

Université de Montréal

La protéine majeure de la capside de l'HSV-1 est ubiquitinée

Par
Pascal Raymond

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 ès sciences (M.Sc.) en pathologie et
biologie cellulaire option biologie cellulaire

Décembre 2008

© Pascal Raymond 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

La protéine majeure de la capside de l'HSV-1 est ubiquitinée

présenté par :
Pascal Raymond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Cohen
président-rapporteur

Dr Roger Lippé
directeur de recherche

Dr Katherine L.B. Borden
membre du jury

Résumé général

Le virus de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1) est le pathogène humain responsable des lésions herpétiques labiales, plus communément appelé « feux sauvages ». Annuellement, il est responsable de plusieurs cas d'encéphalites et d'infections de l'appareil visuel qui sont la principale cause de cécité en Amérique du Nord. Bien qu'il existe quelques traitements antiviraux, aucun vaccin ou médicament ne permet de prévenir ou de guérir les infections causées par ce virus. Aujourd'hui, les infections produites par l'HSV-1 sont présentes partout sur la planète.

Récemment, une étude en protéomique effectuée sur les virus matures extracellulaires a permis d'identifier la présence d'ubiquitines libres et d'enzymes reliées à la machinerie d'ubiquitination dans le virus. De plus, le virus exploite cette machinerie au cours de l'infection. Il est connu que certaines protéines virales sont ubiquitinées durant une infection et que le virus imite même certaines enzymes d'ubiquitination.

Nous avons donc entrepris des recherches afin d'identifier des protéines virales ubiquitinées qui pourraient être présentes dans les virus matures ainsi que leurs rôles potentiels. La protéine majeure de la capsid, VP5, un constituant très important du virus, a été identifiée. Nos recherches nous ont permis de caractériser le type d'ubiquitination, une monoubiquitination sur les lysines K810 et/ou K1275 de VP5. Le rôle que pourrait jouer l'ubiquitination de VP5 dans le cycle de réplication virale et dans les virus matures n'est toutefois pas encore connu.

Mots clés : Herpès simplex de type 1, protéine majeure, VP5, ubiquitine, protéasome

General abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is the human pathogen responsible for herpetic lesion such as cold sores. On a yearly basis, it is responsible for many cases of encephalitis and infections of the eye that are the most common cause of blindness in North America. Antiviral treatments exist, but no vaccines or drugs are able to prevent or cure the diseases caused by this virus. Today, infections caused by HSV-1 are present all around the world.

Recently a proteomics approach was used to study mature extracellular viruses. This study highlighted the presence in the virus of free ubiquitin and ubiquitin related enzymes. Furthermore, the virus exploits this machinery during the course of infection. Also, it is known that certain virally encoded proteins are ubiquitinated and that the virus mimics some ubiquitin related enzymes.

Our researches focused on identifying ubiquitinated viral proteins that could be present in mature extracellular viruses and their potential roles. The major capsid protein, VP5, an important virus component, was identified. We characterised the type of ubiquitination, a monoubiquitination of lysine K810 and/or K1275 of VP5. The role that could play the ubiquitination of VP5 in the viral cell cycle and in mature virions has yet to be identified.

