

Université de Montréal

Protocole d'isolation des virions périnucléaires et extracellulaires chez HSV-1 pour
l'étude par une approche protéomique du mécanisme de transport intracellulaire
emprunté par le virus

Par

Geneviève Taquet

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)

en pathologie et biologie cellulaire

Décembre, 2004

© Geneviève Taquet, 2004



W
4
U58
2005
V.103

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Protocole d'isolation des virions périnucléaires et extracellulaires chez HSV-1 pour
l'étude par une approche protéomique du mécanisme de transport intracellulaire
emprunté par le virus

Présenté par

Geneviève Taquet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Carolina Alfieri

présidente-rapporteuse

Roger Lippé

directeur de recherche

Michel Desjardins

membre du jury

Mémoire accepté le 16 mai 2005

SOMMAIRE

Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1), membre des *herpèsviridae*, est l'agent étiologique des feux sauvages et, plus rarement, d'encéphalites graves souvent mortelles. *In vitro*, des études indiquent que les nouvelles capsides s'assemblent dans le noyau et incorporent l'ADN viral. Elles acquièrent une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire interne par bourgeonnement dans l'espace périnucléaire, lequel est contigu avec la lumière du RE. Elles migrent finalement à la membrane plasmique sans emprunter la voie classique de biosynthèse (RE, Golgi et TGN), mais en fusionnant avec la membrane nucléaire externe, perdant ainsi leur enveloppe. L'enveloppe finale du virion semble acquise plus tard par ré-enveloppement possible au TGN ou aux endosomes précoces. Bien que la composition en protéines des virions HSV-1 intranucléaires et extracellulaires a été examinée, celle des virions périnucléaires et autres intermédiaires cytoplasmiques demeure inconnue. L'objectif à long terme de cette étude est d'examiner par une approche protéomique les étapes de maturation du virus, afin de comprendre son mécanisme de transport intracellulaire. Le but de ce travail était en premier lieu d'établir un protocole pour comparer la composition protéique des capsides extracellulaires et périnucléaires. Pour ces derniers, des cellules mock et infectées ont été cassées mécaniquement sans que l'intégrité des noyaux soit affectée. Nos résultats ont montré que la meilleure méthode pour isoler les virions périnucléaires nécessite l'enveloppement des noyaux par des billes à groupements NH₂. Finalement, lors de l'isolation des virions extracellulaires, l'emploi de billes magnétiques couvertes d'anti-glycoprotéines donne le meilleur rendement.

Mots clés : RE, gB, gD, billes magnétiques, noyaux, TGN, fractionnement subcellulaire, Herpès simplex de type 1

ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), a member of the *herpesviridae*, causes cold sores and, more rarely, highly morbid or fatal encephalitis. *In vitro* studies indicate that assembly of capsids and encapsidation of the viral DNA occur in the nucleus. The new capsids bud into the perinuclear space, which is contiguous with the ER lumen, where they acquire an envelope derived from the inner nuclear membrane. They then reach the extracellular space not through use of the classical biosynthesis transport pathway (ER, Golgi and TGN), but rather by fusion with the outer nuclear membrane, thereby losing their envelope. Final capsid envelopment likely occurs at the Trans-Golgi Network (TGN) or early endosomes by a re-envelopment process. Although the protein composition of extracellular and intranuclear virus has been examined, that of perinuclear and of other cytoplasmic intermediates is unknown. The long term objective of this work is to study capsid maturation using a proteomic approach in order to probe the intracellular transport mechanism of HSV-1. This project essentially sought to compare the protein composition of perinuclear and extracellular virions. As a first step, we wished to set up a perinuclear and extracellular virus isolation protocol. Mock and HSV-1 infected cells were mechanically broken to isolate infected nuclei, with the aim of preserving nuclear integrity. Based on our results, the best method to isolate perinuclear virus required envelopment of nuclei with NH₂ beads. Finally, for isolation of extracellular virus, the use of anti-glycoprotein coupled magnetic beads seems to give the best yield.

Key words: ER, gB, gD, magnetic beads, nuclei, TGN, subcellular fractionation, Herpes simplex virus type 1

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
<i>ABSTRACT</i>	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 CARACTÉRISTIQUES DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1	2
1.1.1 Manifestations cliniques	2
1.1.2 Tropisme, latence et persistance	3
1.1.3 Morphologie.....	4
1.1.3.1 Génome	4
1.1.3.2 Capside.....	5
1.1.3.3 Tégument	7
1.1.3.4 Glycoprotéines	8
1.1.4 Cycle d'infection	8
1.1.4.1 Entrée du virion.....	9
1.1.4.2 Transcription et réplication	12
1.1.4.3 Encapsidation.....	13
1.1.4.4 Bourgeonnement à la membrane nucléaire interne.....	13
1.1.4.5 Dilemme entre voie classique de biosynthèse (luminale) et la voie de ré-enveloppement	14
1.1.4.6 Acquisition du tégument et des glycoprotéines	15
1.1.4.7 Présence de protéines et/ou ARN cellulaires dans les virions extracellulaires	17

1.2 CARACTÉRISTIQUES DES NOYAUX	18
1.2.1 Membrane nucléaire interne	18
1.2.2 Complexe du pore nucléaire	19
1.3 OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	19
CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE EMPLOYÉE DANS CE TRAVAIL	21
2.1 MODÈLE EXPÉRIMENTAL ENVISAGÉ.....	22
2.1.1 Réactifs	22
2.1.2 Type cellulaire employé et conditions de culture	24
2.1.3 Infections par Herpès simplex de type 1 sauvage (F) et mutant (V701).....	25
2.1.4 Récolte des virions extracellulaires.....	26
2.1.5 Isolation des virions périmoléaires.....	26
2.1.5.1 Homogénéisation	28
2.1.5.1.1 Homogénéisation à l'aide de détergent	28
2.1.5.1.2 Homogénéisation à l'aide de méthodes mécaniques.....	29
2.1.5.2 Purification des noyaux.....	30
2.1.5.2.1 Centrifugation basse vitesse.....	30
2.1.5.2.2 Gradient discontinu de densité	30
2.1.5.2.2.1 Gradient de sucrose.....	30
2.1.5.2.2.2 Gradient de Nycodenz	31
2.1.5.2.2.3 Gradient d'Optiprep.....	31
2.1.5.3 Déplétions des membranes nucléaires	32
2.1.5.3.1 Centrifugation des virions à basse vitesse.....	32
2.1.5.3.2 Avidité de différents anticorps par spectrofluorimétrie pour les protéines nucléaires dans l'immunodéplétion et pour les glycoprotéines virales dans l'immunoisolation des virions	33
2.1.5.3.3 Immunoprécipitation de protéines nucléaires avec différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de protéine A	34
2.1.5.3.4 Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne MACS et billes magnétiques	35

2.1.5.3.5 Marquage des noyaux à la biotine, dialyse et isolation avec des billes magnétiques couvertes de streptavidine.....	36
2.1.5.3.6 Couplage des noyaux aux billes magnétiques à groupements NH ₂ activés	38
2.1.6 Immunoisolation des virions.....	39
2.2 IMMUNOFLUORESCENCE	40
2.3 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	41
2.4 IMMUNOBUVARDAGE	42
2.4.1 Préparation des échantillons	42
2.4.2 Électrophorèse et électro-transfert	42
2.4.3 Immunobuvardage	43
2.4.4 Décapage des membranes	43
CHAPITRE 3 : LES RÉSULTATS OBTENUS.....	45
3.1 ISOLATION DES VIRIONS PÉRINUCLÉAIRES.....	46
3.1.1 Homogénéisation des cellules.....	46
3.1.1.1 Lyse de la membrane plasmique par le NP-40.....	46
3.1.1.2 Fractionnement de la membrane plasmique par des méthodes mécaniques.....	47
3.1.1.2.1 Influence de l'isotonicité du tampon sur le rendement du cassage mécanique.....	47
3.1.1.3 Comparaison de l'efficacité de cassage et du rendement en noyaux par diverses méthodes	50
3.1.2 Gradients discontinus de densité.....	55
3.1.2.1 Comparaison par MÉ des cellules lysées par le détergent ou cassées avec le cell-cracker	57
3.1.3 Analyse par immunobuvardage des fractions durant la purification des noyaux ..	62
3.1.4 Déplétion des membranes nucléaires.....	63
3.1.4.1 Avidité de différents anticorps pour les protéines nucléaires	63
3.1.4.2 Immunoprécipitation des protéines nucléaires avec différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de protéine A	65
3.1.4.3 Culottage à basse vitesse des capsides enveloppées et non enveloppées...	70

3.1.4.4 Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne MACS et billes magnétiques	73
3.1.4.5 Déplétion des membranes nucléaires par le marquage des noyaux à la biotine-NHS	74
3.1.4.6 Déplétion des membranes nucléaires à l'aide de billes magnétiques avec des groupements NH ₂ activés à leur surface.....	80
3.2 ISOLATION DES VIRIONS EXTRACELLULAIRES	81
3.2.1 Avidité de différents anticorps pour les glycoprotéines virales	81
3.2.2 Immunoisolation des virions extracellulaires à l'aide de billes magnétiques	83
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE	89
4.1 ISOLATION DES VIRIONS PÉRINUCLÉAIRES	91
4.1.1 Cassage des cellules par le cell-cracker	91
4.1.2 Purification des noyaux par gradient discontinu d'Optiprep	93
4.1.3 Déplétion des membranes nucléaires	95
4.2 IMMUNOISOLATION DES VIRIONS EXTRACELLULAIRES À L'AIDE D'ANTICORPS CONTRE LES GLYCOPROTÉINES VIRALES.....	98
4.3 CONCLUSION	100
CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES.....	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation du génome de HSV-1	5
Figure 2 : Cycle d'infection de HSV-1	10
Figure 3 : Étapes envisagées dans l'isolation des virions périnucléaires	27
Figure 4 : Intégrité de l'enveloppe nucléaire à différents pourcentages de NP-40.....	48
Figure 5 : Influence de l'isotonicité du tampon sur le rendement du cassage mécanique....	51
Figure 6 : Homogénéisation des cellules.....	52
Figure 7 : Purification des noyaux sur gradients de densité	56
Figure 8 : Séparation des noyaux des cellules intactes sur gradient discontinu d'Optiprep.	58
Figure 9 : Microscopie électronique de cellules lysées par le détergent ou cassées par le cell-cracker.....	59
Figure 10 : Analyse par immunobuvardage des fractions durant la purification des noyaux	64
Figure 11 : Avidité de différents anticorps pour les membranes nucléaires.....	66
Figure 12 : Immunoprécipitation de protéines nucléaires par différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de protéine A	68
Figure 13 : Culottage à basse vitesse des capsides enveloppées et non enveloppées.....	71
Figure 14 : Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne et billes magnétiques.....	75
Figure 15 : Déplétion des membranes nucléaires par marquage à la biotine et isolation avec des billes magnétiques couvertes de streptavidine	78
Figure 16 : Déplétion des membranes nucléaires à l'aide de billes magnétiques avec des groupements NH ₂ activés.....	82
Figure 17 : Avidité de différents anticorps pour les glycoprotéines virales	84

Figure 18 : Immunisations des virions extracellulaires à l'aide de billes magnétiques
couplées à des anticorps contre gD 87

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
α -TIF	Facteur α -transducteur (<i>α-trans-inducing factor</i>)
BiP	Protéine liant les immunoglobulines (<i>immunoglobulin binding protein</i>)
BSA	Albumine sérique bovine (<i>bovine serum albumin</i>)
CaCl ₂	Dichlorure de calcium
CBV	Centrifugation basse vitesse
CLAP	Chymostatine/Leupeptine/Aprotinine/Pepstatine
CMV	Cytomégalovirus humain (<i>human Cytomegalovirus</i>)
CPN	Complexe du pore nucléaire
CypA	Cyclophiline A
Dépt	Département
DMEM	Milieu essentiel modifié de Dulbecco (<i>Dulbecco's modified essential medium</i>)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EBV	Virus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
EDTA	Disodium éthylènediaminetétraacétate
ERGIC	Compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi (<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>)
g	Grammes ou force gravitationnelle
^{1/2} g	Diamètre de l'ouverture de l'aiguille, exprimé en pouces par (1/X), où X correspond au numéro de l'aiguille utilisée
GS27	SNARE du Golgi de 27 kD (<i>Golgi SNARE of 27 kD</i>)
GT	Ganglion trijumeau

HCl	Acide chlorydrique
HM	Milieu d'homogénéisation (<i>homogenization media</i>)
HRPO	Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxydase</i>)
HPI	Heures post-infection
HS	Héparan sulfate
HSV-1.....	Virus Herpès simplex de type 1 (<i>Herpes simplex virus type 1</i>)
HSV-2.....	Virus Herpès simplex de type 2 (<i>Herpes simplex virus type 2</i>)
HVEM	Médiateur d'entrée du virus Herpès (<i>Herpesvirus entry mediator</i>)
ICP.....	Protéines de cellules infectées (<i>infected cell proteins</i>)
IR.....	Répétitions inversées (<i>inverted repeats</i>)
JMEM.....	Milieu essentiel modifié de Joklik (<i>Joklik's modified essential medium</i>)
KCl	Chlorure de potassium
kD	Kilo Daltons
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
L	Litres
LAT	Transcrits associés à la latence (<i>latency-associated transcripts</i>)
mA.....	Milliampères
MÉ.....	Microscopie électronique
MES.....	Acide morpholinéthanesulfonique
µg.....	Microgrammes
mg.....	Milligrammes
MgCl ₂	Dichlorure de magnésium
mL	Millilitres
µm	Micromètres
mM	Millimolaires
MNE.....	Membrane nucléaire externe

MNI	Membrane nucléaire interne
MNT	MES/NaCl/Tris
MOI	Multiplicité d'infection (<i>multiplicity of infection</i>)
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ HPO ₄ anhydre.....	Phosphate de sodium dibasique
NaOH	Hydroxyde de sodium
ND10	Domaine nucléaire 10 (<i>nuclear domain 10</i>)
NEAA.....	Acides aminés non essentiels (<i>non essential amino acids</i>)
NK	Tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
nm.....	Nanomètres
Oct-1	Protéine de liaison de l'octamère
ORF	Cadres ouverts de lecture (<i>open reading frames</i>)
Ori.....	Origine de réplication
PBS.....	Saline tamponnée au phosphate sodique (<i>sodium phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS/Tween 20
Pen.....	Pénicilline
PFA.....	Paraformaldéhyde
PFU.....	Unité de formation de plaque (<i>plaque forming unit</i>)
Prot.A	Protéase A
PRV	Virus Pseudorabies (<i>Pseudorabies Virus</i>)
RE.....	Réticulum endoplasmique
RLB	Récepteur de la lamine B
RSB	Tampon standard de réticulocyte (<i>reticulocyte standard buffer</i>)
RTf	Récepteur de la transferrine
SDS.....	Sodium dodecyl sulfate
Sérum	Sérum fœtal de veau inactivé
SIM.....	Sucrose/Imidazole/MgCl ₂

Strep	Streptomycine
TGN.....	Compartiment Trans-Golgien (<i>Trans-Golgi Network</i>)
TR.....	Répétitions terminales (<i>terminal repeats</i>)
Tris	2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
U	Unités
UA	Unités arbitraires
U _L	Unique long
U _S	Unique court (<i>unique short</i>)
VP.....	Protéines du virion (<i>virion proteins</i>)
VZV.....	Virus Varicella Zoster (<i>Varicella Zoster virus</i>)
WS.....	<i>Working solution</i>

*À vous chers parents,
Doris et Jean-Claude,
vous m'avez toujours aidée et épaulée.
Je ne pourrai jamais assez vous remercier,
pour tous ce que vous avez fait pour moi...*

*À Nicolas, mon amour,
parfois mon souffre-douleur, mais combien apprécié.
Merci d'être là,
Je t'aime...*

REMERCIEMENTS

Pour l'aide apportée, les encouragements, les coupes déprime et les nombreux moments de folie, je remercie du fond du cœur Gaudeline, Johanne, Josée, Julie et Sophie, non seulement des collègues de travail, mais j'espère pour longtemps des amies. Merci encore une fois à Julie Bédard pour les conseils et l'aide précieuse pour venir à bout de l'isolation des noyaux et des gradients. À Sophie Dubé, Christiane, Sylvain et Luc, je désire vous dire un gros merci pour l'expertise que vous m'avez fournie et en plus d'être formidables du point de vue professionnel, vous êtes vraiment humains et attachants. Une attention spéciale au laboratoire du Dr Michel Desjardins qui nous a fourni à plusieurs reprises des réactifs et permis d'utiliser certaines de leurs installations. Nous vous devons beaucoup, merci encore.

Merci à toi, Roger, du support apporté tout au long de ce périple et des nombreux conseils.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Caractéristiques du virus Herpès simplex de type 1

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) appartient à la famille virale des *Herpesviridae*, qui regroupe pas moins de huit espèces qui s'attaquent à l'homme et plus d'une centaine qui touchent les animaux. La famille virale se divise en trois sous-familles; alpha, bêta et gamma. Cette famille inclut HSV-1, HSV-2, le Varicella Zoster (VZV) et le virus Pseudorabies (PRV), quatre virus herpès de la sous-famille alpha, le Cytomégalovirus humain (CMV), un membre de la sous-famille bêta, et le virus Epstein-Barr (EBV) qui appartient à la sous-famille gamma. Les virus de type herpès ont plusieurs propriétés communes. Ils ont un génome d'ADN bicaténaire, une capsidie icosaédrique, une enveloppe et la capacité de lyser la cellule hôte tout en persistant et en restant latents dans l'organisme. Ils encodent une panoplie d'enzymes spécifiques nécessaires à la réplication de leur ADN (ADN synthase et polymérase, thymidine kinase, etc.) et pour la maturation des protéines virales (kinases). La synthèse de cet ADN et l'assemblage des capsides sont produits dans le noyau de la cellule hôte.

1.1.1 Manifestations cliniques

Dans le monde entier, plus du tiers de la population est victime d'épisodes récurrents d'herpès et environ 90 % des gens ont été exposés au virus et détiennent des anticorps (1, 74). Les manifestations cliniques d'une infection primaire de type HSV-1 sont variables. Certaines sont totalement asymptomatiques, tandis que d'autres regroupent les feux sauvages, fièvres, maux de gorge, ulcères, oedèmes et lésions vésiculaires. L'éruption de lésions orolabiales est caractérisée par une douleur diffuse, une perception de brûlure et de picotements. Ils sont suivis par la formation des vésicules, laquelle peut s'étendre sur 24 à 48 heures (136, 137, 162). Les vésicules apparaissent sur le rebord (vermillon) des lèvres et persistent au plus pour 48 heures. À l'intérieur de 72 heures, les lésions passent à l'état de pustules ou d'ulcérations jusqu'au stade de croûtes. Après 2 ou 3 jours, il y a une chute de la relâche des virions provenant des lésions et la cicatrisation survient progressivement (5, 137). La cicatrisation est complète dans un délai de 8 à 10 jours. La fréquence des récurrences varie selon les individus (137). Chez l'homme, la récurrence est souvent

associée aux facteurs suivants : la fatigue, le stress, les irradiations aux ultra-violets, les hormones, les microlésions et la fièvre (129, 131). Dans certains cas, chez les individus immunosupprimés HSV-1 peut mener à la cécité, à une encéphalite, à une éruption cutanée disséminée, à une achalasia oesophagienne (absence de relâchement complet des muscles du sphincter oesophagien inférieur)(23), de même que de causer dans 50 % des cas des encéphalites mortelles à leur nouveau-né (159).

1.1.2 Tropisme, latence et persistance

Chez l'homme, HSV-1 possède la capacité d'infecter la plupart de tous les types cellulaires. La nectine-1 (HveC/CD111), le *herpesvirus entry mediator A* (HVEM) et l'héparan sulfate (HS), les récepteurs exprimés sur une grande variété de types cellulaires, sont principalement employés par le virus pour entrer dans la cellule. Toutefois, la perméabilité des cellules au virus est influencée par un ensemble de critères, dont l'importance de chacun est encore mal définie. Parmi ces critères se trouvent l'accessibilité, la densité et/ou la conformation des récepteurs, de même que les événements survenus après la liaison du virus au récepteur et après son entrée dans la cellule. Ceci explique pourquoi les cellules épithéliales des muqueuses et celles des neurones du ganglion trijumeau (GT) sont permissives à HSV-1 (76).

L'initiation de l'infection a lieu où HSV-1 peut accéder aux muqueuses ou à une microlésion. À partir du site de réplication, qui a lieu dans une cellule épithéliale, les virions produits peuvent infecter les neurones sous-jacents, à l'intérieur desquels le transport axonal rétrograde de la nucléocapside l'amène jusqu'à la racine dorsale du GT, un réservoir viral où la latence s'établit (30). La transcription de gènes viraux est considérablement réduite et se limite essentiellement aux gènes LAT (*latency-associated transcripts*), qui ne sont pas traduits (138). Par contre, chez les neurones de souris infectées, des transcrits de gènes α (immédiats précoces), β (précoces) et γ (tardifs précoces) sont toujours produits, et ce, même en état de latence (25, 26, 40, 75). Lors d'une réactivation, le virus migre par transport antérograde le long des axones vers les tissus périphériques pour atteindre les cellules épithéliales des muqueuses dans la zone de l'infection primaire. Le virus peut alors se répliquer normalement en adoptant un cycle lytique et, suite à la production de milliers de

virions, la cellule infectée est lysée. Le mécanisme par lequel la latence succède à la réactivation n'est pas clair, mais il est connu que les lymphocytes T CD8 maintiennent les virus présents dans les neurones à l'état latent (71). Dans les GT, la latence amène une réponse immunitaire chronique qui se traduit par l'infiltration des cellules lymphocytaires, un nombre élevé de transcrits de cytokines qui affectent la réplication virale, et les chemokines qui attirent les cellules du système immunitaire (149).

HSV-1 détient la capacité de tromper le système immunitaire de l'hôte dans le but de persister dans l'organisme. Mogensen et al. (92) a montré que la protéine virale du tégment VP16 réduit indirectement la production de cytokines en déstabilisant leur ARNm, et par conséquent, il y a une chute de la réponse immunitaire. En mode lytique, le virus berne le système immunitaire de plusieurs façons, entre autres, en empêchant l'action des cellules NK (*natural killer*) et en interférant avec la réponse antivirale précoce médiée par les interférons. Il prévient la présentation des antigènes viraux par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I aux cellules T cytotoxiques et il bloque l'action du complément par le biais de l'hétérodimère des glycoprotéines virales gE/gI, qui agit comme récepteur Fc (36, 155).

1.1.3 Morphologie

Le virion de HSV a une taille d'environ 200 nm à 250 nm et se compose de quatre éléments visibles en microscopie électronique (MÉ): i) une structure centrale surnommée le cœur d'ADN, ii) une capsidie protéique qui recouvre le cœur d'ADN, iii) une matière amorphe protéique appelée le tégment, qui recouvre la capsidie et iv) une enveloppe lipidique dérivée de la cellule dans laquelle se trouve des glycoprotéines virales enchâssées et partiellement exposées à la surface du virion (13).

1.1.3.1 Génome

La structure centrale se compose d'ADN viral qui constitue le génome du virus. Celui-ci adopte dans la capsidie une structure semblable à un beignet torsadé. Le génome de HSV-1 contient 152 kpb, se compose de deux séquences uniques : U_S

pour « short » et U_L pour « long » (figure 1). Celles-ci sont réunies par des séquences répétées et inversées (IR), tandis qu'à leur extrémité externe se trouvent des répétitions terminales (TR). HSV-1 est entièrement séquencé (Genbank NC001806) et encode au moins 84 protéines et 94 ORF (86, 109, 157). La nomenclature des protéines virales est définie par le segment U_L ou U_S suivi du chiffre qui permet de localiser sur le génome viral, le gène spécifique. Toutefois, d'autres nomenclatures existent incluant VP (*virion proteins*) ou ICP (*infected cell proteins*), suivi d'un chiffre selon l'ordre de migration électrophorétique des protéines. Finalement dans la littérature, les glycoprotéines sont aussi nommées gB, gC, gD, etc. Une même protéine peut avoir différentes appellations, par exemple, gB est aussi identifié par U_L27 (101).

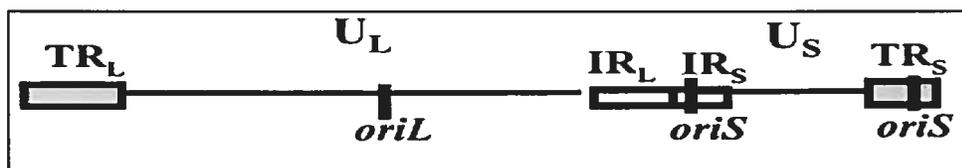


Figure 1. Organisation du génome de HSV-1

U_L : Segment unique « long », U_S : Segment unique « short », TR : répétitions terminales du segment U_L ou U_S , IR : répétitions inversées du segment U_L ou U_S , OriL et OriS : origine de répllication du segment L (1 copie) ou S (2 copies). Modifiée de Sandri-Goldin et al. (121)

1.1.3.2 Capside

L'ADN viral est protégé par une capsid. La capsid mature d'un virion infectieux est d'environ 125 nm de diamètre, de forme icosaédrique et se compose uniquement de protéines virales. Les protéines retrouvées sont les VP5 (U_L19), VP26 (U_L35), U_L6 , VP23 (U_L18) et VP19c (U_L38). Une capsid mature est constituée de 162 capsomères, soit 150 hexamères et 12 pentamères qui prennent place sur un treillis de 16 icosaèdres ($T=16$) (156). Les 150 hexamères se composent chacun de six molécules de VP5, la protéine virale majeure des capsides et de six molécules de VP26. Les pentamères ont deux compositions protéiques différentes. Onze des douze pentamères sont formés de cinq molécules de VP5, tandis que le douzième,

correspond au sommet unique de la capsidie avec une forme cylindrique décrite comme le pore. Ce pore est composé de 12 molécules de U_L6 et constitue un canal axial de 4 nm de diamètre à travers lequel l'ADN peut passer (98). Les capsomères sont soudés entre eux et au plancher de la capsidie en étant groupés par triplets à l'aide du complexe trivalent composé de deux molécules de VP23 et d'une molécule de VP19c.

L'assemblage des capsides est encore sous étude, mais on le décrit comme un phénomène spontané qui se produit dans le noyau. Les capsides doivent passer par un état intermédiaire, ou immature, où elles sont dénuées d'ADN et se nomment procapsides. La procapside diffère de la capsidie mature sur différents points. En MÉ, on constate que la procapside est sphérique plutôt qu'icosaédrique. Le plancher discontinu de la procapside laisse de grands espaces entre les capsomères, contrairement à celui de la capsidie mature qui lui est continu. Les hexamères des procapsides décrivent une forme ovale, tandis que ceux des capsides matures sont hexagonaux. Les procapsides sont beaucoup plus fragiles que les capsides matures, puisqu'elles se dissocient à 4°C. Par contre, l'intégrité des capsides matures n'est pas influencée par de faibles températures (97).

L'équipe de Tatman (147) a introduit individuellement chez des Baculovirus des protéines recombinantes encodant les gènes de la capsidie et montre que la procapside se forme *in vitro*. L'équipe démontre aussi la présence de complexes protéiques pré assemblés (147). Ainsi, VP5 déjà liée à la protéine d'échafaudage pré-VP22a ($U_L26.5$) ou à la protéase A (Prot.A)(U_L26), s'assemblent en intermédiaires partiels de procapsides (97). Ces procapsides partielles ont une structure en arche ou en dôme. Lorsque la procapside s'élargit et se referme, la procapside devient complète. Par la suite, trois modifications sont requises pour que la capsidie devienne mature. L'ordre des modifications n'est pas établi, mais on présume qu'il s'agit d'étapes concomitantes. Ces modifications incluent le clivage protéolytique par la Prot.A de pré-VP22a en VP22a et de U_L26 en VP24 et VP21. La conformation des protéines virales est aussi modifiée et s'accompagne du clivage de l'ADN viral en monomères qui seront encapsidés (63). Finalement, la capsidie devient icosaédrique et stable.

L'infection de cellules humaines par le mutant HSV-1 V701, amène l'accumulation de procapsides dans leur noyau. Ce mutant code pour une Prot.A thermosensible qui l'empêche de cliver la protéine d'échafaudage pré-VP22a et U_L26, bloquant ainsi la maturation de la capsidite à la température non permissive de 39°C. À 31°C, cette mutation est réversible, car la protéase récupère son activité protéolytique (110).

1.1.3.3 Tégument

La capsidite mature est recouverte d'une couche de protéines amorphes appelée tégument dense aux électrons (39). Ce dernier se compose d'au moins 20 protéines : U_L11, U_L13, U_L14, U_L16, U_L21, U_L36 (VP1/2), U_L37, U_L41, U_L46 (VP11/12), U_L47 (VP13/14), U_L48 (VP16)(α -TIF), U_L49 (VP22), U_L51, U_L56, ICP0, ICP4, U_S3, U_S9, U_S10 et U_S11 (88, 101). Les protéines du tégument sont souvent multifonctionnelles et jouent plusieurs rôles, dont celui d'aider au transport de la capsidite à travers la cellule, de moduler l'expression de certains gènes viraux et de l'hôte, de contribuer à l'insertion de l'ADN viral dans le noyau, de permettre l'acquisition de l'enveloppe finale du virion et de moduler la réponse immunitaire (9, 13). Par exemple, Batterson et al. (9) ont découverts que VP16, présent dans la capsidite mature, entre dans le noyau et agit en *trans* pour induire l'expression des gènes α , tandis que Mogensen et al. (92) attribue à cette protéine un rôle dans la stratégie d'évasion virale et que Mossman (95) lui confère un rôle dans la sortie des capsidites du noyau.

L'assemblage du tégument requiert une multitude d'interactions protéines-protéines, dont le lieu et l'ordre d'incorporation ne sont pas encore maîtrisés. De plus, nous ne savons pas si toutes les protéines classifiées comme faisant partie du tégument se trouvent bien dans le tégument du virion extracellulaire, pas plus que nous ne connaissons la composition protéique exacte du tégument des virions intranucléaires et périnucléaires. Dans le cytoplasme, la nucléocapsidite interagit par le biais de VP5 avec la protéine majeure du tégument U_L36, pour possiblement constituer la première couche protéique du tégument (87). Chez PRV, l'équipe de Mettenleiter (72) a démontré que U_L36 interagit avec une autre protéine du tégument, U_L37, et que cette dernière constituait la seconde couche du tégument. Par contre, la

même équipe a récemment montré que la fonction essentielle remplie par U_L36 est indépendante de sa liaison avec U_L37 (45). Bref peu d'information est disponible sur les interactions entre capsides et téguments.

1.1.3.4 Glycoprotéines

HSV-1 encode spécifiquement au moins 10 glycoprotéines (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL et gM), dont neuf ont été détectées à la surface de l'enveloppe lipidique du virion. Certaines contribuent à la fixation du virion à son récepteur et permettent la fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique de la cellule hôte (voir 1.1.4.1). Les glycoprotéines virales sont synthétisées de la même façon que les glycoprotéines de l'hôte, soient par la voie normale de biosynthèse. Ainsi, suite à la traduction des protéines dans le cytosol, elles sont glycosylées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et transitent vers les saccules du Golgi par le biais de vésicules de COP II. Les glycoprotéines mûrent dans le Golgi et sont triées par le compartiment Trans-Golgien (TGN) (152). Dans l'espace périnucléaire, soit l'espace délimité entre les membranes nucléaires interne et externe (7, 53, 160), les capsides virales sont recouvertes d'une enveloppe lipidique issue de la membrane nucléaire interne (MNI) (voir 1.1.4). Il a été démontré que cette enveloppe contient des glycoprotéines virales immatures, dont gB, gD, gH et possiblement gC (48).

1.1.4 Cycle d'infection

Bien que HSV-1 ait été étudié depuis plusieurs décennies, plusieurs interrogations demeurent. Les grandes étapes du cycle d'infection chez HSV-1 sont présentées à la figure 2. L'initiation de l'infection débute grâce à la liaison du virus à la surface cellulaire, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte, l'internalisation de la capside et son transport jusqu'au noyau de la cellule. L'ADN viral parental est répliqué et encapsidé dans le noyau, où sont assemblées de nouvelles capsides. Les nucléocapsides bourgeonnent à la MNI pour émerger dans l'espace périnucléaire. Ces nucléocapsides enveloppées transitent de l'espace périnucléaire, qui est contigu avec le RE (111), pour être acheminées à l'espace extracellulaire par une voie mal définie qui implique possiblement un ré-

enveloppement. Après le ré-enveloppement, les virions enveloppés contenus dans des vacuoles cytoplasmiques dérivées, par exemple, du TGN vont rejoindre l'espace extracellulaire par exocytose (96) via la fusion de l'enveloppe de la vacuole avec la membrane plasmique de la cellule infectée (78). Les virions infectieux libérés peuvent initier un nouveau cycle d'infection auprès des cellules avoisinantes.

