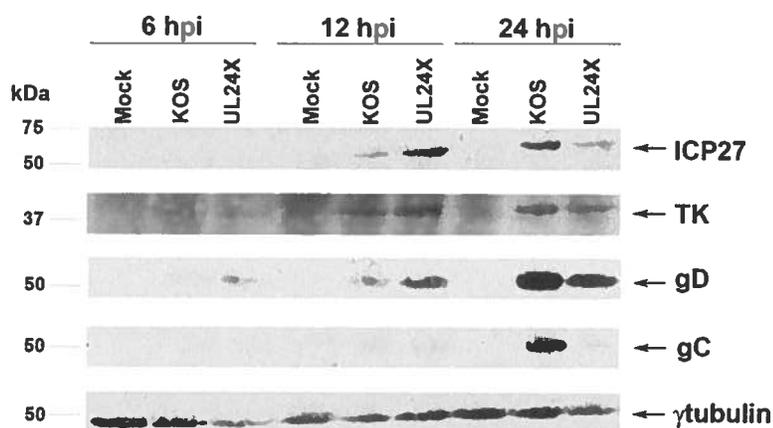


Figure 16. L'expression des protéines virales dans les neurones en culture primaire de souris. Des neurones en culture primaire de souris ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 1. À 6, 12 et 24 hpi, des lysats de protéines ont été réalisés et précipités au TCA suivi d'une analyse par immunobuvardage de type Western. Les niveaux des protéines de chaque classe cinétique ont été analysés à l'aide d'anticorps dirigé contre ICP27, TK, gD et gC. Le contrôle de chargement a été vérifié par les niveaux de la γ -tubuline.

3.4 La réorganisation du nucléole des neurones en contexte d'infection

Le nucléole est la cible de plusieurs virus. Lors d'une infection par le VHS-1, le nucléole subit des modifications. Des protéines majeures du nucléole, la nucléoline, B23, fibrillarine par exemple sont redistribués dans le noyau de fibroblastes et de cellules non immortalisées infectées [46, 210-211]. Étant donné que le neurone est une cellule cible du VHS-1, nous voulions étudier l'effet de l'infection du VHS-1 sur le nucléole des neurones.

3.4.1 La réplication virale est nécessaire pour induire des modifications au nucléole.

Afin de mieux caractériser les modifications au nucléole observées dans les cellules lors de l'infection, des stocks de virus KOS UV-inactivé ont été générés dans le but de vérifier si la réplication virale était nécessaire pour induire les changements au

nucléole. Le virus KOS UV-inactivé a été produit à la suite d'une exposition sous la lumière ultra-violette (voir Matériel et Méthodes). Avant l'inactivation par les UVs, le titre viral était de 9.4×10^8 pfu/mL; et après l'inactivation le titre viral était de 1.78×10^5 pfu/mL. Une première caractérisation a été effectuée à l'aide de fibroblastes immortalisés, des cellules Vero. Les cellules ont été non infectées (mock) ou infectées par KOS et KOS UV-inactivé à une MOI de 10 et puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde. La MOI du virus KOS UV-inactivé a été calculée selon le titre viral obtenu avant l'inactivation pour avoir la même quantité de virus. Les modifications au nucléole ont été évaluées à l'aide d'immunomarquages de la nucléoline, B23, la fibrillarine et d'UBF. La distribution de ces protéines est connue lors de l'infection de cellules Vero [46, 210-212]. Dans les cellules non infectées, le patron de marquage pour chacune des protéines nucléolaires étudiées était comme attendu, en forme de points dans le noyau (Figure 17A). Dans les cellules infectées par KOS, les patrons ont changé dû à la redistribution de chacune des protéines à travers le noyau. Par contre, la distribution de la nucléoline dans les cellules infectées par KOS UV-inactivé était similaire à celle observée dans les cellules non infectées; c'est-à-dire que la nucléoline était sous forme de points dans le noyau. Le même résultat a été observé pour les protéines B23, UBF et fibrillarine dans les fibroblastes infectés par le virus KOS UV-inactivé. Pour s'assurer de la présence du virus KOS UV-inactivé dans l'inoculum, un marquage contre un ensemble de protéines virales (HSV-1) a été fait en parallèle des autres marquages. La colonne de droite de la figure 17A montre la présence de virus dans les cellules infectées par KOS UV-inactivé, mais aucun marquage n'a été visualisé dans les cellules non infectées. L'intensité du marquage dans les neurones infectés par KOS UV-inactivé était plus faible que dans les cellules infectées par KOS, puisque le virus KOS UV-inactivé ne se répliquait pas.

Dans un deuxième temps, l'effet du virus KOS UV-inactivé a été testé sur les neurones humains du modèle LA-N-5. Comme précédemment, les neurones ont été soit non infectés (mock) ou infectés avec les deux virus à une MOI de 10 et fixés à 9 hpi. Nous avons choisi de visualiser l'effet de l'infection à 9 hpi, car à 18 hpi les neurones étaient morts (A.Bourget, données non publiées). Les protéines du nucléole étudiées ont été la nucléoline (première colonne, Figure 17B), B23 (deuxième colonne, Figure 17B) et UBF (troisième colonne, Figure 17B). Comme observé dans les fibroblastes immortalisés, le patron de distribution de la nucléoline, de B23 et d'UBF dans les neurones non infectés était sous forme de points au travers du noyau. Lorsque les

neurones sont infectés par KOS, le patron des protéines nucléolaires est perturbé; la nucléoline et B23 sont retrouvées diffuses dans le noyau et UBF est relocalisé sous forme de petits points au travers du noyau. En revanche, l'infection des neurones par le virus KOS UV-inactivé ne perturbait pas le patron de distribution des protéines du nucléole. Le marquage de la nucléoline, B23 et UBF était similaire à celui observé dans les neurones non infectés; c'est-à-dire que les trois protéines étaient sous forme de points dans le noyau. Par ailleurs, pour s'assurer de la présence de virus dans les neurones infectés par KOS UV-inactivé, un marquage HVS-1 (Figure 17B, colonne de droite) a été réalisé comme pour les cellules Vero. Nous avons observé que le virus KOS UV-inactivé pénétrait dans les neurones infectés contrairement à l'absence de marquage dans les neurones non infectés. Ainsi, la réplication virale était nécessaire pour induire une redistribution des protéines du nucléole lors de l'infection, autant dans les fibroblastes immortalisés que dans les neurones.

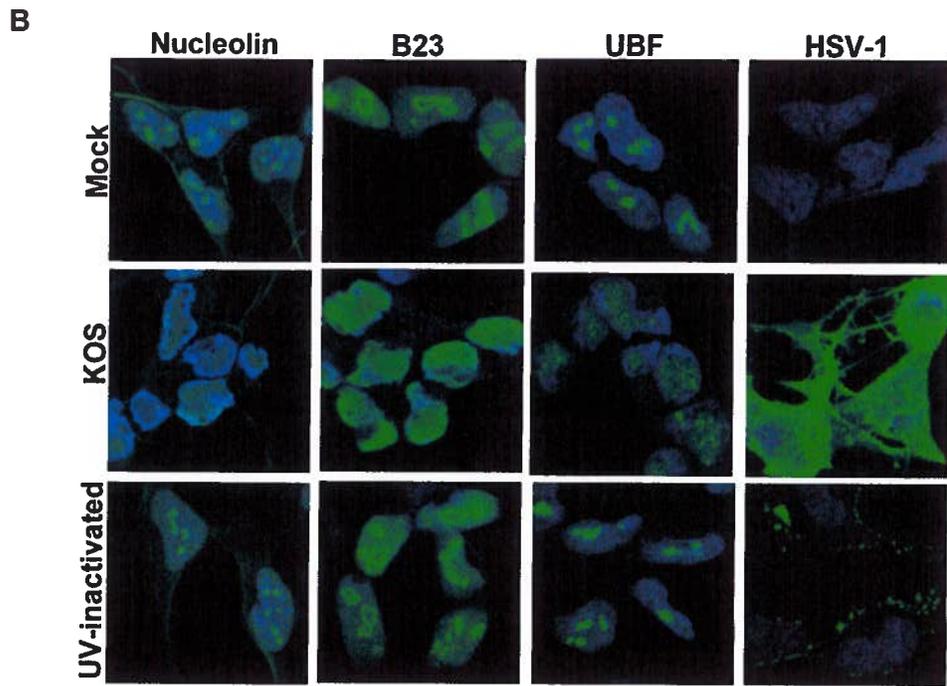
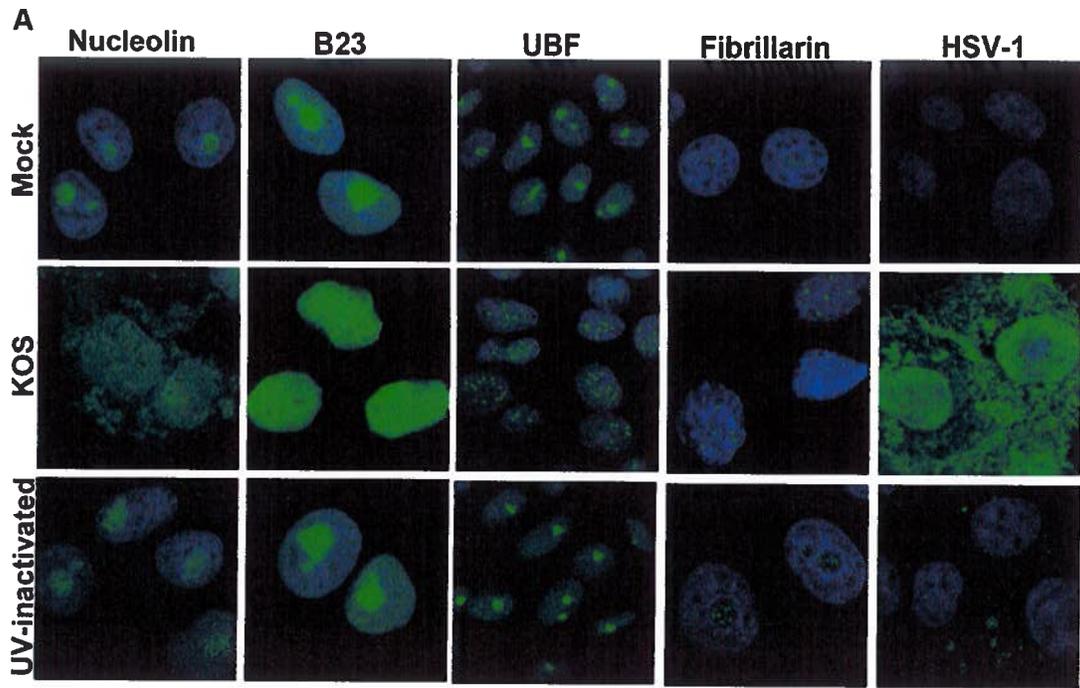


Figure 17. La réplication virale est nécessaire pour les modifications nucléolaires induites par le VHS-1 dans les fibroblastes et des neurones. **(A)** Des cellules Vero ont été non infectées (mock) ou infectées par le virus KOS ou KOS UV-inactivé à une MOI de 10. À 18 hpi, les cellules ont été fixées et immunomarquées contre la nucléoline, B23, UBF, fibrillarine et HSV-1 (vert). Le noyau est coloré par le Draq 5 (bleu). Les images ont été prises par microscopie confocale. **(B)** Les neurones du modèle LA-N-5 ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou KOS UV-inactivé. À 9 hpi, les cellules ont été fixées et immunomarquées pour la nucléoline, B23, UBF et HSV-1 (vert). Le noyau a été coloré par le Draq5 (bleu). Les images ont été prises par microscopie confocale.

3.4.2 La localisation de la protéine UL24 en contexte d'infection

Tôt dans l'infection des fibroblastes, UL24 est détecté dans le noyau [268] avec une localisation transitoire au nucléole [211]. Plus tard dans l'infection des fibroblastes, UL24 est localisé de manière périnucléaire dans une majorité des cellules [211]. Si UL24 est important pour la relocalisation de protéines nucléolaires dans les neurones, on s'attendrait à ce que cette protéine se localise dans le noyau lors de l'infection. Nous avons donc poursuivi nos analyses en regardant la localisation cellulaire d'UL24 dans les neurones en contexte d'infection. Pour ce faire, les neurones du modèle LA-N-5 ont été infectés à une MOI de 5 par le virus vHA-UL24 qui exprime la protéine UL24 jumelée à une étiquette d'hémagglutinine (HA) en N-terminal [211]. L'étiquette HA permet la détection d'UL24 à l'aide d'anticorps à haute affinité contre cet épitope. À 3, 6, 9, 12 et 15 hpi, les neurones infectés ont été fixés et marqués contre HA (vert) et le noyau a été coloré par le Draq5 (bleu) (Figure 18). À 3 hpi, la protéine HA-UL24 n'a pas été détectée dans les neurones, sinon HA-UL24 était proche du seuil de détection. À 6 hpi, HA-UL24 a été retrouvé diffus à des niveaux bas dans le cytoplasme et le noyau. À 9 hpi, HA-UL24 était demeuré diffus et a été détecté uniquement dans le noyau des neurones infectés et cette localisation cellulaire se maintenait à 12 hpi et 15 hpi. Ainsi, la localisation nucléaire d'UL24 soutenait notre hypothèse que cette protéine pourrait intervenir au nucléole des neurones.

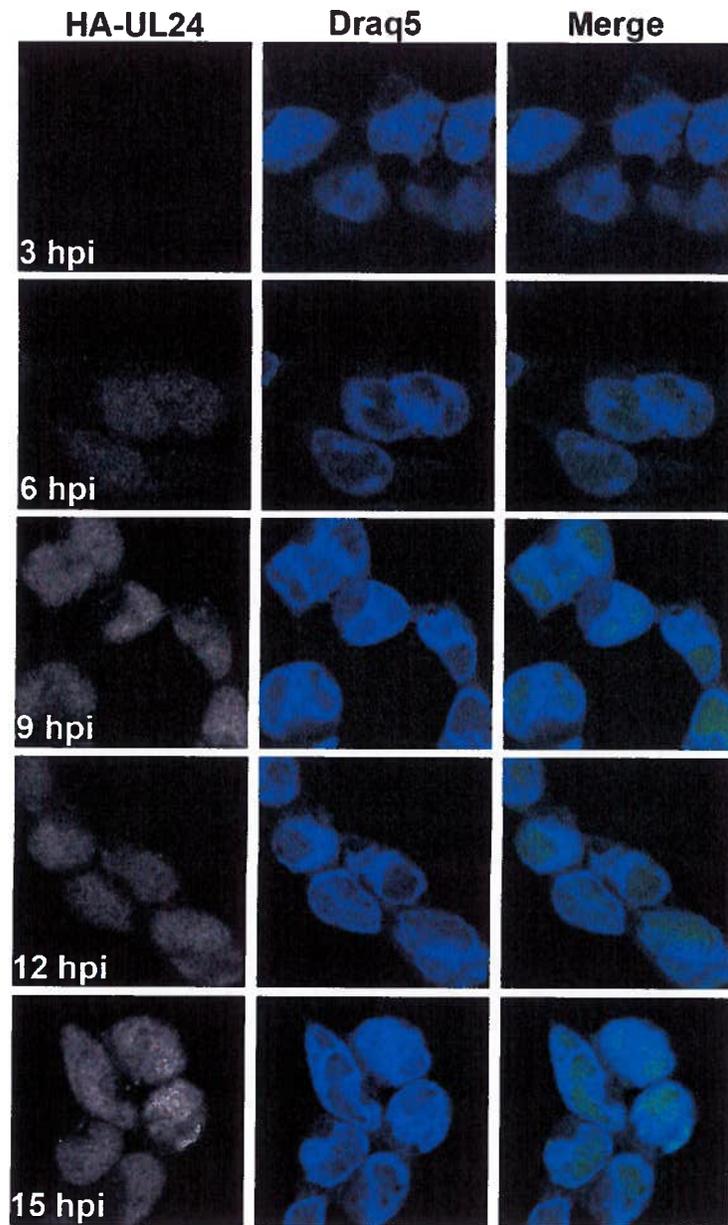


Figure 18. Localisation cellulaire de HA-UL24 au cours de l'infection des neurones. Les neurones ont été infectés par vHA-UL24 à une MOI de 5 et fixés à 3, 6, 9, 12 et 15 hpi. Un anticorps anti-HA (vert) a été utilisé pour détecter HA-UL24 et le noyau a été coloré par le Draq5 (bleu). La juxtaposition des images est montrée dans la colonne de droite. Les images ont été prises par microscopie confocale.

3.4.3 L'effet d'UL24 sur le nucléole

Comme UL24 a été localisé au noyau au cours de l'infection, son effet sur le nucléole a été observé. Les neurones humains du modèle LA-N-5 ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. Les études précédentes sur l'effet d'UL24 sur le nucléole ont été réalisées avec une MOI de 10 [210-212]; donc en conservant les conditions expérimentales, nous allons pouvoir faire un parallèle entre les résultats obtenus dans les neurones et ceux connus dans les fibroblastes. À 9 hpi, les neurones ont été fixés et marqués pour la nucléoline, B23 et UBF (Figure 19). Les images présentées sont représentatives des résultats obtenus dans trois expériences indépendantes. Dans les neurones non infectés, la nucléoline a été retrouvée sous forme de points dans le noyau et un faible marquage représentant possiblement la membrane cellulaire a été observé. Dans les neurones infectés par KOS, la nucléoline a été observée complètement diffuse dans le noyau, contrairement aux neurones infectés par UL24X où la nucléoline persistait sous forme de points en périphérie du noyau. Donc, la redistribution de la nucléoline était dépendante de la protéine virale UL24. Dans le cas de la protéine B23, celle-ci a été observée sous forme d'anneaux et de points dans le noyau dans les neurones non infectés. Cependant, B23 était complètement diffus dans le noyau des neurones infectés par KOS et cette redistribution persistait dans les neurones infectés par UL24X. Donc, contrairement à ce qui a été observé dans les fibroblastes [210], la redistribution de B23 dans les neurones semble être indépendante d'UL24. Finalement, la distribution d'UBF dans les neurones non infectés a été observée aussi sous forme de gros points dans le noyau. Dans les neurones infectés par KOS, UBF a été retrouvé sous forme de petits points et légèrement diffus dans le noyau. Le même résultat a été observé dans les neurones infectés par UL24X. Comme observée dans les fibroblastes, la redistribution d'UBF était indépendante de la protéine UL24.