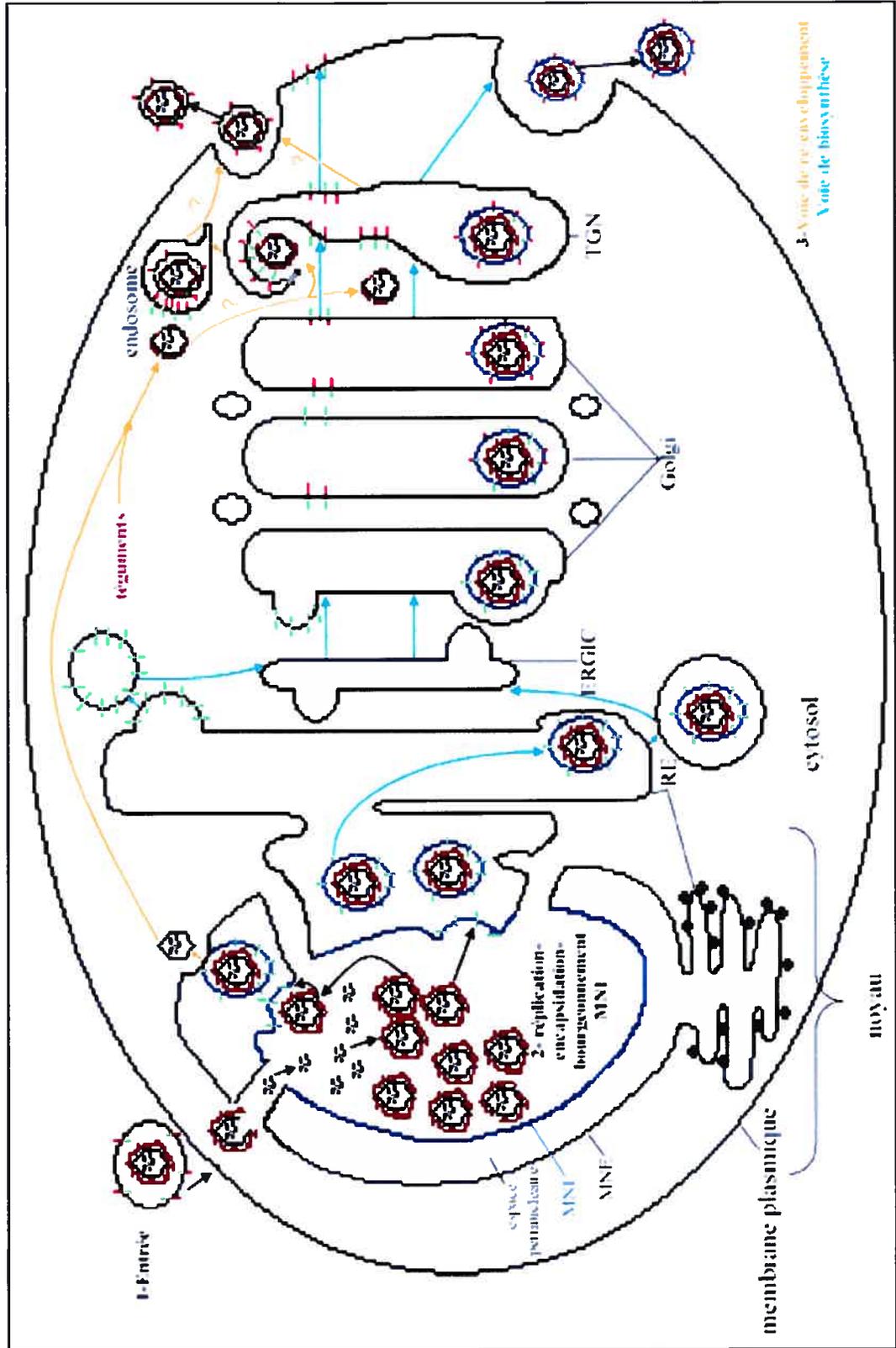
1.1.4.1 Entrée du virion

L'attachement initial du virion à la surface de la cellule a d'abord lieu via l'héparan sulfate, un protéoglycan quasi ubiquitaire présent sur la membrane plasmique de la cellule hôte, et la glycoprotéine C. Les glycoprotéines B ou D peuvent aussi interagir avec le protéoglycan, par contre il s'agit d'interactions secondaires (46, 61, 62). Dans les neurones et les cellules épithéliales, le virus se lie à son récepteur HVEM ou nectine-1 via gD et l'enveloppe du virion fusionne avec la membrane plasmique par un changement de conformation de gD et l'action concertée des glycoprotéines virales, gB, gD et gH/gL (19-21, 28, 46, 48, 115, 125). Des exceptions existent à ce scénario dépendamment du type cellulaire. En effet, dans les cellules HeLa et CHO qui expriment la nectine-1, l'entrée du virus se fait plutôt par endocytose et la relâche de HSV dans le cytosol s'effectue par la fusion avec les endosomes (99). L'endocytose est rapide et indépendante des récepteurs de gD à la surface de la cellule et elle nécessite l'activité de la PI-3 kinase cellulaire (100).

Après l'entrée du virus dans le cytosol, la capsidie dénudée de son enveloppe mais encore recouverte de certains téguments (94) transite vers le noyau par le biais des microtubules et de la dynéine, un complexe moteur protéique reconnu pour déplacer les cargos de la périphérie vers les noyaux. (46, 134, 151). Dans les neurones, la protéine de la capsidie VP26 interagit avec les chaînes légères de la dynéine, RP3 et Tctex, afin de permettre le transport rétrograde de la capsidie de l'arborisation terminale vers le noyau (35). Au noyau, la capsidie interagit directement avec le complexe du pore nucléaire (CPN) et y déverse son ADN (102). La capsidie vide est relâchée vers le cytosol et l'ADN viral parental introduit dans le noyau s'y réplique (84).

Figure 2. Cycle d'infection de HSV-1

Les trois principales étapes du cycle d'infection de HSV-1 sont indiquées : 1-l'entrée, 2-la réplication, l'encapsidation et le bourgeonnement à la membrane nucléaire interne (MNI) et 3-le transit des capsides de l'espace périnucléaire à l'espace extracellulaire par la voie de ré-enveloppement, ou comme pour les glycoprotéines virales, par la voie de biosynthèse (luminale). MNE : Membrane nucléaire externe, RE : réticulum endoplasmique, ERGIC : compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le golgi, TGN : le compartiment trans-golgien.



1.1.4.2 Transcription et réplication

Lorsque le virus infecte une cellule, il provoque rapidement l'arrêt du métabolisme macromoléculaire de l'hôte, c'est-à-dire que ses synthèses d'ADN (118) et de protéines sont inhibées (117, 144, 145). Plusieurs mécanismes existent, notamment l'arrêt de l'épissage des ARNm grâce à la protéine encodée par le gène ICP27 (122, 139).

Lorsque le virus entre en cycle lytique (cycle reproductif), il se réplique activement dans le noyau dans le compartiment de réplication ND10 (nuclear domain 10) (68, 84). Les gènes du cycle lytique s'expriment en trois phases temporelles distinctes, soit celle des gènes immédiats précoces (α), des gènes précoces (β) et des gènes tardifs (γ). Les gènes α sont transcrits par des facteurs viraux présents dans le virion parental ainsi que par l'ARN polymérase II cellulaire. La plupart des gènes β viraux constituent des enzymes ou des protéines de liaison à l'ADN, nécessaires pour la réplication de l'ADN viral, telles que la thymidine kinase et l'ADN polymérase. Les gènes γ encodent des protéines structurales, comme celles de la capsid, des glycoprotéines de l'enveloppe et des protéines du tégument. Toutes les protéines virales sont traduites dans le cytosol de la cellule (109, 116, 142).

L'initiation de la transcription est possible grâce à un complexe se liant au promoteur des gènes α . Les protéines clefs du complexe sont les protéines cellulaires HCF et Oct-1 (protéine de liaison de l'octamère) et la protéine virale α -TIF (VP16 ou facteur α -transducteur) (2). La synthèse des protéines α atteint son paroxysme entre 2-4 heures post-infection (HPI). ICP4, l'un des produits de transcription des gènes α , est requis pour l'activation de la transcription des gènes β et γ (32, 107). La synthèse des protéines β est perceptible 3 HPI, mais atteint son maximum 5 à 7 HPI. La synthèse d'ADN viral débute peu après l'apparition des protéines β , soit aussi tôt que 3 HPI, jusqu'à 15 HPI. Les gènes γ sont divisés en deux groupes : les γ_1 et les γ_2 , puisqu'ils ont une expression échelonnée dans le temps et une dépendance variable à la présence d'ADN viral répliqué. Les protéines γ_1 , comme gB, gD et VP5 sont exprimées tôt dans l'infection, sans que la réplication soit strictement nécessaire, contrairement aux protéines γ_2 , comme gC et US11, exprimées tardivement et seulement après

réplication de l'ADN viral. La synthèse des protéines virales α et β cesse lors de l'expression des gènes γ (115).

La réplication s'initie grâce à la protéine virale U_L9 qui se lie à l'une des origines de réplication (Ori_S ou Ori_L). La réplication est possible à partir d'un génome parental viral circulaire. Tel qu'observé chez le bactériophage λ , le mécanisme présumé de réplication de l'ADN est de type circulaire bidirectionnel passant ensuite aux cercles roulant, d'où émanent de longs concatémères d'ADN liés en tête à queue (80).

1.1.4.3 Encapsidation

Un des événements essentiels à la formation de nucléocapsides matures est le clivage des concatémères d'ADN en génomes individuels, qui doivent s'introduire dans les capsides préformées. Les produits des gènes U_L33 , U_L6 , U_L15 , U_L17 , U_L28 et U_L32 sont tous nécessaires pour le clivage et l'empaquetage de l'ADN dans les capsides. Les produits des gènes U_L15 , U_L28 et U_L33 appartiennent au complexe de la terminase qui assure le clivage des concatémères en monomères et l'empaquetage de l'ADN dans les capsides (10).

1.1.4.4 Bourgeonnement à la membrane nucléaire interne

Les capsides matures pourvues d'ADN et assemblées dans le noyau sont trop grosses (125 nm) pour passer à travers le CPN. Pour sortir du noyau, elles bourgeonnent à travers la MNI pour se retrouver dans l'espace périnucléaire (7, 53, 160). Les protéines U_L11 , U_L20 , U_L31 , U_L34 et la kinase U_S3 joueraient un rôle dans le bourgeonnement du virion de la MNI jusqu'à l'espace périnucléaire (112, 119, 161). La protéine virale du tégment U_L11 contribue à initier le bourgeonnement. Il s'agit d'une protéine myristoylée qui est requise pour l'ancrage de la capside à la membrane nucléaire interne. En MÉ, la délétion de cette protéine amène l'accumulation de plusieurs capsides entourées d'une structure dense aux électrons aux abords de la MNI et leur transport vers l'espace extracellulaire est interrompu (6). Le mécanisme de sortie des virions du noyau n'est toutefois pas clair et la participation de facteurs cellulaires est fort probable.

La protéine transmembranaire non glycosylée encodée par le gène U_L20 possède 222 acides aminés et est conservée parmi tous les *alphaherpesvirus*. Deux mutants viraux ont ciblé cette protéine : le R7225 (HSV-1 U_L20^-) de la souche F et le HSV-1 U_L20^- de la souche KOS. Le premier conserve la partie C-terminale du gène U_L20 , qui est fusionnée en amont et reste en phase avec la partie N-terminale du gène $U_L20.5$, tandis que le deuxième est dépourvu du gène U_L20 en entier sans altérer le gène $U_L20.5$. Chez les cellules infectées, le phénotype du mutant R7225 se caractérise par l'accumulation de virions dans l'espace périnucléaire et de quelques capsides nues dans le cytosol (8). Par contre, le phénotype du mutant HSV-1 U_L20^- KOS se caractérise par une accumulation de plusieurs capsides nues dans de grandes vésicules cytoplasmiques (42). Ces phénotypes laissent croire que U_L20 régule la fusion membranaire et qu'il est nécessaire pour la sortie du virion vers l'espace extracellulaire. Ces mutants appuient un modèle où la particule nouvellement enveloppée quitte l'espace périnucléaire en subissant un dé-enveloppement, suivi d'un ré-enveloppement à une organelle cytoplasmique pour acquérir son enveloppe finale.

1.1.4.5 Dilemme entre la voie classique de biosynthèse (luminale) et la voie de ré-enveloppement

La sortie du virion de l'espace périnucléaire vers l'espace extracellulaire mystifie encore la communauté scientifique. Deux voies ont initialement été proposées pour le transit du virion de l'espace périnucléaire vers l'espace extracellulaire, soit via la voie classique de biosynthèse (luminale) ou via la voie de ré-enveloppement (figure 2). Dans le premier modèle, les capsides enveloppées de l'espace périnucléaire, qui de fait se retrouvent dans le RE puisque ces deux compartiments sont contigus, peuvent alors sortir de la cellule comme les protéines sécrétées. Ainsi, les virions seraient acheminés via le RE, le compartiment intermédiaire (ERGIC), le Golgi et le TGN (65). Dans ce modèle, les protéines du tégument ne pourraient être ajoutées aux capsides que pendant leur enveloppement dans le noyau, c'est-à-dire avant leur bourgeonnement avec la MNI. La composition lipidique de l'enveloppe virale du virion extracellulaire ressemblerait donc à celle des

membranes nucléaires plutôt qu'à celle des membranes d'organelles cytosoliques. De plus, les glycoprotéines virales acquises au niveau de l'espace périnucléaire seraient modifiées et glycosylées à même la capsid (22, 69).

Dans le modèle de ré-enveloppement, les nucléocapsides enveloppées perdent leur enveloppe (dé-enveloppement) en fusionnant avec la membrane nucléaire externe (MNE) et se retrouvent dans le cytosol sous la forme de nucléocapsides nues. Ces nucléocapsides acquièrent leur enveloppe finale en bourgeonnant dans un compartiment cytoplasmique, vraisemblablement le TGN, mais possiblement aussi dans les endosomes précoces (47, 64, 78, 130, 133, 150, 153). Dans ce modèle, le tégment peut s'incorporer à la nucléocapside dans le noyau ou le cytosol. Les glycoprotéines sont modifiées et glycosylées indépendamment des nucléocapsides par la voie classique de biosynthèse et l'enveloppe finale du virion ressemble davantage aux membranes d'organelles cytosoliques qu'aux membranes nucléaires. Le transport du virion du noyau au site de ré-enveloppement s'effectue dans le cytosol de façon antérograde par le biais du moteur kinésine. En effet, les protéines du tégment, U_S11 et de la capsid VP5, interagissent avec la chaîne lourde de la protéine motrice (33). Plusieurs études, dont les données de Turcotte et al. (153) et la présence de nucléocapsides nues en voie de ré-enveloppement dans le cytosol (59) appuient ce dernier modèle de migration pour HSV-1. D'autres virus de la grande famille des *Herpesviridae*, soit PRV, VZV, le CMV humain et le virus de l'herpès humain 6 semblent également utiliser cette voie (14, 38, 47, 53, 70, 73, 108, 158, 163).

1.1.4.6 Acquisition du tégment et des glycoprotéines

Chez les neurones de racines dorsales ganglionnaires de rat, les immunomarquages en MÉ montrent que certaines des protéines du tégment s'ajoutent aux nucléocapsides dans le cytosol du neurone au niveau des vésicules du Golgi et du TGN. Ainsi, la majorité des nucléocapsides qui quittent le noyau sont négatives aux immunodétections contre les protéines du tégment : VP13/14, VP16, VP22 et U_S9, et ce, même si ces protéines se trouvent dans le noyaux ou dans de

petits amas à proximité des membranes nucléaires (91). De plus, des études comparatives entre les *Alpha-* et les *Betaherpesvirus* ont montré que la couche de tégument au niveau des particules virales cytosoliques ou extracellulaires est plus épaisse et moins dense aux électrons, tandis que celle des particules virales périnucléaires est plus fine et plus dense aux électrons (53, 163). À l'intérieur du nucléoplasme, seule la protéine du tégument VP16 est liée aux nucléocapsides, par contre elle est absente au niveau du virion périnucléaire. Également, les protéines du tégument VP11/12, qui interagissent avec VP16 et VP22 sont présentes sur les virions cytosoliques et extracellulaires, mais absentes des virions périnucléaires (88). La majorité des capsides nues dans le cytosol sont dépourvues de VP22, ce qui laisse présager qu'elle est acquise au moment où la capside bourgeonne dans un compartiment cytosolique (91). Il est connu que VP22 se localise et est retenue au niveau des membranes de compartiments acides, comme celles du TGN (73). Alors, VP22 jouerait peut-être un rôle durant la tégumentation et/ou le ré-enveloppement final (16). Malgré ces informations, il existe peu de données sur la séquence et le lieu d'addition des téguments.

Concernant l'acquisition des glycoprotéines matures, la littérature indique que les capsides nues cytosoliques les acquièrent enchâssées dans leur enveloppe finale dans un compartiment post-RE. Cette affirmation est corroborée, entre autres, par le fait que les glycoprotéines gB et gE de HSV-1 détiennent un motif conservé de localisation à la membrane du TGN dans leur domaine C-terminal. Lors d'infection par HSV-1, les immunofluorescences montrent que gE et gB transitent par endocytose entre la surface de la membrane plasmique et le TGN (4, 11). Lors de l'utilisation de la bréfeldine A, un inhibiteur qui fragmente le Golgi et empêche le transport des glycoprotéines à travers ce dernier, les capsides nues restent emprisonnées dans le cytosol (27, 158) et le transport des glycoprotéines virales est bloqué (90). Dans des conditions où les cellules sont infectées par un virus où gH est séquestrée au RE, la progéniture virale totalement exempte en gH est 100 fois moins infectieuse que le virion parental (17). De plus, Skepper et al. (133) ont utilisé le même patron d'expérience pour montrer que la séquestration au RE de la

glycoprotéine gD provoque la perte de la glycoprotéine sur le virion extracellulaire, mais demeure au niveau du virion périnucléaire. Contrairement à Skepper et al, Miranda-Saskena (91), n'a pas pu montrer la présence de la glycoprotéine gD, à la fois, sur les virions périnucléaires et extracellulaires. Cette divergence reste nébuleuse et lève le voile sur le mystère qui entoure la composition de la particule périnucléaire et l'implication de cet intermédiaire dans le mécanisme de ré-enveloppement. Cependant, les cinétiques de transport de VP5 et de gD sont différentes, ce qui présume que les capsides et les glycoprotéines virales empruntent des voies de transport distinctes (79). Il serait donc intéressant d'analyser les intermédiaires viraux, par exemple via une approche protéomique.

1.1.4.7 Présence de protéines et/ou ARN cellulaires dans les virions extracellulaires

Jusqu'à présent, on présume que les virions extracellulaires de type herpès ne contiennent pas de protéines cellulaires. Par contre, des ARN viraux et cellulaires ont été répertoriés dans divers virions. En effet, des ARN cellulaires ont été détectés, chez le CMV humain (54), Vaccinia (24) et le rétrovirus HIV (29, 43, 148). Chez Vaccinia, la présence dans le centre de la capside de l'ARN de la cyclophiline A (CypA), dont la protéine est reconnue pour catalyser des changements de conformation et augmenter le taux de repliement des protéines cellulaires, pourrait être impliqué dans le cycle de réplication du virus. Par ailleurs, CypA amène la réorganisation du cytosquelette et est impliquée dans le trafic cytosolique de protéines et d'autres molécules. Chez HIV, la CypA incorpore le virion en liant la protéine virale Gag et est nécessaire à la production de virus infectieux. Chez HSV-1, l'équipe de Sciortino et al. (127) a montré la présence d'un grand pool d'ARN cellulaires situés dans les virions cytoplasmiques et extracellulaires. Ceci dit, ils n'ont pas pu démontrer si l'incorporation d'un ou de plusieurs de ces ARN était spécifique. Lors d'une infection, ces ARN pourraient permettre une synthèse immédiate en protéines ou jouer un rôle structural (15). La possibilité que des facteurs cellulaires puissent se trouver dans les virions extracellulaires de HSV-1, justifie des études plus poussées sur l'analyse de sa composition et celle de ses intermédiaires, comme les virions

périnucléaires. La découverte de facteurs cellulaires dans l'un ou l'autre des intermédiaires de HSV-1 contribuerait à clarifier le mécanisme de transport utilisé par le virus.

1.2 Caractéristiques des noyaux

Le noyau des cellules eucaryotes est le siège des synthèses de l'ADN et de l'ARN. Il contient dans son nucléoplasme les chromosomes, les nucléoles et la lamina nucléaire. Il est délimité du cytosol par deux enveloppes nucléaires, la MNI et la MNE. La MNE est continue avec le RE et elle rejoint la MNI par les CPN (3). Lors de l'infection par HSV-1, la formation des compartiments ND10 provoque l'élargissement des nucléoles, qui se déplacent vers la membrane nucléaire, se fragmentent et se désagrègent. La chromatine se marginalise et se compresse. Plus tard, l'apparence du noyau est affectée pour devenir multilobée et distordue (93, 126).

1.2.1 La membrane nucléaire interne

Le noyau contient un réseau de filaments intermédiaires protéiques, c'est-à-dire la lamina nucléaire. Celle-ci est formée par l'association des lamines de type A, B et C, fournit de nombreux sites de fixation à la chromatine et est requise pour l'assemblage du noyau suite à la mitose, à la réplication de l'ADN et à la transcription (55, 141). Certaines protéines ancrées dans la MNI interagissent avec la chromatine et la lamina nucléaire, comme le récepteur de la lamine B (RLB) (58, 132). La lamina constitue une barrière physique pour l'acheminement des nucléocapsides à proximité de la MNI pour l'acquisition de leur première enveloppe. HSV-1 contourne cette barrière en abolissant la liaison entre la lamina et le RLB et en relocalisant le récepteur au RE (128), à l'aide des protéines U_L31, U_L34 et U_S3. Ces protéines, qui sont requises pour l'enveloppement primaire des nucléocapsides au niveau de la MNI, masquent indirectement les épitopes des différents types de lamines ou modifient leur conformation pour ensuite les déplacer de la périphérie des noyaux vers des agrégats nucléoplasmiques ou vers le cytoplasme (111). La dissociation entre la chromatine et la lamina ne serait que partielle, caractérisée par

l'affinement de la couche de lamina à des endroits précis, afin de diminuer la barrière physique qui sépare les nucléocapsides de la MNI.

1.2.2 Le complexe du pore nucléaire

Le CPN constitue une ouverture de 9 nm de diamètre disposée entre les membranes nucléaires externe et interne et qui permet le transit bidirectionnel de macromolécules entre le cytoplasme et le noyau (49). La structure de ce pore ressemble à une énorme roue de plus de 1 méga dalton composée de 8 sous unités symétriques, chacune constituée de plus de 100 protéines. Le transporteur, la composante majeure du pore du CPN, est disposé au centre du complexe et est flanqué de deux anneaux coaxiaux, dont l'un est nucléaire et l'autre est cytosolique. Chaque anneau est réuni au transporteur par huit prolongements (31). De plus, l'anneau cytosolique détient huit filaments qui sont projetés dans le cytoplasme, tandis que l'anneau nucléaire est relié à un panier projeté dans le nucléoplasme. Le transporteur se compose, entre autres, de la nucléoporine p62, accessible autant au niveau extranucléaire qu'intranucléaire (18). L'anneau nucléaire se compose de plusieurs protéines dont Nup153, Nup98 et Nup93 (52, 143) et les filaments de l'anneau cytoplasmique se composent, entre autres, de Nup214/CAN, de Nup84, de Nup250 et de RanBP2 (103). Ces molécules constituent des cibles de choix pour immunoprécipiter les noyaux.

1.3 Les objectifs du travail

La composition en protéines des virions HSV-1 intranucléaires et extra-cytoplasmiques est relativement bien connue, contrairement à celle des autres intermédiaires, notamment les virions périnucléaires. À long terme, l'objectif est de parvenir à connaître davantage la composition du virion à différents stades de sa maturation. Cette connaissance permettra de confirmer la voie de ré-enveloppement et d'examiner les étapes de maturation du virus en sachant, par exemple, la séquence d'incorporation et d'addition des téguments. De plus, il sera possible de déterminer quelles sont les molécules nécessaires au passage des capsides à travers les deux enveloppes nucléaires et le cas échéant, d'identifier les facteurs cellulaires impliqués.

Nous avons choisi comme première étape de comparer par une analyse protéomique la composition protéique des capsides périnucléaires et extracellulaires. Pour rencontrer ces objectifs, il a été nécessaire de mettre au point un protocole d'isolation de ces virus, ce qui constitue le but du travail décrit dans le présent mémoire. Les virions extracellulaires ont été récoltés à partir du milieu de culture, suite à une infection avec le virus sauvage. Des noyaux infectés obtenus par cassages mécaniques et enrichis par centrifugation isopycniqque constituent notre source de virions périnucléaires, dont la purification reste à parfaire.

CHAPITRE 2 : LA MÉTHODOLOGIE EMPLOYÉE DANS CE TRAVAIL

2.1 Modèle expérimental

2.1.1 Réactifs

Les acides aminés non essentiels, la L-Glutamine et le Pen/Strep (Pénicilline/Streptomycine) ont été achetés chez Gibco. Le sérum a été acheté chez Médicorp. L'aprotinine, le bicarbonate de sodium, le β -mercaptoéthanol, le BSA (albumine sérique bovine), la chymostatine, le DMEM (milieu Eagle modifié par Dulbecco), le DMSO (sulfoxyde diméthyl), le glycérol, le Hoescht 33 342 (Bisbenzimidazole), l'Igepal-NP-40, l'imidazole, le JMEM (milieu essentiel minimum Eagle modifié par Joklik), la leupeptine, le MES (éthyl méthyl sulfide), le Nycodenz, la pepstatine, le PFA (paraformaldéhyde), la solution de poly-L-Lysine, le SDS (sodium dodecyl sulfate), le silicone SigmaCote, le sodium azide, le sucrose, le Triton X-100, le Tween-20, ont tous été achetés chez Sigma. Le Mowiol 4-88 a été acheté chez Calbiochem, le NaCl (chlorure de sodium) chez Caledon et l'Optiprep chez Nycomed Pharma. Le CaCl₂ (dichlorure de calcium), le DTT (dithiothreitol), l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), le Hepes, le KCl (chlorure de potassium), le KH₂PO₄ (phosphate de potassium monobasique), les tubes à dialyse (*Fisher brand regenerated cellulose*), le MgCl₂ (dichlorure de magnésium), le Na₂HPO₄ anhydre (phosphate de sodium dibasique), le Tris-HCl (hydrochlorure 2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) et le Tris-NaOH (hydroxide sodique 2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) proviennent tous de chez Fisher. La DNase FPLC pure exempte de RNase et les billes de sépharose couvertes de protéine A (4 Fast Flow) proviennent d'Amersham Biosciences. Le cell-cracker et les billes du cell-cracker proviennent tous deux de Isobiotech, tandis que le Dounce de 7 mL nous a été gracieusement prêté par le Dr Paiement. Les seringues, les aiguilles 26 ^{1/2}g, 27 ^{1/2}g et spinales ont été commandés chez Becton Dickinson. Les tubes utilisés pour les gradients discontinus (MLS 50 et SW 28) proviennent de la compagnie Seton et les TLA 55 de la compagnie Beckman. Les tubes *Low Binding* ont été achetés chez Costar. Le glutaraldéhyde 50 % et le sodium cacodylate ont été commandés chez Canemco. Le peptide inhibiteur du récepteur Fc (*FcR blocking Reagent*) et les colonnes de déplétion (LD MACS) proviennent de Miltenyi Biotec. La biotine EZ-Link NHS a

été achetée chez Pierce et les billes magnétiques Biosphères couvertes de streptavidine (compagnie Biosource International) ont été prêtées par le Dr Sylvain Brunet (laboratoire de Dr Michel Desjardins, Dépt. Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Les billes magnétiques Estapor Microsphères à groupements NH₂ de 1.11 µM de diamètre et composées de 44.1 % de ferrite ont été fournies par Merck (Fontenay Sous Bois, France). L'éthanolamine (Sigma -Aldrich) a été fournie par le laboratoire du Dr Latour (Dépt. Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada).

Parmi les réactifs d'électrophorèse et d'immunobuvardages, la glycine a été commandée chez Rose Scientific, le lait écrémé en poudre (Carnation) a été acheté chez Costco, le marqueur de poids moléculaires de type *See Blue Pre-Stained Standard* a été acheté chez InVitrogen, tandis que le *Prestained Protein Marker, Broad Range* provient de New England Biolabs. La membrane de PVDF pourvue de pore de 0.45 µM de diamètre a été achetée chez Millipore. Le Bleu de Bromophénol et le réactif Bio-Rad (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) ont été commandés chez Bio-Rad. Le réactif de chimiluminescence Lumi-Light (*Western Blotting Substrate*) a été obtenu de la compagnie Roche.

Parmi les anticorps primaires utilisés contre le CPN p62 a été acheté chez BD Biosciences, tandis que QE5 et Mab 414 ont été commandés chez Covance Research products. L'anticorps de la MNI reconnaissant le RLB (CDw29f humain) et celui de la membrane plasmique liant le RTf (CD71 humain) ont été achetés chez Cymbus Biotechnology. L'anticorps contre l'Actine-gamma a été gracieusement fourni par Nicole Leclerc (Dépt Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) et Cloë Bulinski (Dépt des Sciences Biologiques, Université Columbia, New York, États-Unis). L'anticorps contre la protéine mitochondriale Tom 20 a été fourni par Dr GC Shore (Dépt de Biochimie, Université McGill, Montréal, Québec, Canada) et celui du marqueur des endosomes précoces EEA1 par Dr M. Zerial (Laboratoire de Chimie Biologique, Université de Ioannina, Ioannina, Grèce). L'anticorps contre BiP (GRP 78) a été commandé chez BD Biosciences, tandis que celui contre la membrane du RE ou la MNE calnexine a été acheté chez Stressgen. Les anticorps contre le Golgi GS27 et Golgine-97 ont été

achetés respectivement chez BD Biosciences et Molecular Probes. L'anticorps contre les endosomes tardifs et les lysosomes Lamp-1 a été acheté chez BD Biosciences et l'isotype de souris IgG2a provient de la compagnie eBiosciences. Le sérum pré-immun de lapin provient du stock fourni par le Dr Babaï (Dépt Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Parmi les anticorps contre gD, HSV-1 et 2 anti-gD a été acheté chez Fitzgerald (Fitzgerald Industries International Inc. Concord, MA, Etats-Unis), le 15 201 a été obtenu de la compagnie QED (QED Bioscience Inc. San Diego, CA, Etats-Unis), le Mab8684 provient de chez Chemicon (CHEMICON International, Inc. Temecula, CA, Etats-Unis), tandis que MCA-DL6 et MCA-1D3 ont été fournis gracieusement par les laboratoires des Drs Eisenberg (Dépt de Microbiologie, Université de Pennsylvanie, Philadelphie, États-Unis) et Cohen (Dépt d'Épidémiologie et de Santé Publique, Université Yale, New Haven, Connecticut, États-Unis). L'anticorps contre gC (VII-13-7) a été fourni par Dr Patricia Spear (Université Northwestern, Chicago, Illinois, États-Unis) et celui contre gE (3114) provient de Dr David Johnson (Laboratoires d'Oncologie Virale, Université de Chicago, Chicago, Illinois, États-Unis). L'anticorps contre gB (gB-1, R-69) a été fourni par Eisenberg et Cohen et celui contre gL (R88 anti-serum) par Patricia Spear. L'anticorps contre la protéine majeure de la capsid VP5 (NC-1) a été fourni par Eisenberg et Cohen. Les anticorps secondaires couplés aux billes magnétiques (chèvre anti-souris ou anti-lapin) MACS Microbeads ont été achetés chez Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Allemagne) ou aux Dynabeads M-280 (mouton anti-souris) proviennent de la compagnie Dynal (Oslo, Norvège). Les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRPO (peroxydase de raifort) (chèvre anti-souris et anti-lapin) ont été commandés de la compagnie Jackson ImmunoResearch (West Grove, Philadelphie États-Unis) et ceux couplés au fluorochrome Alexa 488 (poulet anti-souris ou anti-lapin) proviennent de Molecular Probes (Invitrogen Canada, Inc. Burlington, Ontario).