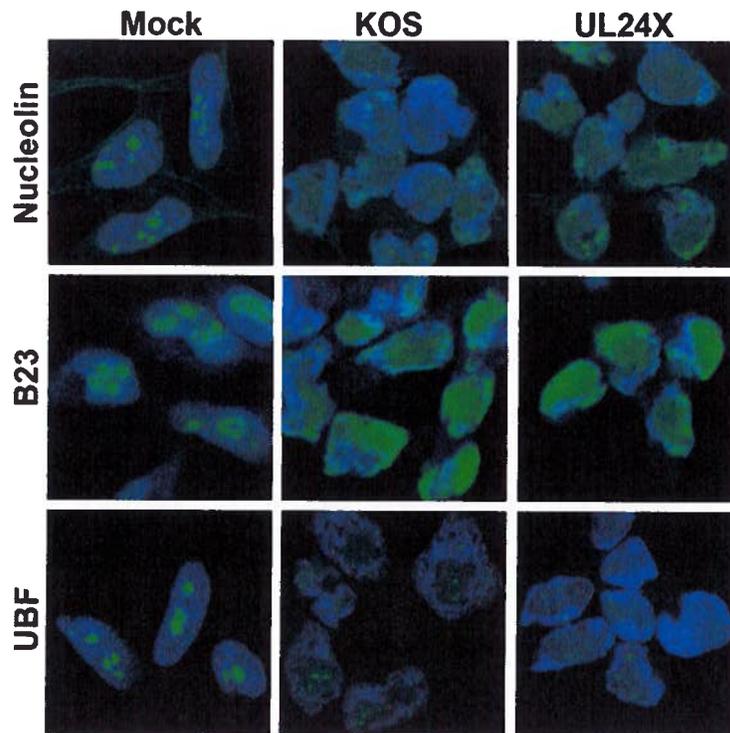


Figure 19. Effet d'UL24 sur le nucléole des neurones. Les neurones ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. À 9 hpi, les neurones ont été fixés et immunomarqués contre la nucléoline (vert), B23 (vert) et UBF (vert). Le noyau a été coloré en bleu par le Draq5. Des images représentatives du patron de distribution des neurones non infectés (mock), infectés par KOS et UL24X sont montrées dans la colonne de gauche, centrale et de droite respectivement. Les images ont été prises en microscopie confocale.

3.4.4 UBF est recruté dans les compartiments de réplication viraux

Le noyau subit plusieurs modifications lors de l'infection due en partie à la formation de VRCs. Lors des observations précédentes, UBF a été redistribué au centre du noyau dans des structures qui semblaient pouvoir être les VRCs. Pour tester cette hypothèse, les neurones humains du modèle LA-N-5 ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. Les neurones ont été fixés à 9 hpi et co-

immunomarqués contre la protéine UBF et une des protéines majeures des VRCs, ICP8. Comme vu dans la section précédente, UBF a été retrouvé sous forme de gros points dans le noyau des neurones non infectés. Lors de l'infection par KOS ou UL24X, UBF a été redistribué à travers le noyau sous forme de petits points avec une légère diffusion (Figure 20). La formation des VRCs a été détectée grâce au marquage contre ICP8 (Figure 20, deuxième colonne). La protéine UBF colocalisait en grande majorité avec la protéine ICP8 dans les neurones infectés ce qui suggérait qu'UBF pourrait être impliqué dans une ou plusieurs étapes du cycle de réplication du VHS-1 telles que la réplication du génome ou le recrutement de l'ARN pol II.

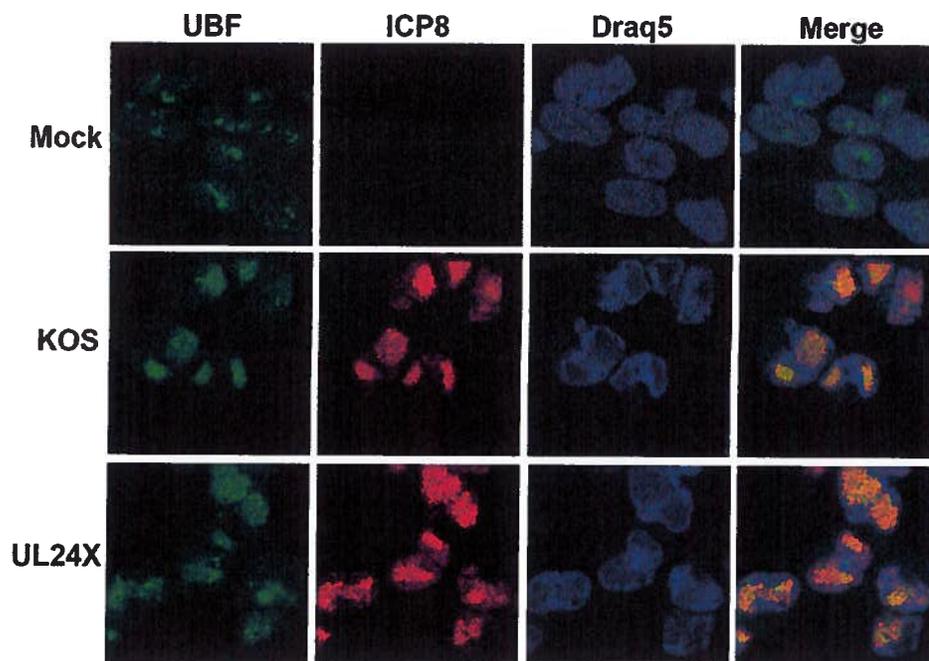


Figure 20. UBF est recruté aux VRCs au cours de l'infection dans les neurones. Les neurones ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X. À 9 hpi, les neurones ont été fixés et co-immunomarqués pour UBF (vert) et ICP8 (rouge). Le noyau a été coloré au Draq5 (bleu). La colonne de droite montre la juxtaposition du marquage UBF et ICP8. Les images ont été prises en microscopie confocale.

3.4.5 Les niveaux des protéines nucléolaires

Afin de vérifier si les modifications au nucléole observées ont été accompagnées d'un changement dans les niveaux de protéines nucléolaires au cours de l'infection, ces niveaux ont été vérifiés par immunobuvardage de type Western. Des neurones humains du modèle LA-N-5 ont été non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X à une MOI de 10. À 9 hpi, des lysats de protéines ont été réalisés et analysés par immunobuvardage de type Western afin de vérifier l'expression de la nucléoline, de B23 et d'UBF. Le témoin de chargement a été vérifié par le niveau d'expression de la γ -tubuline qui était légèrement plus faible dans les lysats protéiques des neurones infectés par UL24X. Ceci a été tenu en compte lors de l'analyse des résultats. En analysant les niveaux d'expression de la nucléoline, il a été observé que les niveaux de la nucléoline semblaient similaires entre les neurones infectés autant par KOS qu'UL24X (Figure 21). Par la suite, les niveaux de B23 semblaient demeurer stables au cours de l'infection, même en absence d'UL24. Finalement, les niveaux d'UBF semblaient rester constants au cours de l'infection. Les résultats sont reproductibles puisque trois expériences indépendantes ont généré des résultats similaires. Cependant, une augmentation mineure de l'expression de la nucléoline, de B23 et d'UBF dans les neurones infectés en comparaison aux neurones non infectés a été détectée. Cette légère différence a aussi été observée dans une autre expérience dans le cas d'UBF, mais n'a pas été reproduite par la suite. Ainsi, aucun changement drastique n'a été observé au niveau de l'expression de la nucléoline, de B23 et d'UBF dans les neurones pendant l'infection et en absence d'UL24.

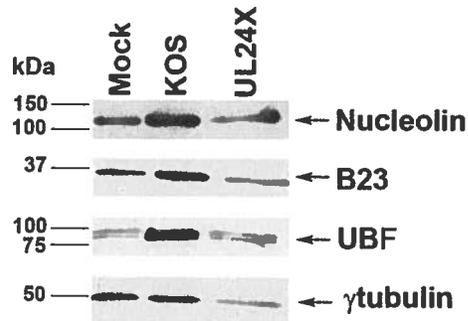


Figure 21. Niveaux d'expression des protéines du nucléole dans les neurones lors d'une infection. Des lysats protéiques provenant de neurones non infectés (mock) ou infectés par KOS ou UL24X ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Les niveaux de protéines chargés ont été vérifiés en analysant la protéine cellulaire γ -tubuline (48kDa). La nucléoline (100kDa) a été détectée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin (Abcam); B23 (40kDa) a été détecté par un anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology) et UBF (97-98kDa) a été détecté par un anticorps polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology).

CHAPITRE 4: DISCUSSION

Le but de notre étude a été de comprendre l'impact de la réplication virale aiguë du VHS-1 sur les neurones au niveau des modifications du nucléole. Pour ce faire, deux modèles neuronaux ont été générés : un modèle *in vitro* utilisant des cellules humaines issues d'un neuroblastome, LA-N-5, qui ont été différenciées en neurones par un traitement à l'acide rétinoïque; et un modèle de culture primaire neuronale de souris. Les cultures neuronales ont été infectées par un virus de type sauvage (KOS) et un virus déficient en la protéine virale UL24 (UL24X) afin de déterminer la contribution d'UL24 au niveau de la réplication virale dans le modèle neuronal. La localisation cellulaire d'UL24 a été observée au cours de l'infection des neurones LA-N-5 grâce au virus vHA-UL24. Finalement, nous avons élucidé l'impact d'UL24 sur le nucléole des neurones LA-N-5.

4.1 L'impact de la protéine virale UL24 sur la réplication virale dans les neurones

4.1.1 Le modèle LA-N-5

Avant d'entreprendre notre projet, aucune information n'était disponible sur la permissivité et la susceptibilité du modèle LA-N-5 au VHS-1. Un des modèles neuronaux dernièrement connus était le modèle des cellules NT2. La différenciation des cellules humaines NT2 en neurones s'effectue sur une période d'environ 3 mois [192] contrairement au processus de différenciation des cellules humaines LA-N-5 qui s'effectue sur sept jours [135-136]. Les neurones issus de la différenciation des cellules NT2 et LA-N-5 deviennent des neurones cholinergiques et les marqueurs neuronaux sont similaires entre les deux modèles [135, 273]. Cependant, la réplication du VHS-1 dans le modèle neuronal NT2 n'est pas productive [142], quoique la réplication virale du coronavirus dans les modèles neuronaux NT2 et LA-N-5, soit productive, démontrée par une augmentation de nouvelles particules virales dans le milieu sur une période de 72 hpi [102]. Puisque l'objectif de ce mémoire était d'élucider la réplication aiguë dans les neurones, le modèle LA-N-5 représente un meilleur modèle que les NT2 pour ce projet.

L'hypothèse de départ était que le virus déficient en UL24 aurait un défaut important dans la réplication virale comparativement au virus de type sauvage. Jacobson et al. ont démontré qu'UL24 est important pour la réplication virale en culture cellulaire puisqu'en son absence, les titres viraux produits dans les fibroblastes étaient réduits de 1 log₁₀ [149]. Dans un modèle murin d'infection oculaire, l'absence de la protéine virale

UL24 se reflète par une diminution significative d'environ 4 log₁₀ des titres viraux dans les neurones du ganglion trijumeau [148]. Nous avons donc testé l'hypothèse qu'UL24 aurait un plus grand impact lors de l'infection de neurones. Toutefois, nous avons observé une diminution des titres viraux en absence d'UL24 de 1 log₁₀. Cette différence observée dans les neurones est similaire aux résultats obtenus dans les cellules épithéliales et les fibroblastes [25, 149]. Ces résultats suggèrent que le mécanisme impliquant UL24 dans la réplication virale est commun dans les différents types cellulaires. Par conséquent, la diminution des titres viraux de 4 log₁₀ observée dans les TGs ne s'explique pas seulement par une réduction de la réplication virale; d'autres fonctions, cellulaires ou virales, semblent être impliquées. La réduction des titres viraux dans les TGs de souris infectées par UL24X pourrait être possiblement expliquée par la sortie basolatérale du virus des cellules épithéliales. Ainsi en absence d'UL24, le nombre de particules virales transporté de manière rétrograde serait diminué expliquant une réduction de la réplication virale. UL24 pourrait aussi être impliqué dans le transport antérograde des capsides.

4.1.2 Le modèle des cultures primaires neuronales de souris

Les cultures primaires neuronales de souris représentent un modèle potentiel pour l'étude de la réplication virale du VHS-1 et la pureté de la culture en tant que neurones est élevée [38]. Dans la littérature, les cultures de ganglions dorsaux ou trijumeaux sont fréquemment utilisées pour l'étude du VHS-1 [199, 373]. Sous nos conditions expérimentales, l'infection des neurones murins en culture primaire sur une période de 24 heures à une forte MOI ne semble pas être productive (données non publiées). Néanmoins, l'analyse de l'expression des protéines virales provenant des neurones murins en culture primaire infectés à une MOI de 1 démontre une augmentation de l'expression des protéines virales montrant que le virus peut se répliquer dans ces cellules. Peut-être que l'utilisation d'un stock de virus hautement purifié (par exemple sur un gradient) permettrait une infection à haute MOI sans la toxicité.

En réponse à l'infection par le VHS-1, la transcription des gènes α est stimulée par le complexe VP16/HCF [158, 244]. Une étude a démontré que le facteur cellulaire HCF est séquestré au cytoplasme dans les neurones sensoriels [179]. Cette

séquestration empêcherait la formation du complexe VP16/HCF dans le noyau pour activer la transcription des gènes α ; ce qui contribuerait à l'établissement de la latence [5]. Une possibilité est que l'expression des protéines virales plus tardivement dans les neurones en culture primaire pourrait s'expliquer par la localisation cytoplasmique de HCF qui affecterait la formation du complexe VP16/HCF. De plus, le facteur cellulaire, Zhangfei qui est présent dans les neurones sensoriels, inhiberait la réplication virale en interagissant avec VP16 le rendant inaccessible pour le complexe VP16/HCF [5].

Lors de la transcription virale dans les fibroblastes et dans des cellules d'origine épithéliales, VP16 est transcrit avec une cinétique tardive. Cependant VP16 est synthétisé *de novo* dans les neurones du TG c'est-à-dire que VP16 précède l'expression des gènes viraux [345]. Si VP16 est exprimé en quantité suffisante, il peut promouvoir l'expression des gènes α . Ceci crée une boucle de rétroaction positive qui empêche l'établissement de la latence et pourrait promouvoir la réactivation [345]. Ainsi, les neurones entraînent dans un cycle de réplication lytique. Une expression *de novo* de VP16 dans les neurones humains LA-N-5 pourrait expliquer la susceptibilité à une infection productive de ces cellules.

Des études sur l'expression génique dans les neurones de TG proposent que de niveaux bas d'expressions des gènes immédiats-précoces et précoces sont critiques pour stimuler la réplication du génome ce qui expliquerait le retard observé dans la production de virus [173, 250]. Kosz-Vnenchak et al. (1993) ont proposé que le cycle de réplication virale se déroule sur 48 h [173]. Par contre, d'autres études plus récentes ont détecté la présence de virus entre 14 et 24 h [272, 345] suggérant un manque de sensibilité dans la méthode utilisée par Kosz-Vnenchak et al. (1993). Nos résultats obtenus quant à l'expression génique dans les neurones en culture primaire concordent avec ceux de Pesola et al., car nous détectons des antigènes viraux entre 12 et 24 hpi. Contrairement au modèle proposé par Kosz-Vnenchak et al. (1993), l'augmentation de l'expression des gènes viraux n'est pas dû à la réplication virale dans les neurones en période de réactivation, mais à un second cycle d'infection par les neurones réactivés [272]. Néanmoins, Sawtel et Thompson (2004) suggèrent que les résultats démontrant la présence de virus avant 24 hrs devraient être analysés avec précaution [301].

Il est mentionné précédemment que la protéine virale UL24 est importante pour la réplication *in vitro* et *in vivo*. La différence d'environ 1 \log_{10} entre le virus déficient en

UL24 et le virus parental observée dans le modèle LA-N-5 est présente aussi dans les cultures primaires neuronales de souris. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la protéine UL24 ait un rôle au niveau de la sortie basolatérale des cellules épithéliales du virus ou au niveau de la dissémination virale dans les neurones. La capacité d'avoir une infection productive dans les deux modèles neuronaux permettrait l'analyse de l'impact du virus sur le nucléole. Pour les neurones murins en culture primaire, le possible retard dans l'expression des protéines virales pourrait avoir un impact sur la cinétique des modifications au nucléole.

Quelques équipes ont démontré que l'ADN viral, des transcrits et des particules du VHS-1 peuvent être détectés dans les neurones jusqu'à une à deux semaines post-infection [169, 174, 345]. De plus, Kosz-Vnenchak et al, (1993) ont montré que la réplication virale dans les neurones en culture primaire de rat est détectée jusqu'à 150 hpi approximativement [173]. Nos résultats de l'étude de la réplication virale dans les neurones en culture primaire corrélaient avec ceux publiés. La diminution des titres viraux à 168 hpi sans mort cellulaire évidente suggère comme hypothèse que le virus serait entré dans un état de « dormance » similaire à la latence. Il est possible d'induire chimiquement l'état de « dormance » *in vitro*. Dans le modèle neuronal PC12, les neurones sont traités à l'acyclovir à la suite d'une infection par le VHS-1 pour ainsi inhiber la réplication virale et forcer le virus à entrer dans un état de « latence » [65]. L'état similaire à la « latence » peut aussi être induit dans les cultures primaires de neurones corticaux (SCG) en présence d'ACV et de NGF dans le milieu de culture [48, 373-375]; l'expression des gènes viraux est diminuée et les transcrits LATs sont présents. Néanmoins, des expériences supplémentaires doivent être effectuées avant de conclure que le virus entre dans un état similaire à la latence *in vivo* dans les neurones en culture primaire de souris.

4.2 Le VHS-1 affecte le nucléole des neurones lors de l'infection

4.2.1 La réplication virale est nécessaire pour induire des modifications au nucléole

Plusieurs stress peuvent induire un remaniement du nucléole. Pendant une infection par le VHS-1, beaucoup de modifications morphologiques et moléculaires se produisent dans la cellule. Dans les cellules infectées, l'architecture du noyau et du

nucléole est modifiée [235]. Au cours de l'infection par le VHS-1, plusieurs protéines virales se retrouvent temporairement au nucléole et certaines protéines nucléolaires sont redistribuées au travers du noyau. Notamment, des études ont démontré que la fibrillarine, B23, la sous-unité de l'ARN pol I (RPA194) et UBF sont relocalisés dans le noyau des fibroblastes et des cellules d'origine épithéliale infectées [46, 210-212, 332]. Ces redistributions se produisent tôt lors de l'infection dans le cas d'UBF et d'autres surviennent plus tardivement comme pour B23.

L'utilisation d'un virus UV-inactivé qui est incapable de se répliquer permet de mettre en évidence l'impact de la réplication virale sur le nucléole. Dès l'entrée du VHS-1, les protéines des ND-10 comme hDaxx et ATRX vont s'associer à l'ADN viral parental pour former les « *ND10-like foci* » [94, 96]. Dans les cellules non infectées, le complexe hDaxx/ATRX semble être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes cellulaires [338]. Ainsi, le recrutement des protéines des ND-10 aurait une activité antivirale puisqu'elles semblent réprimer la réplication virale [64, 94-95, 209]. Pour contrecarrer cette réponse antivirale, ICP0 va dégrader les protéines PML et Sp100 des ND-10 [52, 91-93, 223]. Contrairement au ND-10, les étapes précoces du cycle de réplication du VHS-1 (entrée du virus, décapsidation du virus et entrée du génome dans le noyau) ne semblent pas suffisantes pour induire des modifications au nucléole puisque la réplication virale est nécessaire pour induire ces modifications. Ceci nous a été démontré par l'infection de fibroblastes et de neurones par le virus KOS UV-inactivé. Les perturbations au nucléole semblent nécessiter la synthèse de produits viraux. Les résultats obtenus dans les fibroblastes [210-211] supportent cette hypothèse, car la redistribution de la nucléoline et de B23, par exemple, survient plus tardivement dans l'infection. Une autre possibilité est que la relocalisation des protéines nucléolaires soit dû à des modifications post-traductionnelles par des protéines virales d'où la nécessité de la réplication virale pour modifier le nucléole. Plusieurs sites de modifications post-traductionnelles ont été identifiés pour la nucléoline, B23 et UBF.

4.2.2 Effet du VHS-1 sur le nucléole des neurones et le rôle d'UL24 dans ces modifications.

La localisation cellulaire de la protéine UL24 dans les fibroblastes et cellules épithéliales a déjà été étudiée. Des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules

infectées ont démontré que la protéine UL24 est détectée à partir de 12 hpi et est détectée au noyau et dans le cytoplasme [268]. Par ailleurs, cette distribution a été confirmée en utilisant un virus dont UL24 est couplé à une étiquette d'hémagglutinine (HA) permettant la détection d'UL24 [211]. De plus, notre laboratoire a observé qu'UL24 se localise transitoirement au nucléole des cellules infectées [211]. Nos résultats sur la localisation d'UL24 dans les neurones corréntent avec ce qui a déjà été démontré, sauf pour la localisation transitoire au nucléole. Une possibilité est que le temps où UL24 était au nucléole était entre deux temps analysés. Cependant, la présence exclusive au noyau d'UL24 est compatible avec un impact sur le nucléole.

Le nucléole des cellules infectées subit d'importantes perturbations. UL24 est une protéine hautement conservée dans la famille des herpèsvirus, et plus précisément, son domaine N-terminal contient cinq domaines d'homologie (HDs) [148]. Le domaine N-terminal d'UL24 est suffisant pour induire la redistribution de la nucléoline et de B23 au noyau dans les fibroblastes immortalisés [26, 210-211]. De plus, le domaine N-terminal contient un motif d'endonucléase dont la fonction demeure inconnue [168]. Des mutations au niveau d'acides aminés hautement conservés ciblant le motif d'endonucléase perturbe le patron de distribution de B23 et de la nucléoline [25, 210]. Par ailleurs, l'utilisation de cellules non immortalisées (HFF) montre les mêmes modifications au nucléole que les cellules immortalisées [210]. Ainsi, on peut dire que ces phénomènes de redistribution des protéines nucléolaires sont conservés dans les différents types de fibroblastes. Ceci suggère que ces deux protéines auraient un rôle commun dans l'infection, mais aucun lien entre UL24 et nucléoline ou B23 a été encore identifié.

Par contre, nos résultats dans les neurones suggèrent le contraire. Comme dans les fibroblastes immortalisés et non immortalisés, la nucléoline est redistribuée dans le noyau et ceci est dépendant d'UL24. Toutefois, la redistribution de B23 est différente dans les neurones. La protéine UL24 n'affecte aucunement le patron de distribution de B23. Ainsi, notre hypothèse originale que la nucléoline et B23 auraient un rôle commun lors de l'infection ne semble pas valide au moins dans les neurones. Cette différence observée entre les fibroblastes et les neurones pourrait s'expliquer par le fait que les neurones sont des cellules très spécialisées et de ce fait les protéines peuvent être modifiées autrement affectant la formation des complexes protéiques. Donc, le complexe

protéique recrutant B23 dans les fibroblastes ne se formerait pas dans les neurones. Une autre hypothèse est que B23 n'accomplit pas la même fonction cellulaire dans les neurones que dans les fibroblastes.

Dans les fibroblastes infectés par le VHS-1, d'autres protéines nucléolaires, dont UBF sont redistribuées de manière UL24-indépendante [211-212]. La protéine UBF est recrutée partiellement aux compartiments de réplication viraux [212, 332]. Stow et al. (2009) suggèrent que le recrutement d'UBF aux compartiments de réplication aiderait la réplication virale. Cependant, le recrutement d'UBF aux compartiments de réplication viraux n'est visible qu'à 5 hpi [212]. À ce temps, la réplication virale a déjà commencé. Donc si UBF joue un rôle dans la réplication virale, cette fonction surviendrait plus tardivement. Nos résultats démontrent qu'UBF est recruté massivement aux VRCs de manière UL24-indépendante dans les neurones. Ceci renforce l'hypothèse que UBF affecte la réplication virale et que cette fonction est importante dans divers types cellulaires. Des expériences supplémentaires restent à faire pour déterminer l'impact d'UBF dans la réplication virale et le mécanisme.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons étudié la réplication virale aiguë dans les neurones au niveau des modifications au nucléole. Pour ce faire, deux modèles neuronaux ont été générés et caractérisés. Le modèle neuronal LA-N-5 permet d'obtenir des neurones humains à la suite d'une différenciation *in vitro* à l'acide rétinoïque. Les neurones sont susceptibles et supportent l'infection par le VHS-1. Le deuxième modèle, la culture primaire de neurone murin, supporte aussi la réplication du virus, mais les titres viraux obtenus semblent moins importants que dans le modèle LA-N-5.

La protéine virale UL24 est importante pour la neuropathogenèse et pour des modifications au nucléole lors de l'infection de fibroblastes et de lignées d'origine épithéliales. Dans un modèle oculaire murin d'infection, une diminution des titres viraux de 4 \log_{10} est observée dans les ganglions trijumeaux en absence d'UL24 [148] suggérant qu'UL24 est important pour la réplication virale neuronale. De plus, l'absence d'UL24 diminue le taux de réactivation du virus dans un modèle *in vivo* [196]. Cependant, nous avons observé une diminution des titres viraux d'environ 1 \log_{10} dans les neurones humains du modèle LA-N-5 et dans les neurones de souris en culture primaire en absence d'UL24. La diminution de 4 \log_{10} dans les TGs *in vivo* ne s'explique donc pas seulement par l'impact de l'absence de la protéine UL24 sur la réplication virale dans les neurones. D'autres fonctions d'UL24 semblent affecter les titres viraux dans les TGs. Une autre possibilité serait qu'UL24 pourrait aussi avoir un rôle au niveau de la dissémination virale dans les neurones du TG ce qui expliquerait la baisse des titres viraux *in vivo* en absence d'UL24.

Les cultures primaires de neurones de souris étaient susceptibles à l'infection par le VHS-1. Par contre, nous avons observé une chute des titres viraux à 168 hpi pour le virus de type sauvage et le virus déficient en UL24. Ces résultats pourraient suggérer que le virus entre dans un état similaire à la latence *in vivo*. Des expériences analysant la présence des transcrits LATs et l'expression des gènes viraux sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Nos résultats sur l'impact du VHS-1 sur le nucléole des neurones humains du modèle LA-N-5 ont démontré que plusieurs des modifications sont conservées entre les neurones et les cellules de type épithélial ou fibroblaste. Nous avons observé que la nucléoline est redistribuée de manière dépendante d'UL24. Il a été démontré que la nucléoline est importante pour la réplication virale dans les fibroblastes, plus

précisément pour la sortie du noyau des capsides. La conservation de cette modification entre les différents types cellulaires témoigne de l'importance de la nucléoline dans la biologie du VHS-1. La protéine UBF est relocalisée indépendamment d'UL24 et est recrutée aux compartiments de réplication viraux. Dans les fibroblastes, UBF est recruté aux compartiments de réplication viraux après le début de la synthèse de l'ADN viral. Donc, UBF pourrait jouer un rôle dans la réplication virale, mais le rôle exact reste à être déterminé. Contrairement à ce qui a été observé dans les fibroblastes [210], la protéine nucléolaire B23 est redistribuée indépendamment d'UL24. Ainsi, l'hypothèse que B23 et la nucléoline auraient un rôle commun dans la réplication virale ne semble pas être valide, au moins dans les neurones.

En perspectives, l'effet de mutations ponctuelles dans UL24 pourrait être testé pour voir leur effet lors de l'infection neuronale. Certaines mutations, telles que E99A/K101A qui cible le domaine endonucléase d'UL24, affectent le nucléole dans les fibroblastes (redistribution nucléoline et B23 est affecté). De plus, la mutation E99A/K101A diminue la gravité de la maladie dans un modèle murin d'infection oculaire. Il serait intéressant de voir l'effet de cette mutation sur la réplication virale et sur le nucléole au niveau des neurones. Comme mentionnée précédemment, la nucléoline est importante pour la sortie nucléaire du virus et la redistribution de la nucléoline est conservée parmi les types cellulaires lors de l'infection. Aussi, UL24 semble jouer un rôle lors de cette sortie et nous observons une diminution des titres viraux en absence d'UL24. Il serait intéressant d'évaluer la sortie du virus du noyau des neurones en absence d'UL24. Finalement, le modèle des cultures primaires semble établir « une latence » à la suite d'une infection par le VHS-1. Une meilleure caractérisation de ce modèle en évaluant l'expression des gènes lytiques des différentes classes cinétique et la présence des transcrits LATs demeure essentielle pour vérifier cet état de « latence ».

Pour conclure, la protéine virale UL24 pourrait servir de nouvelle cible thérapeutique puisque la réplication neuronale et la réactivation du VHS-1 sont affectées lorsqu'UL24 est absent ou muté. L'impact d'UL24 sur le nucléole, surtout l'effet sur la nucléoline, pourrait être une des activités à cibler.

Références

1. Adachi, Y., T.D. Copeland, M. Hatanaka, and S. Oroszlan, *Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(19): p. 13930-13934.
2. Ahmad, Y., F.-M. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley, and A.I. Lamond, *NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update*. Nucl. Acids Res., 2009. **37**(suppl_1): p. D181-184.
3. Ahmed, M., M. Lock, C.G. Miller, and N.W. Fraser, *Regions of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript That Protect Cells from Apoptosis In Vitro and Protect Neuronal Cells In Vivo*. J. Virol., 2002. **76**(2): p. 717-729.
4. Akey, C.W. and K. Luger, *Histone chaperones and nucleosome assembly*. Curr. Opin. Struct. Biol., 2003. **13**(1): p. 6-14.
5. Akhova, O., M. Bainbridge, and V. Misra, *The Neuronal Host Cell Factor-Binding Protein Zhangfei Inhibits Herpes Simplex Virus Replication*. J. Virol., 2005. **79**(23): p. 14708-14718.
6. Alwine, J.C., W.L. Steinhart, and C.W. Hill, *Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEP-2 and KB cells*. Virology, 1974. **60**(1): p. 302-307.
7. Amelio, A.L., N.V. Giordani, N.J. Kubat, J.E. O'Neil, and D.C. Bloom, *Deacetylation of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) Enhancer and a Decrease in LAT Abundance Precede an Increase in ICP0 Transcriptional Permissiveness at Early Times Postexplant*. J. Virol., 2006. **80**(4): p. 2063-2068.
8. Andrews P.W., Damjanov I., Simon D., Banting G.S., Carlin C., Dracopoli N.C., and F. J., *Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro*. Lab. Invest., 1984. **50**(2): p. 147-62.
9. Angelier, N., M. Tramier, E. Louvet, M. Coppey-Moisan, T.M. Savino, J.R. De Mey, and D. Hernandez-Verdun, *Tracking the Interactions of rRNA Processing Proteins during Nucleolar Assembly in Living Cells*. Mol. Biol. Cell, 2005. **16**(6): p. 2862-2871.
10. Antinone, S.E., S.V. Zaichick, and G.A. Smith, *Resolving the Assembly State of Herpes Simplex Virus during Axon Transport by Live-Cell Imaging*. J. Virol., 2010. **84**(24): p. 13019-13030.
11. Aravind, L., K.S. Makarova, and E.V. Koonin, *SURVEY AND SUMMARY*. Nucleic Acids Res., 2000. **28**(18): p. 3417-3432.
12. Arai, J., H. Goto, T. Suenaga, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Imai, A. Minowa, H. Akashi, H. Arase, Y. Kawaoka, and Y. Kawaguchi, *Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1*. Nature, 2010. **467**(7317): p. 859-862.
13. Arthur, J.L., C.G. Scarpini, V. Connor, R.H. Lachmann, A.M. Tolkovsky, and S. Efstathiou, *Herpes Simplex Virus Type 1 Promoter Activity during Latency Establishment, Maintenance, and Reactivation in Primary Dorsal Root Neurons In Vitro*. J. Virol., 2001. **75**(8): p. 3885-3895.
14. Awasthi, S., J.M. Lubinski, C.E. Shaw, S.M. Barrett, M. Cai, F. Wang, M. Betts, S. Kingsley, D.J. DiStefano, J.W. Balliet, J.A. Flynn, D.R. Casimiro, J.T. Bryan, and

- H.M. Friedman, *HSV-2 glycoprotein C subunit immunization combined with glycoprotein D improves the protection of dorsal root ganglia in mice and reduces the frequency of recurrent vaginal shedding of HSV-2 DNA in guinea pigs compared with glycoprotein D alone*. J. Virol., 2011: p. JVI.00849-11.
15. Baldick, C., Jr and T. Shenk, *Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles*. J. Virol., 1996. **70**(9): p. 6097-6105.
 16. Banerjee, R., M.K. Weidman, S. Navarro, L. Comai, and A. Dasgupta, *Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription*. J. Gen. Virol., 2005. **86**(8): p. 2315-2322.
 17. Banker, G.A. and W.M. Cowan, *Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture*. Brain Res., 1977. **126**(3): p. 397-425.
 18. Bartlett, W. and G. Banker, *An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts*. The Journal of Neuroscience, 1984. **4**(8): p. 1944-1953.
 19. Batterson, W. and B. Roizman, *Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes*. J. Virol., 1983. **46**(2): p. 371-377.
 20. Bazett-Jones, D., B. Leblanc, M. Herfort, and T. Moss, *Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF*. Science, 1994. **264**(5162): p. 1134-1137.
 21. Bechtel, J.T., R.C. Winant, and D. Ganem, *Host and Viral Proteins in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus*. J. Virol., 2005. **79**(8): p. 4952-4964.
 22. Belin, S., K. Kindbeiter, S. Hacot, M.A. Albaret, J.-X. Roca-Martinez, G. Thérizols, O. Grosso, and J.-J. Diaz, *Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection*. RNA, 2010. **16**(1): p. 131-140.
 23. Benowitz, L.I. and A. Routtenberg, *GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity*. Trends Neurosci., 1997. **20**(2): p. 84-91.
 24. Berciano, M.T., N.T. Villagrà, E. Pena, J. Navascués, I. Casafont, and M. Lafarga, *Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons*. Microsc. Res. Tech., 2002. **56**(2): p. 132-142.
 25. Bertrand, L., G.A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson, *Conserved Residues in the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Are Important for Dispersal of the Nucleolar Protein Nucleolin*. J. Virol., 2010. **84**(1): p. 109-118.
 26. Bertrand, L. and A. Pearson, *The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin*. J. Gen. Virol., 2008. **89**(5): p. 1142-1151.
 27. Besse, S. and F. Puvion-Dutilleul, *Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells*. Eur. J. Cell Biol., 1996. **71**(1): p. 33-44.
 28. Besse, S. and F. Puvion-Dutilleul, *Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection*. J. Cell Sci., 1996. **109**(1): p. 119-129.
 29. Biffo S., Verhaagen J., Schrama L.H., Schotman P., D. W., and M. F.L., *B-50/GAP43 expression correlates with process outgrowth in the embryonic mouse nervous system*. Eur. J. Neurosci., 1990. **2**(6): p. 487-499.
 30. Blakeney, S., J. Kowalski, D. Tummolo, J. DeStefano, D. Cooper, M. Guo, S. Gangolli, D. Long, T. Zamb, R.J. Natuk, and R.J. Visalli, *Herpes Simplex Virus*