2.1.2 Type cellulaire employé et conditions de culture

Certaines expériences ont été réalisées à partir des cellules BHK (ATCC, Manassas, VA, États-Unis) cultivées en pétri, mais par la suite dans des cellules s₃HeLa (EMBL, Heidelberg, Allemagne) en suspension, afin de produire de grosses préparations cellulaires et de maximiser ainsi la production de virions périnucléaires et extracellulaires. Les essais de plaques ont été réalisés sur la lignée cellulaire Vero (ATCC). Les cellules s₃HeLa ont été cultivées en suspension à l'aide de flasques à agitation (Bellco) placés sur une plaque agitatrice aimantée (Cellgro stirrer 45 600 Thermolyne) disposée dans un incubateur (National Heinicke) à 37°C sans CO₂. Le milieu de culture utilisé pour les cellules s₃HeLa est le milieu minimum essentiel modifié selon Joklik (JMEM) contenant déjà de la L-glutamine et dans lequel ont été ajoutés 5 % de sérum fœtal de veau inactivé (Sérum), 2 g/L de bicarbonate de sodium, 0.1 mM d'acides aminés non essentiels (NEAA), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Pen/Strep). Le milieu de culture utilisé pour la prolifération des cellules BHK et Vero est le milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), dans lequel ont été ajoutés 10 % de sérum, 2 mM de L-glutamine et la même concentration de Pen/Strep que celle du JMEM. Ces cellules sont placées dans un incubateur à 37°C en présence d'humidité avec 5 % de CO₂.

2.1.3 Infections par Herpès simplex de type 1 sauvage (F) et mutant (V701)

Deux souches virales de HSV-1 ont été utilisées, la première est la sauvage (HSV-1 de la souche F) et la deuxième est la mutante (HSV-1 V701 de la souche 17⁺). Cette dernière code pour la protéase A thermosensible impliquée dans la maturation des capsides et l'encapsidation de l'ADN viral (110). Les préparations du stock de virus sauvage (HSV-1) et celle du virus mutant ont été basées sur le protocole de Sodeik (134) à partir de cellules BHK en pétri et titré sur des cellules Vero. Le titre viral des stocks de virus sauvages et mutants utilisés était de 1.1 X10¹⁰ PFU/mL (données non montrées).

L'infection a eu lieu à partir de cellules s₃HeLa en suspension situées dans une phase exponentielle de croissance. Cet état est atteignable en passant les cellules la veille à une concentration de 5×10^5 cellules/mL. Après douze heures, les cellules atteignent une concentration d'environ 8×10^5 cellules/mL. La concentration des cellules a ensuite été ajustée à 4.2×10^6 cellules/mL par le biais d'une centrifugation de 10 minutes à 21 degrés à 300 g (Sorvall RT 6 000 D). Le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu d'infection (JMEM sans sérum et supplémenté avec 0.1 % d'albumine sérique bovine (BSA), 2 g/L de bicarbonate de sodium, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine et 0.1 mM de NEAA). Le virus sauvage ou mutant a été ajouté à une multiplicité d'infection (MOI) de 2. Le tout a été incubé pendant 1 heure à 37°C pour l'adsorption du virus dans un incubateur à cellules à humidité avec 5 % de CO₂ sur un agitateur rotatif Baxter S/P rotator V. Par la suite, la concentration des cellules a été ajustée avec du JMEM normal de culture (c'est-à-dire supplémenté avec du sérum) pour atteindre 5×10^5 cellules/mL et la suspension est de nouveau incubée dans un erlenmeyer à 37°C (virus sauvage), ou à la température non permissive de 39°C (virus mutant thermosensible V701). L'incubation se déroule dans un incubateur à cellules à humidité avec 5 % de CO₂, comme décrit ci-haut. Étant donné que les cellules étaient plus affectées avec une infection par le virus sauvage, le temps d'incubation était de 10 heures pour le virus sauvage ou 11 heures pour le virus mutant. En parallèle, des cellules non infectées (mock) ont été soumises aux mêmes traitements à des fins de contrôle.

2.1.4 Récolte des virions extracellulaires

Dix ou onze heures post-infection (HPI), les virions extracellulaires ont été récoltés par centrifugation des cellules pour 10 minutes à 300 g dans le rotor Sorvall RT 6 000 D à 4°C (pour le virus sauvage) ou à 8°C (pour le virus mutant). Le surnageant a alors été transféré dans un tube Corning à embout conique de 250mL et a été centrifugé de nouveau 10 minutes à 300 g dans le rotor Sorvall RT 6 000 D. Ce deuxième surnageant a été transféré dans des tubes SW 28 et les virus culotés à 113 000 g (Sorvall Ultra Pro 80) à 4°C ou 8°C pour 1 heure. Le surnageant a été jeté et le virus provenant de 35 mL de milieu de culture après l'infection a été bien

resuspendu pour 12 heures dans 40 μ L de MNT (30 mM MES (acide morpholinethanesulfonique), 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4) à 4°C pour ensuite être resuspendu à nouveau pour éviter l'agrégation des virions et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.5 Isolation des virions périnucléaires

L'isolation des virions périnucléaires et extracellulaires requérait des étapes communes, par contre, l'obtention des virions périnucléaires nécessitait la mise au point d'un protocole particulier (figure 3). Lors de l'isolation des virions périnucléaires, toutes les étapes s'effectuaient à une température de travail et avec des solutions ajustées à une température de 4°C (pour les cellules mock et les cellules infectées avec le virus sauvage) ou à 8°C (pour les cellules infectées avec le virus mutant et pour les cellules mock correspondantes).

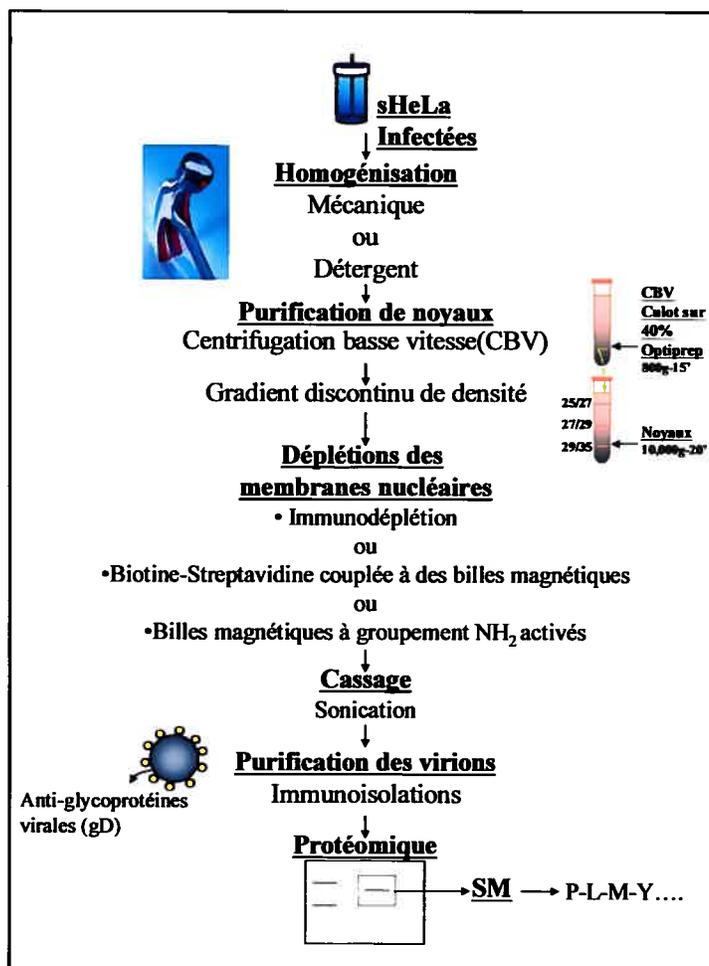


Figure 3. Étapes envisagées dans l'isolation des virions périnucléaires

SM : Spectrométrie de masse

2.1.5.1 Homogénéisation

L'isolation des virions périnucléaires requiert l'homogénéisation des cellules. Celle-ci nécessite le retrait des contaminants cellulaires (organites, cytoplasme) et le maintien des deux enveloppes nucléaires, puisqu'on s'intéressait aux virions situés entre ces deux enveloppes. Les cellules mock ou infectées à 10 ou 11 HPI ont été initialement comptées à l'aide d'un hémacytomètre (Hausser scientifique) et d'un microscope photonique (Zeiss Axiovert 25). Les cellules ont été lavées par centrifugation à 300 g (rotor Sorvall RT 6 000 D) pour 10 minutes et resuspendues dans du PBS (Saline tamponnée au phosphate sodique). Les cellules ont été centrifugées de nouveau et resuspendues dans divers tampons, selon la méthode utilisée pour homogénéiser les cellules (voir plus bas). Ces tampons contenaient tous 5 mM de dichlorure de magnésium ($MgCl_2$) pour resuspendre les noyaux après le cassage des cellules et améliorer la stabilité des noyaux (49, 102).

2.1.5.1.1 Homogénéisation à l'aide de détergent

Les cellules ont été resuspendues dans un ratio de 6.7×10^6 cellules /mL dans le tampon de lyse isotonique modifié de l'équipe d'Ojala (102). Ce tampon contient 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4 et 5 mM de $MgCl_2$ et selon le cas, 0-0.5 % d'Igepal (NP-40) (37). La lyse a été effectuée pour 30 minutes en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CLAP) (5 μ g/mL de chymostatine, 0.5 μ g/mL de leupeptine, 2.5 μ g/mL d'aprotinine et 0.5 μ g/mL de pepstatine). La qualité de la lyse a été vérifiée par microscopie photonique. La lyse a été arrêtée par la dilution du tampon de lyse avec 10 volumes de PBS/ 5 mM $MgCl_2$. L'aspect des noyaux a ensuite été vérifié par immunofluorescence (voir 2.2) ou la préparation de noyaux a été directement centrifugée à basse vitesse (CBV) (voir 2.1.5.2.1).

2.1.5.1.2 Homogénéisation à l'aide de méthodes mécaniques

Dans l'étude présentée à la figure 5, des cellules non infectées s₃HeLa ont été cassées par une seringue couplée à une aiguille 26^{1/2} g ou 27^{1/2} g ou par un cell-cracker (0.05 mm de clairance) dans le tampon isotonique SIM (250 mM de sucrose, 3 mM imidazole pH 7.4, 1 mM de MgCl₂) (102) ou le tampon hypotonique RSB modifié de Penman (105) (10 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl₂). Les cellules ont été cassées par la seringue et par le cell-cracker dans un ratio respectivement de 4.4 X 10⁷ et 2 X 10⁷ cellules/mL. La seringue 26^{1/2} g a été utilisée dans le tampon isotonique et la seringue 27^{1/2} g dans le tampon hypotonique. Dans d'autres essais, des cellules non infectées de type BHK en pétri (essais préliminaires) ou de type s₃HeLa en suspension ont été fragmentées par l'une de trois méthodes, soit avec le cell-cracker, la seringue ou un Dounce de 7 mL muni d'un piston de type serré (tight). Puisque la concentration des cellules est importante avec les cassages mécaniques, celle-ci a été ajustée à 2 X 10⁷ cellules/mL en conformité avec divers protocoles disponibles au laboratoire, avec le tampon hypotonique et incubées pour 10 minutes sans agitation, afin que les cellules se gonflent. Le gonflement voulu, vérifié par microscopie photonique, est obtenu lorsque le volume du cytosol atteint deux fois celui du noyau. Tout juste avant cassage, de la CLAP (voir 2.1.5.1.1) a été ajoutée à la suspension cellulaire diluée dans le tampon hypotonique.

Le cell-cracker consiste en un cylindre de 8.020 mm de diamètre dans lequel on place une bille de taille définie. L'espace entre le cylindre et la bille correspond à la clairance et affecte l'efficacité du cassage des cellules selon les types cellulaires. Les clairances testées étaient de 0.018 mm ou 0.05 mm (essais préliminaires) et de 0.042 mm. Les clairances de la seringue (aiguille 27^{1/2} g) et du Dounce, sont respectivement de 0.9 mm et de 0.05 mm. Dans le cas du cell-cracker, les cellules non infectées ont été cassées par environ 3 passages, tandis qu'il a fallu environ un ou deux passages de plus pour casser les cellules infectées. Dans cette technique de cassage, le nombre de passage requis varie d'une préparation cellulaire à une autre. Pour le Dounce ou la seringue, les cellules mock ont été cassées par six passages. Dans toutes les techniques testées, la qualité du cassage a été vérifiée à l'aide d'un microscope photonique et les rendements en cellules cassées et en noyaux ont été

déterminés avec un hémacytomètre avant et après le cassage. Après le cassage, l'isotonicité des noyaux a été rétablie rapidement par l'ajout de deux volumes de solution de PBS/5 mM MgCl₂. Une analyse de la pureté des noyaux contenus dans cette préparation a été réalisée par immunobuvardage contre divers marqueurs d'organelles cellulaires (voir 2.4). Alternativement, les noyaux ont été directement centrifugés à basse vitesse (voir 2.1.5.2.1).

2.1.5.2 Purification des noyaux

2.1.5.2.1 Centrifugation basse vitesse

Une fois les cellules cassées ou lysées, les noyaux ont été récupérés par centrifugation à basse vitesse (CBV) sur un coussin d'Optiprep de 40 %. Cette opération vise à diminuer l'agrégation du matériel et à réduire les dommages pouvant être causés aux noyaux en évitant de les culotter (50). Après centrifugation des lysats cellulaires à 800 g pour 15 minutes, le matériel se trouvant sur le coussin d'Optiprep a été récolté avec une seringue reliée à une aiguille de prélèvement spinal ou avec une pompe péristaltique (Pharmacia LKB pump P-1) et dilué dans du SIM (pour les gradients de sucrose ou de Nycodenz) ou de 25 % d'Optiprep (pour les gradients d'Optiprep). Les solutions diluées d'Optiprep ont été faites à partir d'une solution de 50 % d'Optiprep appelée *working solution* (WS). La WS a été préparée en mélangeant 5 volumes de solution stock commerciale de 60 % d'Optiprep avec un volume (ratio 5 :1) de diluant (150 mM de KCl, 30 mM de MgCl₂ et 120 mM de Tris-NaOH pH 7.4). La WS a ensuite été ajustée au pourcentage voulu d'Optiprep en la diluant avec du milieu d'homogénéisation (HM) (250 mM de sucrose, 25 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ et 20 mM de Tris-NaOH pH 7.4), tel que suggéré par le manufacturier. Dans certains cas, les noyaux ont directement été congelés dans du PBS/ 5 mM MgCl₂/ 50 % glycérol/ 1 mM DTT.

2.1.5.2.2 Gradient discontinu de densité

2.1.5.2.2.1 Gradient de sucrose

Le gradient de sucrose composé d'une couche de 40 % et d'une de 70 % a été adapté de Hsu (66). Dans des tubes MLS 50, 1 mL de sucrose 70 % a été placé au

fond du tube et recouvert par 2.5 mL de sucrose 40 %. Les noyaux récoltés à l'interface après le CBV ont été dilués dans 1 mL de SIM et déposés sur la couche de 40 % de sucrose. Les gradients ont été centrifugés à 82 000g pour 40 minutes. Des fractions ont été prélevées à chaque interface et examinées sous le microscope photonique.

2.1.5.2.2.2 Gradient de Nycodenz

Le gradient de 5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-triiodo-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-isophthalamide), appelé communément le Nycodenz et recommandé dans l'isolation des noyaux de mammifères, a été adapté du protocole de Rickwood (41, 113). Il était composé d'une couche de 35 % et une autre de 80 %. La préparation de 50 mL d'une solution de 80 % de Nycodenz a été préparée dans 20 mM de Tris-NaOH pH 7.4. Une solution de 10 mL de Nycodenz 35 % a été préparée à partir de celle de 80 % en la diluant dans 20 mM de Tris-NaOH pH 7.4. Une solution contenant plus de 30 % (1.15 g/cm^3) de Nycodenz n'est plus iso-osmotique, alors 8 % de sucrose a été ajouté pour pallier à la situation, selon les recommandations de Rickwood (41, 113). Dans des tubes MLS 50, 1 mL de Nycodenz 80 % a été placé au fond du tube et recouvert par 2.5 mL de Nycodenz 35 %. Les noyaux récoltés à l'interface après la CBV ont été dilués dans 1 mL de SIM et déposés au dessus du gradient. Les gradients ont été centrifugés à 82 000 g pour 40 minutes. Des fractions ont été prélevées à chaque interface et examinées sous le microscope photonique.

2.1.5.2.2.3 Gradient d'Optiprep

Le gradient d'Optiprep était composé de quatre couches : 25 %, 27 %, 29 % et 35 %. Les solutions ont été préparées à partir de la WS de 50 % d'Optiprep et diluées au pourcentage voulu avec du HM pH 7.4. Dans un tube MLS 50, 750 μL d'Optiprep 35 % a été placé dans le fond du tube, recouvert par 1.750 mL d'Optiprep 29%. Par la suite, 1 mL d'Optiprep 27 % a été ajouté et le pourcentage d'Optiprep des noyaux récoltés à l'interface après la CBV a été ajusté à 25 % d'Optiprep (avec du HM ou de

l'Optiprep 40 %), puis déposés dans un volume total de 1 mL à la surface du gradient. Dans un tube SW 28, l'ordre des différentes couches d'Optiprep était le même, par contre les volumes étaient de 5.8 mL pour l'Optiprep 35 %, de 13.6 mL pour l'Optiprep 29 % et de 7.8 mL autant pour l'Optiprep 27 % que 25 %. En moyenne, 1×10^7 et 1×10^8 noyaux ont été chargés à la surface des gradients MLS 50 et SW 28, respectivement. Les gradients ont été centrifugés à 10 000 g pour 20 minutes. Des fractions ont été prélevées à chaque interface et examinées sous le microscope photonique. Les résultats ont été compilés à l'aide d'un hémacytomètre.

Le matériel récolté aux différentes interfaces, dont les noyaux prélevés à l'interface 29/35 pour le gradient d'Optiprep, a été dilué avec 1 volume de glycérol 99 % et ajusté à 1 mM de DTT avant d'être congelé rapidement dans l'azote liquide et ensuite être entreposé à -80°C jusqu'à utilisation. Dans certains cas, il a été dilué avec au moins deux volumes de PBS/5 mM MgCl_2 et centrifugé à 800 g pour 5 minutes (rotor 12 124 Sigma 1-15K). Le culot a ensuite été resuspendu dans le volume voulu de PBS/5 mM MgCl_2 afin de réaliser certaines expériences à partir d'un échantillon frais, telle qu'une analyse de la pureté des noyaux par immunobuvardage contre divers marqueurs des organites cellulaires (voir 2.4).

2.1.5.3 Déplétions des membranes nucléaires

2.1.5.3.1 Centrifugation des virions à basse vitesse

Les virions enveloppés extracellulaires concentrés dans du MNT (60 μL), provenaient du milieu de culture, récoltés à partir d'une infection avec le virus sauvage HSV-1 (F) (voir 2.1.4). Une partie de ces virions a été dépourvue de leur enveloppe par un traitement avec un tampon contenant du Triton X-100 (100 mM de NaCl, 20 mM de Tris pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0 et 1 % de Triton X-100) (102). Un volume de 120 μL de tampon de lyse contenant de la CLAP a été ajouté aux virions concentrés pour être incubés à 4°C pour 35 minutes. Des virions enveloppés ont aussi été incubés, comme contrôle, avec le même tampon mais sans Triton X-100. Comme contrôle additionnel, du milieu de culture de cellules non infectées et concentré dans du MNT a été incubé avec le tampon isotonique sans Triton X-100. Par la suite, les différentes préparations de 180 μL ont d'abord été centrifugées à 80 000 g pour 1

heure à 4°C dans le rotor Beckman TLA 55 pour récolter tous les virions. Après la centrifugation, la qualité de la lyse a été évaluée en analysant 1/6 (30 µL) des surnageants par immunobuvardage.

Pour vérifier si les virions ont la capacité de précipiter à basse vitesse, le culot de virus pour chaque préparation a d'abord été resuspendu dans 60 µL de MNT pour ensuite centrifuger 10 µL de ce volume à 400 g dans le rotor 12 124 de la centrifugeuse Sigma 1-15K pour 5 minutes à 4°C. Un autre volume de 10 µL de ce matériel a été chargé sur gel comme échantillon total non centrifugé. Le volume total du surnageant et du culot obtenus après la centrifugation à 400 g ont été chargés sur gel 8 % de polyacrylamide (voir 2.4 pour la description des paramètres d'électrophorèse et d'immunobuvardage).

2.1.5.3.2 Avidité de différents anticorps par spectrofluorimétrie pour les protéines nucléaires dans l'immunodéplétion et pour les glycoprotéines virales dans l'immunoisolation des virions

Dans les essais d'avidité des anticorps nucléaires pour l'immunodéplétion, des noyaux congelés et isolés de cellules non infectées et purifiés sur gradient d'Optiprep ont été utilisés. Une quantité de 100 µg de protéines, dosées selon la méthode colorimétrique de Lowry (83), ont été incubées dans un volume total de 500 µL avec 2.5 µL, 5 µL ou 7.5 µL d'anticorps en présence de tampon dégazé composé de PBS/2 mM EDTA/0.5 % BSA. Les anticorps monoclonaux de souris contre la MNI (RLB CDw49f humain) et contre le CPN (p62, QE5 et Mab 414) ont été incubés individuellement avec le matériel pour 30 minutes à 4°C avec agitation sur un support rotatif (Scientific industries, Multi-purpose rotator, model 150). Les noyaux ont ensuite été lavés par centrifugation à 800 g (rotor 12 124 de Sigma 1-15K) à 4°C pour 10 minutes. Le surnageant a été jeté et les noyaux resuspendus avec 500 µL de PBS/5 mM MgCl₂ pour être de nouveau centrifugé. Le surnageant a été encore jeté et les noyaux resuspendus dans 100 µL d'anticorps secondaire fluorescent (poulet anti-souris Alexa 488 dilué 1 :100 dans le tampon dégazé). Le matériel a été incubé pour 30 minutes à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Après deux lavages par

centrifugation (800 g pour 10 minutes) avec du PBS/5 mM MgCl₂, le culot a été resuspendu dans 50 µL de tampon dégazé et analysé par fluorimétrie (voir plus bas).

Pour les essais d'avidité des anticorps contre les glycoprotéines virales, des cellules infectées ont été cassées mécaniquement et les virions du cytoplasme séparés des noyaux par une CBV. Cinquante microgrammes de protéines (voir 2.1.5.3.2) ont été incubées dans un volume total de 500 µL avec 2.5 µL, 5 µL ou 7.5 µL d'anticorps en présence du tampon dégazé. Les anticorps monoclonaux de souris contre gD (HSV-1 et 2 anti-gD, 15 201, Mab8684, MCA-1D3 et MCA-DL6), contre gC (VII-13-7) et contre gE (3114) et les anticorps polyclonaux de lapin contre gB (R-69) et gL (R88 anti-serum) ont été incubés individuellement avec les virus pour 30 minutes à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Le matériel a été centrifugé à 18 000 g (rotor 12 124 de Sigma 1-15K) à 4°C pour 30 minutes. Le surnageant a été jeté et les particules virales resuspendues avec 500 µL de PBS/5 mM MgCl₂ pour être de nouveau lavé par centrifugation. Les particules virales ont été resuspendues dans 100 µL d'anticorps secondaire fluorescent de poulet anti-souris Alexa 488 dilué 1 :100 ou 100 µL d'anticorps secondaire de poulet anti-lapin Alexa 488 dilué 1 :50. Les dilutions ont été préparées dans le tampon dégazé. Le matériel a été incubé pour 30 minutes à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Le matériel a été centrifugé à 18 000 g à 4°C pour 10 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot resuspendu avec 100 µL de PBS/5 mM MgCl₂ pour être de nouveau lavé puis resuspendu dans 50 µL de tampon dégazé et finalement analysé par fluorimétrie.

Les noyaux et les virus marqués par des anticorps ont été transférés dans une plaque 96 puits et l'intensité de fluorescence mesurée par un spectrofluorimètre Wallac selon une longueur d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et de 535 nm, respectivement. Le bruit de fond, dont la valeur a été fournie par l'intensité de fluorescence émise par un échantillon blanc, a été soustrait des valeurs obtenues. Pour chaque anticorps secondaire donné, un contrôle sans anticorps primaire a été inclus.

2.1.5.3 Immunoprécipitation de protéines nucléaires avec différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de protéine A

Des billes de sépharose couvertes de protéine A ont préalablement été lavées avec 1 mL de PBS à trois reprises par centrifugation à 800 g pour 1 minute (rotor 12 124 Sigma 1-15K). Les billes ont ensuite été resuspendues dans un volume de PBS. L'immunoprécipitation a été réalisée en duplicata à température ambiante et les incubations effectuées sur support rotatif (Scientific industries, Multi-purpose rotator, model 150). Quatre-vingt microgrammes de protéines (voir 2.1.5.3.2) du surnageant du lysat cellulaire obtenu par CBV et contenant des membranes nucléaires ont été incubées pendant 15 minutes avec 2 μ L de sérum pré-immun de lapin, pour réduire les interactions non spécifiques, dans un volume total de 1 mL de PBS. Quatre-vingt dix microlitres de billes pré lavées ont ensuite été ajoutés aux préparations de protéines et d'anticorps pré-immun pour 45 minutes d'incubation. Les préparations ont été centrifugées et le surnageant a été incubé pendant 1 heure avec 60 μ L de billes pré lavées et 2 μ g (2 μ L) d'anticorps contre la nucléoporine p62 (p62) ou d'autres protéines du CPN (QE5 ou Mab 414). Les billes ont été culottées, lavées pour réduire les interactions non spécifiques avec 1 mL de tampon (150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4), culottées à nouveau, lavées encore une fois avec 1 mL de tampon (10 mM Tris-HCl pH 7.4) et culottées pour une dernière fois. Une préparation de protéines immunoprécipitées sans anticorps primaires a été utilisée comme contrôle. Les protéines liées aux billes ont été chargées sur gel de 12 % de polyacrylamide pour électrophorèse. Quatre-vingt microgrammes de protéines présentes avant immunoprécipitation ont aussi été chargées pour déterminer le signal total. L'efficacité de l'immunoprécipitation a été analysée par un immunobuvardage contre la nucléoporine p62 (voir 2.4 pour la description des paramètres d'électrophorèse et d'immunobuvardage).

2.1.5.3.4 Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne MACS et billes magnétiques

Cinq cents microgrammes de protéines (voir 2.1.5.3.2) provenant du surnageant du lysat cellulaire centrifugé à basse vitesse et contenant des débris nucléaires ont été incubées avec 20 μL de peptide inhibiteur du récepteur Fc dans un volume total de 1 mL avec 15 μg , 50 μg ou 75 μg d'anticorps monoclonal contre p62 en présence du tampon dégazé (décrit en 2.1.5.3.2). Avant l'ajout de l'anticorps primaire, 5 % du matériel a été chargé sur gel pour représenter le total. Par la suite, le matériel a été incubé pour 30 minutes à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Un volume de 200 μL d'anticorps secondaires (chèvre anti-souris) couplés à des billes magnétiques MACS Microbeads ont été ajoutés pour une autre incubation de 40 minutes à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Entre temps, des colonnes de déplétion LD MACS ont été lavées avec 2 X 1 mL de tampon dégazé. Après incubation, chaque préparation a été déposée sur une colonne fixée au portoir aimanté SuperMACS (de Miltenyi Biotech fourni par Dr Michel Desjardins) et le flux d'écoulement a été recueilli. Un pourcentage de 5 % du volume total a été chargé sur gel pour représenter l'écoulement. La colonne encore fixée à l'aimant a été lavée avec 1.5 mL de tampon dégazé. Un pourcentage de 5 % du liquide élué de la colonne a été chargé sur gel pour représenter le matériel contenu dans la fraction du lavage. Finalement, chaque colonne a été retirée de l'aimant, 1.5 mL de tampon a été ajouté à la colonne et poussé à travers celle-ci avec un piston. De nouveau, 5 % du matériel élué a été chargé sur gel 8 % de polyacrylamide pour représenter le contenu du matériel présent dans la fraction positive (voir 2.4 pour la description des paramètres d'électrophorèse et d'immunobuvardage).

2.1.5.3.5 Marquage des noyaux à la biotine, dialyse et isolation avec des billes magnétiques couvertes de streptavidine

Toutes les étapes du protocole ont été effectuées dans des tubes eppendorf « Low Binding » en utilisant le même matériel que pour les colonnes MACS. Trois cent microgrammes de protéines ont été dosées (voir 2.1.5.3.2) et incubées avec 150 μg de biotine-NHS EZ-Link (Pierce), provenant d'une solution stock de biotine d'une

concentration de 1 mg/mL diluée dans du DMSO. Une autre préparation sans biotine a été testée comme contrôle. Un échantillon de 15 µg de protéines non additionné de biotine a été chargé sur gel pour représenter le total. Le volume de la réaction a été ajusté à 1 mL avec du PBS/5 mM MgCl₂ /1 % BSA et incubé sans agitation à 4°C pour 30 minutes. Pour éviter la précipitation du matériel dans le fond des tubes, ceux-ci ont été basculés à trois reprises aux 10 minutes. Chaque préparation a ensuite été transférée dans un tube de dialyse de 19 mm de largeur et de 5.4 cm de longueur avec une porosité permettant le transfert des molécules ayant une taille inférieure à 3.5 kD et préalablement humidifiées avec de l'eau déionisée autoclavée pour 20 minutes. Les échantillons ont été immergés dans un bac contenant 1 L de tampon de dialyse composé de PBS/5 mM MgCl₂/1 % BSA pour deux heures à 4°C avec une légère agitation avec un barreau magnétique. Par la suite, le tampon a été jeté pour être remplacé par un litre de tampon de dialyse frais pour une autre période d'équilibration de 2 heures à 4°C. Après la dialyse, 5 % du rétentat ont été chargés sur gels de polyacrylamide pour représenter la fraction du matériel récupéré après dialyse.

De la CLAP a été ajoutée aux noyaux dialysés et ceux-ci cassés par dix cycles de congélation (azote liquide)-décongélation (37°C) et de deux traitements de 15 secondes chacun à 4°C au sonicateur (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100) à l'intensité préréglée de 2. La qualité du cassage a été vérifiée au microscope photonique. Les échantillons biotinylé et non biotinylé ont chacun été divisés en trois fractions de volume égal. Le pourcentage de BSA des différentes fractions a été ajusté à 1 %, 2.5 % ou 5 % avec une solution de BSA concentrée dans du PBS. Un volume de 100 µL de billes magnétiques Biosphères couvertes de streptavidine, préalablement lavées selon les instructions du manufacturier, ont été resuspendues dans du PBS contenant 1 %, 2.5 % ou 5 % de BSA. Les billes magnétiques ont été ajoutées aux fractions correspondantes pour un volume final de 600 µL. Les échantillons ont été incubés pour 14 heures à 4°C avec agitation sur un support rotatif. Les différentes fractions ont été déposées sur un portoir aimanté pour tubes eppendorfs (Dyna) à 4°C pour 10 minutes. Quinze pourcents du volume du surnageant de chaque fraction (correspondant à 5 % du matériel de départ) a été

chargé sur gel pour représenter le matériel contenu dans le surnageant A. Le reste du surnageant a été retiré et le culot de billes lavé avec 600 μL de PBS/ 5 mM MgCl_2 . Ces suspensions ont de nouveau été remises pour 10 minutes à 4°C sur le portoir aimanté à eppendorfs. Un pourcentage de 15 % du volume du surnageant de chaque fraction a été chargé sur gel pour représenter le matériel contenu dans le surnageant B. Le reste du surnageant a été retiré, les préparations ont été retirées du portoir aimanté à eppendorfs et le culot de billes resuspendu avec 600 μL de PBS/ 5 mM MgCl_2 . Un pourcentage de 15 % du volume de chacune de ces fractions a été chargé sur gels de 7 % de polyacrylamide pour représenter le matériel contenu dans la fraction positive (voir 2.4 pour la description des paramètres d'électrophorèse et d'immunobuvardage).