- Type 2 UL24 Gene Is a Virulence Determinant in Murine and Guinea Pig Disease Models.* J. Virol., 2005. **79**(16): p. 10498-10506.
31. Bloom, D.C., *HSV LAT and neuronal survival.* Int. Rev. Immunol., 2004. **23**(1-2): p. 187-98.
 32. Bloom, D.C. and J.G. Stevens, *Neuron-specific restriction of a herpes simplex virus recombinant maps to the UL5 gene.* J. Virol., 1994. **68**(6): p. 3761-3772.
 33. Boisvert, F.-M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A.I. Lamond, *The multifunctional nucleolus.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007. **8**(7): p. 574-585.
 34. Borer, R.A., C.F. Lehner, H.M. Eppenberger, and E.A. Nigg, *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm.* Cell, 1989. **56**(3): p. 379-390.
 35. Bortz, E., J.P. Whitelegge, Q. Jia, Z.H. Zhou, J.P. Stewart, T.-T. Wu, and R. Sun, *Identification of Proteins Associated with Murine Gammaherpesvirus 68 Virions.* J. Virol., 2003. **77**(24): p. 13425-13432.
 36. Branco, F.J. and N.W. Fraser, *Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Expression Protects Trigeminal Ganglion Neurons from Apoptosis.* J. Virol., 2005. **79**(14): p. 9019-9025.
 37. Brewer, G.J. and J.R. Torricelli, *Isolation and culture of adult neurons and neurospheres.* Nat. Protoc., 2007. **2**(6): p. 1490-1498.
 38. Brewer, G.J., J.R. Torricelli, E.K. Eevege, and P.J. Price, *Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination.* J. Neurosci. Res., 1993. **35**(5): p. 567-576.
 39. Brideau, A.D., B.W. Banfield, and L.W. Enquist, *The Us9 Gene Product of Pseudorabies Virus, an Alphaherpesvirus, Is a Phosphorylated, Tail-Anchored Type II Membrane Protein.* J. Virol., 1998. **72**(6): p. 4560-4570.
 40. Brown, Z.A., L.A. Vontver, J. Benedetti, C.W. Critchlow, D.E. Hickok, C.J. Sells, S. Berry, and L. Corey, *Genital herpes in pregnancy: risk factors associated with recurrences and asymptomatic viral shedding.* Am. J. Obstet. Gynecol., 1985. **153**(1): p. 24-30.
 41. Bujnicki, J.M. and L. Rychlewski, *Grouping together highly diverged PD-(D/E)XK nucleases and identification of novel superfamily members using structure-guided alignment of sequences profiles.* J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001. **3**(1): p. 69-72.
 42. Bujnicki, J.M. and L. Rychlewski, *The Herpesvirus Alkaline Exonuclease Belongs to the Restriction Endonuclease PD-(D/E)XK Superfamily: Insight from Molecular Modeling and Phylogenetic Analysis.* Virus Genes, 2001. **22**(2): p. 219-230.
 43. Burkham, J., D.M. Coen, C.B.C. Hwang, and S.K. Weller, *Interactions of Herpes Simplex Virus Type 1 with ND10 and Recruitment of PML to Replication Compartments.* J. Virol., 2001. **75**(5): p. 2353-2367.
 44. Cadoz M., M.M., Seigneurin J.M. and al., *Phase I trial R7020: a live attenuated recombinant HSV candidate vaccine.*, in *32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1992: Anaheim CA, USA.
 45. Cajal, S.R., *Neurones extra-médullaires, mais dont le cylindre-axe pénètre dans la moelle.* Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol. vol.1. 1909, Madrid.
 46. Calle, A., I. Ugrinova, A.L. Epstein, P. Bouvet, J.-J. Diaz, and A. Greco, *Nucleolin Is Required for an Efficient Herpes Simplex Virus Type 1 Infection.* J. Virol., 2008. **82**(10): p. 4762-4773.
 47. Callebaut, C., J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J.-P. Briand, and A.G. Hovanessian, *Identification of V3 Loop-binding Proteins as Potential Receptors Implicated in*

- the Binding of HIV Particles to CD4+Cells.* J. Biol. Chem., 1998. **273**(34): p. 21988-21997.
48. Camarena, V., M. Kobayashi, J.Y. Kim, P. Roehm, R. Perez, J. Gardner, A.C. Wilson, I. Mohr, and M.V. Chao, *Nature and Duration of Growth Factor Signaling through Receptor Tyrosine Kinases Regulates HSV-1 Latency in Neurons.* Cell Host Microbe, 2010. **8**(4): p. 320-330.
 49. Casafont, I., R. Bengoechea, J. Navascués, E. Pena, M.T. Berciano, and M. Lafarga, *The giant fibrillar center: A nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglia neurons.* J. Struct. Biol., 2007. **159**(3): p. 451-461.
 50. Ch'ng, T.H. and L.W. Enquist, *Neuron-to-Cell Spread of Pseudorabies Virus in a Compartmented Neuronal Culture System.* J. Virol., 2005. **79**(17): p. 10875-10889.
 51. Chayavichitsilp, P., J.V. Buckwalter, A.C. Krakowski, and S.F. Friedlander, *Herpes simplex.* Pediatr. Rev., 2009. **30**(4): p. 119-29; quiz 130.
 52. Chelbi-Alix, M.K. and H. de The, *Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins.* Oncogene, 1999. **18**(4): p. 935-41.
 53. Chen, C.M., S.Y. Chiang, and N.H. Yeh, *Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity.* J. Biol. Chem., 1991. **266**(12): p. 7754-7758.
 54. Chen, D., M. Dundr, C. Wang, A. Leung, A. Lamond, T. Misteli, and S. Huang, *Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins.* The Journal of Cell Biology, 2005. **168**(1): p. 41-54.
 55. Chen, D. and S. Huang, *Nucleolar Components Involved in Ribosome Biogenesis Cycle between the Nucleolus and Nucleoplasm in Interphase Cells.* The Journal of Cell Biology, 2001. **153**(1): p. 169-176.
 56. Chen, S., M. Kramer, P. Schaffer, and D. Coen, *A viral function represses accumulation of transcripts from productive- cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus.* J. Virol., 1997. **71**(8): p. 5878-5884.
 57. Chen, X.-P., J. Li, M. Mata, J. Goss, D. Wolfe, J.C. Glorioso, and D.J. Fink, *Herpes Simplex Virus Type 1 ICP0 Protein Does Not Accumulate in the Nucleus of Primary Neurons in Culture.* J. Virol., 2000. **74**(21): p. 10132-10141.
 58. Cheung, Y.-T., W.K.-W. Lau, M.-S. Yu, C.S.-W. Lai, S.-C. Yeung, K.-F. So, and R.C.-C. Chang, *Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research.* Neurotoxicology, 2009. **30**(1): p. 127-135.
 59. Cioce, M. and A.I. Lamond, *CAJAL BODIES: A Long History of Discovery.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2005. **21**(1): p. 105-131.
 60. Cliffe, A.R., D.A. Garber, and D.M. Knipe, *Transcription of the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Promotes the Formation of Facultative Heterochromatin on Lytic Promoters.* J. Virol., 2009. **83**(16): p. 8182-8190.
 61. Cocchi, F., L. Menotti, P. Mirandola, M. Lopez, and G. Campadelli-Fiume, *The Ectodomain of a Novel Member of the Immunoglobulin Subfamily Related to the Poliovirus Receptor Has the Attributes of a Bona Fide Receptor for Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Human Cells.* J. Virol., 1998. **72**(12): p. 9992-10002.
 62. Cook, W.J. and D.M. Coen, *Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1UL24mRNA Expression via Differential Polyadenylation.* Virology, 1996. **218**(1): p. 204-213.

63. Costanzo, F., G. Campadelli-Fiume, L. Foa-Tomasi, and E. Cassai, *Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B*. J. Virol., 1977. **21**(3): p. 996-1001.
64. Cuchet, D., A. Sykes, A. Nicolas, A. Orr, J. Murray, H. Sirma, J. Heeren, A. Bartelt, and R.D. Everett, *PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication*. J. Cell Sci., 2011. **124**(2): p. 280-291.
65. Danaher, R.J., Jacob R.J., Miller C.S., *Establishment of a quiescent herpes simplex virus type 1 infection in neurally-differentiated PC12 cells*. J. Neurovirol., 1999. **5**(3): p. 258-67.
66. Danaher, R.J., R.J. Jacob, M.R. Steiner, W.R. Allen, J.M. Hill, and C.S. Miller, *Histone deacetylase inhibitors induce reactivation of herpes simplex virus type 1 in a latency-associated transcript-independent manner in neuronal cells*. J. Neurovirol., 2005. **11**(3): p. 306-317.
67. Danaher, R.J., J. R.J., C. M.D., F. C.S., and M. C.S., *Heat stress activates production of herpes simplex virus type 1 from quiescently infected neurally differentiated PC12 cells*. J. Neurovirol., 1999. **5**(4): p. 374-83.
68. Davison, A., R. Eberle, B. Ehlers, G. Hayward, D. McGeoch, A. Minson, P. Pellett, B. Roizman, M. Studdert, and E. Thiry, *The order Herpesvirales*. Arch. Virol., 2009. **154**(1): p. 171-177.
69. Davison, A.J., *Channel catfish virus: a new type of herpesvirus*. Virology, 1992. **186**(1): p. 9-14.
70. Davison, A.J., *Evolution of the herpesviruses*. Vet. Microbiol., 2002. **86**(1-2): p. 69-88.
71. Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.-M.L. Deuff, and T. Renault, *A novel class of herpesvirus with bivalve hosts*. J. Gen. Virol., 2005. **86**(1): p. 41-53.
72. de Verdugo, U., H. Selinka, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P. Hofschneider, and R. Kandolf, *Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses*. J. Virol., 1995. **69**(11): p. 6751-6757.
73. del Rio, T., T.H. Ch'ng, E.A. Flood, S.P. Gross, and L.W. Enquist, *Heterogeneity of a Fluorescent Tegument Component in Single Pseudorabies Virus Virions and Enveloped Axonal Assemblies*. J. Virol., 2005. **79**(7): p. 3903-3919.
74. Deshmane, S.L. and N.W. Fraser, *During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure*. J. Virol., 1989. **63**(2): p. 943-947.
75. Devireddy, L.R. and C.J. Jones, *Olf-1, a Neuron-specific Transcription Factor, Can Activate the Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cell Protein 0 Promoter*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(1): p. 77-81.
76. Di Bacco, A., J. Ouyang, H.-Y. Lee, A. Catic, H. Ploegh, and G. Gill, *The SUMO-Specific Protease SENP5 Is Required for Cell Division*. Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(12): p. 4489-4498.
77. Diefenbach, R.J., M. Miranda-Saksena, M.W. Douglas, and A.L. Cunningham, *Transport and egress of herpes simplex virus in neurons*. Rev. Med. Virol., 2008. **18**(1): p. 35-51.
78. DiMario, P.J., *Cell and Molecular Biology of Nucleolar Assembly and Disassembly*, in *Int. Rev. Cytol.*, W.J. Kwang, Editor. 2004, Academic Press. p. 99-178.
79. Dogiel, A.S., *Der Bau Der Spinalganglien Bei Den Saugetieren*. Anat. Anz. Vol. vol.12. 1896: Centralblatt fur die Gesante Wissenschaftliche Anatomie.

80. Dollery, S.J., M.G. Delboy, and A.V. Nicola, *Low pH-Induced Conformational Change in Herpes Simplex Virus Glycoprotein B*. J. Virol., 2010. **84**(8): p. 3759-3766.
81. Drubin, D.G., S.C. Feinstein, E.M. Shooter, and M.W. Kirschner, *Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors*. The Journal of Cell Biology, 1985. **101**(5): p. 1799-1807.
82. Dry, I., D.M. Haig, N.F. Inglis, L. Imrie, J.P. Stewart, and G.C. Russell, *Proteomic Analysis of Pathogenic and Attenuated Alcelaphine Herpesvirus 1*. J. Virol., 2008. **82**(11): p. 5390-5397.
83. Dumler, I., V. Stepanova, U. Jerke, O.A. Mayboroda, F. Vogel, P. Bouvet, V. Tkachuk, H. Haller, and D.C. Gulba, *Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin*. Current biology : CB, 1999. **9**(24): p. 1468-1476.
84. Efstathiou, S. and C.M. Preston, *Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency*. Virus Res., 2005. **111**(2): p. 108-119.
85. Engman, M.-L., I. Adolfsson, I. Lewensohn-Fuchs, M. Forsgren, M. Mosskin, and G. Malm, *Neuropsychologic Outcomes in Children With Neonatal Herpes Encephalitis*. Pediatr. Neurol., 2008. **38**(6): p. 398-405.
86. Enomoto, T., M.S. Lindström, A. Jin, H. Ke, and Y. Zhang, *Essential Role of the B23/NPM Core Domain in Regulating ARF Binding and B23 Stability*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(27): p. 18463-18472.
87. Enquist, L.W., M.J. Tomishima, S. Gross, and G.A. Smith, *Directional spread of an [alpha]-herpesvirus in the nervous system*. Vet. Microbiol., 2002. **86**(1-2): p. 5-16.
88. Epstein, M.A., *OBSERVATIONS ON THE MODE OF RELEASE OF HERPES VIRUS FROM INFECTED HELA CELLS*. The Journal of Cell Biology, 1962. **12**(3): p. 589-597.
89. Erard, M., F. Lakhdar-Ghazal, and F. Amalric, *Repeat peptide motifs which contain β -turns and modulate DNA condensation in chromatin*. Eur. J. Biochem., 1990. **191**(1): p. 19-26.
90. Erard, M.S., P. Belenguer, M. Caizergues-Ferrer, A. Pantaloni, and F. Amalric, *A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1*. Eur. J. Biochem., 1988. **175**(3): p. 525-530.
91. Everett, R.D., *Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response*. Cell. Microbiol., 2006. **8**(3): p. 365-374.
92. Everett, R.D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, M. Kathoria, and J. Parkinson, *The Disruption of ND10 during Herpes Simplex Virus Infection Correlates with the Vmw110- and Proteasome-Dependent Loss of Several PML Isoforms*. J. Virol., 1998. **72**(8): p. 6581-6591.
93. Everett, R.D. and G. Maul, *HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML*. The EMBO journal, 1994. **13**(21): p. 5062.
94. Everett, R.D. and J. Murray, *ND10 Components Relocate to Sites Associated with Herpes Simplex Virus Type 1 Nucleoprotein Complexes during Virus Infection*. J. Virol., 2005. **79**(8): p. 5078-5089.
95. Everett, R.D., J. Murray, A. Orr, and C.M. Preston, *Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes Are Associated with ND10 Nuclear Substructures in Quiescently Infected Human Fibroblasts*. J. Virol., 2007. **81**(20): p. 10991-11004.
96. Everett, R.D., G. Sourvinos, C. Leiper, J.B. Clements, and A. Orr, *Formation of Nuclear Foci of the Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP4 at*

- Early Times of Infection: Localization, Dynamics, Recruitment of ICP27, and Evidence for the De Novo Induction of ND10-Like Complexes.* J. Virol., 2004. **78**(4): p. 1903-1917.
97. Fang, S.-H. and N.-H. Yeh, *The Self-Cleaving Activity of Nucleolin Determines Its Molecular Dynamics in Relation to Cell Proliferation.* Exp. Cell Res., 1993. **208**(1): p. 48-53.
 98. Fankhauser, C., E. Izaurralde, Y. Adachi, P. Wingfield, and U.K. Laemmli, *Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element.* Mol. Cell. Biol., 1991. **11**(5): p. 2567-2575.
 99. Farrell, M.J., A.T. Dobson, and L.T. Feldman, *Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(3): p. 790-794.
 100. Fath, T., J. Eidenmüller, T. Maas, and R. Brandt, *Herpes simplex virus-mediated expression of the axonal protein tau in human model neurons (NT2-N cells).* Microsc. Res. Tech., 2000. **48**(2): p. 85-96.
 101. Fatica, A. and D. Tollervey, *Making ribosomes.* Curr. Opin. Cell Biol., 2002. **14**(3): p. 313-318.
 102. Favreau, D.J., M. Desforges, J.R. St-Jean, and P.J. Talbot, *A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus.* Virology, 2009. **395**(2): p. 255-267.
 103. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology.* 5th ed. 2007, Philadelphia, Pa. ; London: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2 v. (xix, 3091, 86).
 104. Frazier, D., D. Cox, E. Godshalk, and P. Schaffer, *Identification of cis-acting sequences in the promoter of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts required for activation by nerve growth factor and sodium butyrate in PC12 cells.* J. Virol., 1996. **70**(11): p. 7433-7444.
 105. Fréhlick, L.J., J.M. Eirín-López, and J. Ausió, *New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones.* Bioessays, 2007. **29**(1): p. 49-59.
 106. Gall, J.G., *CAJAL BODIES: The First 100 Years.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2000. **16**(1): p. 273-300.
 107. Garber, D., P. Schaffer, and D. Knipe, *A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1.* J. Virol., 1997. **71**(8): p. 5885-5893.
 108. Gautier, T., N. Fomproix, C. Masson, M.C. Azum-Gélade, N. Gas, and D. Hernandez-Verdun, *Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA.* Biol. Cell, 1994. **82**(2-3): p. 81-93.
 109. Gebrane-Younes, J., N. Fomproix, and D. Hernandez-Verdun, *When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA.* J. Cell Sci., 1997. **110**(19): p. 2429-2440.
 110. Geraghty, R.J., C. Krummenacher, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and P.G. Spear, *Entry of Alphaherpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor.* Science, 1998. **280**(5369): p. 1618-1620.
 111. Gerster, T. and R.G. Roeder, *A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(17): p. 6347-6351.

112. Ghisolfi-Nieto, L., G. Joseph, F. Puvion-Dutilleul, F. Amalric, and P. Bouvet, *Nucleolin is a Sequence-specific RNA-binding Protein: Characterization of Targets on Pre-ribosomal RNA*. J. Mol. Biol., 1996. **260**(1): p. 34-53.
113. Gimenez-Cassina, A., F. Lim, and J. Diaz-Nido, *Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors*. J. Neurosci. Res., 2006. **84**(4): p. 755-767.
114. Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet, *Structure and functions of nucleolin*. J. Cell Sci., 1999. **112**(6): p. 761-772.
115. Gomples U, M.A., *The properties and sequence of glycoprotein H of herpes simplex virus type 1*. Virology, 1986. **152**(2): p. 230-47.
116. Gong, L. and E.T.H. Yeh, *Characterization of a Family of Nucleolar SUMO-specific Proteases with Preference for SUMO-2 or SUMO-3*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(23): p. 15869-15877.
117. Greene, L.A. and G. Rein, *Synthesis, storage and release of acetylcholine by a noradrenergic pheochromocytoma cell line*. Nature, 1977. **268**(5618): p. 349-351.
118. Greene, L.A.a.T.A.S., *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
119. Grummt, I., *Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus*. Genes Dev., 2003. **17**(14): p. 1691-1702.
120. Gunning, P., P. Letourneau, G. Landreth, and E. Shooter, *The action of nerve growth factor and dibutyl adenosine cyclic 3':5'- monophosphate on rat pheochromocytoma reveals distinct stages in the mechanisms underlying neurite outgrowth*. The Journal of Neuroscience, 1981. **1**(10): p. 1085-1095.
121. Haarr, L., D. Shukla, E. Rødahl, M.C. Dal Canto, and P.G. Spear, *Transcription from the Gene Encoding the Herpesvirus Entry Receptor Nectin-1 (HveC) in Nervous Tissue of Adult Mouse*. Virology, 2001. **287**(2): p. 301-309.
122. Hadjiolov, A.A., *The nucleolus and ribosom biogenesis*. 1985: Springer-Verlag.
123. Hagmann, M., O. Georgiev, W. Schaffner, and P. Douville, *Transcription factors interacting with herpes simplex virus α gene promoters in sensory neurons*. Nucleic Acids Res., 1995. **23**(24): p. 4978-4985.
124. Hanada, K., C.Z. Song, K. Yamamoto, K. Yano, Y. Maeda, K. Yamaguchi, and M. Muramatsu, *RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription*. EMBO J., 1996. **15**(9): p. 2217-2226.
125. Handsfield, H.H., A.B. Waldo, Z.A. Brown, L. Corey, J.L. Drucker, C.W. Ebel, P.A. Leone, L.R. Stanberry, and R.J. Whitley, *Neonatal Herpes Should be a Reportable Disease*. Sex. Transm. Dis., 2005. **32**(9): p. 521-525.
126. Hann, L.E., W.J. Cook, S.L. Uprichard, D.M. Knipe, and D.M. Coen, *The Role of Herpes Simplex Virus ICP27 in the Regulation of UL24 Gene Expression by Differential Polyadenylation*. J. Virol., 1998. **72**(10): p. 7709-7714.
127. Hannan K.M., Hannan R.D., Smith S.D., Jefferson L.S., M. Lun, and R. L.I., *Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1*. Oncogene, 2000. **19**(43): p. 4988-4999.
128. Harley, C.A., A. Dasgupta, and D.W. Wilson, *Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles*. J. Virol., 2001. **75**(3): p. 1236-1251.
129. Hatanaka, M., *Discovery of the nucleolar targeting signal*. Bioessays, 1990. **12**(3): p. 143-8.

130. Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T.M. Michaelidis, and I. Grummt, *Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation*. EMBO J., 1998. **17**(24): p. 7373-7381.
131. Hernandez-Verdun, D., *Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle*. Nucleus, 2011. **2**(3): p. 0--1.
132. Hernandez-Verdun, D., P. Roussel, and J. Gébrane-Younès, *Emerging concepts of nucleolar assembly*. J. Cell Sci., 2002. **115**(11): p. 2265-2270.
133. Herold, B.C., R.J. Visalli, N. Susmarski, C.R. Brandt, and P.G. Spear, *Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B*. J. Gen. Virol., 1994. **75**(6): p. 1211-1222.
134. Herold, B.C., D. WuDunn, N. Soltys, and P.G. Spear, *Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity*. J. Virol., 1991. **65**(3): p. 1090-1098.
135. Hill, D.P. and K.A. Robertson, *Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retinoic acid*. Dev. Brain Res., 1997. **102**(1): p. 53-67.
136. Hill, D.P. and K.A. Robertson, *Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction*. Brain Res. Protoc., 1998. **2**(3): p. 183-190.
137. Hiscox, J.A., *RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus*. Nat. Rev. Microbiol., 2007. **5**(2): p. 119-127.
138. Holland, D.J., M. Miranda-Saksena, R.A. Boadle, P. Armati, and A.L. Cunningham, *Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Proteins in Axons of Peripheral Human Fetal Neurons: an Immunoelectron Microscopy Study*. J. Virol., 1999. **73**(10): p. 8503-8511.
139. Honess, R.W. and B. Roizman, *Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins*. J. Virol., 1974. **14**(1): p. 8-19.
140. Hong-Yan, Z., T. Murata, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, and Y. Nishiyama, *Identification and Characterization of the UL24 Gene Product of Herpes Simplex Virus Type 2*. Virus Genes, 2001. **22**(3): p. 321-327.
141. Horie, H. and S.U. Kim, *Improved survival and differentiation of newborn and adult mouse neurons in F12 defined medium by fibronectin*. Brain Res., 1984. **294**(1): p. 178-181.
142. Hsu, W.-L. and R.D. Everett, *Human Neuron-Committed Teratocarcinoma NT2 Cell Line Has Abnormal ND10 Structures and Is Poorly Infected by Herpes Simplex Virus Type 1*. J. Virol., 2001. **75**(8): p. 3819-3831.
143. Huang, J., H.M. Lazear, and H.M. Friedman, *Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus*. Virology, 2011. **409**(1): p. 12-16.
144. Huang, S., *Building an efficient factory*. The Journal of Cell Biology, 2002. **157**(5): p. 739-741.
145. Irwin, N. and J.R. Madsen, *Molecular biology of axonal outgrowth. 1. Growth cones and GAP-43*. Pediatr. Neurosurg., 1997. **27**(3): p. 113-20.
146. Itahana, K., K.P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi, and Y. Zhang, *Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation*. Mol. Cell, 2003. **12**(5): p. 1151-1164.

147. Izumi, R.E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta, *Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation*. *Virus Res.*, 2001. **76**(1): p. 17-29.
148. Jacobson, J.G., S.-H. Chen, W.J. Cook, M.F. Kramer, and D.M. Coen, *Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice*. *Virology*, 1998. **242**(1): p. 161-169.
149. Jacobson, J.G., S.L. Martin, and D.M. Coen, *A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture*. *J. Virol.*, 1989. **63**(4): p. 1839-1843.
150. Jacomy, H., G. Fragoso, G. Almazan, W.E. Mushynski, and P.J. Talbot, *Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice*. *Virology*, 2006. **349**(2): p. 335-346.
151. Johannsen, E., M. Luftig, M.R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff, *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004. **101**(46): p. 16286-16291.
152. Jones, C., *Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003. **16**(1): p. 79-95.
153. Jordan, R., J. Pepe, and P.A. Schaffer, *Characterization of a Nerve Growth Factor-Inducible Cellular Activity That Enhances Herpes Simplex Virus Type 1 Gene Expression and Replication of an ICP0 Null Mutant in Cells of Neural Lineage*. *J. Virol.*, 1998. **72**(7): p. 5373-5382.
154. Kasem, S., M.H.H. Yu, S. Yamada, A. Kodaira, T. Matsumura, K. Tsujimura, H. Madbouly, T. Yamaguchi, K. Ohya, and H. Fukushi, *The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model*. *Virology*, 2010. **400**(2): p. 259-270.
155. Katan, M., A. Haigh, C.P. Verrijzer, P.C. van der Vliet, and P. O'Hare, *Characterization of a cellular factor which interacts functionally with Oct-1 in the assembly of a multicomponent transcription complex*. *Nucleic Acids Res.*, 1990. **18**(23): p. 6871-6880.
156. Kattenhorn, L.M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H.L. Ploegh, and B.M. Kessler, *Identification of Proteins Associated with Murine Cytomegalovirus Virions*. *J. Virol.*, 2004. **78**(20): p. 11187-11197.
157. Kesari, S., B.P. Randazzo, T. Valyi-Nagy, Q.S. Huang, S.M. Brown, A.R. MacLean, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, and N.W. Fraser, *Therapy of experimental human brain tumors using a neuroattenuated herpes simplex virus mutant*. *Lab. Invest.*, 1995. **73**: p. 636-648.
158. Khurana, B. and T.M. Kristie, *A Protein Sequestering System Reveals Control of Cellular Programs by the Transcriptional Coactivator HCF-1*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(32): p. 33673-33683.
159. Khurts, S., K. Masutomi, L. Delgermaa, K. Arai, N. Oishi, H. Mizuno, N. Hayashi, W.C. Hahn, and S. Murakami, *Nucleolin Interacts with Telomerase*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(49): p. 51508-51515.
160. Kimberlin, D.W., *Neonatal Herpes Simplex Infection*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004. **17**(1): p. 1-13.
161. Kimberlin, D.W., C.-Y. Lin, R.F. Jacobs, D.A. Powell, L.M. Frenkel, W.C. Gruber, M. Rathore, J.S. Bradley, P.S. Diaz, M. Kumar, A.M. Arvin, K. Gutierrez, M. Shelton, L.B. Weiner, J.W. Sleasman, T.M.a. de Sierra, S.-J. Soong, J. Kiell, F.D. Lakeman, R.J. Whitley, t.N.I.o. Allergy, and I.D.C.A.S.G. a, *Natural History of Neonatal Herpes Simplex Virus Infections in the Acyclovir Era*. *Pediatrics*, 2001. **108**(2): p. 223-229.

162. Kimberlin, D.W. and D.J. Rouse, *Genital Herpes*. N. Engl. J. Med., 2004. **350**(19): p. 1970-1977.
163. Kinch, L.N., K. Ginalski, L. Rychlewski, and N.V. Grishin, *Identification of novel restriction endonuclease-like fold families among hypothetical proteins*. Nucleic Acids Res. **33**(11): p. 3598-3605.
164. Kivell, B.M., F.J. McDonald, and J.H. Miller, *Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons*. Dev. Brain Res., 2000. **120**(2): p. 199-210.
165. Klein, J. and I. Grummt, *Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: The nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(11): p. 6096-6101.
166. Kleinman, H.K., B.S. Weeks, F.B. Cannon, T.M. Sweeney, G.C. Sephel, B. Clement, M. Zain, M.O. Olson, M. Jucker, and B.A. Burrous, *Identification of a 110kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide*. Arch. Biochem. Biophys., 1991. **290**(2): p. 320-5.
167. Knipe, D.M. and A. Cliffe, *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nat. Rev. Microbiol., 2008. **6**(3): p. 211-221.
168. Knizewski, L., L. Kinch, N.V. Grishin, L. Rychlewski, and K. Ginalski, *Human Herpesvirus 1 UL24 Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease*. J. Virol., 2006. **80**(5): p. 2575-2577.
169. Knotts, F.B., M.L. Cook, and J.G. Stevens, *Pathogenesis of Herpetic Encephalitis in Mice after Ophthalmic Inoculation*. J. Infect. Dis., 1974. **130**(1): p. 16-27.
170. Kolb, G. and T.M. Kristie, *Association of the Cellular Coactivator HCF-1 with the Golgi Apparatus in Sensory Neurons*. J. Virol., 2008. **82**(19): p. 9555-9563.
171. Kops, A.d.B. and D.M. Knipe, *Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein*. Cell, 1988. **55**(5): p. 857-868.
172. Kosz-Vnenchak, M., D.M. Coen, and D.M. Knipe, *Restricted expression of herpes simplex virus lytic genes during establishment of latent infection by thymidine kinase-negative mutant viruses*. J. Virol., 1990. **64**(11): p. 5396-5402.
173. Kosz-Vnenchak, M., J. Jacobson, D.M. Coen, and D.M. Knipe, *Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons*. J. Virol., 1993. **67**(9): p. 5383-5393.
174. Kramer, M.F., S.-H. Chen, D.M. Knipe, and D.M. Coen, *Accumulation of Viral Transcripts and DNA during Establishment of Latency by Herpes Simplex Virus*. J. Virol., 1998. **72**(2): p. 1177-1185.
175. Kramer, T., T.M. Greco, L.W. Enquist, and I.M. Cristea, *Proteomic Characterization of Pseudorabies Virus Extracellular Virions*. J. Virol., 2011. **85**(13): p. 6427-6441.
176. Krantz, S., R. Salazar, R. Brandt, J. Kellermann, and F. Lottspeich, *Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937*. Biochim. Biophys. Acta, 1995. **1266**(1): p. 109-12.
177. Kristensson, K., E. Lycke, M. Roytta, B. Svennerholm, and A. Vahne, *Neuritic Transport of Herpes Simplex Virus in Rat Sensory Neurons in vitro. Effects of Substances Interacting with Microtubular Function and Axonal Flow [Nocodazole, Taxol and Erythro-9-3-(2-hydroxyethyl)adenine]*. J. Gen. Virol., 1986. **67**(9): p. 2023-2028.

178. Kristie, T.M. and P.A. Sharp, *Purification of the cellular C1 factor required for the stable recognition of the Oct-1 homeodomain by the herpes simplex virus alpha-trans-induction factor (VP16)*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(9): p. 6525-6534.
179. Kristie, T.M., J.L. Vogel, and A.E. Sears, *Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(4): p. 1229-1233.
180. Krummenacher, C., J. Zabolotny, and N. Fraser, *Selection of a nonconsensus branch point is influenced by an RNA stem-loop structure and is important to confer stability to the herpes simplex virus 2-kilobase latency-associated transcript*. J. Virol., 1997. **71**(8): p. 5849-5860.
181. Kubat, N.J., A.L. Amelio, N.V. Giordani, and D.C. Bloom, *The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) Enhancer/rcr Is Hyperacetylated during Latency Independently of LAT Transcription*. J. Virol., 2004. **78**(22): p. 12508-12518.
182. Kubat, N.J., R.K. Tran, P. McAnany, and D.C. Bloom, *Specific Histone Tail Modification and Not DNA Methylation Is a Determinant of Herpes Simplex Virus Type 1 Latent Gene Expression*. J. Virol., 2004. **78**(3): p. 1139-1149.
183. Kume, T., Y. Kawato, F. Osakada, Y. Izumi, H. Katsuki, T. Nakagawa, S. Kaneko, T. Niidome, Y. Takada-Takatori, and A. Akaike, *Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype*. Neurosci. Lett., 2008. **443**(3): p. 199-203.
184. Lafarga, M., A. M.A., B. M.T., and M. E., *Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat*. J. Comp. Neurol., 1991. **308**(3): p. 329-39.
185. Lanciotti, M., P.G. Montaldo, S. Folghera, E. Lucarelli, P. Cornaglia-Ferraris, and M. Ponzoni, *A combined evaluation of biochemical and morphological changes during human neuroblastoma cell differentiation*. Cell. Mol. Neurobiol., 1992. **12**(3): p. 225-40.
186. Laquerre, S., R. Argnani, D.B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, and J.C. Glorioso, *Heparan Sulfate Proteoglycan Binding by Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins B and C, Which Differ in Their Contributions to Virus Attachment, Penetration, and Cell-to-Cell Spread*. J. Virol., 1998. **72**(7): p. 6119-6130.
187. Larrucea, S., R. Cambroner, C. González-Rubio, B. Fraile, C. Gamallo, G. Fontán, and M. López-Trascasa, *Internalization of Factor J and Cellular Signalization after Factor J-Cell Interaction*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999. **266**(1): p. 51-57.
188. LaVail, J.H., A.N. Tauscher, E. Aghaian, O. Harrabi, and S.S. Sidhu, *Axonal Transport and Sorting of Herpes Simplex Virus Components in a Mature Mouse Visual System*. J. Virol., 2003. **77**(11): p. 6117-6126.
189. LaVail, J.H., A.N. Tauscher, J.W. Hicks, O. Harrabi, G.T. Melroe, and D.M. Knipe, *Genetic and Molecular In Vivo Analysis of Herpes Simplex Virus Assembly in Murine Visual System Neurons*. J. Virol., 2005. **79**(17): p. 11142-11150.
190. LaVail, J.H., A.N. Tauscher, A. Sucher, O. Harrabi, and R. Brandimarti, *Viral regulation of the long distance axonal transport of herpes simplex virus nucleocapsid*. Neuroscience, 2007. **146**(3): p. 974-985.
191. Lawrence, F.J., B. McStay, and D.A. Matthews, *Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis*. J. Cell Sci., 2006. **119**(12): p. 2621-2631.

192. Lee, V. and P. Andrews, *Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins*. The Journal of Neuroscience, 1986. **6**(2): p. 514-521.
193. Leib, D.A., C.L. Bogard, M. Kosz-Vnenchak, K.A. Hicks, D.M. Coen, D.M. Knipe, and P.A. Schaffer, *A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency*. J. Virol., 1989. **63**(7): p. 2893-2900.
194. Leib, D.A., K.C. Nadeau, S.A. Rundle, and P.A. Schaffer, *The promoter of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 contains a functional cAMP-response element: role of the latency-associated transcripts and cAMP in reactivation of viral latency*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(1): p. 48-52.
195. Leiva-Torres, G.A., P.-A. Rochette, and A. Pearson, *Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation*. J. Gen. Virol., 2010. **91**(5): p. 1109-1116.
196. Leiva-Torres, G.A., P.-A. Rochette, and A. Pearson, *Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation*. J. Gen. Virol., 2010: p. vir.0.017921-0.
197. Leung, A.K.L., D. Gerlich, G. Miller, C. Lyon, Y.W. Lam, D. Lleres, N. Daigle, J. Zomerdijk, J. Ellenberg, and A.I. Lamond, *Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells*. The Journal of Cell Biology, 2004. **166**(6): p. 787-800.
198. Li, D., M. Miller, and P.D. Chantler, *Association of a cellular myosin II with anionic phospholipids and the neuronal plasma membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(3): p. 853-857.
199. Li, W., J. Wang, and D. Wang, *Establishment of primary cultured neurons model of mouse embryo with HSV-1 infection*. Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi= Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi= Chinese journal of experimental and clinical virology, 2003. **17**(3): p. 237.
200. Li, W.R., J.W. Wang, and D.X. Wang, *Establishment of primary cultured neurons model of mouse embryo with HSV-1 infection*. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2003. **17**(3): p. 237-9.
201. Li, Y., *Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat*. J. Virol., 1997. **71**(5): p. 4098-4102.
202. Liang, Y., J.L. Vogel, A. Narayanan, H. Peng, and T.M. Kristie, *Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks [alpha]-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency*. Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.), 2009. **15**(11): p. 1312-1317.
203. Lieberman, A.R., *Sensory ganglia*. The Peripheral Nerve, ed. L. D.N. 1976, London: Chapman and Hall.
204. Liesegang, T.J., *Herpes Simplex Virus Epidemiology and Ocular Importance*. Cornea, 2001. **20**(1): p. 1-13.
205. Lilley, C.E., C.T. Carson, A.R. Muotri, F.H. Gage, and M.D. Weitzman, *DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005. **102**(16): p. 5844-5849.
206. Lindstrom, M.S., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling*. Biochem Res Int, 2011. **2011**: p. 195209.