2.1.5.3.6 Couplage des noyaux aux billes magnétiques à groupements NH_2 activés

Toutes les étapes du protocole ont été effectuées dans des tubes eppendorf *Low Binding*. Cinq microlitres de billes magnétiques de type Estapor couvertes de groupements NH_2 ont d'abord été lavées à quatre reprises, à l'aide du portoir aimanté à eppendorfs, avec des volumes de 200 μL d'eau déionisée et autoclavée. Par la suite, les groupements des billes ont été activés par leur incubation de 4 heures à température ambiante, sans agitation, avec 200 μL d'une solution de 8 % de glutaraldéhyde diluée dans de l'eau déionisée et autoclavée. Durant leur activation, les billes ont été resuspendues doucement à la pipette à trois reprises pour limiter leur agrégation. À l'aide du portoir aimanté, les billes ont été lavées par deux lavages de 200 μL chacun avec du PBS/ 5 mM MgCl_2 . Pour éviter que les billes s'agrègent trop entre elles lors des lavages, les tubes de billes restaient accolés à l'aimant pour un maximum de 30 secondes. Au dernier lavage, les billes ont été resuspendues dans 200 μL de tampon PBS/5 mM MgCl_2 /1 mM de DTT et ajoutées séquentiellement aux 150 μg de protéines (voir 2.1.5.3.2) de noyaux décongelés, provenant de l'interface du CBV. Comme contrôle, un autre échantillon de 150 μg de protéines provenant aussi des noyaux de l'interface de la CBV n'a pas été incubé avec les billes magnétiques. Le marquage des noyaux par les groupements activés des billes

magnétiques a eu lieu à 4°C pour 18 heures avec agitation sur le support rotatif. Après le marquage, 250 µL de PBS/5 mM MgCl₂ a été ajouté pour diluer le glycérol contenu dans les préparations. Dans le cas du contrôle sans billes, le seul moyen pour récupérer et laver les noyaux est de procéder à une CBV (voir 2.1.5.2.1), tandis que l'échantillon avec les billes magnétiques a été déposé sur le portoir aimanté à eppendorfs pour un maximum de 30 secondes. Les échantillons avec et sans billes ont été lavés à deux reprises avec 200 µl de PBS/ 5 mM MgCl₂. Après le dernier lavage, chaque échantillon a été resuspendu dans un volume de 400 µL de PBS/5 mM MgCl₂, dans lequel une solution d'éthanolamine 3 % diluée dans du PBS/5 mM MgCl₂ a été ajoutée goutte à goutte pour obtenir 0.1 % d'éthanolamine finale. L'éthanolamine a été employée pour contribuer à rendre covalentes et résistantes à la sonication les liaisons formées entre les noyaux et les billes magnétiques et de limiter ultérieurement le marquage des virions périnucléaires libérés par des billes libres après sonication des noyaux. Les deux échantillons ont été incubés à température ambiante pour 30 minutes sans agitation. Deux lavages ont été effectués, tel que décrit plus haut, et le matériel obtenu après le dernier lavage a été resuspendu dans 400 µL de PBS/5 mM MgCl₂/5 % BSA pour une incubation de 30 minutes à température ambiante sans agitation. Le BSA a été utilisé pour séquestrer les groupements encore réactifs des billes libres. Les deux échantillons ont été lavés à trois reprises pour être resuspendus dans 400 µL de PBS/5 mM MgCl₂/5 mM DTT à température ambiante et sans agitation pour 15 minutes. Le DTT a été utilisé, de concert avec l'éthanolamine, pour réduire les groupements activés des billes libres résiduelles et stabiliser les liaisons entre les noyaux et les billes. Deux lavages ont été effectués et le matériel obtenu après le dernier lavage a été resuspendu dans 150 µL de PBS/5 mM MgCl₂. L'aspect du matériel a été visualisé au microscope photonique avec un grossissement à 1 000 X en champ clair (Zeiss Axiophot).

2.1.6 Immunoisolation des virions

Quatre volumes de 150 µL de billes magnétiques Dynabeads de 2.8 µM de diamètre couvertes d'anticorps secondaires (mouton anti-souris) ont été lavées à trois reprises selon les indications du manufacturier à l'aide du portoir aimanté à

ependorfs avec le tampon prescrit, soit du PBS/0.1 % BSA (tampon I). Au dernier lavage, les anticorps secondaires présents sur les billes ont été couplés à 48.4 μg ou 193.5 μg d'anticorps monoclonal contre gD (MCA-DL6) à 17.5 mg/mL ou à la même quantité du contrôle (isotype de souris IgG2a) à 1 mg/mL par une incubation d'une heure à 4°C avec agitation sur le support rotatif dans 1 mL de tampon I. Les billes couplées aux anticorps primaires ou au contrôle ont été lavées à trois reprises en déposant les tubes sur le portoir aimanté à eppendorfs pour 2 minutes. Le surnageant a été retiré et les billes ont été resuspendues avec 1 mL de tampon I. Au dernier lavage, 25 μg de protéines (voir 2.1.5.3.2) de virions extracellulaires concentrés dans du MNT provenant du milieu de culture d'une infection avec le virus sauvage (voir 2.1.3) ont été ajoutées aux billes couplées dans un volume total de 250 μL de tampon II (PBS/1 % BSA/150 mM NaCl) et incubés pour 1 heure à 4°C avec agitation sur le support rotatif. Les billes ont été déposées pour 2 minutes sur le portoir aimanté à eppendorfs. Le surnageant a été récupéré et 90 μL a été chargé sur gel pour représenter le contenu du surnageant A. Les billes ont été lavées avec 250 μL de tampon III (PBS/ 500 mM NaCl) et les tubes remis pour un autre 2 minutes sur le portoir aimanté. Le surnageant a été récupéré et 90 μL chargé sur gel pour représenter le contenu du surnageant B. Les billes ont été lavées avec 250 μL de PBS et les tubes ont ensuite été remis sur le portoir aimanté. Le surnageant a été retiré et les billes ont été resuspendues dans 250 μL de PBS. Une fraction de 90 μL du volume total de billes a été prélevé pour représenter le matériel contenu dans la fraction positive. Pour représenter le total, neuf microgrammes de protéines de virions non immunisolées ont été chargées, comme les échantillons prélevés, sur gels de 8 % de polyacrylamide pour électrophorèse et analysés par immunobuvardage (voir 2.4 pour la description des paramètres d'électrophorèse et d'immunobuvardage).

2.2 Immunofluorescence

Les lamelles utilisées pour fixer les lysats cellulaires des cellules mock ou infectées avec le virus HSV-1 V701 traitées à différents pourcentages de NP-40 (voir 2.1.5.1.1 et figure 4) ont été pré-traitées à la poly-L-lysine pour faciliter la fixation du matériel. Pour ce faire, elles ont été nettoyées à l'éthanol 70 %, ensuite rincées à l'eau

déionisée et agitées pour 5 minutes à température ambiante dans un contenant de plastique rempli d'une solution diluée de poly-L-lysine 1 % faite dans de l'eau déionisée. Les lamelles ont ensuite été rincées avec de l'eau déionisée et finalement asséchées. À partir d'une quantité identique de cellules mock et infectées, des volumes proportionnels du lysat cellulaire ont été déposés pour 30 minutes à température ambiante sur les lamelles pré-traitées à la poly-L-lysine (85). Après la fixation du matériel, les lamelles ont été lavées deux fois avec 1 mL de PBS à 4°C. Le matériel a été fixé en incubant les lamelles pour 30 minutes à 4°C avec 1 mL de PFA 3 % froid dilué dans du PBS. Les échantillons ont ensuite été lavés tel que décrit plus haut avec du PBS, pour ensuite être neutralisés avec 1 mL de PBS/50 mM NH₄Cl pour 30 minutes à température ambiante. Le matériel a été lavé de nouveau, pour ensuite être perméabilisé pour 4 minutes à la température ambiante avec 1 mL de PBS/0.1 % Triton X-100. Les lamelles ont été lavées et transférées dans une chambre humide constituée d'une plaque dont le fond est couvert de papier 3M humidifié et recouvert par du parafilm. Toutes les étapes qui s'y déroulent ont été effectuées à température ambiante. Les lamelles ont été déposées, matériel orienté vers le parafilm, sur 30 µL d'une solution de blocage composée de PBS/10 % sérum. Le blocage a été effectué pour 20 minutes et l'excédent de solution a été enlevé par un papier absorbant. Le matériel a ensuite été incubé pour 30 minutes avec 20 µL d'anticorps contre la calnexine diluée 1 :200 dans la solution de blocage. Les lamelles ont été lavées à trois reprises pour 5 minutes avec 100 µL de PBS. Les lamelles ont été incubées pour 30 minutes avec 50 µL de solution d'anticorps secondaire fluorescent poulet anti-lapin Alexa 488 diluée 1 :1 000 dans du PBS puis lavées à trois reprises pour 5 minutes avec 100 µL de PBS. Les lamelles ont été rincées dans de l'eau distillée et l'excédant de liquide retiré par un papier absorbant. Les lamelles ont été montées sur des lames (côté matériel vers la lame) avec 10 µL de Mowiol/Hoescht [0.2 µg/mL]. Les lames ont été visualisées à 1 000 X par un microscope à fluorescence (Zeiss Axiophot) équipé de filtres. Des images ont été acquises avec une caméra Retiga 1300 (Q Imaging) et traitées par le logiciel Photoshop 7.0.

2.3 Microscopie électronique

Des noyaux, issus des cellules mock ou infectées avec HSV-1 V701 ou HSV-1 sauvage (voir 2.1.3) et cassées avec le cell-cracker (voir 2.1.5.1.2), ont été récoltés de l'interface 29/35 d'un gradient d'Optiprep (voir 2.1.5.2.2). Tous les tubes employés dans les manipulations ont été préalablement traités pour 14 à 16 heures avec le silicone SigmaCote pour réduire la perte de noyaux ayant tendance à s'accoler sur la paroi des tubes non traités. Les noyaux ont été dilués dans 2 volumes de PBS/5 mM MgCl₂ avant d'être centrifugés à 800 g (rotor 12 124 Sigma 1-15K) pour 10 minutes à 8°C ou 4°C, dépendamment du virus employé. Le culot d'au minimum 1 X 10⁷ noyaux, comptés à l'hémacytomètre, a été resuspendu doucement dans du PBS/5 mM MgCl₂. Trois lavages par centrifugation à 800 g pour 10 minutes ont été effectués avec un volume de 0.1 % de sodium cacodylate, dilué dans de l'eau déionisée. Par la suite, les noyaux ont été fixés avec une solution de 0.1 % sodium cacodylate/2.5 % glutaraldéhyde et conservés à 4°C pour deux à trois jours. Le matériel a ensuite été monté sur une résine d'épon et visualisé en MÉ. Les étapes qui suivent la fixation du matériel ont été réalisées par Josée Letellier, technicienne au laboratoire.

2.4 Immunobuvardage

2.4.1 Préparation des échantillons

Les divers échantillons ont été préalablement traités pour 5 minutes à 37°C avec 20 unités de DNase I et 5 mM de CaCl₂. Ces paramètres sont tirés du protocole fourni par la compagnie Ambion, afin de réduire la viscosité des échantillons en dégradant l'ADN. Par la suite, chaque échantillon, ainsi qu'un étalon de référence de poids moléculaires connus, ont été incubés pour 5 minutes à 95°C avec un tampon de chargement (2 % SDS, 10 % glycérol, 0.1 % de Bleu de Bromophénol et 2 % de β -Mercaptoéthanol) et finalement centrifugés à 10 000 g (rotor 12 124 Sigma 1-15K) pour 2 minutes à température ambiante. Dans le cas des billes de sépharose liées aux protéines nucléaires par le biais de la protéine A (voir 2.1.5.3.3), celles-ci n'ont pas été traitées à la DNase I, mais ont été resuspendues avec 40 μ L d'eau déionisée avant d'être traitées avec le tampon de chargement.

2.4.2 Électrophorèse et électro-transfert

Les échantillons ont été déposés sur un gel d'acrylamide de 7 %, 8 % ou 12 % (Bio-Rad; Mississauga, ON). L'électrophorèse a été réalisée à un courant constant de 70 mA à température ambiante, dans un tampon contenant 25 mM Tris-Base/ 250 mM glycine/ 0.1 % SDS. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de PVDF Immobilon-P de 0.45 µM par électro-transfert, effectué à 32.5 mA pour des gels de 1.0 mm d'épaisseur et à 45 mA pour des gels de 1.5 mm d'épaisseur pendant 16 à 18 heures, selon la méthode décrite par Sambrook (120).

2.4.3 Immunobuvardage

Les membranes ont été incubées pour 1 heure sous agitation douce avec un agitateur à plateau Rocker II (Boekel Scientific), dans une solution de blocage PBS-Tween 20 (PBST) (PBS/ 0.1 % Tween 20) contenant 5 % de lait écrémé en poudre, afin d'éliminer les interactions non spécifiques avec l'anticorps primaire. Les membranes ont ensuite été incubées avec agitation pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de PBST contenant un anticorps primaire approprié, 5 % de lait écrémé et 0.02 % de sodium azide. Ensuite trois lavages successifs de 5 minutes ont été effectués avec agitation à température ambiante dans du PBST contenant 5 % de lait écrémé. Les membranes ont ensuite été incubées avec une agitation douce de 45 minutes dans une solution de PBS, dans laquelle était diluée l'anticorps secondaire HRPO chèvre anti-souris ou chèvre anti-lapin, selon le cas. Les membranes ont été lavées deux fois à température ambiante pendant 5 minutes avec agitation avec du PBST et une dernière fois avec du PBS. Les protéines ont été révélées par une réaction de chimiluminescence avec le Lumi-Light, selon les instructions prescrites par le manufacturier. Les membranes ont finalement été exposées sur films BioMax MR qui ont été développés avec l'appareil 100-Plus automatic X-Ray (All-Pro Imaging Corporation) après une exposition de quelques secondes à 10 minutes. Les dilutions des anticorps primaires et secondaires de souris étaient respectivement 1 :2 000 et 1 :10 000 pour gD (MCA-DL6), 1 :1 000 et 1 :5 000 pour la nucléopore p62, 1 :100 et 1 :5 000 pour Lamp-1, 1 :200 et 1 :5 000 pour le récepteur de la transferrine (CD71 humain), 1 :100 et 1 :5 000 pour GS27, 1 :1 000

et 1 :5 000 pour la Golgine-97 et 1 :250 et 1 :5 000 pour BiP (GRP78). Les dilutions des anticorps primaires et secondaires de lapin étaient 1 : 2 000 et 1 :10 000 pour gB (anti gB-1, R-69), 1 :5 000 et 1 :5 000 pour Tom 20, 1 :200 et 1 :5 000 pour EEA1, 1 :2 000 et 1 : 3 000 pour la Calnexine, 1 :10 000 et 1 :10 000 pour VP5 (NC-1) et 1 :5 000 et 1 :5 000 pour l'Actine-gamma;.

2.4.4 Décapage des membranes

Afin d'effectuer l'immunobuvardage contre tous les marqueurs à l'étude, les membranes ont dues être réutilisées jusqu'à trois fois. Pour ce faire, les anticorps ont été enlevés par incubation à 55°C (incubateur avec agitation Julabo SW22) pour 30 minutes avec une solution de décapage (1.4 M de 2-Mercapthoéthanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) modifiée du protocole prescrit par ECL (*ECL Western Blotting Detection Reagents*; Amersham). Par la suite, les membranes ont été lavées à deux reprises avec du PBST pour 10 minutes à la température ambiante avec agitation. La qualité du décapage a été vérifiée en incubant les membranes avec du Lumi-Light et révélée par autoradiographie comme ci haut. Ces membranes, exemptes d'anticorps, ont de nouveau été bloquées par le tampon PBST additionné de 5 % de lait écrémé avant d'être incubées avec le prochain anticorps primaire à tester.

CHAPITRE 3 : LES RÉSULTATS OBTENUS

3.1 Isolation des virions périnucléaires

Dans un premier temps, nous avons entrepris d'isoler les virions périnucléaires. Idéalement, ceci devait avoir lieu par une infection avec le mutant HSV-1(F) U_L20⁻ R7225, mais celui-ci est difficile à produire en quantité suffisante. Cette situation sera rapidement palliée, puisqu'une lignée cellulaire qui complète le gène U_L20 sera disponible prochainement. Entre temps, une autre approche a été utilisée pour permettre l'isolation de noyaux contenant des virions immatures. Cette approche employait des cellules infectées avec le mutant thermosensible HSV-1 V701. Après la période d'adsorption effectuée à 37°C, l'infection d'une durée de 11 heures a été faite à la température non permissive de 39°C. À cette température, les virions immatures s'accumulaient aussi au noyau, mais à l'intérieur de celui-ci, plutôt que dans l'espace périnucléaire. Afin d'obtenir suffisamment de matériel, les infections ont été effectuées sur des cellules s₃HeLa, qui ont la capacité de croître en suspension.

3.1.1 Homogénéisation des cellules

Plusieurs méthodes d'homogénéisation cellulaire ont été explorées, afin d'obtenir des noyaux dont l'enveloppe serait intègre. Parmi celles les plus fréquemment utilisées, nous avons testé la lyse et le fractionnement de la membrane plasmique des cellules s₃HeLa avec le détergent doux non-ionique NP-40 et des méthodes mécaniques comme la seringue, le dounce et le cell-cracker.

3.1.1.1 Lyse de la membrane plasmique par le NP-40

Il était important que le pourcentage de NP-40 employé soit suffisamment élevé pour lyser la membrane plasmique, sans toutefois risquer d'endommager la MNE des noyaux ou l'enveloppe des virions périnucléaires (102). Dépendamment du type cellulaire, le NP-40 est généralement utilisé à un pourcentage de 0.5 % pour l'homogénéisation de la membrane plasmique mais pas des noyaux (37, 60). Nous

avons donc testés en duplicat différentes concentrations de NP-40 variant de 0.1 à 0.5 % (figure 4). Étant donné que l'isotonicité n'influe pas sur l'efficacité du détergent, celle-ci a été réalisée en condition isotonique. Pour s'assurer du maintien de l'intégrité de la MNE des noyaux non infectés (Mock) ou infectés, nous les avons examinés par une coloration au hoescht, un marqueur passif de la chromatine, et par une immunofluorescence contre la calnexine, à la fois un marqueur du RE et de la MNE (104). Dans les échantillons contrôles, c'est-à-dire en l'absence de NP-40, la présence de calnexine autour des noyaux a été remarquée, tant pour les cellules mock qu'infectées (figure 4). À 0.2 % de NP-40, les noyaux mock et infectés ont été partiellement positifs à la calnexine et la coloration au hoescht a montré que la chromatine des noyaux infectés disposée à la périphérie, contrairement à celle des noyaux mock, était plus uniforme. À 0.3 % de NP-40, les noyaux mock ont été totalement dépourvus de calnexine, tandis que les noyaux infectés en possédaient parfois un peu. Cependant, ces derniers ont été endommagés, comparativement aux noyaux mock. À 0.5 % de NP-40, la proportion des noyaux infectés marqués à la calnexine, ne semblait pas plus faible qu'à 0.3 % de détergent, par contre le marquage était différent. Tel que prévu les noyaux n'étaient pas lysés à cette concentration de NP-40. Toutefois, les noyaux mock n'étaient pas du tout marqués à la calnexine. La présence du marquage à la calnexine a montré que les cellules mock et infectées lysées jusqu'à 0.2 % de NP-40 ont conservé en général leur MNE.

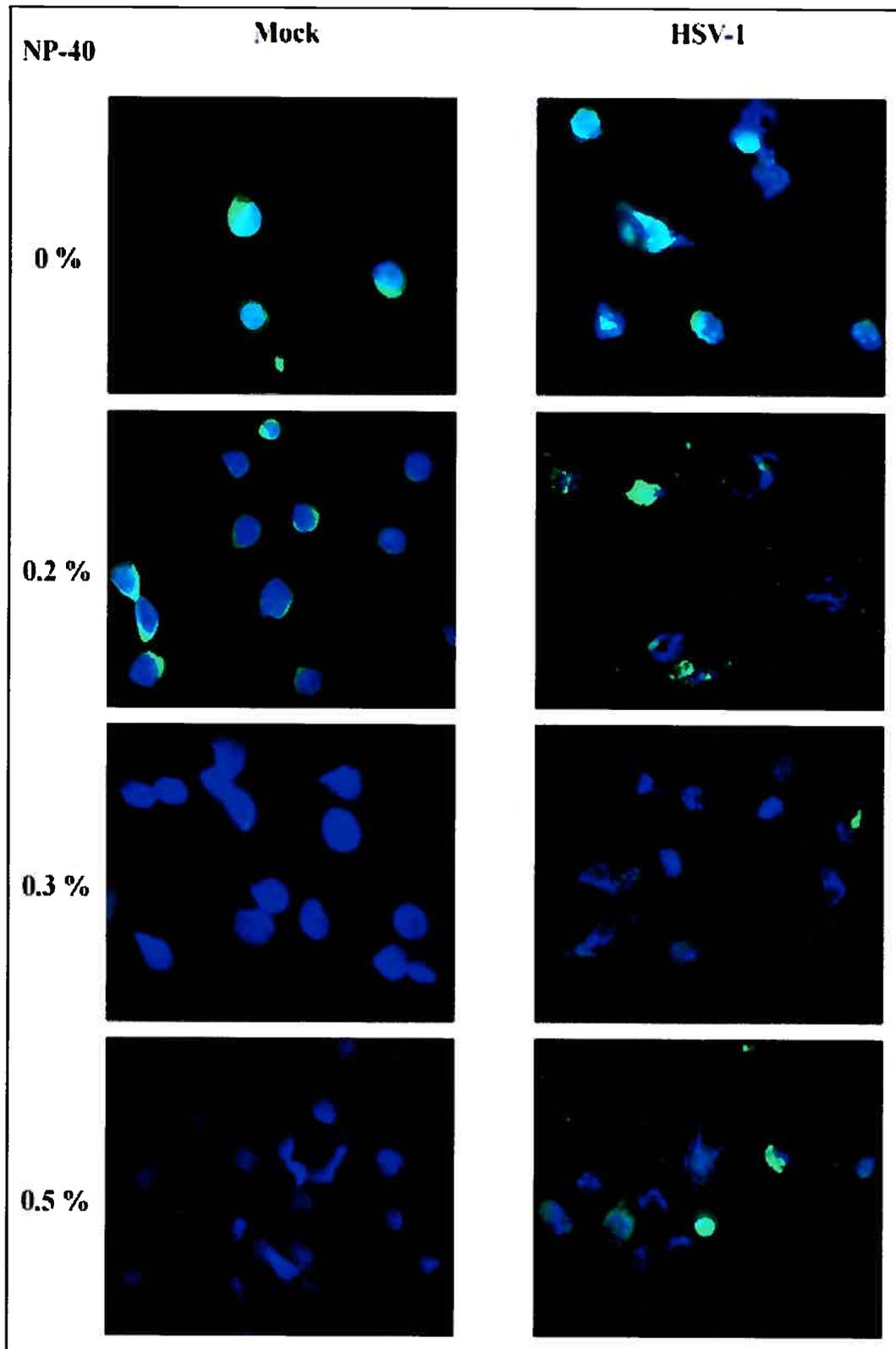
3.1.1.2 Fractionnement de la membrane plasmique par des méthodes mécaniques

3.1.1.2.1 Influence de l'isotonicité du tampon sur le rendement du cassage mécanique

Dans son protocole, Penman décrivait en 1966 (105) que le fractionnement ou cassage des membranes cellulaires se déroulait en condition hypotonique. Dans un premier temps, nous avons comparé le cassage mécanique des

Figure 4. Intégrité de l'enveloppe nucléaire à différents pourcentages de NP-40

Le même nombre de cellules s_3 HeLa en suspension infectées par HSV-1 ou non (mock) a été lysé avec différents pourcentages de NP-40 et fixé sur des lames traitées à la poly-L-lysine. L'immunofluorescence a été réalisée contre la calnexine (dilution 1:200) en vert en présence de hoescht (0,2 μ g/mL). Grossissement 1 000 X.



cellules HeLa en condition hypotonique et isotonique. Pour ce faire, des cellules mock ont été cassées avec une seringue munie d'une aiguille ou avec un cell-cracker. L'expérience a été effectuée à cinq reprises lors du cassage hypotonique avec la seringue et en duplicata pour les autres conditions. Tel qu'aperçu à la figure 5, le rendement de cassage en condition hypotonique a été d'environ 50 % et 55 %, respectivement pour la seringue et le cell-cracker, tandis qu'en condition isotonique, le rendement ne dépassait pas 10 %, et ce, autant pour la seringue que pour le cell-cracker. Il a donc été montré que le rendement de cassage en condition hypotonique des cellules s_3 HeLa était supérieur à celui obtenu en condition isotonique. Il est à noter que les résultats étaient les mêmes avec des cellules infectées cassées par le cell-cracker (données non montrées). Dans ce cas-ci, le cell-cracker donnait un meilleur rendement de cassage que la seringue. Pour éviter d'éventuellement tout casser les noyaux, leur isotonicité a été rapidement rétablie en les diluant dans du PBS après le cassage.

3.1.1.3 Comparaison de l'efficacité de cassage et du rendement en noyaux par diverses méthodes

Selon les résultats compilés aux figures 4 et 5, la lyse à 0.2 % de NP-40 a permis de préserver l'intégrité de la MNE et la rupture des cellules par méthodes mécaniques était nettement favorisée en condition hypotonique. Ayant ces informations, nous les avons comparées pour évaluer quelle approche permettait d'obtenir à la fois la meilleure efficacité de cassage des cellules et le plus grand rendement en noyaux. Pour ce faire, des cellules mock s_3 HeLa en suspension ont été fractionnées en condition hypotonique par des méthodes mécaniques (seringue, Dounce et cell-cracker) ou lysées en condition isotonique avec 0.2 % de NP-40. Les résultats montrés ci-dessous ont été comptabilisés lors d'expériences réalisées en triplicata pour la seringue, en duplicata pour le Dounce et suite à un essai pour le cell-cracker et le NP-40. Les données compilées dans la figure 6 ont montré que la lyse avec détergent était la méthode la plus efficace pour casser les cellules (figure 6A).

Pour le cassage mécanique des cellules l'efficacité était de 76 % avec la seringue et 58 % pour le cell-cracker ou le Dounce. La figure 6B a toutefois révélé que le cassage mécanique en condition hypotonique avec le cell-cracker permettait d'obtenir le plus grand rendement en noyaux (40 %), tandis que la lyse au NP-40 suivait avec près de 35 %. L'isolation de noyaux consiste généralement à les séparer du cytoplasme en les culotant à 1 000 g pendant 10-15 minutes (114). Toutefois, afin de réduire le risque d'agrégation des noyaux et éviter de les endommager, cette étape a été remplacée par une centrifugation basse vitesse (800 g pour 15 minutes) (CBV) sur un coussin d'iodixanol (Optiprep) de 40 %. Afin de séparer les noyaux présents à l'interface des autres organites, nous les avons ensuite purifiés par une centrifugation isopycnique sur diverses matrices de gradients.

3.1.2 Gradients discontinus de densité

Le sucrose, le Nycodenz et l'Optiprep, trois matrices de centrifugations isopycniques, ont été comparées et testées respectivement à une, deux ou trois reprises, dans le but d'obtenir le plus haut rendement en noyaux purifiés. Les paramètres des gradients testés ont été conçus à partir des protocoles fournis par les manufacturiers et par Graham (51). À la figure 7, les résultats ont montrés que pour les gradients de sucrose et de Nycodenz aucun noyau n'a pu être détecté et que le gradient de sucrose ne permettait que la récupération de 8.5 % du matériel total (cellules intactes, cellules cassées et noyaux), comparativement à 26.4 % pour le gradient de Nycodenz. Il semblait donc que l'intégrité des noyaux obtenus par ces deux matrices de gradients était grandement altérée. En effet, avec le gradient de sucrose, des débris et des noyaux très endommagés ont été observés par contraste de phase à l'interface entre le SIM et la couche de 40 % de sucrose. Ceci a aussi été observé avec le gradient de Nycodenz à l'interface formé entre les couches de 35 % et de 80 % (données non montrées). Contrairement aux gradients de sucrose et de Nycodenz, le gradient d'Optiprep a permis une récolte moyenne de 12.6 % de noyaux et de 30.4 % pour le matériel total (figure 7). Dans certains cas, du matériel a été retenu aux interfaces 25/27 et 27/29 du gradient d'Optiprep. Des immunofluorescences contre la calnexine, en présence de hoescht, ont montrées que

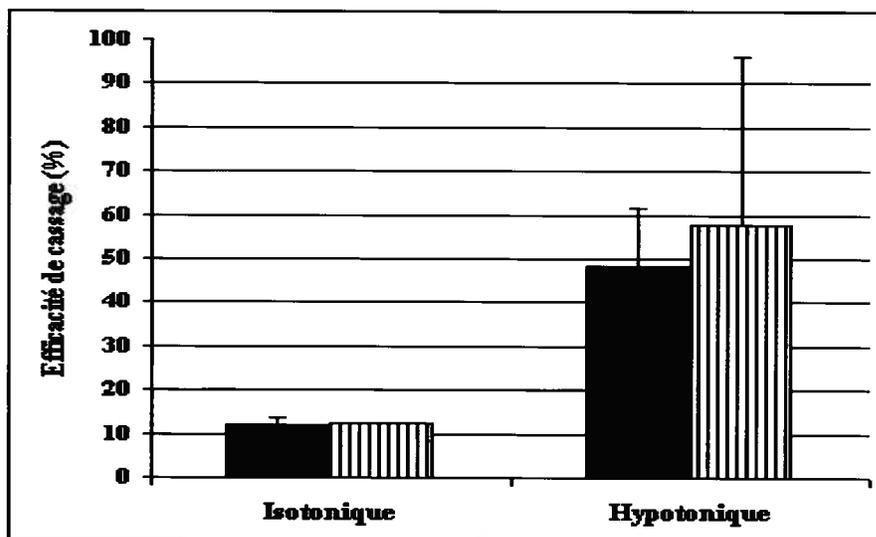
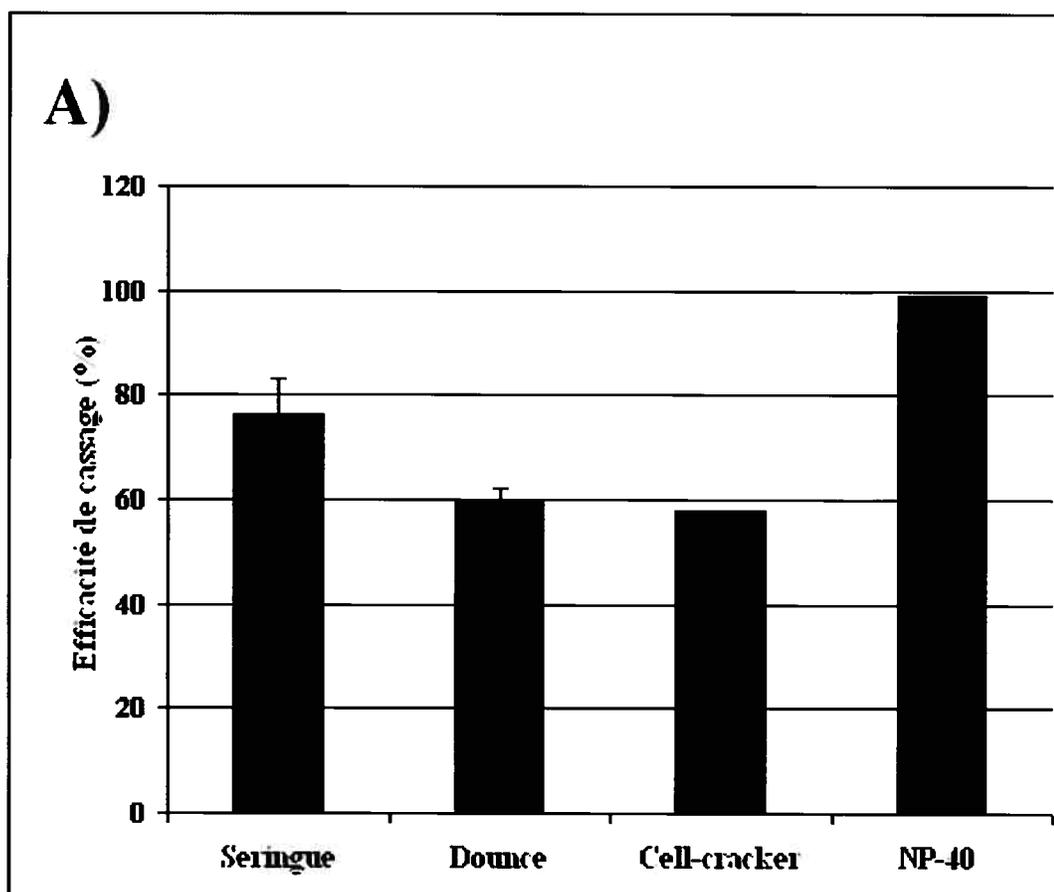


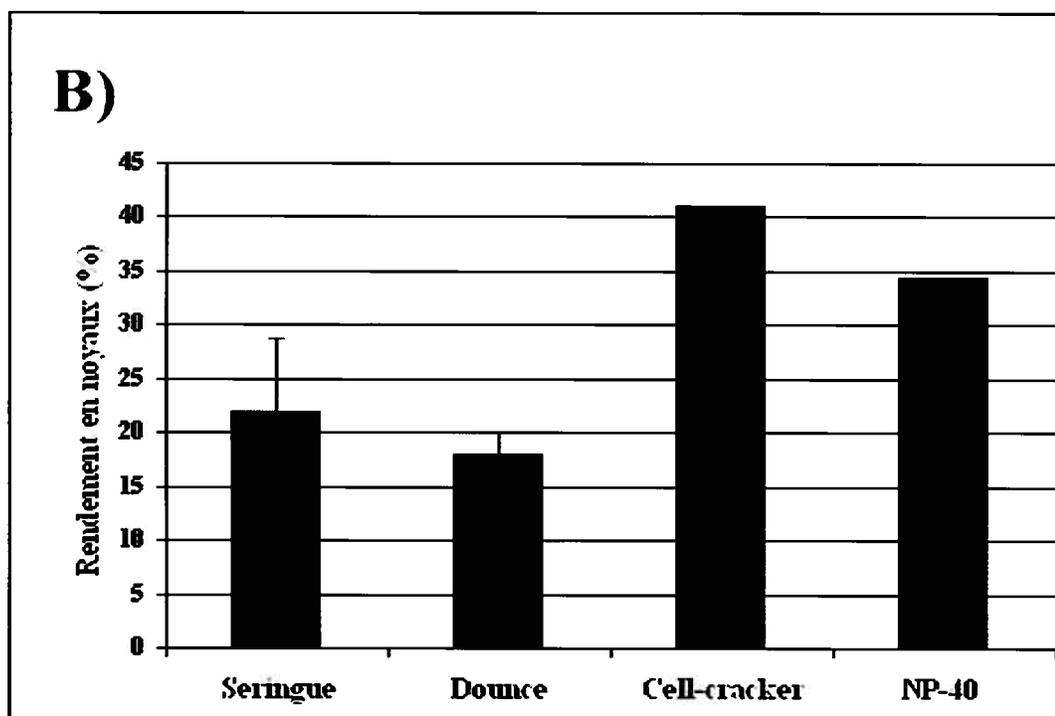
Figure 5. Influence de l'isotonicité du tampon sur le rendement du cassage mécanique

Des cellules s_3 HeLa non infectées ont été cassées avec une seringue (barres noires pleines) ou avec un cell-cracker (barres hachurées en noir et blanc) en condition isotonique (150 mM NaCl) ou hypotonique (10 mM NaCl). L'efficacité de cassage a été évaluée avec un hémacytomètre.