207. Loiacono, C.M., R. Myers, and W.J. Mitchell, *Neurons Differentially Activate the Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Gene ICP0 and ICP27 Promoters in Transgenic Mice*. J. Virol., 2002. **76**(5): p. 2449-2459.
208. Lu, R. and V. Misra, *Potential Role for Luman, the Cellular Homologue of Herpes Simplex Virus VP16 (alpha Gene trans-Inducing Factor), in Herpesvirus Latency*. J. Virol., 2000. **74**(2): p. 934-943.
209. Lukashchuk, V. and R.D. Everett, *Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx*. J. Virol., 2010. **84**(8): p. 4026-4040.
210. Lymberopoulos, M.H., A. Bourget, N.B. Abdeljelil, and A. Pearson, *Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress*. Virology, 2011. **412**(2): p. 341-8.
211. Lymberopoulos, M.H. and A. Pearson, *Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin*. Virology, 2007. **363**(2): p. 397-409.
212. Lymberopoulos, M.H. and A. Pearson, *Relocalization of Upstream Binding Factor to Viral Replication Compartments Is UL24 Independent and Follows the Onset of Herpes Simplex Virus 1 DNA Synthesis*. J. Virol., 2010. **84**(9): p. 4810-4815.
213. Mador, N., D. Goldenberg, O. Cohen, A. Panet, and I. Steiner, *Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcripts Suppress Viral Replication and Reduce Immediate-Early Gene mRNA Levels in a Neuronal Cell Line*. J. Virol., 1998. **72**(6): p. 5067-5075.
214. Mador, N., A. Panet, D. Latchman, and I. Steiner, *Expression and Splicing of the Latency-Associated Transcripts of Herpes Simplex Virus Type 1 in Neuronal and Non-Neuronal Cell Lines*. J. Biochem. (Tokyo), 1995. **117**(6): p. 1288-1297.
215. Malm, G., *Neonatal herpes simplex virus infection*. Semin. Fetal. Neonatal Med., 2009. **14**(4): p. 204-208.
216. Malm, G. and M. Forsgren, *Neonatal herpes simplex virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum*. Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition, 1999. **81**(1): p. F24-F29.
217. Malm G., B.U.a.F.M., *Neonatal herpes simplex: clinical findings and outcome in relation to type of maternal infection*. Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung., 1995. **84**(3): p. 256-60.
218. Margolis, T.P., C.R. Dawson, and J.H. LaVail, *Herpes simplex viral infection of the mouse trigeminal ganglion. Immunohistochemical analysis of cell populations*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1992. **33**(2): p. 259-67.
219. Marriott D.R., H.W.D., Ljunberg C.M., *Astrocytes*. J. Cohen, Wilkin (Eds.) ed, ed. N.C. Culture. 1995, New York: Oxford University Press.
220. Marshall, K.R., R.H. Lachmann, S. Efstathiou, A. Rinaldi, and C.M. Preston, *Long-Term Transgene Expression in Mice Infected with a Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Severely Impaired for Immediate-Early Gene Expression*. J. Virol., 2000. **74**(2): p. 956-964.
221. Mata, M.Z., XiaoPing Hu, David J. Fink, Marina, *HveC (nectin-1) is expressed at high levels in sensory neurons, but not in motor neurons, of the rat peripheral nervous system*. J. Neurovirol., 2001. **7**(5): p. 476-480.
222. Matthews, D.A., *Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm*. J. Virol., 2001. **75**(2): p. 1031-1038.
223. Maul, G.G., H.H. Guldner, and J.G. Spivack, *Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0)*. J. Gen. Virol., 1993. **74**(12): p. 2679-2690.

224. McGeoch, D.J., S. Cook, A. Dolan, F.E. Jamieson, and E.A.R. Telford, *Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses*. J. Mol. Biol., 1995. **247**(3): p. 443-458.
225. McGeoch, D.J., M.A. Dalrymple, A.J. Davison, A. Dolan, M.C. Frame, D. McNab, L.J. Perry, J.E. Scott, and P. Taylor, *The Complete DNA Sequence of the Long Unique Region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1*. J. Gen. Virol., 1988. **69**(7): p. 1531-1574.
226. McGeoch, D.J., D. Gatherer, and A. Dolan, *On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae*. J. Gen. Virol., 2005. **86**(2): p. 307-316.
227. McStay, B., M.W. Frazier, and R.H. Reeder, *xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription*. Genes Dev., 1991. **5**(11): p. 1957-1968.
228. Mellerick, D.M. and N.W. Fraser, *Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state*. Virology, 1987. **158**(2): p. 265-75.
229. Melli G., H.A., *Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies*. Expert Opin Drug Discov, 2009. **4**(10): p. 1035-1045.
230. Mettenleiter, T.C., *Herpesvirus Assembly and Egress*. J. Virol., 2002. **76**(4): p. 1537-1547.
231. Mettenleiter, T.C., *Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle*. Vet. Microbiol., 2006. **113**(3-4): p. 163-169.
232. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr. Opin. Microbiol., 2006. **9**(4): p. 423-429.
233. Miranda-Saksena, M., P. Armati, R.A. Boadle, D.J. Holland, and A.L. Cunningham, *Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Cultured, Dissociated Human and Rat Dorsal Root Ganglion Neurons*. J. Virol., 2000. **74**(4): p. 1827-1839.
234. Mongelard, F. and P. Bouvet, *Nucleolin: a multiFACeTed protein*. Trends Cell Biol., 2007. **17**(2): p. 80-86.
235. Monier, K., J.C.G. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K.F. Sullivan, *Annexation of the interchromosomal space during viral infection*. Nat. Cell Biol., 2000. **2**(9): p. 661-665.
236. Montgomery, R.I., M.S. Warner, B.J. Lum, and P.G. Spear, *Herpes Simplex Virus-1 Entry into Cells Mediated by a Novel Member of the TNF/NGF Receptor Family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-436.
237. Morgan, C., H.M. Rose, M. Holden, and E.P. Jones, *Electron microscopic observations on the development of herpes simplex virus*. J. Exp. Med., 1959. **110**(4): p. 643-656.
238. Morris, G.E., *The Cajal body*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2008. **1783**(11): p. 2108-2115.
239. Moss, T. and V.Y. Stefanovsky, *At the Center of Eukaryotic Life*. Cell, 2002. **109**(5): p. 545-548.
240. Moss, T. and S. V.Y., *Promotion and regulation of ribosomal transcriptio in eukaryotes by RNA polymerase I*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1995. **50**: p. 25-66.

241. Murzin, A.G., S.E. Brenner, T. Hubbard, and C. Chothia, *SCOP: a structural classification of protein database for the investigation of sequences and structures*. J. Mol. Biol., 1995. **247**(4): p. 536-40.
242. Nahmias, A.J., W.E. Josey, Z.M. Naib, M.G. Freeman, R.J. Fernandez, and J.H. Wheeler, *Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection*. Am. J. Obstet. Gynecol., 1971. **110**(6): p. 825-37.
243. Narayan, M., I. Younis, D.M. D'Agostino, and P.L. Green, *Functional Domain Structure of Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 Rex*. J. Virol., 2003. **77**(23): p. 12829-12840.
244. Narayanan, A., M.L. Nogueira, W.T. Ruyechan, and T.M. Kristie, *Combinatorial Transcription of Herpes Simplex Virus and Varicella Zoster Virus Immediate Early Genes Is Strictly Determined by the Cellular Coactivator HCF-1*. J. Biol. Chem., 2005. **280**(2): p. 1369-1375.
245. Nascimento, R., J. Dias, and R. Parkhouse, *The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex*. Arch. Virol., 2009. **154**(7): p. 1143-1149.
246. Nascimento, R. and R.M.E. Parkhouse, *Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex*. J. Gen. Virol., 2007. **88**(5): p. 1446-1453.
247. Nebel, T., K.N. Pestonjamas, J.D. Leszyk, J.L. Crowley, S.W. Oh, and E.J. Luna, *Proteomic Analysis of a Detergent-resistant Membrane Skeleton from Neutrophil Plasma Membranes*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(45): p. 43399-43409.
248. Negatsch, A., H. Granzow, C. Maresch, B.G. Klupp, W. Fuchs, J.P. Teifke, and T.C. Mettenleiter, *Ultrastructural Analysis of Virion Formation and Intraaxonal Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Primary Rat Neurons*. J. Virol., 2010. **84**(24): p. 13031-13035.
249. Neumann, D.M., P.S. Bhattacharjee, N.V. Giordani, D.C. Bloom, and J.M. Hill, *In Vivo Changes in the Patterns of Chromatin Structure Associated with the Latent Herpes Simplex Virus Type 1 Genome in Mouse Trigeminal Ganglia Can Be Detected at Early Times after Butyrate Treatment*. J. Virol., 2007. **81**(23): p. 13248-13253.
250. Nichol, P., J. Chang, E. Johnson, Jr, and P. Olivo, *Herpes simplex virus gene expression in neurons: viral DNA synthesis is a critical regulatory event in the branch point between the lytic and latent pathways*. J. Virol., 1996. **70**(8): p. 5476-5486.
251. Nigg, E.A., *Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 779-787.
252. Nisole, S., B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.-P. Briand, and A.G. Hovanessian, *The Anti-HIV Pseudopeptide HB-19 Forms a Complex with the Cell-surface-expressed Nucleolin Independent of Heparan Sulfate Proteoglycans*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(39): p. 27875-27884.
253. Nisole, S., B. Krust, and A.G. Hovanessian, *Anchorage of HIV on Permissive Cells Leads to Coaggregation of Viral Particles with Surface Nucleolin at Membrane Raft Microdomains*. Exp. Cell Res., 2002. **276**(2): p. 155-173.
254. Nisole, S., E.A. Said, C. Mische, M.-C. Prevost, B. Krust, P. Bouvet, A. Bianco, J.-P. Briand, and A.G. Hovanessian, *The Anti-HIV Pentameric Pseudopeptide HB-19 Binds the C-terminal End of Nucleolin and Prevents Anchorage of Virus Particles in the Plasma Membrane of Target Cells*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(23): p. 20877-20886.

255. O'Connor, C.M. and D.H. Kedes, *Mass Spectrometric Analyses of Purified Rhesus Monkey Rhadinovirus Reveal 33 Virion-Associated Proteins*. J. Virol., 2006. **80**(3): p. 1574-1583.
256. O'Sullivan, A.C., G.J. Sullivan, and B. McStay, *UBF Binding In Vivo Is Not Restricted to Regulatory Sequences within the Vertebrate Ribosomal DNA Repeat*. Mol. Cell. Biol., 2002. **22**(2): p. 657-658.
257. Ohara, P.T., M.S. Chin, and J.H. LaVail, *The Spread of Herpes Simplex Virus Type 1 from Trigeminal Neurons to the Murine Cornea: an Immunoelectron Microscopy Study*. J. Virol., 2000. **74**(10): p. 4776-4786.
258. Ohara, P.T., A.N. Tauscher, and J.H. LaVail, *Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea*. Brain Res., 2001. **899**(1-2): p. 260-263.
259. Okuwaki, M., *The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein*. J. Biochem. (Tokyo), 2008. **143**(4): p. 441-448.
260. Okuwaki, M., A. Iwamatsu, M. Tsujimoto, and K. Nagata, *Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins*. J. Mol. Biol., 2001. **311**(1): p. 41-55.
261. Okuwaki, M., M. Tsujimoto, and K. Nagata, *The RNA Binding Activity of a Ribosome Biogenesis Factor, Nucleophosmin/B23, Is Modulated by Phosphorylation with a Cell Cycle-dependent Kinase and by Association with Its Subtype*. Mol. Biol. Cell, 2002. **13**(6): p. 2016-2030.
262. Olden, K., M. Willingham, and I. Pastan, *Cell surface myosin in cultured fibroblasts*. Cell, 1976. **8**(3): p. 383-390.
263. Olson, M.O.J., M. Dunder, and A. Szebeni, *The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities*. Trends Cell Biol., 2000. **10**(5): p. 189-196.
264. Orrick, L.R., M.O. Olson, and H. Busch, *Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973. **70**(5): p. 1316-20.
265. Pahlman, S., L. Odelstad, E. Larsson, G. Grotte, and K. Nilsson, *Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. Int. J. Cancer Suppl., 1981. **28**(5): p. 583-9.
266. Pahlman, S., A.I. Ruusala, L. Abrahamsson, M.E. Mattsson, and T. Esscher, *Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation*. Cell Differ. Dev., 1984. **14**(2): p. 135-44.
267. Paustian, T. *Through the Microscope*. June 2011.
268. Pearson, A. and D.M. Coen, *Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1*. J. Virol., 2002. **76**(21): p. 10821-10828.
269. Pena, E., M.T. Berciano, R. Fernandez, J.L. Ojeda, and M. Lafarga, *Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons*. The Journal of Comparative Neurology, 2001. **430**(2): p. 250-263.
270. Penfold, M.E., P. Armati, and A.L. Cunningham, *Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(14): p. 6529-6533.

271. Perng, G.-C., C. Jones, J. Ciacci-Zanella, M. Stone, G. Henderson, A. Yukht, S.M. Slanina, F.M. Hofman, H. Ghiasi, A.B. Nesburn, and S.L. Wechsler, *Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1500-1503.
272. Pesola, J.M., J. Zhu, D.M. Knipe, and D.M. Coen, *Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early and Early Gene Expression during Reactivation from Latency under Conditions That Prevent Infectious Virus Production*. *J. Virol.*, 2005. **79**(23): p. 14516-14525.
273. Pleasure, S., C. Page, and V. Lee, *Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons*. *The Journal of Neuroscience*, 1992. **12**(5): p. 1802-1815.
274. Ponzoni, M., P. Bocca, V. Chiesa, A. Decensi, V. Pistoia, L. Raffaghello, C. Rozzo, and P.G. Montaldo, *Differential Effects of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and Retinoic Acid on Neuroblastoma Cells: Apoptosis versus Differentiation*. *Cancer Res.*, 1995. **55**(4): p. 853-861.
275. Potel, C., K. Kaelin, L. Danglot, A. Triller, C. Vannier, and F. Rozenberg, *Herpes simplex virus type 1 glycoprotein B sorting in hippocampal neurons*. *J. Gen. Virol.*, 2003. **84**(10): p. 2613-2624.
276. Prescott, D. and M. Bender, *Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells*. *Exp. Cell Res.*, 1962. **26**(2): p. 260-268.
277. Prestayko, A.W., G.R. Klomp, D.J. Schmoll, and H. Busch, *Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particles from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. *Biochemistry (Mosc.)*, 1974. **13**(9): p. 1945-51.
278. Prieto J.L., M.B., *Nucleolar biogenesis: the first small steps*. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005. **33**(Pt6): p. 1441-3.
279. Proenca, J.T., H.M. Coleman, M.P. Nicoll, V. Connor, C.M. Preston, J. Arthur, and S. Efstathiou, *An investigation of HSV promoter activity compatible with latency establishment reveals VP16 independent activation of HSV immediate early promoters in sensory neurones*. *J. Gen. Virol.*, 2011.
280. Ramsamoj, P., V. Notario, and A. Dritschilo, *Modifications of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation*. *Radiat. Res.*, 1995. **143**(2): p. 158-64.
281. Ranvier, M.L., *Des tubes nerveux en T et de leurs relation avec les cellules ganglionnaires*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. Vol. 81. 1875, Paris.
282. Raska, I., K. Koberna, J. Malínský, H. Fidlerová, and M. Masata, *The nucleolus and transcription of ribosomal genes*. *Biol. Cell*, 2004. **96**(8): p. 579-594.
283. Reed, M.L., B.K. Dove, R.M. Jackson, R. Collins, G. Brooks, and J.A. Hiscox, *Delineation and Modelling of a Nucleolar Retention Signal in the Coronavirus Nucleocapsid Protein*. *Traffic*, 2006. **7**(7): p. 833-848.
284. Richart, S.M., S.A. Simpson, C. Krummenacher, J.C. Whitbeck, L.I. Pizer, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and C.L. Wilcox, *Entry of Herpes Simplex Virus Type 1 into Primary Sensory Neurons In Vitro Is Mediated by Nectin-1/HveC*. *J. Virol.*, 2003. **77**(5): p. 3307-3311.
285. Rock, D.L. and N.W. Fraser, *Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice*. *Nature*, 1983. **302**(5908): p. 523-5.
286. Rock, D.L. and N.W. Fraser, *Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region*. *J. Virol.*, 1985. **55**(3): p. 849-852.