Figure 6. Homogénéisation des cellules

Des cellules s_3 HeLa non infectées ont été fragmentées en condition hypotonique par les méthodes mécaniques (seringue, Dounce et cell-cracker) ou ont été lysées en condition isotonique avec 0.2 % de NP-40. L'efficacité de cassage des cellules (A) et le rendement en noyaux obtenus (B) ont été déterminés à l'aide d'un hémacytomètre. Les expériences étudiant la seringue, le cell-cracker et la lyse ont été effectuées en triplicat et celles du Dounce en duplicat.





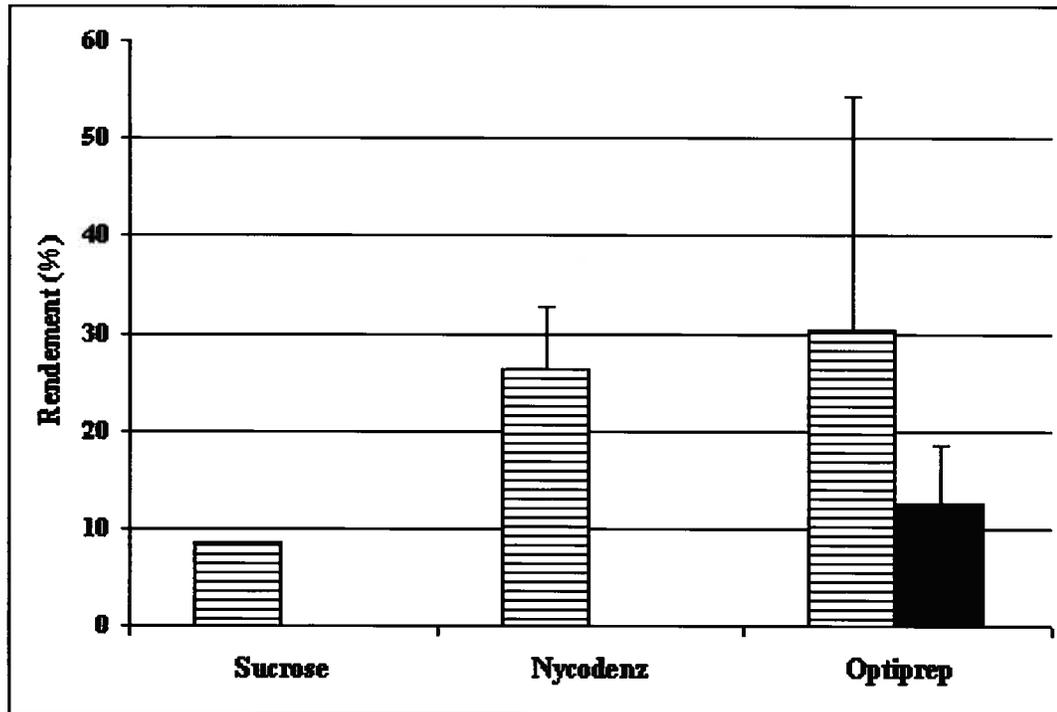


Figure 7. Purification des noyaux sur gradients de densité

Après l'homogénéisation mécanique de cellules s_3 HeLa mock ou infectées, le lysat a été déposé sur un coussin d'Optiprep et centrifugé à basse vitesse (CBV). L'interface de la CBV a été déposée sur différentes matrices de gradients, soit de sucrose, de Nycodenz ou d'Optiprep. Le matériel a été récolté aux différentes interfaces après centrifugation et quantifié à l'aide d'un hémacytomètre. Barres hachurées : cellules non cassées et noyaux, répertoriés aux différentes interfaces, barres noires pleines : noyaux isolés.

ce matériel se composait essentiellement pour l'interface 25/27, de cellules intactes ou peu lysées recouvertes de structures cytoplasmiques visibles en microscopies photonique et de fluorescence. Les structures retrouvées à l'interface 27/29 correspondaient à des noyaux, lorsque le gradient était chargé avec trop de matériel (données non montrées). Nous avons donc choisi le gradient d'Optiprep pour purifier les noyaux.

Pour confirmer que le matériel récolté à l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep était bel et bien des noyaux, nous avons lysé des cellules avec 0.5 % de NP-40, une concentration généralement utilisée pour lyser la membrane plasmique, mais pas les noyaux (figure 4) (37, 60) et les avons mises sur un gradient d'Optiprep. La figure 8 a confirmée que les cellules intactes migrent à l'interface 25/27, alors que les noyaux se retrouvent à l'interface 29/35.

3.1.2.1 Comparaison par MÉ des cellules lysées par le détergent ou cassées avec le cell-cracker

Un point important dans l'isolation des virions périnucléaires était le maintien de l'espace périnucléaire et donc, la préservation de la MNE. De plus, il fallait s'assurer que les noyaux obtenus étaient dépourvus le plus possible de contaminants. Afin de vérifier si le cell-cracker ou la lyse avec le NP-40 permettait de respecter ces deux critères, nous avons observé par MÉ l'aspect des noyaux obtenus par lyse (0.2 % et 0.1 % de NP-40 avec ou sans agitation) ou cassage mécanique (cell-cracker) et purifiés sur des gradients d'Optiprep. Les noyaux obtenus par lyse à 0.2 % (figure 9A) ou 0.1 % avec agitation (figure 9B) et 0.1 % sans agitation (figure 9C) n'avaient pas une enveloppe nucléaire intacte ou contenaient de nombreuses structures non identifiables. À l'opposé, les noyaux obtenus par le cell-cracker étaient de belle apparence, leur MNE était intacte (petite tête de flèche) et peu de contaminants étaient présents (figure 9D). Des noyaux infectés isolés par un pourcentage plus élevé de NP-40, tel que 0.25 % et 0.3 %, ont aussi été visualisés par MÉ, cependant le matériel obtenu a été dégradé et les noyaux visibles semblaient évidés de leur chromatine (données non montrées). En comparant les résultats obtenus en immunofluorescence et ceux en MÉ (figures 4 et 9), il était clair que le pourcentage

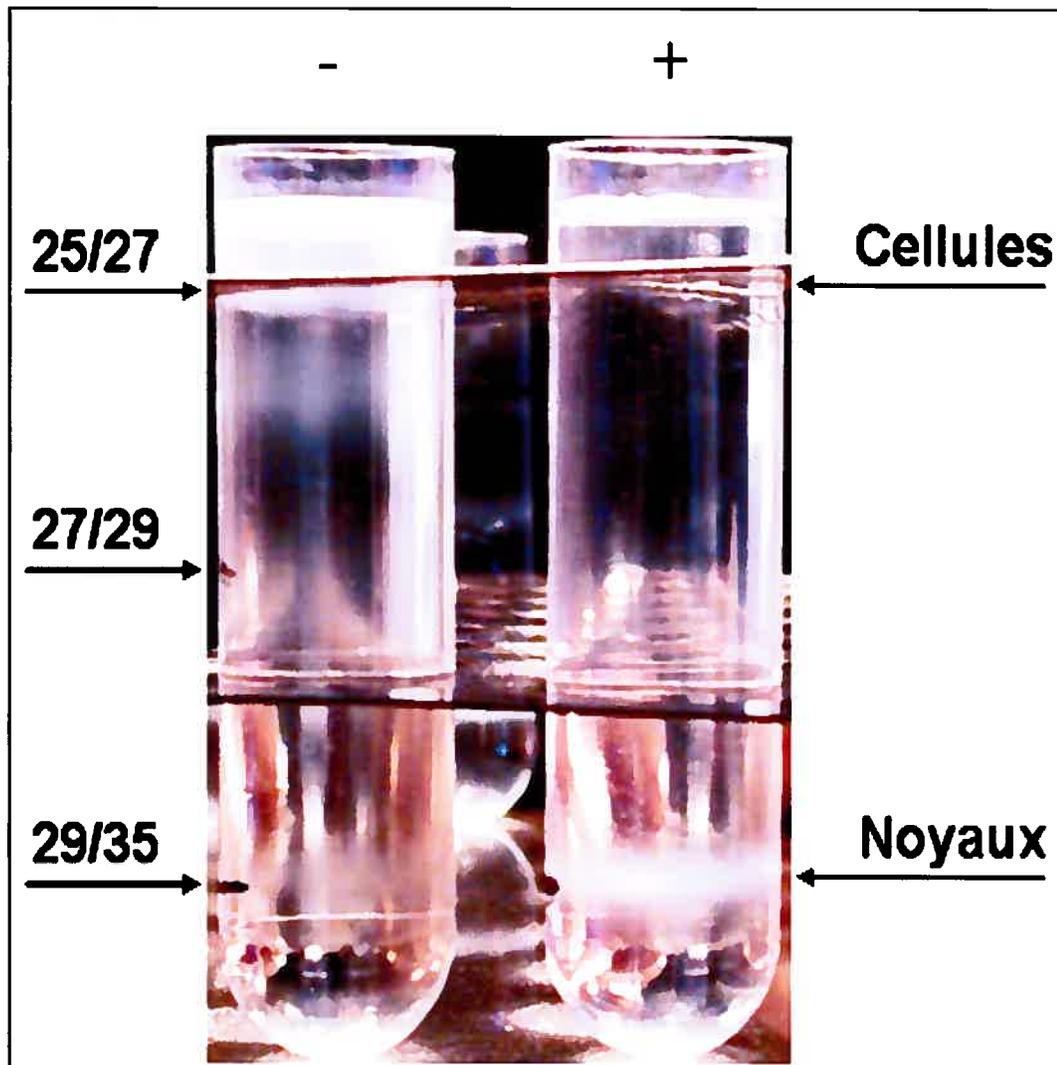
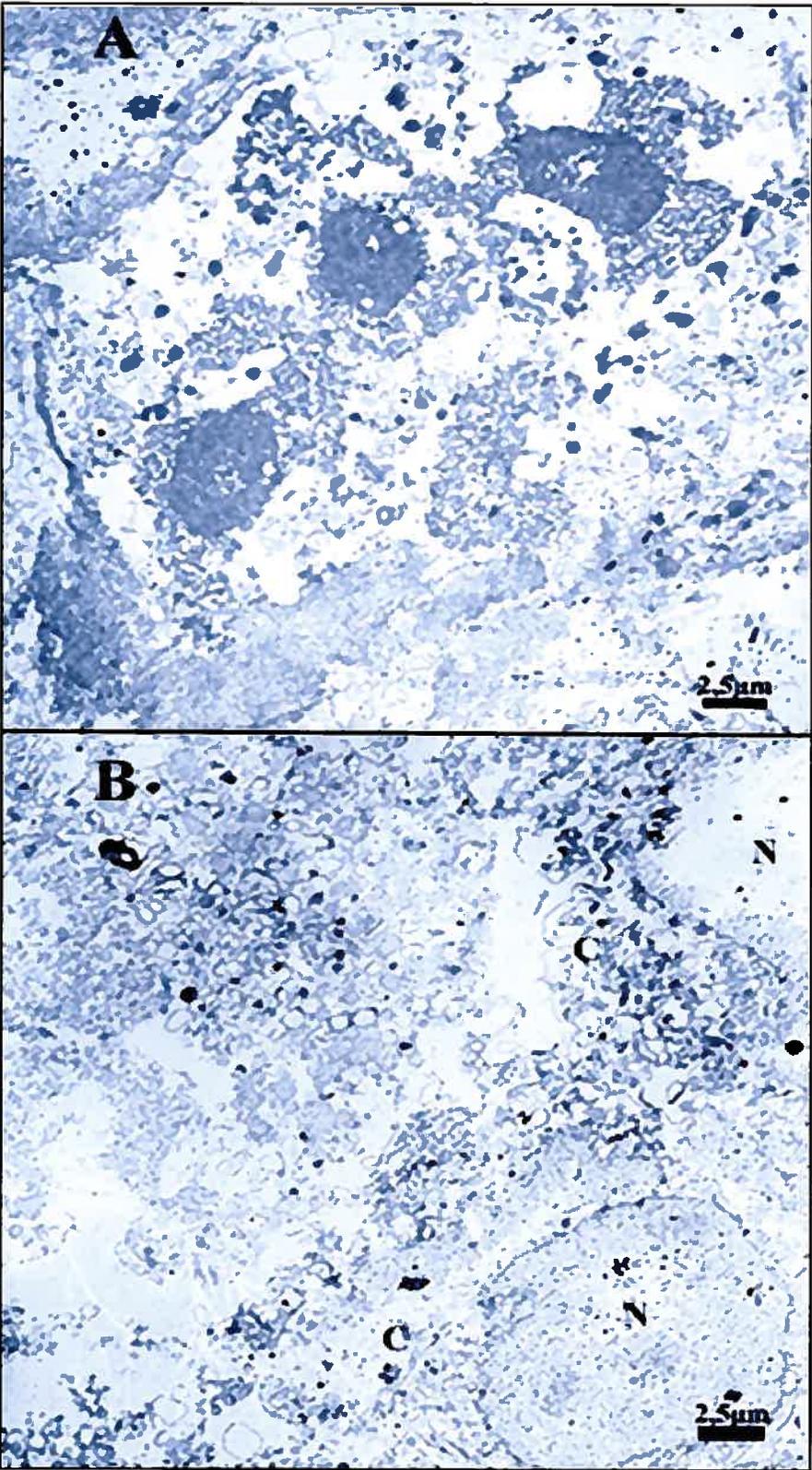


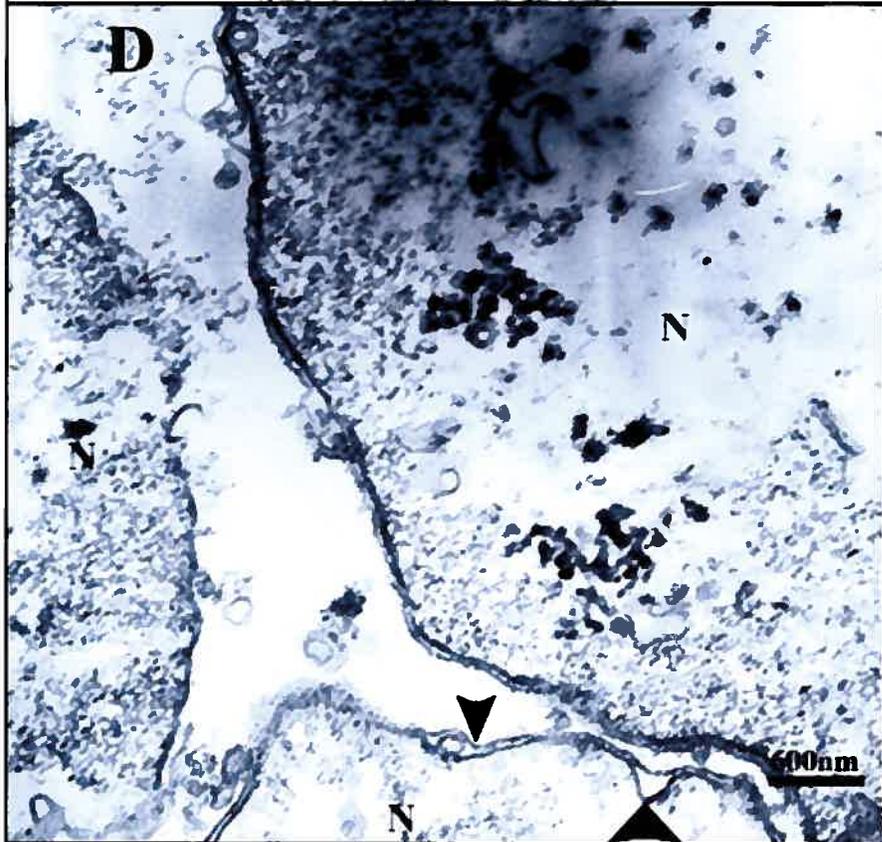
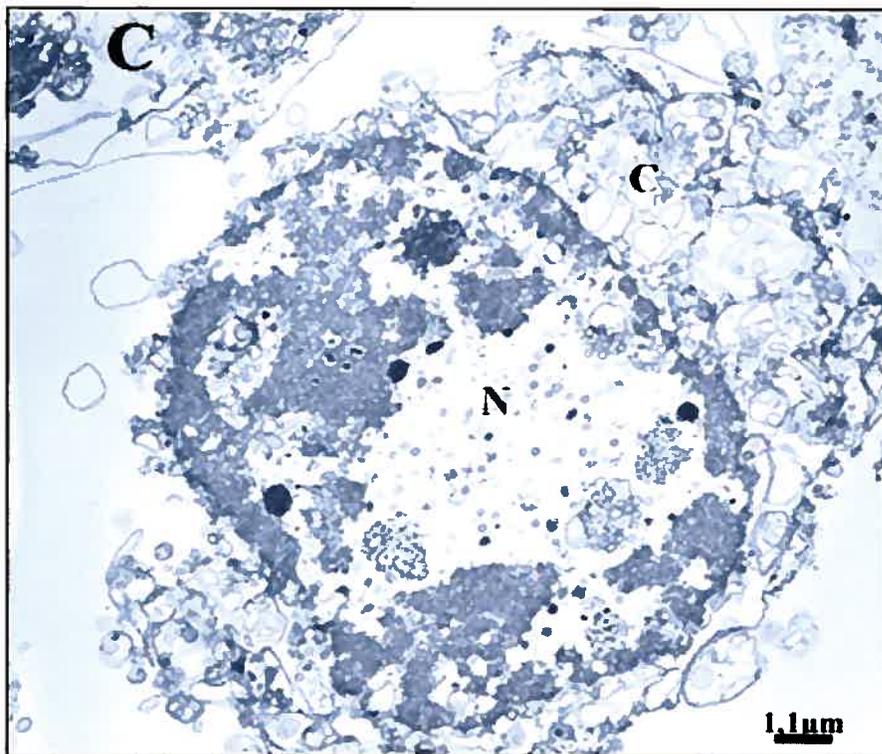
Figure 8. Séparation des noyaux des cellules intactes sur gradient discontinu d'Optiprep

Des cellules mock non traitées (-) ou traitées (+) avec 0.5 % de détergent NP-40 ont été déposées sur un coussin d'Optiprep et centrifugées à basse vitesse (CBV). L'interface a été récoltée et resuspendue dans 25 % d'Optiprep. Cette suspension a été déposée sur un gradient discontinu d'Optiprep, composé de haut en bas de 25 %, 27 %, 29 % et 35 % d'Optiprep. Les gradients ont été centrifugés à 10 000 g pour 20 minutes à 4 °C dans le rotor SW 28. Les cellules restent à la surface du gradient, tandis que les noyaux s'accumulent à l'interface 29/35.

Figure 9. Microscopie électronique de cellules lysées par le détergent ou cassées par le cell-cracker

Des noyaux ont été isolés de cellules s_3 HeLa infectées par HSV-1 V701 et lysées avec 0.2 % (A) ou 0.1 % avec agitation (B) et 0.1 % sans agitation (C) de NP-40 ou cassées mécaniquement avec le cell-cracker (0.042 mm de clairance) (D). Les noyaux ont été purifiés tel que décrit à la figure 8, soit par centrifugation à basse vitesse suivi d'un gradient discontinu d'Optiprep. Le matériel de l'interface 29/35 a été fixé pour être intégré à une résine d'épon et ensuite visualisé par microscopie électronique. N : Noyau, C : cytosol, petite tête de flèche (►): membrane nucléaire externe et grosse tête de flèche (►): membrane nucléaire interne. Les expériences ont été effectuées une fois avec les différents pourcentages de détergent et en triplicata avec le cell-cracker.





de détergent utilisable pour obtenir des noyaux infectés exempts de contaminants cytosoliques et pourvus d'une enveloppe nucléaire intègre se trouvait dans une fenêtre beaucoup trop fine pour être une technique d'isolation à envisager. Ainsi, nous avons choisi de casser les cellules en condition hypotonique avec le cell-cracker plutôt qu'avec le NP-40.

3.1.3 Analyse par immunobuvardage des fractions durant la purification des noyaux

Pour examiner l'état d'enrichissement des noyaux lors de leur purification par centrifugation à basse vitesse et sur gradient de densité, des fractions infectées ou non infectées ont été recueillies aux différentes étapes du processus de purification et analysées en triplicata par immunobuvardage contre différents marqueurs d'organelles cellulaires (figure 10). Comme contrôle, un échantillon correspondant à l'homogénat immédiatement après le cassage du matériel a été utilisé (Tot.). L'infection a été confirmée par un marqueur de l'enveloppe virale, la glycoprotéine virale D (gD). Après la centrifugation à basse vitesse (CBV), l'interface était riche en endosomes tardifs, en lysosomes (Lamp-1), en Golgi (Golgine-97 et GS27), en RE (calnexine et BiP), en mitochondries (Tom 20), en Actine-gamma et en noyaux (p62). Il est à noter que cette fraction contenait aussi toutes les cellules intactes. Le surnageant (Sur.) qui découlait de la CBV était riche en endosomes précoces (EEA1), en Actine-gamma et en RE, surtout pour l'infecté (BiP). Des traces de mitochondries (Tom 20), de noyaux (p62), de Golgi (Golgine-97), d'endosomes tardifs et de lysosomes (Lamp-1) ont aussi été observées. L'interface obtenue de la CBV a été déposée sur gradient discontinu d'Optiprep. En plus de l'interface 29/35, seul le matériel mock retrouvé à l'interface 25/27 était assez important pour être récupéré et analysé. L'interface 27/29 des échantillons mock et infecté n'a pas été présentée, étant donné qu'elle ne contenait pas de matériel. L'interface 25/27 était riche en Golgi (GS27 et Golgine-97), en RE (calnexine et BiP), en noyaux (p62), en Actine-gamma, en mitochondries (Tom20), en endosomes tardifs et en lysosomes (Lamp-1). Les fractions provenant de l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep étaient riches en noyaux (p62), contenaient un peu de RE (calnexine et BiP), de Golgi (GS27 et

Golgi-97), d'endosomes tardifs et des lysosomes (Lamp-1). Dans cette fraction, des traces de mitochondries (Tom20) et d'Actine-gamma ont été remarquées. L'immunobuvardage à l'aide de l'anticorps contre le récepteur de la transferrine (RTf), un marqueur fréquemment recyclé à la membrane plasmique suite à son transit des endosomes précoces (77), n'a pas permis de caractériser l'efficacité de la perte de la membrane plasmique et des endosomes précoces des noyaux, étant donné qu'aucun signal n'a été obtenu dans les fractions mock, et ce, malgré plusieurs essais. Contrairement au signal des mitochondries (Tom 20) celui de BiP, de la calnexine et de p62 était un peu plus intense dans l'échantillon 29/35 mock que dans l'infecté. Donc, la fraction 29/35 contenait, tel que désiré, des noyaux et du RE, mais aussi quelques endosomes tardifs, lysosomes et du Golgi, ainsi que des traces d'Actine-gamma et de mitochondries.

3.1.4 Déplétion des membranes nucléaires

Les noyaux mock ou infectés obtenus de l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep étaient partiellement purifiés. La prochaine étape envisagée consistait à immunoprécipiter les virions périnucléaires à l'aide d'anticorps contre les glycoprotéines virales enchâssées dans l'enveloppe virale. Pour ce faire, nous avons d'abord testé différentes techniques pour se débarrasser totalement des glycoprotéines virales présentes dans l'enveloppe nucléaire et des autres organites. Cette étape était nécessaire pour augmenter la pureté des virions périnucléaires.

3.1.4.1 Avidité de différents anticorps pour les protéines nucléaires

Dans l'objectif d'employer les anticorps les plus efficaces lors du processus de déplétion des membranes nucléaires, l'avidité de différents anticorps spécifiques à des protéines transmembranaires du noyau a été déterminée. Pour ce faire, trois volumes différents de chaque anticorps ont d'abord été incubés avec des noyaux mock, d'un gradient discontinu d'Optiprep, puis avec des anticorps secondaires fluorescents. L'avidité des anticorps a été quantifiée en unités arbitraires (UA) avec

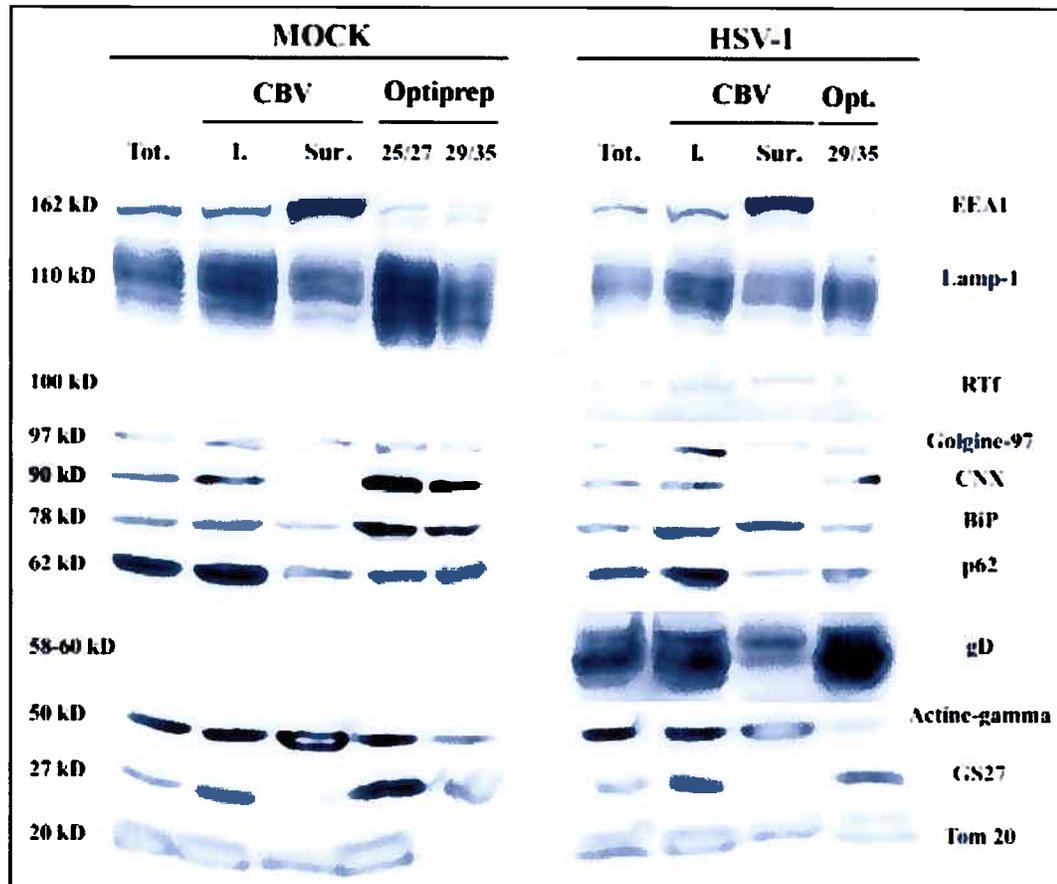


Figure 10. Analyse par immunobuvardages des fractions durant la purification des noyaux

Au cours du protocole d'isolation des noyaux mock et infectés avec HSV-1, des fractions de 50 μ g de protéines ont été chargées sur un gel de 12 % de polyacrylamide pour électrophorèse et analysées par immunobuvardage contre plusieurs marqueurs intracellulaires. EEA1 : endosomes précoces; Lamp-1 : lysosomes et endosomes tardifs; RTn : récepteur de la transferrine; Golgine-97 et GS27 : Golgi; CNX : RE et MNE; BiP : RE et espace périnucléaire; p62 : pore nucléaire; gD (MCA-DL6) : glycoprotéine virale gD; Actine-gamma : cytosquelette et Tom 20 : mitochondries. Les poids moléculaires des molécules testées sont notés à gauche en kilo daltons (kD). Tot. : homogénat; CBV : centrifugation basse vitesse; I. : interface CBV; Sur. : surnageant CBV; 25/27 et 29/35 : interface entre 25 % et 27 % et entre 29 % et 35 % d'Optiprep.

un spectrofluorimètre. Le volume d'anticorps secondaires et la quantité de protéines nucléaires requises ont été déterminées préalablement (données non montrées). Des anticorps reconnus en MÉ ou en immunofluorescence pour lier les composantes du CPN ou la face interne de la MNI ont été envisagés dans l'immunodéplétion des membranes nucléaires. L'anticorps contre p62 lie le CPN tant du côté nucléaire que cytosolique (18). Mab 414 et QE5 sont reconnus pour lier différentes composantes du CPN (67) et l'anticorps contre le récepteur de la lamine B (RLB) reconnaît la protéine correspondante ancrée dans la MNI (voir 1.2.1 et 1.2.2). L'anticorps contre p62 a été testé en duplicata tandis que Mab 414, QE5 et l'anticorps contre le RLB ont été testés par un essai unique.

Dans la figure 11, un volume de 7.5 μ L d'anticorps Mab 414 ou QE5 semblait saturant. À ce même volume, l'intensité de fluorescence, des différents anticorps contre les protéines nucléaires était, en ordre décroissant : de 4 552 pour Mab 414, de 3 031.5 pour p62, de 2 357 pour QE5 et de 1 356 pour RLB.

3.1.4.2 Immunoprécipitation des protéines nucléaires avec différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de la protéine A

Pour confirmer que ces anticorps nucléaires fonctionnaient bien, l'immunoprécipitation des protéines nucléaires a été effectuée en duplicata à l'aide de billes de sépharose couvertes de la protéine A. Les protéines nucléaires libérées dans le surnageant de la CBV, après que les cellules mock s_3 HeLa aient été cassées avec le cell-cracker, ont été utilisées plutôt que celles retrouvées au niveau de noyaux intacts, puisqu'elles avaient l'avantage d'exposer plus d'épitopes aptes à être liés par les anticorps nucléaires. Après l'immunoprécipitation contre p62, QE5 ou Mab 414, les protéines liées aux billes de sépharose par le biais de la protéine A ont été chargées sur gels de polyacrylamide pour électrophorèse et analysées par immunobuvardage contre p62. Le signal maximal des protéines nucléaires (Total) correspondait aux protéines nucléaires avant l'immunoprécipitation. Une immunoprécipitation en absence d'anticorps primaire a été pratiquée en tant que contrôle.