287. Rodahl, E. and L. Haarr, *Analysis of the 2-kilobase latency-associated transcript expressed in PC12 cells productively infected with herpes simplex virus type 1: evidence for a stable, nonlinear structure*. J. Virol., 1997. **71**(2): p. 1703-1707.
288. Rodrigues, S.H., N.P. Silva, L.R. Delicio, C. Granato, and L.E. Andrade, *The behavior of the coiled body in cells infected with adenovirus in vitro*. Mol. Biol. Rep., 1996. **23**(3-4): p. 183-9.
289. Roizman, B., *The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: The role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex*. J. Virol., 2011: p. JVI.00180-11.
290. Roussel, P., C. André, L. Comai, and D. Hernandez-Verdun, *The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs*. The Journal of Cell Biology, 1996. **133**(2): p. 235-246.
291. Rubenstein, R. and R.W. Price, *Early inhibition of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activity in herpes simplex virus type 1 infection of PC12 cells*. J. Neurochem., 1984. **42**(1): p. 142-50.
292. Sagou, K., M. Uema, and Y. Kawaguchi, *Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids*. J. Virol., 2010. **84**(4): p. 2110-21.
293. Saksena, M.M., H. Wakisaka, B. Tijono, R.A. Boadle, F. Rixon, H. Takahashi, and A.L. Cunningham, *Herpes Simplex Virus Type 1 Accumulation, Envelopment, and Exit in Growth Cones and Varicosities in Mid-Distal Regions of Axons*. J. Virol., 2006. **80**(7): p. 3592-3606.
294. Sanders, P.G., N.M. Wilkie, and A.J. Davison, *Thymidine Kinase Deletion Mutants of Herpes Simplex Virus Type 1*. J. Gen. Virol., 1982. **63**(2): p. 277-295.
295. Sanij, E., G. Poortinga, K. Sharkey, S. Hung, T.P. Holloway, J. Quin, E. Robb, L.H. Wong, W.G. Thomas, V. Stefanovsky, T. Moss, L. Rothblum, K.M. Hannan, G.A. McArthur, R.B. Pearson, and R.D. Hannan, *UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals*. The Journal of Cell Biology, 2008. **183**(7): p. 1259-1274.
296. Sato, K., R. Hayami, W. Wu, T. Nishikawa, H. Nishikawa, Y. Okuda, H. Ogata, M. Fukuda, and T. Ohta, *Nucleophosmin/B23 Is a Candidate Substrate for the BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase*. J. Biol. Chem., 2004. **279**(30): p. 30919-30922.
297. Sato, S., S.B. Burgess, and D.L. McIlwain, *Transcription and Motoneuron Size*. J. Neurochem., 1994. **63**(5): p. 1609-1615.
298. Satoh, T., J. Arii, T. Suenaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P.G. Spear, L.L. Lanier, and H. Arase, *PILR \pm Is a Herpes Simplex Virus-1 Entry Coreceptor That Associates with Glycoprotein B*. Cell, 2008. **132**(6): p. 935-944.
299. Sawtell, N., *Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level*. J. Virol., 1997. **71**(7): p. 5423-5431.
300. Sawtell, N.M., D.K. Poon, C.S. Tansky, and R.L. Thompson, *The Latent Herpes Simplex Virus Type 1 Genome Copy Number in Individual Neurons Is Virus Strain Specific and Correlates with Reactivation*. J. Virol., 1998. **72**(7): p. 5343-5350.
301. Sawtell, N.M. and R.L. Thompson, *Comparison of Herpes Simplex Virus Reactivation in Ganglia In Vivo and in Explants Demonstrates Quantitative and Qualitative Differences*. J. Virol., 2004. **78**(14): p. 7784-7794.
302. Sawtell, N.M., R.L. Thompson, and R.L. Haas, *Herpes Simplex Virus DNA Synthesis Is Not a Decisive Regulatory Event in the Initiation of Lytic Viral Protein*

- Expression in Neurons In Vivo during Primary Infection or Reactivation from Latency.* J. Virol., 2006. **80**(1): p. 38-50.
303. Scheer, U. and R. Hock, *Structure and function of the nucleolus.* Curr. Opin. Cell Biol., 1999. **11**(3): p. 385-390.
 304. Schmidt-Zachmann, M.S., C. Dargemont, L.C. Kühn, and E.A. Nigg, *Nuclear export of proteins: The role of nuclear retention.* Cell, 1993. **74**(3): p. 493-504.
 305. Schwartz, J. and B. Roizman, *Similarities and Differences in the Development of Laboratory Strains and Freshly Isolated Strains of Herpes Simplex Virus in HEp-2 Cells: Electron Microscopy.* J. Virol., 1969. **4**(6): p. 879-889.
 306. Scott, B.S., *Adult mouse dorsal root ganglia neurons in cell culture.* J. Neurobiol., 1977. **8**(5): p. 417-27.
 307. Seeger, R., Y. Danon, S. Rayner, and F. Hoover, *Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody.* J. Immunol., 1982. **128**(2): p. 983-989.
 308. Seither, P., O. Zatssepina, M. Hoffmann, and I. Grummt, *Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I.* Chromosoma, 1997. **106**(4): p. 216-225.
 309. Shaw, P.J. and E.G. Jordan, *The Nucleolus.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1995. **11**(1): p. 93-121.
 310. Shieh, M.T., D. WuDunn, R.I. Montgomery, J.D. Esko, and P.G. Spear, *Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans.* The Journal of Cell Biology, 1992. **116**(5): p. 1273-1281.
 311. Shirata, N., A. Kudoh, T. Daikoku, Y. Tatsumi, M. Fujita, T. Kiyono, Y. Sugaya, H. Isomura, K. Ishizaki, and T. Tsurumi, *Activation of Ataxia Telangiectasia-mutated DNA Damage Checkpoint Signal Transduction Elicited by Herpes Simplex Virus Infection.* J. Biol. Chem., 2005. **280**(34): p. 30336-30341.
 312. Shukla, D., J. Liu, P. Blaiklock, N.W. Shworak, X. Bai, J.D. Esko, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, R.D. Rosenberg, and P.G. Spear, *A Novel Role for 3-O-Sulfated Heparan Sulfate in Herpes Simplex Virus 1 Entry.* Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
 313. Simonin, D., J.J. Diaz, T. Mass√©, and J.J. Madjar, *Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1.* J. Gen. Virol., 1997. **78**(2): p. 435-43.
 314. Simpson-Holley, M., R.C. Colgrove, G. Nalepa, J.W. Harper, and D.M. Knipe, *Identification and Functional Evaluation of Cellular and Viral Factors Involved in the Alteration of Nuclear Architecture during Herpes Simplex Virus 1 Infection.* J. Virol., 2005. **79**(20): p. 12840-12851.
 315. Singh, J. and G. Kaur, *Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures.* Brain Res., 2007. **1154**: p. 8-21.
 316. Sirri, V., D. Hernandez-Verdun, and P. Roussel, *Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus.* The Journal of Cell Biology, 2002. **156**(6): p. 969-981.
 317. Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun, *The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery.* J. Cell Sci., 1999. **112**(19): p. 3259-3268.
 318. Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun, *In Vivo Release of Mitotic Silencing of Ribosomal Gene Transcription Does Not Give Rise to Precursor Ribosomal RNA Processing.* The Journal of Cell Biology, 2000. **148**(2): p. 259-270.

319. Sirri, V., S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun, *Nucleolus: the fascinating nuclear body*. Histochem. Cell Biol., 2008. **129**(1): p. 13-31.
320. Skepper, J.N., A. Whiteley, H. Browne, and A. Minson, *Herpes Simplex Virus Nucleocapsids Mature to Progeny Virions by an Envelopment {right-arrow} Deenvelopment {right-arrow} Reenvelopment Pathway*. J. Virol., 2001. **75**(12): p. 5697-5702.
321. Smiley, J.R., B. Panning, and C.A. Smibert, *Regulation of cellular genes by HSV products*. Herpesvirus transcription and its regulation. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1991: p. 151-179.
322. Snyder, A., T.W. Wisner, and D.C. Johnson, *Herpes Simplex Virus Capsids Are Transported in Neuronal Axons without an Envelope Containing the Viral Glycoproteins*. J. Virol., 2006. **80**(22): p. 11165-11177.
323. Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius, *Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus*. The Journal of Cell Biology, 1997. **136**(5): p. 1007-1021.
324. Sourvinos, G. and R.D. Everett, *Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells*. EMBO J., 2002. **21**(18): p. 4989-4997.
325. Spivack, J.G., G.M. Woods, and N.W. Fraser, *Identification of a novel latency-specific splice donor signal within the herpes simplex virus type 1 2.0-kilobase latency-associated transcript (LAT): translation inhibition of LAT open reading frames by the intron within the 2.0-kilobase LAT*. J. Virol., 1991. **65**(12): p. 6800-6810.
326. Spruance, S.L., J.C. Overall, E.R. Kern, G.G. Krueger, V. Pliam, and W. Miller, *The Natural History of Recurrent Herpes Simplex Labialis*. N. Engl. J. Med., 1977. **297**(2): p. 69-75.
327. Srivastava, M. and H.B. Pollard, *Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights*. FASEB J., 1999. **13**(14): p. 1911-1922.
328. Stanberry, L.R., S.L. Spruance, A.L. Cunningham, D.I. Bernstein, A. Mindel, S. Sacks, S. Tying, F.Y. Aoki, M. Slaoui, M. Denis, P. Vandepapeliere, and G. Dubin, *Glycoprotein-D-Adjuvant Vaccine to Prevent Genital Herpes*. N. Engl. J. Med., 2002. **347**(21): p. 1652-1661.
329. Staněk, D. and K. Neugebauer, *The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze*. Chromosoma, 2006. **115**(5): p. 343-354.
330. Stefanovsky, V.Y., D.P. Bazett-Jones, G. Pelletier, and T. Moss, *The DNA Supercoiling Architecture Induced by the Transcription Factor xUBF Requires Three of Its Five HMG-Boxes*. Nucleic Acids Res., 1996. **24**(16): p. 3208-3215.
331. Stefanovsky, V.Y., G. Pelletier, R. Hannan, T. Gagnon-Kugler, L.I. Rothblum, and T. Moss, *An Immediate Response of Ribosomal Transcription to Growth Factor Stimulation in Mammals Is Mediated by ERK Phosphorylation of UBF*. Mol. Cell, 2001. **8**(5): p. 1063-1073.
332. Stow, N.D., V.C. Evans, and D.A. Matthews, *Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments*. J. Gen. Virol., 2009. **90**(1): p. 69-73.
333. Sugimoto, K., M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto, and Y. Kawaguchi, *Simultaneous Tracking of Capsid, Tegument, and Envelope Protein Localization in Living Cells Infected with Triply Fluorescent Herpes Simplex Virus 1*. J. Virol., 2008. **82**(11): p. 5198-5211.

334. Swaminathan, V., A.H. Kishore, K.K. Febitha, and T.K. Kundu, *Human Histone Chaperone Nucleophosmin Enhances Acetylation-Dependent Chromatin Transcription*. *Mol. Cell. Biol.*, 2005. **25**(17): p. 7534-7545.
335. Szebeni, A., B. Mehrotra, A. Baumann, S.A. Adam, P.T. Wingfield, and M.O.J. Olson, *Nucleolar Protein B23 Stimulates Nuclear Import of the HIV-1 Rev Protein and NLS-Conjugated Albumin†*. *Biochemistry (Mosc.)*, 1997. **36**(13): p. 3941-3949.
336. Tago, K., S. Chiocca, and C.J. Sherr, *Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: A p53-independent function*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005. **102**(21): p. 7689-7694.
337. Tandrup, T., *Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival*. *J. Neurocytol.*, 2004. **33**(2): p. 173-192.
338. Tang, J., S. Wu, H. Liu, R. Stratt, O.G. Barak, R. Shiekhattar, D.J. Picketts, and X. Yang, *A Novel Transcription Regulatory Complex Containing Death Domain-associated Protein and the ATR-X Syndrome Protein*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(19): p. 20369-20377.
339. Taus, N.S. and W.J. Mitchell, *The Transgenic ICP4 Promoter Is Activated in Schwann Cells in Trigeminal Ganglia of Mice Latently Infected with Herpes Simplex Virus Type 1*. *J. Virol.*, 2001. **75**(21): p. 10401-10408.
340. Taylor, T.J. and D.M. Knipe, *C-terminal region of herpes simplex virus ICP8 protein needed for intranuclear localization*. *Virology*, 2003. **309**(2): p. 219-231.
341. Thiry, E., F. Meurens, B. Muylkens, M. McVoy, S. Gogev, J. Thiry, A. Vanderplassen, A. Epstein, G. Keil, and F. Schynts, *Recombination in alphaherpesviruses*. *Rev. Med. Virol.*, 2005. **15**(2): p. 89-103.
342. Thiry, M. and D.L.J. Lafontaine, *Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments*. *Trends Cell Biol.*, 2005. **15**(4): p. 194-199.
343. Thoenen, H. and Y.A. Barde, *Physiology of nerve growth factor*. *Physiol. Rev.*, 1980. **60**(4): p. 1284-1335.
344. Thompson, R. and N. Sawtell, *The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency*. *J. Virol.*, 1997. **71**(7): p. 5432-5440.
345. Thompson, R.L., C.M. Preston, and N.M. Sawtell, *De Novo Synthesis of VP16 Coordinates the Exit from HSV Latency In Vivo*. *PLoS Pathog.*, 2009. **5**(3): p. e1000352.
346. Tognon, M., R. Guandalini, M.G. Romanelli, R. Manservigi, and B. Trevisani, *Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1*. *Virus Res.*, 1991. **18**(2): p. 135-50.
347. Toma, H.S., A.T. Murina, R.G. Areaux, D.M. Neumann, P.S. Bhattacharjee, T.P. Foster, H.E. Kaufman, and J.M. Hill, *Ocular HSV-1 Latency, Reactivation and Recurrent Disease*. *Semin. Ophthalmol.*, 2008. **23**(4): p. 249-273.
348. Tomishima, M.J. and L.W. Enquist, *A conserved α -herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins*. *The Journal of Cell Biology*, 2001. **154**(4): p. 741-752.
349. Tomishima, M.J. and L.W. Enquist, *In Vivo Egress of an Alphaherpesvirus from Axons*. *J. Virol.*, 2002. **76**(16): p. 8310-8317.
350. Topp, K.S., K. Bisla, N.D. Saks, and J.H. Lavail, *Centripetal transport of herpes simplex virus in human retinal pigment epithelial cells in vitro*. *Neuroscience*, 1996. **71**(4): p. 1133-1144.

351. Trinkle-Mulcahy, L. and A.I. Lamond, *Mitotic phosphatases: no longer silent partners*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2006. **18**(6): p. 623-631.
352. Tuan, J.C., W. Zhai, and L. Comai, *Recruitment of TATA-Binding Protein-TAFI Complex SL1 to the Human Ribosomal DNA Promoter Is Mediated by the Carboxy-Terminal Activation Domain of Upstream Binding Factor (UBF) and Is Regulated by UBF Phosphorylation*. *Mol. Cell. Biol.*, 1999. **19**(4): p. 2872-2879.
353. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe, *Herpes Simplex Virus Type 1 Capsids Transit by the trans-Golgi Network, Where Viral Glycoproteins Accumulate Independently of Capsid Egress*. *J. Virol.*, 2005. **79**(14): p. 8847-8860.
354. Valyi-Nagy, T., S. Deshmane, A. Dillner, and N.W. Fraser, *Induction of cellular transcription factors in trigeminal ganglia of mice by corneal scarification, herpes simplex virus type 1 infection, and explantation of trigeminal ganglia*. *J. Virol.*, 1991. **65**(8): p. 4142-4152.
355. van Genderen, I.L., R. Brandimarti, M.R. Torrisi, G. Campadelli, and G. van Meer, *The Phospholipid Composition of Extracellular Herpes Simplex Virions Differs from That of Host Cell Nuclei*. *Virology*, 1994. **200**(2): p. 831-836.
356. Varnum, S.M., D.N. Streblov, M.E. Monroe, P. Smith, K.J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D.G. Camp, II, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R.D. Smith, and J.A. Nelson, *Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome*. *J. Virol.*, 2004. **78**(20): p. 10960-10966.
357. Voit, R. and I. Grummt, *Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(24): p. 13631-13636.
358. Voit, R., M. Hoffmann, and I. Grummt, *Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF*. *EMBO J.*, 1999. **18**(7): p. 1891-1899.
359. Waggoner, S. and P. Sarnow, *Viral Ribonucleoprotein Complex Formation and Nucleolar-Cytoplasmic Relocalization of Nucleolin in Poliovirus-Infected Cells*. *J. Virol.*, 1998. **72**(8): p. 6699-6709.
360. Wang, Q.-Y., C. Zhou, K.E. Johnson, R.C. Colgrove, D.M. Coen, and D.M. Knipe, *Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005. **102**(44): p. 16055-16059.
361. Wang, S.-K., C.-Y. Duh, and C.-W. Wu, *Human Cytomegalovirus UL76 Encodes a Novel Virion-Associated Protein That Is Able To Inhibit Viral Replication*. *J. Virol.*, 2004. **78**(18): p. 9750-9762.
362. Ward, P.L., G. Campadelli-Fiume, E. Avitabile, and B. Roizman, *Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1*. *J. Virol.*, 1994. **68**(11): p. 7406-7417.
363. Weller, S.K., *Alpha herpesviruses : molecular virology*. 2011, Norfolk, UK: Caister Academic Press. x, 448.
364. Weller, S.K., M.R. Seghatoleslami, L. Shao, D. Rowse, and E.P. Carmichael, *The Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease is Not Essential for Viral DNA Synthesis: Isolation and Characterization of a lacZ Insertion Mutant*. *J. Gen. Virol.*, 1990. **71**(12): p. 2941-2952.
365. Wheeler, C.E.J. and W.H.J. Cabaniss, *Epidemic cutaneous herpes simplex in wrestlers (herpes gladiatorum)*. *JAMA (J. Am. Med. Assoc.)*, 1965. **194**(9): p. 993-7.