Figure 11. Avidité de différents anticorps pour les membranes nucléaires

Des immunoprécipitations avec différents anticorps contre les protéines nucléaires ont été réalisées à partir de noyaux obtenus de l'interface 29/35 d'un gradient discontinu d'Optiprep (100 µg de protéines). Les immunoprécipitations ont été accomplies par l'incubation du matériel en microplaques avec différentes quantités d'anticorps primaires et ensuite avec un excès d'anticorps secondaires fluorescents. L'intensité de la fluorescence, indiquée en unités arbitraires (UA), a été quantifiée avec un spectrofluorimètre. QE5 : pore nucléaire et filaments cytoplasmiques; Mab 414 et p62 : pore nucléaire et RLB : récepteur de la lamine B ancré dans la MNI.

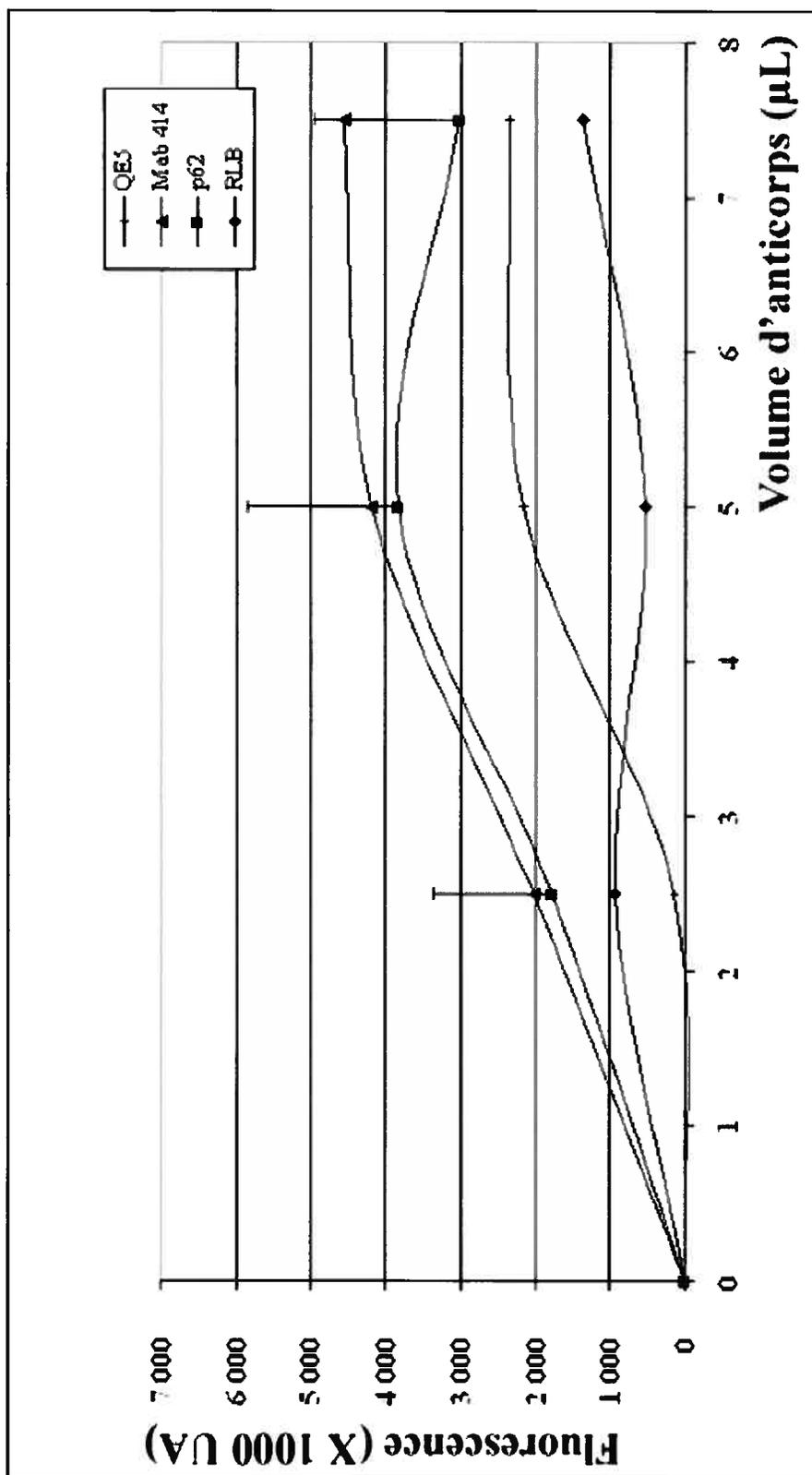
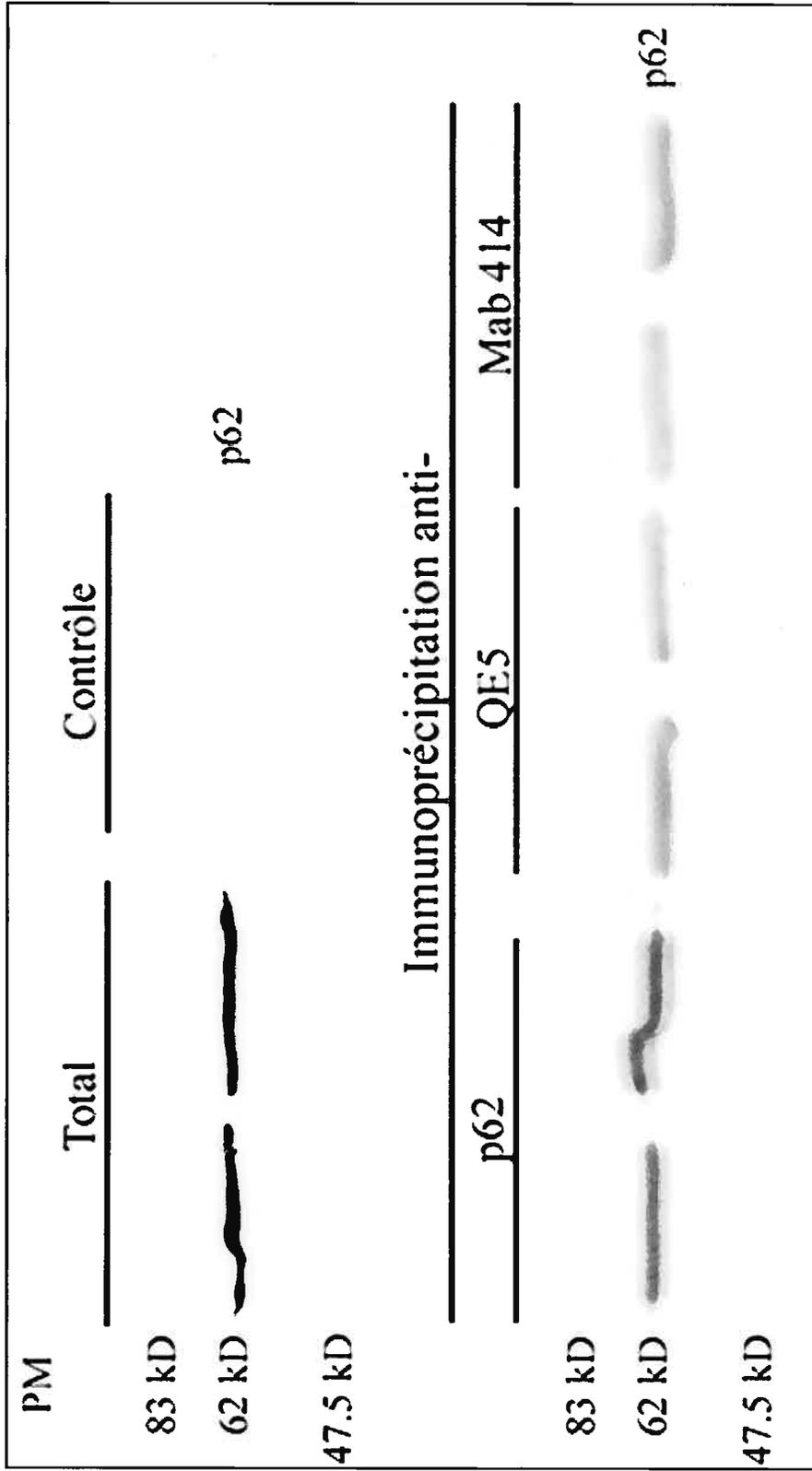


Figure 12. Immunoprécipitation de protéines nucléaires par différents anticorps spécifiques et des billes de sépharose couvertes de protéine A

Des immunoprécipitations à partir de préparations non infectées contenant des débris de membranes nucléaires (80 μ g de protéines) ont été faites en duplicata avec trois anticorps nucléaires différents : p62, QE5 et Mab 414 (tous à 1 mg/mL). Préalablement, les débris nucléaires ont été incubés avec un sérum pré-immun de lapin pour 15 minutes et ensuite des billes de sépharose couvertes par la protéine A ont été ajoutées pour 45 minutes. Les préparations ont été centrifugées pour 1 minute à 800 g et le surnageant incubé pendant 1 heure avec 2 μ g d'anticorps primaires et des billes de sépharose. Les préparations ont été centrifugées à nouveau, les billes lavées et finalement les protéines liées aux billes chargées sur gels de 12 % de polyacrylamide pour électrophorèse. L'efficacité de l'immunoprécipitation a été analysée par un immunobuvardage contre la nucléopore p62. Total : Protéines nucléaires avant immunoprécipitation, Contrôle : immunoprécipitation sans anticorps primaires, QE5 : pore nucléaire et filaments cytoplasmiques, Mab 414 et p62 : pore nucléaire. PM : poids moléculaires des marqueurs électrophorétique indiqués en kilo Daltons (kD).



Tel qu'observé à la figure 12, l'immunoprécipitation avec l'anticorps p62 permettait une meilleure récupération de nucléoporine p62 que QE5 ou Mab 414. Par contre, la quantité récupérée correspondait au plus à 50 % du signal total. L'immunoprécipitation était spécifique, puisqu'il n'y avait aucun bruit de fond décelable dans l'échantillon contrôle.

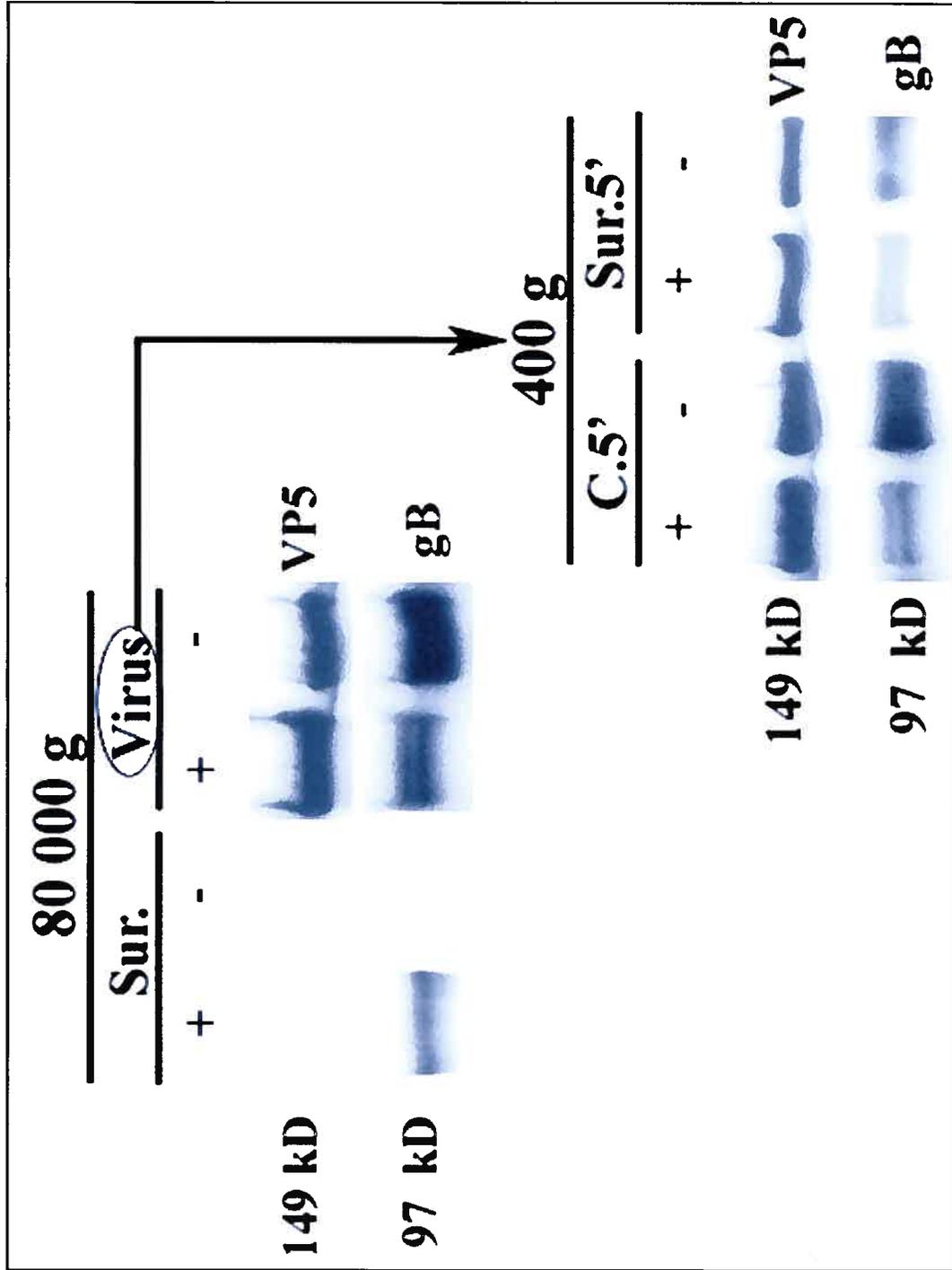
3.1.4.3 Culottage à basse vitesse des capsides enveloppées et non enveloppées

La technique de déplétion la plus rapide et surtout la plus simple était sans aucun doute l'immunoprécipitation. Toutefois, selon divers laboratoires, les virions seraient aisément centrifugés (communication du Dr B. Sodeik, Dépt de Virologie, École Médicale de Hannover, Hannover, Allemagne), ce qui empêcherait donc leur séparation des membranes nucléaire par cette approche. Afin de vérifier si l'immunoprécipitation des membranes nucléaires était envisageable, la capacité de culotter les virions a donc été examinée. Pour ce faire, des virions extracellulaires ont été récupérés du milieu de culture après une infection. Pour comparer les virions enveloppés aux nucléocapsides sans enveloppe, des virions extracellulaires ont été traités 30 minutes avec 1 % de Triton et 150 mM de NaCl (102) pour dénuder les capsides de leur enveloppe. Les virions intacts (-) ou traités au détergent (+), ont été centrifugés à 80 000 g pour 30 minutes, le culot obtenu correspondant au total de virus (Virus) (figure 13). Le surnageant de l'échantillon de virions non lysés obtenu par la centrifugation à 80 000 g (Sur. 80 000 g) servait de contrôle pour l'efficacité de la lyse. Ces capsides nues ou enveloppées ont ensuite été resuspendues et centrifugé à 400 g pour 5 minutes. Après la seconde centrifugation, des fractions du culot (C.5') et du surnageant (S.5') ont été récupérées, mises sur gels de polyacrylamide et analysées par immunobuvardage contre la glycoprotéine virale de l'enveloppe gB et la protéine majeure de la capside VP5. Le signal maximal attendu pour chaque protéine virale correspondait au culot total de virus (Virus).

Tel qu'observé à la figure 13, l'échantillon traité au détergent était dépourvu d'une partie de son enveloppe, puisque la glycoprotéine gB, d'environ 97 kD (57), se

Figure 13. Culottage à basse vitesse des capsides enveloppées et non enveloppées

Des virions extracellulaires HSV-1 ont été traités (+) ou non (-) avec 1 % de Triton X-100 afin de lyser leur enveloppe lipidique. Les virions ont ensuite été centrifugés à 80 000 g pour 1 heure. Le culot de virus (Virus) a été resuspendu et centrifugé de nouveau à 400 g pour 5 minutes. Des fractions équivalentes ont été chargées sur gels 8 % de polyacrylamide pour électrophorèse. Un immunobuvardage contre la protéine majeure de la capsid VP5 (NC-1) et la glycoprotéine virale de l'enveloppe du virion gB (R-69) ont finalement été faits. Sur. : surnageant après centrifugation à 80 000 g, Virus : culot de virus après centrifugation à 80 000 g, C.5' et Sur.5': culot et surnageant obtenus après 5 minutes de centrifugation à 400 g. Les poids moléculaires des molécules testées sont notés à gauche en kilo daltons (kD). Cette expérience a été effectuée en duplicata.



trouvait en partie dans le surnageant du lysat (Sur. 80 000 g). Par contre, la lyse de l'enveloppe était incomplète, telle que constatée par la présence de gB dans le total des virions traités (Virus +). Chez les virions traités ou non au détergent, la protéine VP5 de 149 kD (13) et gB, étaient clairement détectables dans le culot après seulement 5 minutes à 400 g (C.5'). Par conséquent, les virions enveloppés et non enveloppés précipitaient rapidement à basse vitesse, ce qui excluait la possibilité d'une séparation des virions périnucléaires et des membranes nucléaires par immunoprécipitation à l'aide de billes de sépharose.

3.1.4.4 Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne MACS et billes magnétiques

Puisqu'il était impossible de dépler les membranes nucléaires par centrifugation (figure 13), nous avons opté de le faire avec des billes magnétiques. Dans le but de dépler un maximum de membranes nucléaires, plusieurs essais ont été tentés par immunodéplétion sur des colonnes MACS (figure 14). Tout d'abord, des noyaux infectés issus du gradient discontinu d'Optiprep, étaient cassés par plusieurs cycles de congélation et de décongélation ou par sonication pour exposer les épitopes aptes à être liés par les anticorps nucléaires et libérer les virions périnucléaires. L'anticorps contre p62 a été utilisé à maintes reprises, puisque son aptitude à immunoprécipiter des débris nucléaires à l'aide de billes de sépharose couvertes par la protéine A (figure 12) était la meilleure. Différentes quantités d'anticorps contre p62 ont été utilisées afin de déterminer quelle quantité était requise pour immunoprécipiter toutes les membranes nucléaires. L'incubation des noyaux cassés en présence de l'anticorps primaire a été effectuée en présence d'un peptide synthétique inhibiteur des liaisons non spécifiques. Celles-ci pouvaient se produire entre la chaîne constante de l'anticorps et le récepteur Fc présent sur l'hétérodimère gE/gI de l'enveloppe virale. Les incubations avec les différents anticorps et les étapes de lavage et d'élution ont été effectuées à l'aide d'un tampon dégazé composé de 0.5 % de BSA, afin d'éviter de boucher les colonnes MACS avec des bulles d'air et de réduire les liaisons non spécifiques. Au cours du processus de déplétion, des

fractions équivalentes ont été recueillies à différentes étapes, mises sur gels de polyacrylamide et analysées par immunobuvardage contre p62 et gB. L'homogénat nucléaire avant l'immunodéplétion a été représenté par Tot.

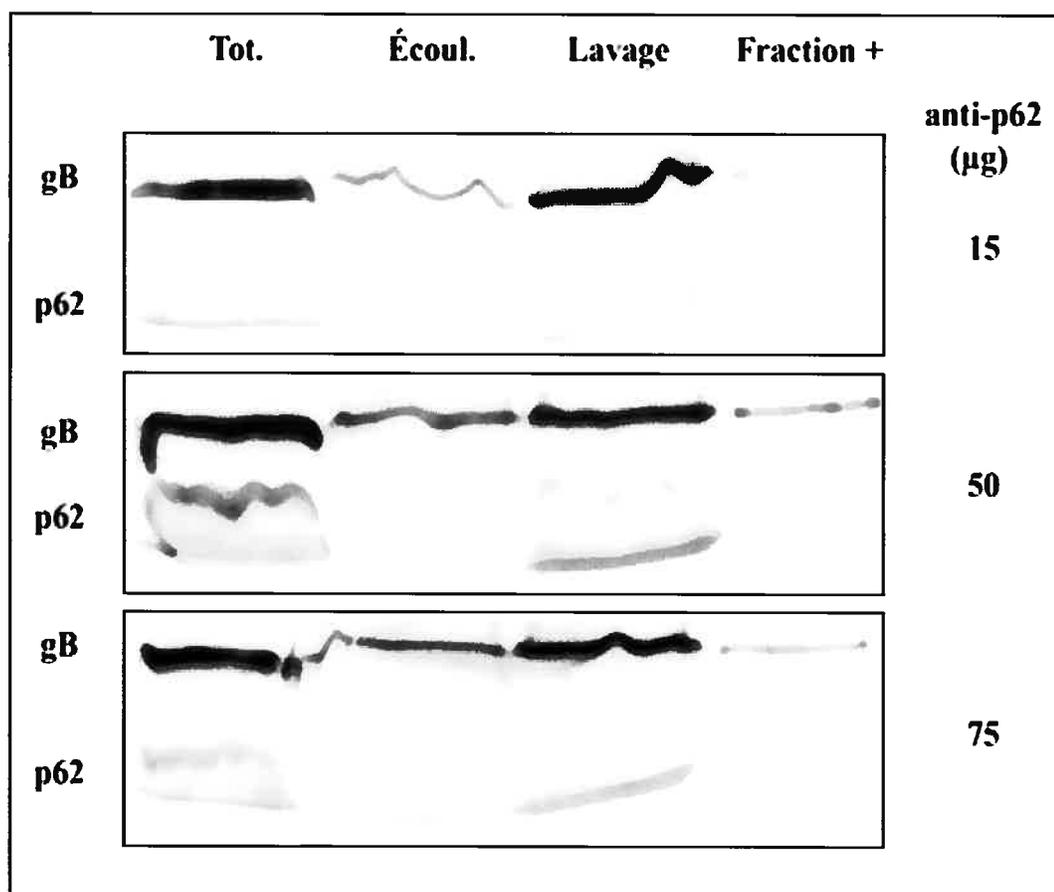
Malgré l'hétérogénéité du signal total en p62 pour les différentes quantités d'anticorps testées, l'immunobuvardage contre cet anticorps a montré que dans aucune des trois situations il était possible de détecter le matériel nucléaire dans l'éluat (Fraction +) (figure 14). Le marqueur nucléaire se trouvait exclusivement dans le puit de la fraction de lavage. L'immunobuvardage contre gB montrait que les virus et les glycoprotéines présentes sur les débris de membranes nucléaires n'étaient pas non plus liés à la colonne et se retrouvaient essentiellement dans les fractions passant à travers la colonne (Écoule.) et celles de lavage. Par contre, une faible portion se retrouvait dans la fraction positive. Dans d'autres expériences, l'immunodéplétion a été réalisée en présence de trois anticorps combinés, soit p62, Mab 414 et QE5. Les résultats ont montrés que la présence des anticorps combinés ne permettait pas de récupérer plus de membranes nucléaires dans la fraction positive. La presque totalité du matériel nucléaire se retrouvait de nouveau dans les fractions de lavage (données non montrées). Cependant, chacun de ces trois anticorps pris individuellement dans l'immunoprécipitation de noyaux fonctionnait bien, tel que vu à la figure 12. Il était donc clair que cette technique ne parvenait pas à dépléter de façon efficace les membranes nucléaires.

3.1.4.5 Déplétion des membranes nucléaires par le marquage des noyaux à la biotine-NHS

Étant donné que le système de colonnes MACS n'était pas adéquat pour immunodépléter les noyaux, nous avons envisagé de marquer des noyaux avec de la biotine-NHS. Cette nouvelle approche aurait, par ailleurs, l'avantage d'immunodépléter les autres organites contaminant la préparation de noyaux. Plusieurs essais ont été tentés, autant au niveau des noyaux mock qu'infectés. Étant donné que la biotine est de petite taille, celle-ci pouvait théoriquement s'infiltrer dans le nucléoplasme en traversant le CPN et marquer, en plus des contaminants post-

Figure 14. Immunodéplétion des membranes nucléaires par colonne et billes magnétiques

Des immunodéplétions à partir de préparations infectées contenant des débris de membranes nucléaires (500 µg de protéines) ont été faites avec trois quantités différentes d'anticorps primaires anti-nucléoporine p62 à 1 mg/mL (indiquées en µg à droite). Les anticorps primaires ont été incubés pour 30 minutes avec la préparation. Un volume de 200 µL de billes magnétiques MACS couvertes d'anticorps secondaires a ensuite été ajouté à la préparation pour 40 minutes avant de le déposer sur des colonnes de déplétion LD MACS. La colonne a été lavée avec du tampon dégazé. Des fractions équivalentes ont été chargées sur gels de 8% de polyacrylamide pour électrophorèse et analysées par immunobuvardage contre la nucléoporine p62 et la glycoprotéine virale gB (R-69). Tot. : homogénat nucléaire avant l'immunodéplétion, Écoule. : matériel s'écoulant à travers la colonne et Fraction + : éluat. Ces immunodéplétions ont été reproduites plus de trois fois.



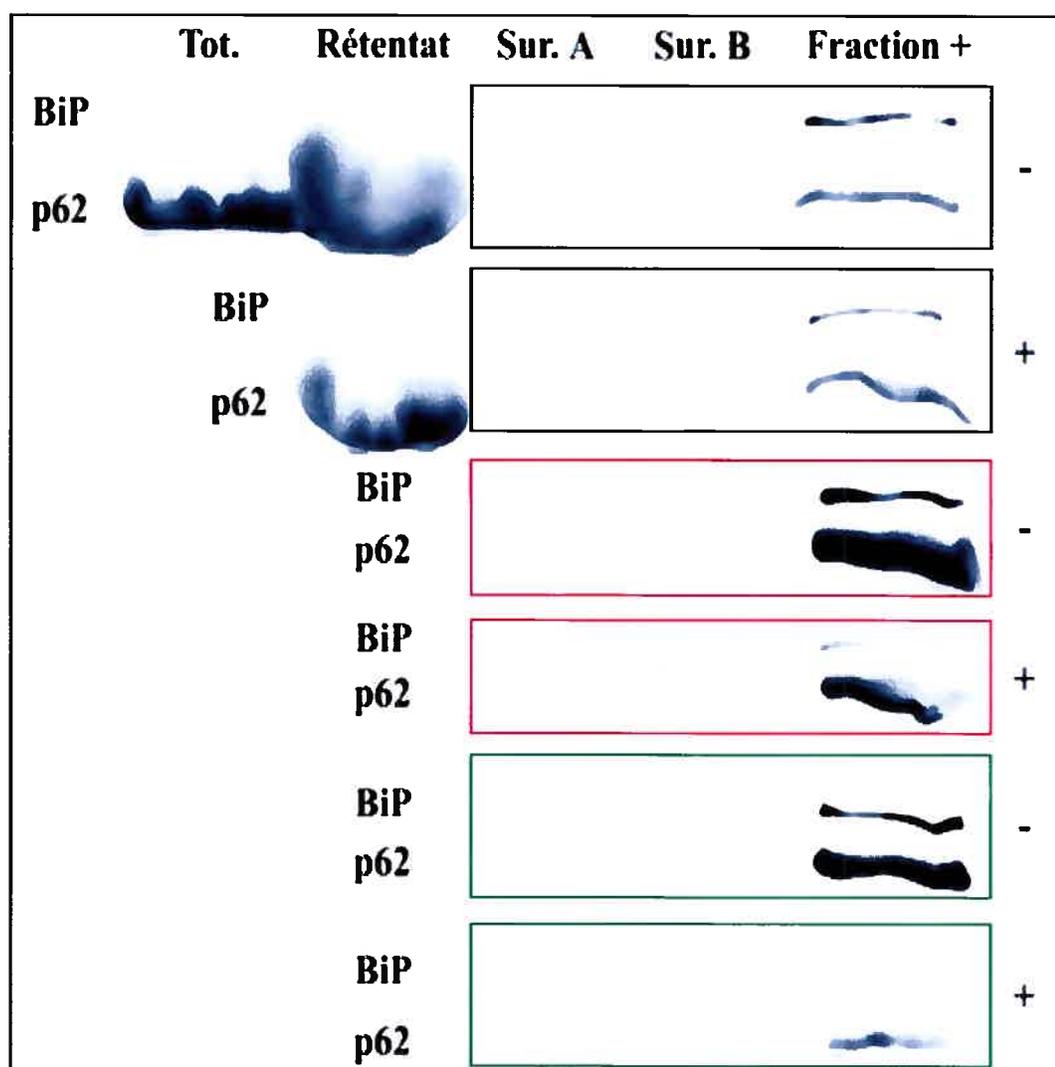
nucléaires (figure 10), la MNI. La quantité de biotine nécessaire à la saturation du matériel a été préalablement déterminée par titration. Pour ce faire, des préparations contenant 100 µg de noyaux prélevés à l'interface de la CBV ont été marqués par différentes quantités de biotine. Les différentes préparations ont ensuite été analysées par immunobuvardage avec la streptavidine-HRPO. Les résultats ont montrés que 20 µg de biotine suffisaient pour saturer les 100 µg de noyaux (données non montrées).

Suite au marquage de noyaux avec la biotine, l'excès de biotine a été retiré de la préparation par une dialyse et les noyaux retenus dans le tube à dialyse (Rétentat) cassés par sonication pour libérer les virions périnucléaires. Les débris marqués par la biotine (+) ont été incubés en présence de billes magnétiques couvertes de streptavidine, et ce, à différentes concentrations de BSA. Un contrôle sans biotine (-) a été effectué pour s'assurer de la spécificité de l'immunodéplétion. Un immunobuvardage des différentes fractions contre p62 a été effectué. Pour s'assurer que la biotine ne marquait pas la lumière du RE, où se trouvaient les virions périnucléaires, un immunobuvardage contre BiP a également été fait. La figure 15 a montré que la presque totalité du matériel nucléaire était récupéré après la dialyse (voir Rétentat). Par contre, indépendamment du pourcentage de BSA qui a été utilisé pendant l'incubation des noyaux avec les billes couvertes de streptavidine, la récupération de p62 dans la fraction positive (Fraction +) était peu spécifique. Si l'augmentation de la quantité de p62 récupérée dans la fraction positive semblait influencée par le pourcentage de BSA dans le tampon d'incubation, il reste qu'elle n'était pas spécifique. En effet, en l'absence de biotine mais avec 2.5 % ou 5 % de BSA, la quantité de matériel nucléaire récupérée était semblable ou supérieure à celle obtenue en présence de biotine. L'immunobuvardage contre BiP, n'a pas pu montrer l'abondance de la protéine luminale dans le total et le rétentat, étant donné l'absence de signal, possiblement dû au manque de sensibilité de l'anticorps. Cependant, un enrichissement de BiP par les billes expliquerait pourquoi la protéine a été détectée dans la fraction positive autant en présence qu'en absence de biotine.

Étant donné que l'interaction entre la biotine et la streptavidine est très forte, il semblait probable que les conditions utilisées lors de l'électrophorèse étaient

Figure 15. Déplétion des membranes nucléaires par marquage à la biotine et isolation avec des billes magnétiques couvertes de streptavidine

Des noyaux mock ont été isolés de cellules s_3 HeLa par rupture avec un cell-cracker en condition hypotonique suivi de la CBV. Les noyaux ont été prélevés (100 μ g de protéines), incubés pour 30 minutes avec 50 μ g de biotine (+) ou sans biotine (-) puis dialysés pour 4 heures. Ils ont ensuite été incubés pendant 14 heures avec des billes magnétiques couvertes de streptavidine en présence de 1 % (encadrés en noir), 2.5 % (encadrés en rouge) ou 5 % (encadrés en vert) de BSA comme agent bloqueur. Les membranes nucléaires liées aux billes magnétiques ont été isolées sur un aimant et lavées à deux reprises. Des fractions équivalentes au cours du processus ont été chargées sur gels de 7 % de polyacrylamide pour électrophorèse et analysées par immunobuvardage contre les protéines BiP et p62. Tot. : noyaux intacts avant immunodéplétion, Rétentat : rétentat après la dialyse, Sur. A et Sur. B : respectivement, premier et deuxième lavages et Fraction + : éluat. Ces déplétions ont été reproduites plus de trois fois.



inadéquates pour dissocier les protéines marquées des billes magnétiques. Pour vérifier si la récupération du matériel biotinylé était plus importante que celle observée plus haut, le contenu des gels de concentration « stacking gels » a aussi été transféré sur des membranes de PVDF et analysé par immunobuvardage. L'immunobuvardage contre p62 a bien montré la présence de matériel nucléaire biotinylé emprisonné dans les puits du gel. Par contre les problèmes de spécificité étaient toujours présents puisqu'il y avait autant de p62 récupéré en présence ou en l'absence de biotine (données non montrées).