366. Whitbeck, J.C., W.C. Lawrence, and L.J. Bello, *Characterization of the Bovine Herpesvirus 1 Homolog of the Herpes Simplex Virus 1 UL24 Open Reading Frame*. *Virology*, 1994. **200**(1): p. 263-270.
367. Whitley, R.J., *Herpes simplex virus infection*. 2nd ed ed. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, ed. J.S.R.a.J.O. Klein. 1989, Philadelphia: W.B. Sanders Company.
368. Whitley, R.J. and H. C., *Neonatal herpes simplex virus infections*. *Pediatr. Rev.*, 1985. **7**: p. 119-126.
369. Whitley, R.J., Gnann J.W., *The epidemiology and clinical manifestations of herpes simplex virus infections*. *The human herpesviruses*, ed. B. Roizman, Whitley R.J., Loez C., eds. 1993, New York: Raven.
370. Whitley, R.J., D.W. Kimberlin, and B. Roizman, *Herpes Simplex Viruses*. *Clin. Infect. Dis.*, 1998. **26**(3): p. 541-555.
371. Whitley, R.J., S.-J. Soong, M.S. Hirsch, A.W. Karchmer, R. Dolin, G. Galasso, J.K. Dunnick, and C.A. Alford, *Herpes Simplex Encephalitis*. *N. Engl. J. Med.*, 1981. **304**(6): p. 313-318.
372. Whitlow, Z.W. and T.M. Kristie, *Recruitment of the Transcriptional Coactivator HCF-1 to Viral Immediate-Early Promoters during Initiation of Reactivation from Latency of Herpes Simplex Virus Type 1*. *J. Virol.*, 2009. **83**(18): p. 9591-9595.
373. Wilcox, C., R. Smith, C. Freed, and E. Johnson, *Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 1990. **10**(4): p. 1268-1275.
374. Wilcox, C.L. and E.M. Johnson, Jr, *Nerve growth factor deprivation results in the reactivation of latent herpes simplex virus in vitro*. *J. Virol.*, 1987. **61**(7): p. 2311-2315.
375. Wilcox, C.L. and E.M. Johnson, Jr, *Characterization of nerve growth factor-dependent herpes simplex virus latency in neurons in vitro*. *J. Virol.*, 1988. **62**(2): p. 393-399.
376. Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E.M. Schraner, E. Loeffe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther, *Impairment of Nuclear Pores in Bovine Herpesvirus 1-Infected MDBK Cells*. *J. Virol.*, 2005. **79**(2): p. 1071-1083.
377. Wilkinson, D.E. and S.K. Weller, *Recruitment of Cellular Recombination and Repair Proteins to Sites of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Replication Is Dependent on the Composition of Viral Proteins within Prereplicative Sites and Correlates with the Induction of the DNA Damage Response*. *J. Virol.*, 2004. **78**(9): p. 4783-4796.
378. Wilson, A.C., K. LaMarco, M.G. Peterson, and W. Herr, *The VP16 accessory protein HCF is a family of polypeptides processed from a large precursor protein*. *Cell*, 1993. **74**(1): p. 115-125.
379. Wilson, S.S., E. Fakioglu, and B.C. Herold, *Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2009. **7**(5): p. 559-568.
380. Wisner, T.W., K. Sugimoto, P.W. Howard, Y. Kawaguchi, and D.C. Johnson, *Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Capsids in Neurons by both Separate and Married Mechanisms*. *J. Virol.*, 2011. **85**(12): p. 5919-5928.
381. Wong, J.M.Y., L. Kusdra, and K. Collins, *Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage*. *Nat. Cell Biol.*, 2002. **4**(9): p. 731-736.
382. Wood, P.M. and R.P. Bunge, *Myelination of cultured dorsal root ganglion neurons by oligodendrocytes obtained from adult rats*. *J. Neurol. Sci.*, 1986. **74**(2-3): p. 153-69.

383. Xia, K., D. Knipe, and N. DeLuca, *Role of protein kinase A and the serine-rich region of herpes simplex virus type 1 ICP4 in viral replication*. J. Virol., 1996. **70**(2): p. 1050-1060.
384. Xiao, P. and J.P. Capone, *A cellular factor binds to the herpes simplex virus type 1 transactivator Vmw65 and is required for Vmw65-dependent protein-DNA complex assembly with Oct-1*. Mol. Cell. Biol., 1990. **10**(9): p. 4974-4977.
385. Xie Hong-rong, H. Lin-sen, and L. Guo-yi, *SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Chin. Med. J. (Engl.), 2010. **123**(8): p. 1086-92.
386. Xue, Z. and T. Melese, *Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis?* Trends Cell Biol., 1994. **4**(12): p. 414-417.
387. Zhai, W. and L. Comai, *Repression of RNA Polymerase I Transcription by the Tumor Suppressor p53*. Mol. Cell. Biol., 2000. **20**(16): p. 5930-5938.
388. Zhu, F.X., J.M. Chong, L. Wu, and Y. Yuan, *Virion Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus*. J. Virol., 2005. **79**(2): p. 800-811.

Annexe I

Les résultats présentés dans les figures 22, 23 et 24 font partie de ma contribution à l'article Lymberopoulos MH, Bourget A, Ben Abdeljelil et Pearson A. (2011). Involvement of UL24 in herpes simplex virus-1 induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412(2) p.341-8.

Lors de cette collaboration, j'ai effectué les expériences et généré les figures 22, 23 et 24. De plus, j'ai aussi effectué les expériences et généré les figures qui sont présentées dans l'article comme figures supplémentaires, mais non présentées dans ce mémoire.

L'infection par le VHS-1 induit plusieurs modifications au nucléole de fibroblastes. La redistribution de B23 au cours de l'infection par le VHS-1 a déjà été déterminée, mais les facteurs viraux responsables n'ont pas été encore identifiés [46]. Par microscopie confocale, nous avons testé l'hypothèse qu'UL24 était impliqué dans la redistribution de B23 dans les cellules infectées par le VHS-1. Tout d'abord une expérience de cinétique d'infection sur les cellules Vero, nous a permis d'observer que B23 est complètement diffus dans les cellules à 12 hpi, mais une faible redistribution de B23 dans les cellules est apparente dès 6hpi (Figure 22). Donc, la redistribution de B23 survient tardivement au cours de l'infection. Aussi, B23 a été retrouvé au noyau sous forme d'un ou deux points intenses correspondant au nucléole dans les cellules non infectées (Figure 22). Une faible diffusion de B23 au niveau du nucléoplasme a aussi été observée dans certaines cellules. En contraste, dans la majorité des fibroblastes infectés par KOS, B23 était dispersé au travers du noyau (Figure 22) ce qui concorde avec les résultats publiés précédemment. Cependant, B23 persistait sous forme de points dans les fibroblastes infectés par un virus déficient en UL24 (UL24X). Comme observée pour la nucléoline [211], la morphologie des points de B23 était déformée contrairement aux points de B23 dans les fibroblastes non infectés.

Puisque la partie N-terminale d'UL24 contient des domaines d'homologies [149] composés d'acides aminés hautement conservés et que ceux-ci affectent la distribution de la nucléoline [25], nous avons voulu déterminer l'impact des acides aminés hautement conservés d'UL24 sur la distribution de la protéine B23 en contexte de transfection transitoire [210]. Pour ce faire, 1×10^5 cellules cos-7 ont été transfectées avec 0,2 μ g de pLBPfl-HA-UL24 ou les différents variants en utilisant le réactif *Fugene 6* (Roche). Deux jours post-transfections, les cellules ont été fixées et co-immunomarquées contre HA-UL24 (vert) et B23 (rouge).

La figure 23A montre une représentation schématique des domaines d'homologie d'UL24 et des substitutions d'acides aminés étudiées. Dans les cellules exprimant HA-UL24 de type sauvage, B23 était diffus dans le noyau (Figure 23B). Les différents variants d'UL24 ont été exprimés dans les cellules et les patrons de distribution de B23 ont été classés selon trois catégories : B23 est sous forme de points, B23 est partiellement diffus (points de B23 sont flous) et B23 est complètement diffus. La Figure 23B montre le patron représentatif de chaque variant étudié. Dans la catégorie où

B23 persiste sous forme de points, on retrouve : Y26A, E69A/V70A, E99A/K101A et I97A/I98A. Dans la seconde catégorie, on retrouve les variants : H22L, R75A/D78A, G121A, Q124A/L125A et Q154A. Finalement, B23 était complètement diffus dans les cellules exprimant HA-UL24 et Q117A.

La figure 24 montre la moyenne des données de trois expériences indépendantes où plus de 100 cellules ont été comptées par expérience. Pour la forme de type sauvage d'UL24, moins de 5 % des cellules exprimant HA-UL24 démontraient B23 sous forme de points, tandis que 7 % des cellules exprimant la partie N-terminale d'UL24 ont exprimé B23 sous forme de points. B23 est maintenu sous forme de points dans 93 % des cellules exprimant la partie C-terminale d'UL24. Les substitutions qui affectaient sévèrement la capacité d'UL24 à redistribuer B23 c'est-à-dire que 50 % des cellules ont montré B23 sous forme de points sont Y26A, E69A/V70A, I97A/I98A et E99A/K101A (Figure 24). Les mutations qui affectaient modérément la distribution de B23 où 34 % à 47 % des cellules maintenaient B23 sous forme de points incluent H22L, R75A/D78A, G121A, Q124A/L125A et Q154A (Figure 23B et 24). La mutation Q117A affectait très peu la capacité d'UL24 à disperser B23 puisque dans moins de 9 % des cellules, B23 persistaient sous forme de points. Ces résultats démontrent que les acides aminés hautement conservés ont une importance dans la capacité d'UL24 à disperser B23 et que le motif d'endonucléase est important pour la dispersion de B23. L'impact des mutations sur la dispersion était similaire entre la nucléoline et B23, mais pas identique. Ceci suggère un rôle biologique commun et important pour B23 dans le cycle de réplication du VHS-1 au moins dans les fibroblastes.

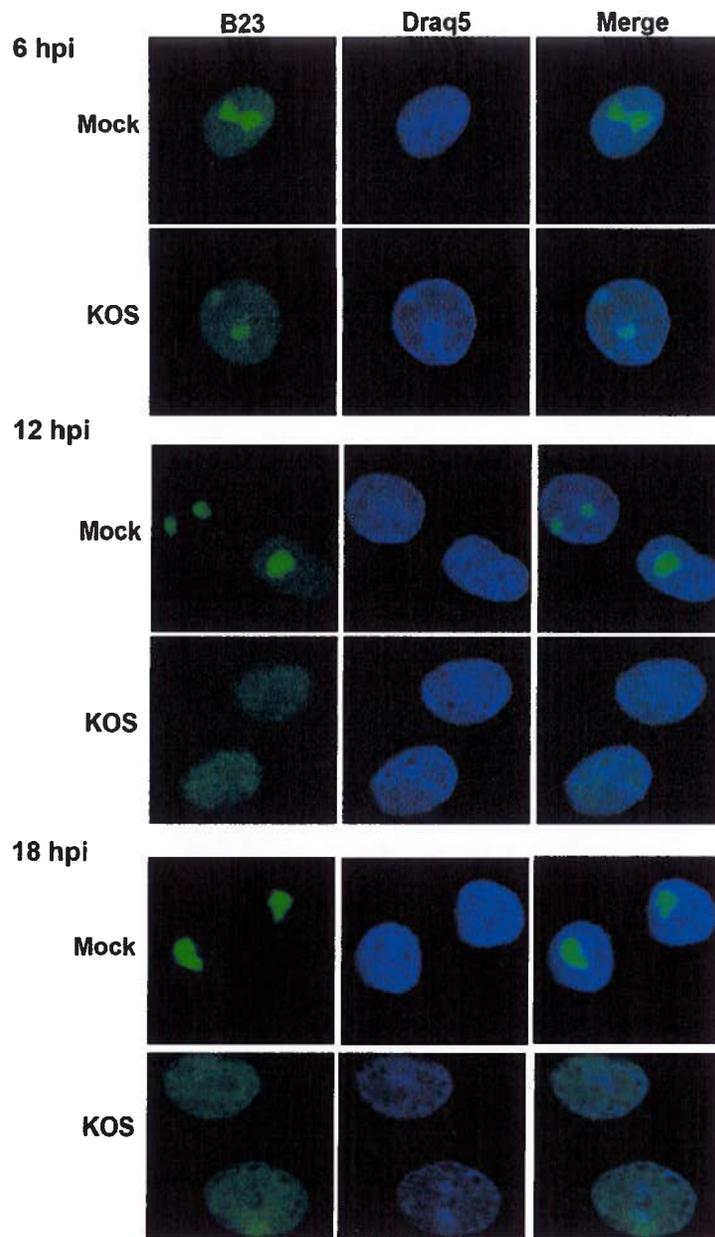


Figure 22. La redistribution de B23 survient tardivement au cours de l'infection par le virus herpès simplex 1. Les cellules Vero ont été non infectées (mock) ou infectées par KOS à une MOI de 10. Aux temps postinfection indiqués, les cellules ont été fixées et immunomarquées pour B23 (vert). Le noyau a été coloré par le Draq5 (bleu). Les photos ont été prises en microscopie confocale. Les panneaux de droites montrent la juxtaposition des images.

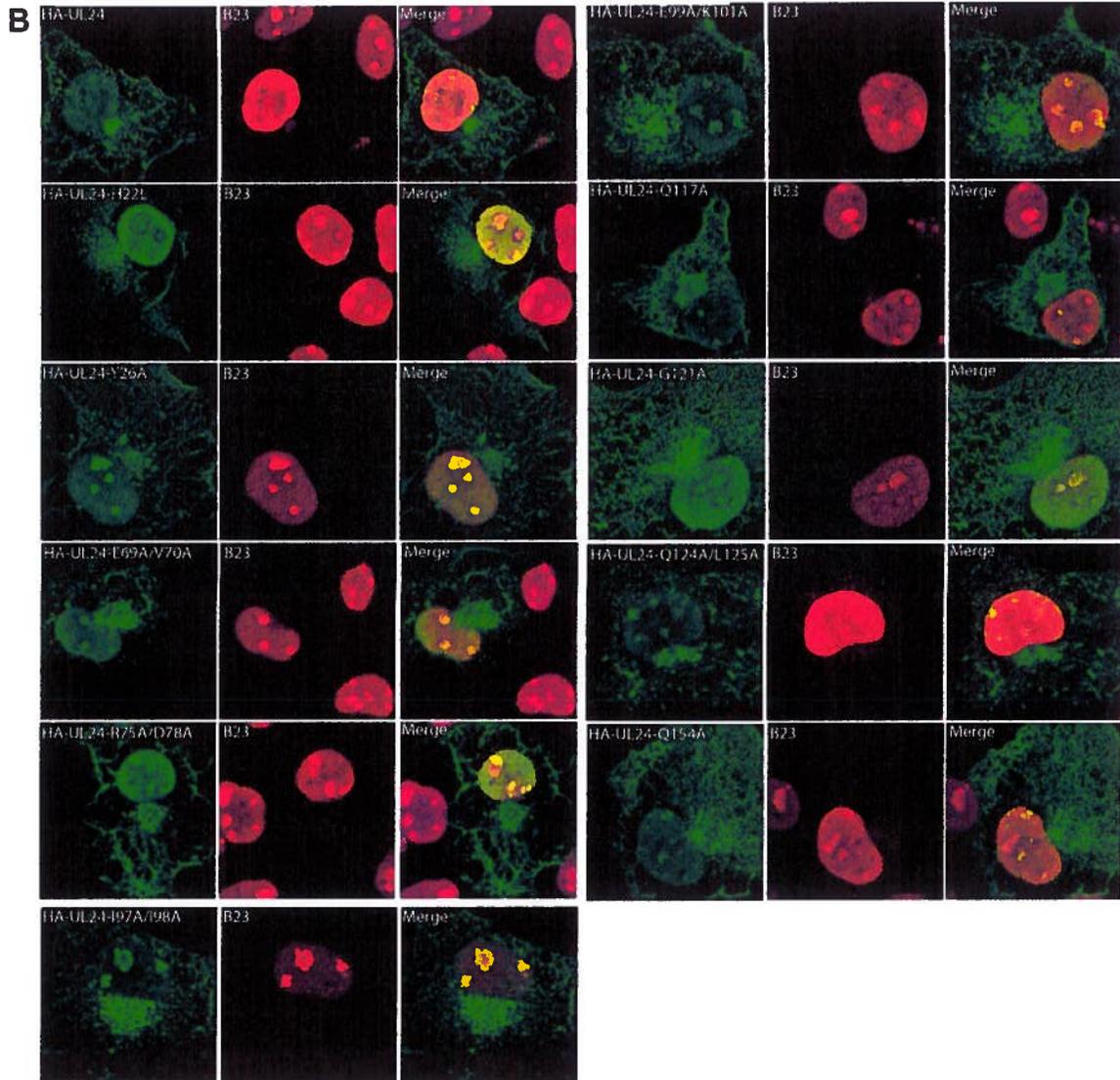
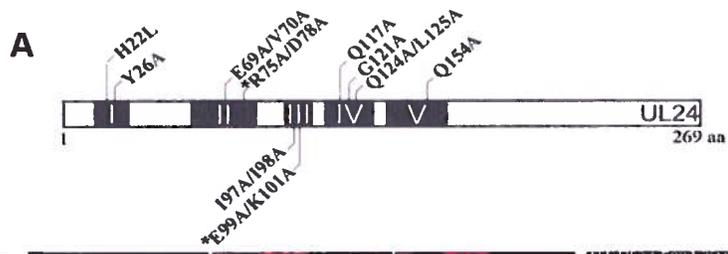


Figure 23. L'impact d'UL24 sur la distribution de B23. **(A)** Schéma de la protéine UL24. Les boîtes noires représentent les domaines d'homologie (HDs). Les mutations simples ou doubles analysées dans cette expérience sont indiquées en haut et en bas du schéma d'UL24. Les nombres représentent la position des mutations. Le résidu original est indiqué avant le nombre suivi du résidu changé. L'astérisque indique le motif d'endonucléase. **(B)** Cellules cos-7 transfectées transitoirement avec un plasmide exprimant HA-UL24 ou les variants de HA-UL24. Les cellules ont été immunomarquées 48 h post-transfection pour HA (vert) et B23 (rouge). Les images ont été prises en microscopie confocale.

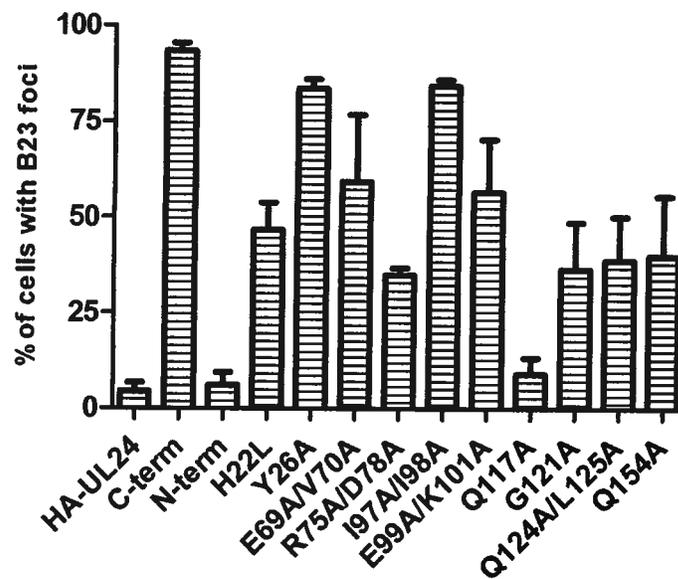


Figure 24. Quantification du patron de distribution de B23 dans les cellules cos-7 transfectées transitoirement par les différents variants de HA-UL24. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes où plus de 100 cellules ont été comptées pour chaque forme d'UL24. La barre d'erreur représente l'écart-type de la moyenne.