Dans le but d'augmenter la spécificité et le rendement du matériel nucléaire récupéré, plusieurs essais ont été tentés où le temps de marquage du matériel à la biotine a été allongé. Alternativement, le marquage à la biotine et les dialyses ont été effectués en présence et en l'absence de 1 % de BSA. Les billes magnétiques ont aussi été prétraitées avec 10 % de BSA. Le temps d'incubation du matériel biotinylé avec la streptavidine en présence de 150 mM de NaCl et le volume de billes ont été diminués. La récupération du matériel marqué a aussi été tentée en deux immunoisolations successives, c'est-à-dire après avoir incubé le matériel marqué avec les billes magnétiques et l'avoir isolé sur aimant, le surnageant obtenu a été incubé à nouveau avec d'autres billes. Des billes provenant de la compagnie Pierce ont aussi été testées. Le tampon de lavage a été additionné de 500 mM de NaCl. Cependant, dans aucune de ces conditions, le matériel nucléaire n'a pu être récupéré de façon spécifique et dans une proportion assez intéressante pour que la technique ait été poursuivie (données non montrées).

3.1.4.6 Déplétion des membranes nucléaires à l'aide de billes magnétiques avec des groupements NH₂ activés à leur surface

La déplétion des membranes nucléaires a ensuite été envisagée à l'aide de billes magnétiques couvertes de groupements NH₂ activables par la glutaraldéhyde. Ces billes sont aptes à établir des interactions avec tous les groupements amines et carbonyles présents à la surface des noyaux non cassés et des organites contaminants. Après le marquage des noyaux intacts avec ces billes, la préparation, tirée d'un essai

unique, a été lavée à quelques reprises et traitée avec 0.1 % d'éthanolamine, afin de stabiliser les bases de Schiff établies et réduire les groupements libres des billes pour éviter qu'elles interagissent avec les virions périnucléaires lors de la sonication ultérieure des noyaux. La figure 16 a montré des noyaux non infectés provenant de l'interface de la CBV et qui ont été initialement utilisés. L'incubation des noyaux mock avec 5 μ L de billes magnétiques, dont leurs groupements NH_2 ont été activés par 8 % de glutaraldéhyde, permettait le recouvrement de tous les noyaux. Des gros agrégats de billes étaient présents sur environ 30 % du matériel marqué (noyau en haut à gauche de la figure 16). Le reste du matériel était couvert par des billes disposées en petits groupements ou en chaînettes (noyau en haut à droite de la figure 16). La situation idéale, où presque la totalité de la surface du noyau était couverte s'est produite sur moins de 30 % du matériel (noyau en bas au centre de la figure 16). Il est à noter que la présence de 0.1 % d'éthanolamine détruisait la plupart des noyaux, particulièrement lorsqu'ils étaient incubés avec une faible quantité de billes. Par ailleurs, les billes formaient déjà de nombreux agrégats suite à leur activation, avant leur incubation avec les noyaux (données non montrées). Donc, il s'agissait de la technique de déplétion des débris membranaires la plus prometteuse, mais à parfaire afin de réduire l'agrégation initiale des billes entre elles et pour maximiser leur capacité à couvrir uniformément la surface de l'enveloppe nucléaire.

3.2 Isolation des virions extracellulaires

3.2.1 Avidité de différents anticorps pour les glycoprotéines virales

Dans l'objectif d'employer les anticorps les plus efficaces lors du processus d'immunoisolation des virions périnucléaires et extracellulaires, l'avidité de différents anticorps spécifiques à des glycoprotéines virales a été déterminée. Pour ce faire, trois volumes différents du même anticorps ont été incubés avec une source abondante de virions enveloppés cytosoliques ou périnucléaires contenue dans le surnageant de la CBV des cellules cassées infectées. L'avidité des anticorps a été déterminée à l'aide d'anticorps secondaires fluorescents, dont l'intensité du signal a été quantifiée en unités arbitraires (UA) avec un spectrofluorimètre. Comme pour les

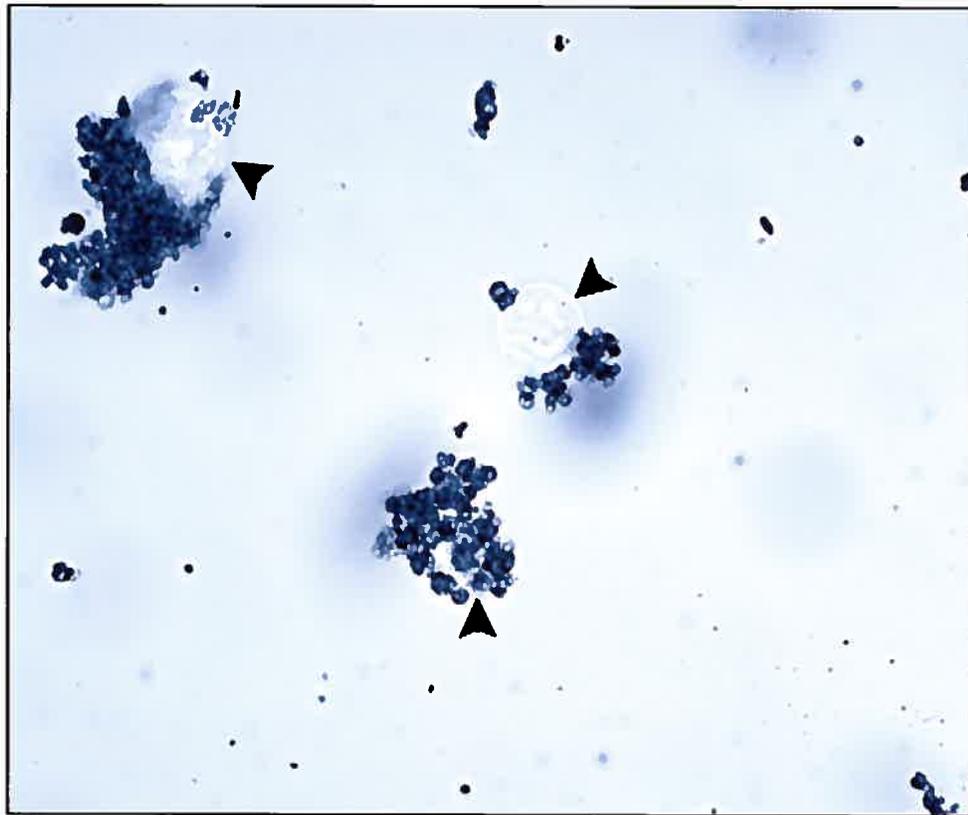


Figure 16. Déplétion des membranes nucléaires à l'aide de billes magnétiques avec des groupements NH_2 activés

Des noyaux mock ont été isolés de cellules $s_3\text{HeLa}$ par rupture avec un cell-cracker en condition hypotonique suivi de la CBV. Les noyaux ont été prélevés (150 μg de protéines) et incubés 14 heures avec 5 μL de billes magnétiques de 1.11 μm de diamètre à groupements NH_2 activés. Par la suite, les groupements NH_2 activés non liés des billes ont été réduits avec 0.1 % d'éthanolamine, 5 mM de DTT et 5 % de BSA. Les noyaux liés aux billes ont été isolés sur un aimant, mis sur lames et observés par microscope photonique. Des noyaux couverts de billes magnétiques sont montrés par des têtes de flèche (\blacktriangleright). Grossissement de 1 000 X.

anticorps dirigés contre les noyaux (figure 11), le volume d'anticorps secondaires et la quantité de protéines virales requises pour obtenir un signal perceptible par l'appareil ont été déterminées préalablement (données non montrées).

La figure 17 indiquait qu'un volume de 7.5 μ L d'anticorps contre les glycoprotéines virales donnait une intensité de fluorescence, en ordre décroissant de 141 041 pour gD MCA-DL6, de 98 791 pour gB R-69, de 6 593 pour gL, de 6 036.5 pour HSV-1 et -2 anti-gD, de 5 636 pour gD MCA-1D3, de 3 110 pour gC, de 2 986 pour gE, de 939 pour gD 15 201 et de 270 pour gD Mab8684. À ce même volume, les différents anticorps contre les glycoprotéines virales, gB, gC, gD, gE et gL, ne semblaient pas suffisants pour saturer l'ensemble du matériel viral. Malgré cela, les signaux obtenus avec les anticorps gD MCA-DL6 et gB R-69 étaient nettement supérieurs à ceux obtenus avec les anticorps contre les antigènes nucléaires (figure 11), des anticorps qui fonctionnaient bien en immunoprécipitation (figure 12). De plus, ces signaux démontrent la disponibilité des épitopes de ces antigènes viraux. Il semblait donc raisonnable de les tester pour l'immunoisolation des virions.

3.2.2 Immunoisolation des virions extracellulaires à l'aide de billes magnétiques

Les virions périnucléaires et extracellulaires ont tous deux une enveloppe contenant des glycoprotéines (48). Bien que la composition complète des virions périnucléaires était inconnue la présence de gB et gD sur ceux-ci a été documentée. Il était donc envisageable d'immunoisoler les virions périnucléaires et extracellulaires avec des anticorps dirigés contre gB et ou gD. L'immunoisolation des virions extracellulaires a donc été initialement pratiquée à l'aide de MCA-DL6, un anticorps spécifique à gD. Cet anticorps a été sélectionné plutôt que l'anticorps qui lie la glycoprotéine gB, soit R-69, étant donné qu'il était monoclonal plutôt que polyclonal, donc en principe plus spécifique. Il était d'ailleurs l'anticorps le plus avide parmi ceux qui ont été testés (figure 17).

Les expériences ont été pratiquées avec des virions extracellulaires, issus du milieu de culture après une infection avec un virus sauvage. Les virions ont été

Figure 17. Avidité de différents anticorps pour les glycoprotéines virales

Des immunodéplétions à partir de préparations infectées contenant des virions enveloppés (50 µg de protéines) ont été faites avec différents anticorps contre les glycoprotéines virales. Les immunoprécipitations ont été réalisées en microplaques par l'incubation du matériel avec les anticorps primaires et ensuite avec des anticorps secondaires fluorescents. L'intensité de la fluorescence, indiquée en unités arbitraires (UA), a été quantifiée avec un spectrofluorimètre. L'avidité des anticorps a été testée par essai unique, exceptée celle de HSV-1 et -2 anti-gD, gB R-69 et gD MCA-1D3 testée en duplicata.

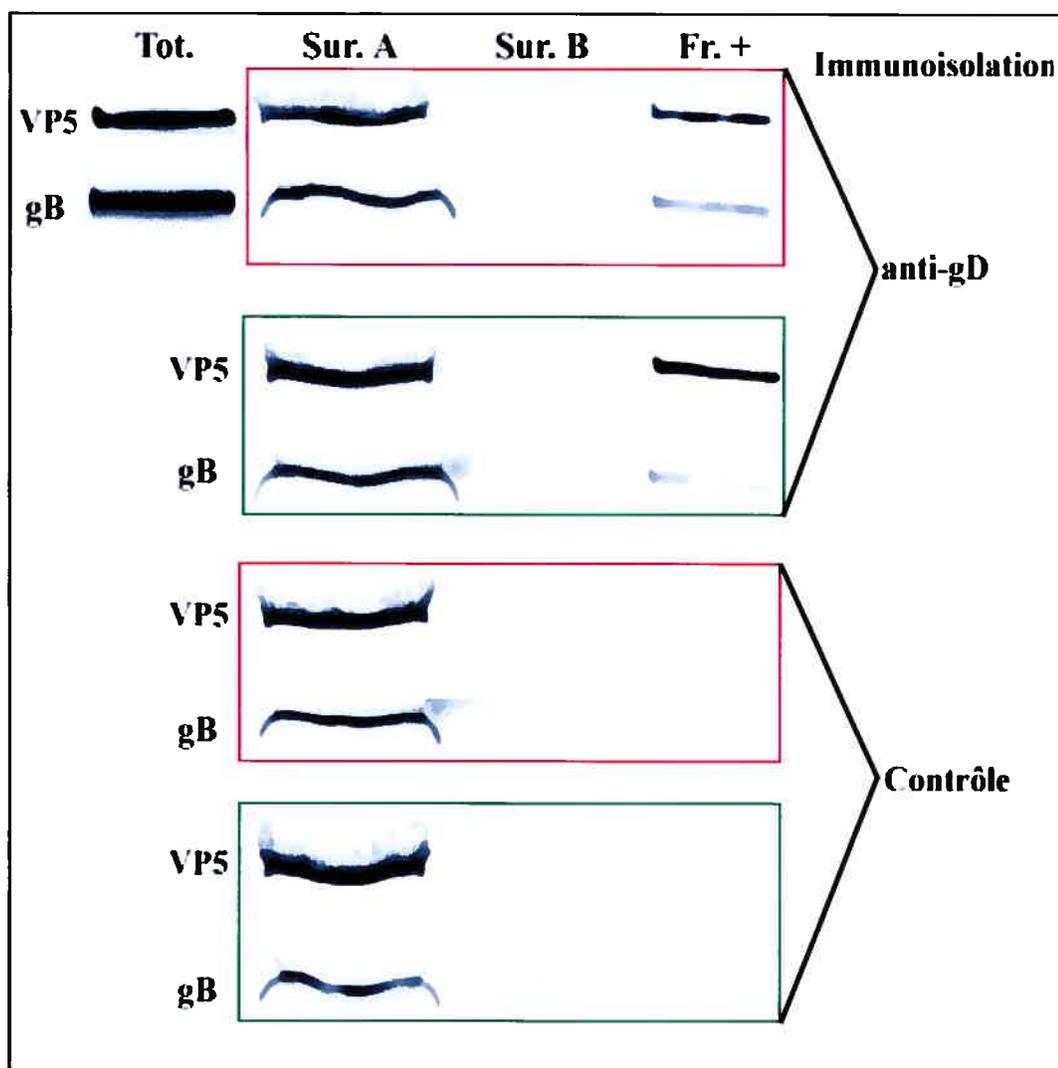
incubés avec deux quantités différentes d'anticorps primaires contre gD. Les anticorps primaires ont été préalablement couplés aux anticorps secondaires déjà greffés à des billes magnétiques par le manufacturier. L'incubation des virions avec les anticorps pré-couplés a été effectuée dans un tampon avec 1 % de BSA et 150 mM de NaCl afin de réduire les interactions non spécifiques. La spécificité de l'immunoisolation a été vérifiée avec l'isotype IgG2a, produit par la même espèce animale que l'anticorps contre gD. L'intégrité des virions extracellulaires isolés a été vérifiée par la présence de la capsidite et des glycoprotéines, grâce aux immunobuvardages contre VP5 et gB sur des fractions équivalentes récoltées à différentes étapes du processus. La figure 18 a montré qu'indépendamment de l'anticorps utilisé ou de la quantité employée, une grande partie du matériel viral, capsidite et glycoprotéine confondues, s'accumulait dans le surnageant A (Sur. A). Avec 48.4 µg d'anticorps contre gD, il y a moins de 20-30 % des glycoprotéines et des capsidites qui ont été récupérées dans la fraction positive (Fr. +). Lorsque la quantité d'anticorps augmentait, il n'y avait pas plus de matériel viral récupéré dans la fraction positive, possiblement parce que la première quantité d'anticorps était saturante ou que les anticorps secondaires présents sur les billes étaient limitants. Lors de l'immunobuvardage contre gB, l'immunoisolation semblait spécifique puisque ni les capsidites ni les glycoprotéines se trouvaient dans la fraction positive, et ce, peu importe la quantité d'isotype utilisée. Le matériel viral du contrôle se situait exclusivement dans le surnageant A. Rien n'a été détecté dans les surnageants B (données non montrées) et C (Sur. C), ce qui signifiait qu'un seul lavage était suffisant. Cependant, un immunobuvardage contre gD avec MCA-DL6 a montré que la spécificité de l'immunoisolation n'était pas totale puisque des contaminants ont été récupérés par réactivité croisée, tandis qu'un autre avec MCA-1D3 indiquait que ce dernier anticorps était non utilisable dû à son manque de sensibilité (données non montrées).

Dans le but d'augmenter le rendement en virions dans la fraction positive, une seconde immunoisolation a été effectuée sur le surnageant A. Les résultats obtenus ont été les mêmes que ceux observés à la figure 18 (données non montrées), c'est-à-dire qu'une petite quantité de matériel viral a été récupérée dans la fraction positive et

que la majorité se retrouvait dans le surnageant A. Par conséquent, le rendement de cette technique était un peu faible, mais la spécificité satisfaisante.

Figure 18. Immunisolations des virions extracellulaires à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps contre gD

Des virus extracellulaires (25 μg de protéines) obtenus par centrifugation et issus du surnageant d'une infection des cellules $s_3\text{HeLa}$ avec HSV-1 (F) sauvage ont été incubés avec 150 μL de billes magnétiques couvertes d'anticorps secondaires et préalablement incubées à 48 μg (encadré en rouge) ou 193.5 μg (encadré en vert) d'anticorps contre la glycoprotéine virale gD (MCA-DL6) à 17.5 mg/mL ou l'isotype IgG2a à 1 mg/mL. Les préparations ont été lavées sur aimant à deux reprises et les virions liés aux billes magnétiques ont aussi été isolés sur l'aimant. Pour chacune des conditions, des fractions équivalentes ont été chargées sur gels de 8 % de polyacrylamide pour électrophorèse. L'efficacité de l'immun isolation a été analysée par immunobuvardage contre VP5 (NC-1) et la glycoprotéine gB (R-69). Tot. : Virus extracellulaires avant l'immun isolation, Sur. A et Sur. B : respectivement, premier et deuxième lavages et Fr. + : virus liés aux billes. Ces immun isolations ont été reproduites en duplicata.



CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif du présent ouvrage était de mettre au point un protocole d'isolation des virions périnucléaires et extracellulaires, afin de comparer leur composition protéique par le biais de la protéomique. Cette technique confirmera, s'il y a lieu, la voie de ré-enveloppement et sera d'autant plus intéressante, puisqu'elle permettra de caractériser davantage le virus de HSV-1. Il sera possible de connaître, entre autres, l'ordre et la séquence d'addition des protéines du tégument et l'identité des protéines nécessaires au bourgeonnement des virions à la MNI.

Les présents travaux ont permis d'explorer différentes techniques de cassage de cellules, soit mécaniques ou par détergent, afin d'obtenir des noyaux dont l'intégrité de l'enveloppe est maintenue. Cet objectif a été atteint avec le cell-cracker. De plus, lors d'une purification par gradients discontinus de densité, le rendement en noyaux a été optimisé avec ceux composés d'Optiprep. Dans les processus de purification des noyaux, il est impossible d'obtenir un échantillonnage pur en une ou deux étapes, tel que confirmé par les immunobuvardages pratiqués contre divers organites cellulaires. L'immunoprécipitation classique des membranes nucléaires avec des billes de sépharose était impossible à réaliser, puisque les virions précipitaient à basse vitesse. Plusieurs techniques de déplétion des membranes nucléaires ont donc été tentées. Tout d'abord, l'immunodéplétion magnétique sur colonne de limaille de fer, ensuite le marquage à la biotine suivi d'une récupération avec des billes magnétiques couvertes par de la streptavidine et finalement le recouvrement des noyaux par des billes magnétiques couvertes de groupements NH_2 activés ont été testés. La dernière technique semble prometteuse mais reste à parfaire. En ce qui concerne l'isolation des virions extracellulaires, un protocole d'immunoisolation avec des billes magnétiques a été mis au point. Ce même protocole pourra servir à isoler les virions périnucléaires une fois la déplétion des membranes nucléaires résolue.

4.1 Isolation des virions périnucléaires

4.1.1 Cassage des cellules par le cell-cracker

Pour s'assurer d'isoler les virions périnucléaires, la technique de cassage employée devait maintenir l'intégrité de l'enveloppe nucléaire pour s'assurer de conserver le pool de ces virions dans la fraction nucléaire. Dès lors, il était possible de ségréger les virions cytoplasmiques des virions désirés emprisonnés dans l'espace périnucléaire. Il est important de noter que la majorité des expériences ont été pratiquées sur des cellules s_3 HeLa cultivées en suspension plutôt qu'en pétri, afin de limiter les dommages pouvant être causés aux noyaux, suite à leur détachement du pétri, en plus de permettre la production de grands volumes de préparation cellulaire. Les cellules en suspension ont été cultivées dans un milieu sans calcium, ce qui limitait la rigidité de leur cytosquelette et ainsi, lors du cassage, diminuait la tension pouvant causer des dommages à l'intégrité des noyaux (135).

Nous avons préalablement comparé l'efficacité de cassage en fonction du type de tampon utilisé. Les cellules non infectées ont été cassées dans un tampon isotonique ou hypotonique par des méthodes mécaniques avec le cell-cracker ou la seringue, deux méthodes où le rendement en noyaux était acceptable (figure 6B). Tel que décrit par Penman (105), les essais effectués confirment une meilleure efficacité de cassage en condition hypotonique (figure 5). Ce résultat s'explique par le fait qu'en condition hypotonique, la taille des cellules devient plus importante et qu'elles sont plus serrées dans le réservoir (chambre) de cassage de l'un ou l'autre des outils utilisés. Le gonflement des cellules permet de mieux différencier les noyaux des cellules qui sont pratiquement de la même taille dans les s_3 HeLa en condition isotonique. Il est aussi possible que le gonflement des cellules autant infectées que non infectées contribue à réduire la rigidité assurée par le cytosquelette. Tous ces facteurs contribuent à ce que la cellule se casse mais pas son noyau. Par conséquent, les cassages mécaniques en condition hypotonique ont été poursuivis.

Parmi les techniques de cassage de cellules testées, soit mécaniques avec le cell-cracker, le Dounce et la seringue ou par détergent avec le NP-40, nous observons en microscopie photonique, que le détergent donne le meilleur rendement

de cassage (Figure 6A). Il semble que les clairances de la seringue et du Dounce, soit respectivement 0.9 mm et 0.05 mm, permettent une efficacité de cassage supérieure au cell-cracker. Dans le cas, du rendement obtenu en noyaux, le cell-cracker éclipse toutefois toutes les autres techniques avec 40 % de rendement (figure 6B). Tel que vu en MÉ, le cassage par cavitation obtenu avec le cell-cracker d'une clairance de 0.042 mm, plutôt que celle suggérée par Penman (105), soit de 0.05 mm, permet de maintenir l'intégrité de l'enveloppe nucléaire autant au niveau des noyaux infectés (figure 9D) que non infectés (données non montrées). Ceci peut s'expliquer par le fait que la clairance du cell-cracker soit mieux adaptée, parmi tous les outils mécaniques employés, au diamètre qu'occupe le noyau des cellules s_3 HeLa. Quant au détergent, on observe qu'il est inadapté pour maintenir l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, qui diffère selon l'infection et l'état de santé des cellules. En effet, l'immunofluorescence du matériel obtenu après la lyse contre la calnexine, un marqueur à la fois du RE et de la MNE (12, 104), montre qu'à partir de 0.2 % de NP-40 le patron de marquage de la protéine ne correspond pas à celui observé normalement sur des enveloppes nucléaires intactes (figure 4). Ces observations confirment celles obtenues en MÉ, où la lyse cellulaire à 0.2 % de NP-40 provoque la dégradation des noyaux infectés et la perte de l'intégrité de leur enveloppe (figure 9A). Une lyse avec 0.1 % en NP-40 avec ou sans agitation (figures 9B et 9C) montre des noyaux infectés endommagés encore encerclés d'organites contaminants difformes. Ainsi, le pourcentage adéquat de NP-40 pour permettre une lyse efficace des cellules infectées se trouve dans une zone très fine et trop variable pour qu'on puisse envisager cette technique à des fins répétitives. D'ailleurs, le détergent risque de détruire l'enveloppe des virions périnucléaires qui est nécessaire pour notre étude protéomique. La MÉ a été utilisée pour vérifier l'état des noyaux isolés et l'aspect de leur enveloppe. Toutefois, leur fonctionnalité, un indice de l'intégrité de leur MNE, n'a pas été testée en vérifiant par exemple s'ils sont aptes à produire des ARN messagers ou produire des vésicules de COPII (voir 1.1.3.4). Considérant le risque d'altérer l'enveloppe des virions périnucléaires et la petite fenêtre utilisable du NP-40, nous avons opté pour une méthode mécanique pour casser les cellules.

4.1.2 Purification des noyaux par gradient discontinu d'Optiprep

Après avoir effectué une étape de purification grossière par la CBV, c'est-à-dire une centrifugation à 800 g pour 15 minutes, nous avons tenté de séparer les organites contaminants des noyaux en fonction de leur densité. Les gradients de densité les plus communément utilisés dans la littérature pour la purification des noyaux de cellules de mammifères sont composés de sucrose, de Nycodenz ou d'Optiprep. Ces trois matrices ont donc été testées. La densité des noyaux est d'environ 1.2 g/cm^3 dans les tampons de faible osmolarité et est supérieure à 1.30 g/cm^3 dans le sucrose (135). Des gradients ont donc été préparés selon les directives du fabricant pour isoler les noyaux. Les noyaux devaient ainsi se retrouver à l'interface entre la couche de 40 % (1.1821 g/cm^3) et celle de 70 % (1.3546 g/cm^3) pour le sucrose (66). Pour le Nycodenz, les noyaux devaient se retrouver à l'interface entre la couche de 35 % ($1.159 \text{ g/cm}^3 = 30\%$ et $1.212 \text{ g/cm}^3 = 40\%$) et celle de 80 % (1.426 g/cm^3) (113) et pour l'Optiprep, à l'interface entre les couches 29 % (environ 1.170 g/cm^3) et celle de 35 % (environ 1.2 g/cm^3) (50). Dans tous les cas, la couche la plus dense située au bas du gradient agit comme un coussin pour éviter aux noyaux de sédimenter au bas du tube et de s'agréger entre eux. Le plus haut rendement en noyaux a été obtenu avec le gradient d'Optiprep (figure 7). Les deux autres matrices n'ont pas permis de récolter une quantité mesurable de noyaux. Ces résultats montrent que l'iodixanol qui compose l'Optiprep est plus efficace que le Nycodenz ou le sucrose pour isoler les noyaux tout en évitant d'affecter leur osmolarité ou de modifier leur structure. Dans les gradients de sucrose, il est connu que les noyaux se retrouvent en condition d'hyperosmolarité. Par conséquent, ils perdent leur contenu en eau et alors leur structure s'endommage et leur fonctionnalité est affectée. Il est donc plus difficile de les séparer des différentes composantes cellulaires en évitant de les détruire. Dans le cas du gradient de Nycodenz, celui-ci est aussi reconnu pour modifier l'osmolarité de certaines organelles. L'absence de récolte de noyaux avec ces deux derniers gradients signifie que leur composition ne permet pas de maintenir l'intégrité nucléaire.

Afin de s'assurer que les structures récoltées à l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep sont vraiment des noyaux, nous avons lysé des cellules avec 0.5 % de NP-

40, une concentration typiquement utilisée pour libérer les noyaux des cellules sans égard à leur fonctionnalité (60). Les noyaux obtenus transitent à l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep (figure 8). Ces résultats, et ceux obtenus par la MÉ de l'échantillon infecté montré à la figure 9D, confirment que les structures retrouvées à l'interface 29/35 sont réellement des noyaux.

En moyenne 10 à 20 % (expériences non montrées et figures 7 et 8) du matériel de départ (cellules) était récupéré sous forme de noyaux à l'interface 29/35 du gradient d'Optiprep. Graham et al. (50) récupèrent aussi les noyaux au dessus de la couche composée de 35 % d'Optiprep et estiment récolter 90 % de l'ADN total chargé. Dans notre projet, le principal objectif du gradient discontinu est de parvenir à isoler des noyaux intègres. La formulation du rendement par Graham et al. ne peut pas être comparée avec nos résultats, puisqu'elle n'indique pas si la MNE est encore intacte. Malgré le fait que nous ne pouvons pas comparer notre rendement avec la littérature, il reste que les rendements en noyaux récupérés sont typiquement de 1-10 % (communications de divers collègues), ce qui signifie que notre méthode permet d'isoler davantage de noyaux, qu'ils soient infectés ou non. Hahn et al (56) ont pu récupérer sur un gradient de Percoll 30 % de noyaux transcriptionnellement actifs de muscles striés de rat. Le fait que ces noyaux proviennent d'un type cellulaire différent et qu'ils ne soient pas infectés constituent toutefois des facteurs importants. Par ailleurs, des noyaux dont la MNE est altérée peuvent sans doute demeurer transcriptionnellement actifs. Cette matrice ou un gradient d'Optiprep avec une densité supérieure, comme 40 % (1.222 g/cm^3), aurait pu être testé afin de vérifier s'il est possible d'augmenter notre rendement en noyaux.

Dans le but de vérifier le niveau d'enrichissement des noyaux obtenus à l'interface 29/35, les noyaux ont été analysés par immunobuvardage. Différentes fractions obtenues tout au long du processus d'isolation des noyaux montrent que les noyaux ont été partiellement enrichis (figure 10). En plus de la MÉ, la confirmation que les structures retrouvées à l'interface 29/35 soient des noyaux est fournie par un enrichissement des marqueurs du transporteur du CPN (p62), de la MNE et du RE (calnexine) et de la lumière du RE (BiP). L'interface est presque totalement exempte

d'endosomes précoces (EEA1), contient encore un peu de Golgi, d'endosomes tardifs et de lysosomes (Lamp-1) et des traces de mitochondries (Tom20) et d'Actine-gamma. Ceci n'est pas surprenant car les mitochondries ($1.15-1.20 \text{ g/cm}^3$) et les lysosomes ($1.10-1.15 \text{ g/cm}^3$) ont une densité dans un milieu de faible osmolarité semblable aux noyaux (135). D'ailleurs, il aurait été intéressant de vérifier si les peroxyosomes contaminent aussi l'interface 29/35, car ils ont une densité presque identique à celle des noyaux, soit entre 1.19 à 1.22 g/cm^3 . Cependant les anticorps disponibles au laboratoire ne fonctionnaient pas par immunobuvardage. La présence de marqueurs Golgiens sur les noyaux de l'interface 29/35 est justifiée par le fait que le Golgi peut-être en communication avec le RE (89) en plus que ce dernier soit contigu à la MNE (104). Il est possible que cela soit différent selon le type cellulaire employé et/ou qu'une couche d'Optiprep supérieure à 29 % aurait limité la présence des marqueurs de cette organelle avec les noyaux. L'intensité du signal de BiP, de la calnexine et de p62 est un peu plus intense dans l'échantillon 29/35 mock que pour les cellules infectées. Il est toutefois connu que la structure des noyaux est considérablement affectée et fragilisée par l'infection (93, 126). Les manipulations subséquentes ont assurément aussi eues un impact sur le maintien de l'intégrité des noyaux. Il semble néanmoins évident qu'au moins une partie significative des noyaux infectés ou non obtenus à l'interface 29/35 conserve leur deux enveloppes nucléaires et par conséquent les virus présents dans l'espace périnucléaire.

4.1.3 Déplétion des membranes nucléaires

Puisque les glycoprotéines virales présentes sur les virions périnucléaires se retrouvent aussi dans les enveloppes nucléaires et que nous planifions purifier les virions périnucléaires par immunoisolation contre ses glycoprotéines virales, il est important de d'abord éliminer les membranes nucléaires. La présence de ces glycoprotéines dans l'enveloppe nucléaire constitue un problème, car elle amènerait des conclusions erronées sur la composition protéique des virions périnucléaires déterminée éventuellement par protéomique. Puisque les virions enveloppés et non enveloppés précipitent à basse vitesse (figure 13), alors il est impossible de dissocier

les membranes nucléaires des virions par immunoprécipitation utilisant des billes de sépharose. Par conséquent, différentes techniques ont été envisagées pour exempter les membranes nucléaires des préparations, comme l'immunodéplétion avec des billes magnétiques et des colonnes MACS. Le marquage des noyaux avec la biotine-NHS et des billes magnétiques couvertes de streptavidine ainsi que le marquage des noyaux avec des billes magnétiques couvertes de groupements NH_2 activés à leur surface ont aussi été testés.

L'avidité de différents anticorps contre des antigènes de la membrane nucléaire a été déterminée par spectrofluorimétrie (figure 11) et celui contre la nucléoporine a été employé pour immunodépléter par billes magnétiques, les débris de membranes après le cassage des noyaux. Cette technique s'est avérée infructueuse, puisque que nous n'avons pas pu récupérer les protéines nucléaires qui se retrouvent plutôt dans le lavage (figure 14). Il est toutefois possible que la quantité de p62 présente dans la fraction positive était insuffisante pour être détectée par immunobuvardage. La détection de la glycoprotéine gB dans la fraction positive peut correspondre autant aux glycoprotéines enchâssées dans la membrane nucléaire que celles du virion enveloppé. Un immunobuvardage contre VP5 aurait pu être fait pour déterminer où les nucléocapsides se retrouvent. Il est difficile de déterminer quels facteurs ont nuis au succès de cette technique. Étant donné, qu'il n'était pas possible d'isoler des protéines nucléaires même en présence de trois anticorps nucléaires combinés (p62, QE5 et Mab 414) (données non montrées), il est probable que les affinités des trois anticorps étaient inefficaces, et ce, malgré le fait qu'ils fonctionnent en immunoprécipitation (figure 12) (103), en immunofluorescence (103) et en marquage immunologique en MÉ (67, 103). La faible valeur des intensités de fluorescence obtenues par spectrofluorimétrie pour les anticorps nucléaires (figure 11), comparativement à celles des anticorps de glycoprotéines virales (figure 17), peut appuyer cette hypothèse. En effet, l'anticorps gD MCA-DL6 détient une intensité de fluorescence qui est 31 fois plus élevée que celle de l'anticorps Mab 414. La faible affinité des anticorps nucléaires aurait pu être confirmée par la détection par immunobuvardage des protéines nucléaires dans les surnageants obtenus lors des tests

d'avidité (figure 11). Il faut aussi envisager que les antigènes n'étaient peut-être pas suffisamment accessibles ou que leurs épitopes étaient dénaturés. D'ailleurs, une trop faible densité d'anticorps secondaires couvrant la surface de la bille pourrait limiter le rendement de déplétion. Étant donné, que l'hétérodimère gE/gI est reconnu pour être présent au niveau des membranes plasmiques des cellules infectées (34), alors rien n'exclut la possibilité qu'il puisse se retrouver aussi au niveau de l'enveloppe nucléaire ou intégrée dans l'enveloppe du virion périnucléaire. La présence de cet hétérodimère aurait pour effet de réduire la récupération de p62 puisqu'il séquestrerait les anticorps utilisés. Pour contrer cette situation, un peptide inhibiteur du récepteur Fc a été incorporé à la réaction (figure 14). Cependant, l'ajout de ce peptide n'a probablement pas contribué à accroître le rendement en protéines nucléaires, puisqu'il a été démontré que cet hétérodimère n'interagit pas avec les chaînes constantes des anticorps de souris utilisés, mais plutôt avec celles produites chez l'homme et le lapin (82). Il est également possible que la force magnétique engendrée dans la colonne soit insuffisante pour récupérer les débris de membranes nucléaires marqués aux anticorps, mais adaptée pour la déplétion de particules plus grosses comme des cellules entières. Les colonnes de sépharose pourraient être considérées comme une alternative, puisque les équipes de Platt et Tuddenham (81, 146) les ont toutes deux utilisées pour immunodépurer avec succès les anticorps de la Galalpha1-3Gal et le facteur VIII du sang. Lors d'expériences futures, d'autres anticorps contre les protéines de l'enveloppe nucléaire pourraient être essayés.

En plus de marquer les membranes nucléaires, les essais avec la biotine-NHS (figure 15) auraient pu permettre de dépler les nucléocapsides non enveloppées du nucléoplasme et les autres organites présents (figure 10). Toutefois, cette technique n'a pas produit les résultats escomptés. D'une part, peu de matériel a été récupéré et d'autre part, cette récupération était non spécifique. Elle était même meilleure sans biotine. Finalement, les virions périnucléaires et BiP n'auraient pas dû être marqués à la biotine, puisqu'en principe inaccessibles. Durant l'incubation du matériel avec les billes de streptavidine, la BSA semble réduire ce manque de spécificité. Il est aussi possible que le marquage de BiP soit expliqué par le fait que la biotine-NHS utilisée

dans ces travaux est perméable aux membranes, tandis que la biotine sulfo-NHS ne l'est pas (106, 154).

Une technique prometteuse pour la déplétion des membranes nucléaires utilise les billes magnétiques de 1.11 μM de diamètre à groupements NH_2 activés. Ces groupements permettent d'interagir avec les noyaux et les autres organites, mais pas avec les virions périmoléculaires puisqu'ils ne sont pas accessibles. Une fois les noyaux couplés aux billes, ils sont cassés par sonication libérant ainsi les virions intranucléaires et périmoléculaires. Contrairement à la biotine, le diamètre des billes est trop grand pour permettre le marquage des structures situées dans le nucléoplasme et à la surface de la MNI. Il nous est possible de marquer tous les noyaux, cependant la surface de couverture est variable et incomplète (figure 16) et l'emploi d'éthanolamine dans la stabilisation des bases de Schiff est néfaste pour les noyaux. De plus, les billes s'associent souvent entre elles et forment des agrégats. Par conséquent, cette technique reste à parfaire en réajustant certains paramètres, notamment pour limiter la formation d'agrégats de billes, pour mieux recouvrir l'ensemble de la surface des noyaux et réduire la toxicité de l'éthanolamine. Les groupements activés réagissent souvent ensemble réduisant ainsi leur capacité d'établir des interactions avec les noyaux. Une forte agitation lors de l'activation des groupements NH_2 sur les billes et l'augmentation des volumes totaux d'incubation et de lavage sont à envisager. Afin de limiter la dégradation du matériel, le pourcentage d'éthanolamine devrait être revu à la baisse. Cet agent, comme le sodium borohydrure forme des liens covalents à partir des interactions formées entre le groupement activé de la bille et une grande variété de groupements fonctionnels présents sur le matériel (Information fournie par M. Fabrice Sultan, conseiller technique, pour Merck France, Fontenay Sous Bois, France). S'il est impossible d'empêcher la dégradation des noyaux par cet agent, le sodium borohydrure pourrait être utilisé. Un contrôle avec des billes magnétiques couvertes de groupements NH_2 non activés devrait aussi être employé.

4.2 Immunoisolation des virions extracellulaires à l'aide d'anticorps contre les glycoprotéines virales

L'immunoisolation à l'aide d'anticorps contre les glycoprotéines virales est une excellente approche pour purifier tant les virions extracellulaires que périnucléaires. Dans les deux cas, l'enveloppe des virions est enchâssée de glycoprotéines virales, ce qui nous permet de les distinguer des nucléocapsides nues cytosoliques et nucléaires. Jusqu'à présent les paramètres ont été mis au point avec les virions extracellulaires, puisqu'ils sont plus simples à obtenir et plus abondants que les virions périnucléaires. Toutefois, il est connu que gB et gD se trouvent autant sur les virions périnucléaires qu'extracellulaires. Ceci justifie le choix de l'anticorps gD MCA-DL6, un anticorps monoclonal ayant la plus haute avidité par spectrofluorimétrie (figure 17). Avant qu'ils soient incubés avec les virions, les anticorps primaires ont préalablement été couplés aux anticorps secondaires, eux-mêmes déjà greffés aux billes magnétiques Dynabeads de 2.8 μM de diamètre. Le rendement obtenu était un peu faible, mais la spécificité satisfaisante (figure 18). Au plus, 20-30 % du matériel représenté par le marqueur de la capsid VP5 et la glycoprotéine gB se trouvent dans la fraction positive, le reste se situe dans le lavage. Selon l'immunobuvardage contre gD avec l'anticorps MCA-DL6, l'immunoisolation avec ce même anticorps n'est pas totalement spécifique puisqu'elle provoque la récupération de contaminants par une réactivité croisée. Le faible rendement pourrait être dû à une trop faible densité d'anticorps secondaires sur les billes magnétiques. Il serait donc envisageable d'utiliser plus de billes magnétiques, d'effectuer une seconde immunoisolation sur le surnageant ou d'employer d'autres anticorps monoclonaux contre gD, comme Fab AC8, 04-3, 04-4, 04-12 et 34-7 déjà utilisés pour l'immunoprécipitation par Sanna et al. (123). L'autre alternative serait d'utiliser seul ou en combinaison avec MCA-DL6 l'anticorps polyclonal contre gB R-69, le second en importance selon le test d'avidité déterminé par spectrofluorimétrie (figure 17). Cependant, les anticorps polyclonaux sont parfois moins spécifiques que les monoclonaux. Dans l'éventualité où le rendement ne serait pas augmenté, le point le plus important est que l'immunoisolation des virions semble spécifique. Dans le but

d'accroître davantage la pureté des virions périnucléaires, il est quasi impératif de combiner cette technique avec une autre isolation à l'aide d'un gradient continu de Nycodenz (124), présentement au point au laboratoire.

4.3 Conclusion

Afin de caractériser la voie de transport intracellulaire empruntée par HSV-1, l'objectif du travail était de mettre au point un protocole d'isolation des virions périnucléaires et extracellulaires et d'éventuellement comparer leur composition protéique par une approche protéomique. Cette approche, jamais envisagée auparavant, confirmerait la voie de ré-enveloppement en plus de déceler, s'il y a lieu, des protéines cellulaires et/ou virales nécessaires au transit des virions de l'espace périnucléaire jusqu'au cytosol. Il serait possible de déterminer quelles protéines composent le tégument du virion périnucléaire, et la caractérisation de cet intermédiaire permettrait subséquemment de connaître la séquence d'incorporation des protéines du tégument. La caractérisation de la voie de transport intracellulaire empruntée par HSV-1 permettra de fournir de nouvelles cibles pour limiter la récurrence des crises d'herpès. Ceci est important car l'HSV-1, typique des autres virus cytolitiques, acquiert des mutations en se répliquant. Ainsi, certaines souches sont maintenant résistantes aux actuels traitements antiviraux, tel que l'acyclovir (44, 140).

CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES

1. **A.D.A.M** 2004, posting date. A PRIMEDIA Company. [Online.]
2. **Advani, S. J., L. O. Durand, R. R. Weichselbaum, and B. Roizman.** 2003. Oct-1 is posttranslationally modified and exhibits reduced capacity to bind cognate sites at late times after infection with herpes simplex virus 1. *J Virol* **77**:11927-32.
3. **Alberts, e. c.** 1999. L'ESSENTIEL DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE INTRODUCTION A LA BIOLOGIE MOLICULAIRE DE LA CELLULE, 1 ed.
4. **Alconada, A., U. Bauer, B. Sodeik, and B. Hoflack.** 1999. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol* **73**:377-87.
5. **Bader, C., Crumpacker, CS., Schnipper, LE. et al.** 1978. The natural history of recurrent facial-oral infection with herpes simplex virus. *Journal of infectious disease* **138**:897-905.
6. **Baines, J. D., R. J. Jacob, L. Simmerman, and B. Roizman.** 1995. The herpes simplex virus 1 UL11 proteins are associated with cytoplasmic and nuclear membranes and with nuclear bodies of infected cells. *J Virol* **69**:825-33.
7. **Baines, J. D., and B. Roizman.** 1992. The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *J Virol* **66**:5168-74.
8. **Baines, J. D., P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-24.
9. **Batterson, W., D. Furlong, and B. Roizman.** 1983. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol* **45**:397-407.
10. **Beard, P. M., and J. D. Baines.** 2004. The DNA cleavage and packaging protein encoded by the UL33 gene of herpes simplex virus 1 associates with capsids. *Virology* **324**:475-82.
11. **Beitia Ortiz de Zarate, I., K. Kaelin, and F. Rozenberg.** 2004. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J Virol* **78**:1540-51.
12. **Blobel G, P. V.** 1966. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* **154**:1662-5.
13. **Bowman, B. R., M. L. Baker, F. J. Rixon, W. Chiu, and F. A. Quioco.** 2003. Structure of the herpesvirus major capsid protein. *Embo J* **22**:757-65.
14. **Brack, A. R., J. M. Dijkstra, H. Granzow, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 1999. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol* **73**:5364-72.

15. **Bresnahan, W. A., and T. Shenk.** 2000. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles [In Process Citation]. *Science* **288**:2373-6.
16. **Brignati, M. J., J. S. Loomis, J. W. Wills, and R. J. Courtney.** 2003. Membrane association of VP22, a herpes simplex virus type 1 tegument protein. *J Virol* **77**:4888-98.
17. **Browne, H., S. Bell, T. Minson, and D. W. Wilson.** 1996. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J Virol* **70**:4311-6.
18. **Buss, F., and M. Stewart.** 1995. Macromolecular interactions in the nucleoporin p62 complex of rat nuclear pores: binding of nucleoporin p54 to the rod domain of p62. *J Cell Biol* **128**:251-61.
19. **Bzik, D. J., B. A. Fox, N. A. DeLuca, and S. Person.** 1984. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* **137**:185-90.
20. **Bzik, D. J., B. A. Fox, N. A. DeLuca, and S. Person.** 1984. Nucleotide sequence specifying the glycoprotein gene, gB, of herpes simplex virus type 1. *Virology* **133**:301-14.
21. **Cai, W. H., B. Gu, and S. Person.** 1988. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion [published erratum appears in *J Virol* 1988 Nov;62(11):4438]. *J Virol* **62**:2596-604.
22. **Campadelli-Fiume, G., F. Farabegoli, S. Di Gaeta, and B. Roizman.** 1991. Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **65**:1589-95.
23. **Castagliuolo, I., P. Brun, M. Costantini, C. Rizzetto, G. Palu, M. Costantino, N. Baldan, and G. Zaninotto.** 2004. Esophageal achalasia: is the herpes simplex virus really innocent? *J Gastrointest Surg* **8**:24-30; discussion 30.
24. **Castro, A. P., T. M. Carvalho, N. Moussatche, and C. R. Damaso.** 2003. Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *J Virol* **77**:9052-68.
25. **Chen, S. H., M. F. Kramer, P. A. Schaffer, and D. M. Coen.** 1997. A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **71**:5878-84.
26. **Chen, S. H., L. Y. Lee, D. A. Garber, P. A. Schaffer, D. M. Knipe, and D. M. Coen.** 2002. Neither LAT nor open reading frame P mutations increase expression of spliced or intron-containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **76**:4764-72.
27. **Cheung, P., B. W. Banfield, and F. Tufaro.** 1991. Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *J Virol* **65**:1893-904.
28. **Cocchi, F., D. Fusco, L. Menotti, T. Gianni, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. The soluble ectodomain of herpes simplex

- virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7445-50.
29. **Colgan, J., H. E. Yuan, E. K. Franke, and J. Luban.** 1996. Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires Gag dimerization. *J Virol* **70**:4299-310.
 30. **Cook, M. L., Stevens, J.G.** 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence of intra-axonal transport of infection. *Infectious Immunology* **7**:272-288.
 31. **Daneholt, B.** 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* **88**:585-8.
 32. **DeLuca, N. A., A. M. McCarthy, and P. A. Schaffer.** 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol* **56**:558-70.
 33. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, E. Diefenbach, D. J. Holland, R. A. Boadle, P. J. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**:3282-91.
 34. **Dingwell, K. S., and D. C. Johnson.** 1998. The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J Virol* **72**:8933-42.
 35. **Douglas, M. W., R. J. Diefenbach, F. L. Homa, M. Miranda-Saksena, F. J. Rixon, V. Vittone, K. Byth, and A. L. Cunningham.** 2004. Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* **279**:28522-30.
 36. **Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, and H. M. Friedman.** 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* **65**:7046-50.
 37. **Eisenman, R. N., C. Y. Tachibana, H. D. Abrams, and S. R. Hann.** 1985. V-myc- and c-myc-encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* **5**:114-26.
 38. **Enquist, L. W.** 1999. Life beyond eradication: veterinary viruses in basic science. *Arch Virol Suppl* **15**:87-109.
 39. **Falke, D., R. Siegert, and W. Vogell.** 1959. [Electron microscopic findings on the problem of double membrane formation in herpes simplex virus]. *Arch Gesamte Virusforsch* **9**:484-96.
 40. **Feldman, L. T., A. R. Ellison, C. C. Voytek, L. Yang, P. Krause, and T. P. Margolis.** 2002. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:978-83.
 41. **Ford, T., J. Graham, and D. Rickwood.** 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* **220**:360-6.
 42. **Foster, T. P., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas.** 2004. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein modulates membrane fusion

- events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J Virol* **78**:5347-57.
43. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-62.
 44. **Frobert, E., T. Ooka, J. C. Cortay, B. Lina, D. Thouvenot, and F. Morfin.** 2005. Herpes simplex virus thymidine kinase mutations associated with resistance to acyclovir: a site-directed mutagenesis study. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1055-9.
 45. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2004. Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein. *J Virol* **78**:11879-89.
 46. **Garner, J. A.** 2003. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:1497-513.
 47. **Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, and M. D. Gershon.** 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* **68**:6372-90.
 48. **Ghosh, K., and H. P. Ghosh.** 1999. Role of the membrane anchoring and cytoplasmic domains in intracellular transport and localization of viral glycoproteins. *Biochem Cell Biol* **77**:165-78.
 49. **Gilchrist, J. S., and G. N. Pierce.** 1993. Identification and purification of a calcium-binding protein in hepatic nuclear membranes. *J Biol Chem* **268**:4291-9.
 50. **Graham, J., T. Ford, and D. Rickwood.** 1994. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal Biochem* **220**:367-73.
 51. **Graham, J. M.** 2002. OptiPrep density gradient solutions for mammalian organelles. *ScientificWorldJournal* **2**:1440-3.
 52. **Grandi, P., T. Dang, N. Pane, A. Shevchenko, M. Mann, D. Forbes, and E. Hurt.** 1997. Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* **8**:2017-38.
 53. **Granzow, H., F. Weiland, A. Jons, B. G. Klupp, A. Karger, and T. C. Mettenleiter.** 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* **71**:2072-82.
 54. **Greijer, A. E., C. A. Dekkers, and J. M. Middeldorp.** 2000. Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell RNA during the assembly process. *J Virol* **74**:9078-82.
 55. **Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, and M. Cohen.** 2000. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* **129**:313-23.
 56. **Hahn CG, C. J.** 1990. Isolation of transcriptionally active nuclei from striated muscle using Percoll density gradients. *Anal Biochem.* **190**:193-7.
 57. **Handler CG, E. R., Cohen GH.** 1996. Oligomeric structure of glycoproteins in herpes simplex virus type 1. *J Virol.* **70**:6067-70.

58. **Haraguchi, T., T. Koujin, T. Hayakawa, T. Kaneda, C. Tsutsumi, N. Imamoto, C. Akazawa, J. Sukegawa, Y. Yoneda, and Y. Hiraoka.** 2000. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci* **113 (Pt 5):779-94.**
59. **Harley, C. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson.** 2001. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J Virol* **75:1236-1251.**
60. **Hart, D. A.** 1975. Studies on nonidet P40 lysis of murine lymphoid cells. I. Use of cholera toxin and cell surface Ig to determine degree of dissociation of the plasma membrane. *J Immunol* **115:871-5.**
61. **Herold, B. C., and P. G. Spear.** 1994. Neomycin inhibits glycoprotein C (gC)-dependent binding of herpes simplex virus type 1 to cells and also inhibits postbinding events in entry. *Virology* **203:166-71.**
62. **Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, and P. G. Spear.** 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol* **75:1211-22.**
63. **Heymann, J., Cheng, N., Newcomb, WW., Trus, BL., Brown, JC., Steven, AC.** 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **10:334-341.**
64. **Homman-Loudiyi, M., K. Hultenby, W. Britt, and C. Soderberg-Naucler.** 2003. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol* **77:3191-203.**
65. **Hong, W.** 1998. Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **111:2831-9.**
66. **Hsu. Hsien-wen., P. E. S., Rossiter.BW.** 1981. Techniques of chemistry vol XVI, Separations by centrifugal phenomena. Krieger Pub Co.
67. **Iborra, F. J., D. A. Jackson, and P. R. Cook.** 2000. The path of RNA through nuclear pores: apparent entry from the sides into specialized pores. *J Cell Sci* **113 Pt 2:291-302.**
68. **Ishov, A. M., and G. G. Maul.** 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134:815-26.**
69. **Johnson, D. C., and P. G. Spear.** 1982. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* **43:1102-12.**
70. **Jones, F., and C. Grose.** 1988. Role of cytoplasmic vacuoles in varicella-zoster virus glycoprotein trafficking and virion envelopment. *J Virol* **62:2701-11.**
71. **Khanna, K. M., A. J. Lepisto, and R. L. Hendricks.** 2004. Immunity to latent viral infection: many skirmishes but few fatalities. *Trends Immunol* **25:230-4.**

72. **Klupp, B. G., W. Fuchs, H. Granzow, R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter.** 2002. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol* **76**:3065-71.
73. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2000. Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* **74**:10063-73.
74. **Knipe, D., Howley, PM.** 1996. *Fields Virology*, Third edition ed, vol. Chap. 71-72-73. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
75. **Kramer, M. F., and D. M. Coen.** 1995. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **69**:1389-99.
76. **Krummenacher, C., F. Baribaud, M. Ponce de Leon, I. Baribaud, J. C. Whitbeck, R. Xu, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2004. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. *Virology* **322**:286-99.
77. **Lamb, J. E., F. Ray, J. H. Ward, J. P. Kushner, and J. Kaplan.** 1983. Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in HeLa cells. *J Biol Chem* **258**:8751-8.
78. **Landini MP, S. B., Badiali L, Gonczol E, Mirollo G.** 1987. Structural components of human cytomegalovirus: in situ localization of the major glycoprotein. *Intervirology* **27**:154-160.
79. **LaVail, J. H., A. N. Tauscher, E. Aghaian, O. Harrabi, and S. S. Sidhu.** 2003. Axonal transport and sorting of herpes simplex virus components in a mature mouse visual system. *J Virol* **77**:6117-26.
80. **Lehman, I. R., and P. E. Boehmer.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **274**:28059-62.
81. **Lin SS, H. M., Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL.** 2000. The role of anti-Gal α 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* **70**:1667-74.
82. **Lin X, L. J., Friedman HM.** 2004. Immunization strategies to block the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol.* **78**:2562-71.
83. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75.
84. **Maul, G. G., A. M. Ishov, and R. D. Everett.** 1996. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**:67-75.
85. **Mazia, D., G. Schatten, and W. Sale.** 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol* **66**:198-200.
86. **McGeoch, D. J.** 1986. Some highlights of animal virus research in 1985. *J Gen Virol* **67**:813-30.
87. **McNabb, D. S., and R. J. Courtney.** 1992. Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology* **190**:221-32.

88. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**:1537-47.
89. **Milne, D. M., P. Looby, and D. W. Meek.** 2001. Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. *Exp Cell Res* **263**:43-54.
90. **Miranda-Saksena, M., P. Armati, R. A. Boadle, D. J. Holland, and A. L. Cunningham.** 2000. Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol* **74**:1827-39.
91. **Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, P. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol* **76**:9934-51.
92. **Mogensen, T. H., J. Melchjorsen, L. Malmgaard, A. Casola, and S. R. Paludan.** 2004. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **78**:5883-90.
93. **Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K. F. Sullivan.** 2000. Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* **2**:661-5.
94. **Morrison, E. E., A. J. Stevenson, Y. F. Wang, and D. M. Meredith.** 1998. Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J Gen Virol* **79**:2517-28.
95. **Mossman, K. L., R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley.** 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event [In Process Citation]. *J Virol* **74**:6287-99.
96. **Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman.** 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* **104**:313-20.
97. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, B. L. Trus, N. Cheng, A. Steven, F. Booy, and J. C. Brown.** 1999. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J Virol* **73**:4239-50.
98. **Newcomb, W. W., D. R. Thomsen, F. L. Homa, and J. C. Brown.** 2003. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *J Virol* **77**:9862-71.
99. **Nicola, A. V., A. M. McEvoy, and S. E. Straus.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **77**:5324-32.
100. **Nicola, A. V., and S. E. Straus.** 2004. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol* **78**:7508-17.
101. **Nishiyama, Y.** 2004. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Med Virol* **14**:33-46.
102. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of

- capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex In vitro [In Process Citation]. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
103. **Pante, N., R. Bastos, I. McMorrow, B. Burke, and U. Aebi.** 1994. Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol* **126**:603-17.
 104. **Paulsson, K., and P. Wang.** 2003. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1641**:1-12.
 105. **Penman, S.** 1966. RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J Mol Biol* **17**:117-30.
 106. **Pierce** 2003, posting date. Biotinylation reagent selection guide. [Online.]
 107. **Preston, C. M.** 1979. Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK. *J Virol* **29**:275-84.
 108. **Radsak, K., M. Eickmann, T. Mockenhaupt, E. Bogner, H. Kern, A. Eishubinger, and M. Reschke.** 1996. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* **141**:557-72.
 109. **Rajcani, J., V. Andrea, and R. Ingeborg.** 2004. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* **28**:293-310.
 110. **Register, R. B., and J. A. Shafer.** 1996. A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1. *J Virol Methods* **57**:181-93.
 111. **Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**:5564-75.
 112. **Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**:8939-52.
 113. **Rickwood, D., T. Ford, and J. Graham.** 1982. Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Anal Biochem* **123**:23-31.
 114. **Rickwood, D. a.** 1992. *Cell biology labfax*. BIOS Scientific publishers, Oxford, UK.
 115. **Roizman, B.** 1996. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11307-12.
 116. **Roizman, B.** 1999. HSV gene functions: what have we learned that could be generally applicable to its near and distant cousins? [In Process Citation]. *Acta Virol* **43**:75-80.
 117. **Roizman, B., G. S. Borman, and M. K. Roust.** 1965. Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *Nature* **206**:1374-5.
 118. **Roizman, B., and P. R. Roane, Jr.** 1964. The Multiplication of Herpes Simplex Virus. Ii. The Relation between Protein Synthesis and the Duplication of Viral DNA in Infected Hep-2 Cells. *Virology* **22**:262-9.
 119. **Roller, R. J., Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, and D. DeSalvo.** 2000. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**:117-29.

120. **Sambrook, J., Fritsch, E.F et T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor.
121. **Sandri-Goldin, R. M.** 2003. Replication of the herpes simplex virus genome: does it really go around in circles? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7428-9.
122. **Sanfilippo, C. M., R. C. Lombardozi, F. N. Chirimuuta, and J. A. Blaho.** 2004. Herpes simplex virus 1 infection is required to produce ICP27 immunoreactive triplet forms when ribosomal aminoacyl-tRNA translocation is blocked by cycloheximide. *Virology* **324**:554-66.
123. **Sanna PP, W. R., De Logu A, Bloom FE, Burton DR.** 1995. Directed selection of recombinant human monoclonal antibodies to herpes simplex virus glycoproteins from phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:6439-43.
124. **Sathananthan, B., E. Rodahl, T. Flatmark, N. Langeland, and L. Haarr.** 1997. Purification of herpes simplex virus type 1 by density gradient centrifugation and estimation of the sedimentation coefficient of the virion. *Apmis* **105**:238-46.
125. **Scanlan, P. M., V. Tiwari, S. Bommireddy, and D. Shukla.** 2003. Cellular expression of gH confers resistance to herpes simplex virus type-1 entry. *Virology* **312**:14-24.
126. **Schwartz, J., and B. Roizman.** 1969. Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells: electron and light microscope observations. *Virology* **38**:42-9.
127. **Sciortino, M. T., M. Suzuki, B. Taddeo, and B. Roizman.** 2001. RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J Virol* **75**:8105-16.
128. **Scott, E. S., and P. O'Hare.** 2001. Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**:8818-30.
129. **Segal, A. L., A. H. Katcher, V. J. Brightman, and M. F. Miller.** 1974. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *J Dent Res* **53**:797-803.
130. **Severi, B., M. P. Landini, and E. Govoni.** 1988. Human cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol* **98**:51-64.
131. **Ship, II, W. K. Ashe, and H. W. Scherp.** 1961. Recurrent "fever blister" and "canker sore". Tests for herpes simplex and other viruses with mammalian cell cultures. *Arch Oral Biol* **3**:117-24.
132. **Simpson-Holley, M., J. Baines, R. Roller, and D. M. Knipe.** 2004. Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol* **78**:5591-600.
133. **Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne, and A. Minson.** 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* **75**:5697-702.

134. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
135. **Spector, G., Leinwand.** 1998. Chap. 34 Subcellular Fractionation. *In* C. Press (ed.), *Cells a laboratory manual: culture and biochemical analysis of cells*, vol. 1.
136. **Spruance, S. L., and C. S. Crumpacker.** 1982. Topical 5 percent acyclovir in polyethylene glycol for herpes simplex labialis. Antiviral effect without clinical benefit. *Am J Med* **73**:315-9.
137. **Spruance, S. L., J. C. Overall, Jr., E. R. Kern, G. G. Krueger, V. Pliam, and W. Miller.** 1977. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med* **297**:69-75.
138. **Stevens, J. G., L. Haarr, D. D. Porter, M. L. Cook, and E. K. Wagner.** 1988. Prominence of the herpes simplex virus latency-associated transcript in trigeminal ganglia from seropositive humans. *J Infect Dis* **158**:117-23.
139. **Stingley, S. W., J. J. Ramirez, S. A. Aguilar, K. Simmen, R. M. Sandri-Goldin, P. Ghazal, and E. K. Wagner.** 2000. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J Virol* **74**:9916-27.
140. **Stranska, R., R. Schuurman, E. Nienhuis, I. W. Goedegebuure, M. Polman, J. F. Weel, P. M. Wertheim-Van Dillen, R. J. Berkhout, and A. M. van Loon.** 2005. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* **32**:7-18.
141. **Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi.** 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* **122**:42-66.
142. **Subak-Sharpe, J. H., and D. J. Dargan.** 1998. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes* **16**:239-51.
143. **Sukegawa, J., and G. Blobel.** 1993. A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* **72**:29-38.
144. **Summers, W. P., M. Wagner, and W. C. Summers.** 1975. Possible peptide chain termination mutants in thymidine kinase gene of a mammalian virus, herpes simplex virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:4081-4.
145. **Sydiskis, R. J., and B. Roizman.** 1966. Polysomes and protein synthesis in cells infected with a DNA virus. *Science* **153**:76-8.
146. **Takase T, R. F., Goodall AH, Kernoff PB, Middleton S, Chand S, Denson KW, Austen DE, Tuddenham EG.** 1987. Production of factor VIII deficient plasma by immunodepletion using three monoclonal antibodies. *Br J Haematol.* **66**:497-502.
147. **Tatman, J. D., V. G. Preston, P. Nicholson, R. M. Elliott, and F. J. Rixon.** 1994. Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* **75**:1101-13.
148. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-5.

149. **Theil, D., T. Derfuss, I. Paripovic, S. Herberger, E. Meinel, O. Schueler, M. Strupp, V. Arbusow, and T. Brandt.** 2003. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* **163**:2179-84.
150. **Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**:163-78.
151. **Topp, K. S., K. Bisla, N. D. Saks, and J. H. Lavail.** 1996. Centripetal transport of herpes simplex virus in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Neuroscience* **71**:1133-44.
152. **Torrisi, M. R., C. Di Lazzaro, A. Pavan, L. Pereira, and G. Campadelli-Fiume.** 1992. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J Virol* **66**:554-61.
153. **Turcotte, S., Letellier, J., Lippé, R.** 2004. HSV-1 capsids transit by the TGN, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *Soumis à Journal of virology.*
154. **Turner MS, T. P., Hafner LM, Giffard PM.** 1997. Identification and characterization of a basic cell surface-located protein from *Lactobacillus fermentum* BR11. *J Bacteriol.* **179**:3310-6.
155. **Van Vliet, K. E., L. A. De Graaf-Miltenburg, J. Verhoef, and J. A. Van Strijp.** 1992. Direct evidence for antibody bipolar bridging on herpes simplex virus-infected cells. *Immunology* **77**:109-15.
156. **Voet, D., Voet, JG.** 1998. *Biochimie*, Second edition ed. De Boeck Université.
157. **Ward, P. L., D. E. Barker, and B. Roizman.** 1996. A novel herpes simplex virus 1 gene, UL43.5, maps antisense to the UL43 gene and encodes a protein which colocalizes in nuclear structures with capsid proteins. *J Virol* **70**:2684-90.
158. **Whealy, M. E., J. P. Card, R. P. Meade, A. K. Robbins, and L. W. Enquist.** 1991. Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol* **65**:1066-81.
159. **Whitley, R. J., S. J. Soong, C. A. Alford, M. S. Hirsch, R. Schooley, M. N. Oxman, J. D. Connor, R. Betts, R. Dolin, and R. C. Reichman.** 1985. Design of therapeutic studies in herpes simplex encephalitis. *Lancet* **1**:284-5.
160. **Whittaker, G. R., and A. Helenius.** 1998. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* **246**:1-23.
161. **Yamauchi, Y., C. Shiba, F. Goshima, A. Nawa, T. Murata, and Y. Nishiyama.** 2001. Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J Gen Virol* **82**:1423-8.
162. **Young, S. K., N. H. Rowe, and R. A. Buchanan.** 1976. A clinical study for the control of facial mucocutaneous herpes virus infections. I. Characterization of natural history in a professional school population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **41**:498-507.

163. **Zhu, Z., M. D. Gershon, Y. Hao, R. T. Ambron, C. A. Gabel, and A. A. Gershon.** 1995. Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* **69**:7951-9.