Key words: Herpes simplex virus 1, major protein, VP5, ubiquitin, proteasome

Table des matières

Résumé général	i
General abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux et figures	v
Liste des tableaux et figures présents dans l'article	v
Liste des abréviations	vii
Nomenclature	x
Remerciements	xi
1 Introduction	1
1.1 La famille des <i>herpesviridae</i>	1
1.2 Virus Herpès simplex de type 1	4
1.2.1 Pathologies associées et prévalence chez l'humain	4
1.2.2 Tropisme, latence et persistance	6
1.2.3 Architecture et composition du virus	9
1.2.4 Génome	10
1.2.4.1 Composition et organisation de l'ADN viral	10
1.2.4.2 Transcription de l'ADN viral	10
1.2.4.3 Réplication de l'ADN viral	13
1.2.5 Cycle viral	15
1.2.5.1 Adhésion et entrée	15
1.2.5.2 Assemblage des capsides	17
1.2.5.3 Sortie du virus	20
1.3 Herpèsvirus et la machinerie d'ubiquitination	25
1.3.1 L'ubiquitination	25
1.3.2 Relation de l'HSV-1 avec la machinerie d'ubiquitination	27
2 Article : La protéine majeure de la capsid de l'HSV-1 est ubiquitinée	30
2.1 Objectifs	30
2.2 Note sur le texte	30
2.3 Abstract	32
2.4 Introduction	33
2.5 Materials and methods	36
2.5.1 Cells and viruses	36
2.5.2 Antibodies	36
2.5.3 Transfection of Hela cells with ubiquitin constructs	36
2.5.4 Cell lysates	37
2.5.5 <i>In vitro</i> nuclear egress assay and preparation of extranuclear capsids	37
2.5.6 Cytosol and extracellular virions	37
2.5.7 Immunoprecipitation of VP5	38
2.5.8 MG132 treatment	38
2.5.9 VP5 stability assay	38
2.5.10 SDS-PAGE and Western blots	39
2.5.11 Fluorescence microscopy	39
2.5.12 Plaque assays	40
2.5.13 Mass spectrometry	40
2.6 Results	41
2.6.1 Presence of ubiquitinated species in the virus	41
2.6.2 Main immunoreactive band is VP5	42

2.6.3 Free cytosolic VP5 is also ubiquitinated.....	42
2.6.4 Ubiquitination does not target VP5 for degradation.....	43
2.6.5 Ubiquitination does not impact viral egress.....	44
2.6.6 VP5 is mono-ubiquitinated.....	44
2.6.7 VP5 has two putative ubiquitination sites.....	45
2.7 Discussion.....	57
2.7.1 VP5 is ubiquitinated.....	57
2.7.2 Putative role of VP5 modification.....	57
2.8 Acknowledgements.....	60
2.9 References.....	61
3 Discussion générale.....	68
3.1 VP5 est ubiquitinée.....	68
3.2 Rôles de l'ubiquitine et mécanisme d'ubiquitination de VP5.....	70
3.3 Autres protéines virales ubiquitinées.....	72
3.4 Effet du MG-132 sur la transcription et la réplication virale.....	73
3.5 Perspectives d'avenir.....	74
4 Conclusion.....	76
Bibliographie.....	78

Liste des tableaux et Figures

- Tableau 1 Sous-familles d'herpèsvirus humains et les principales pathologies associées.
- Figure 1 Photo du virus de l'Herpès simplex prise en microscopie électronique (Coloration négative)
- Figure 2 Séroprévalence de l'Herpès simplex de type 1 par tranche d'âge
- Figure 3 Exemple d'un site d'infection et de latence de l'HSV-1 chez l'humain
- Figure 4 Schéma illustrant l'infection d'une cellule épithéliale ainsi que le transport rétrograde et antérograde des capsides virales dans le neurone
- Figure 5 Illustration d'une particule mature de l'HSV-1
- Figure 6 Schématisation linéaire du génome de l'HSV-1
- Figure 7 Activation de la transcription des gènes viraux
- Figure 8 Modèle de réplication de l'ADN viral de l'HSV-1
- Figure 9 Récepteurs de surface cellulaire et ligands viraux qui participent à l'entrée de l'HSV-1 dans la cellule
- Figure 10 Modèle d'assemblage des capsides et de l'encapsidation de l'ADN viral
- Figure 11 Modèle lumineuse de la sortie de l'HSV-1 de la cellule
- Figure 12 Modèle de ré-enveloppement de la sortie de l'HSV-1 de la cellule
- Figure 13 Modèle de pores élargis de la sortie de l'HSV-1 de la cellule
- Figure 14 Cascade enzymatique de l'ubiquitination d'une protéine
- Figure 15 Séquence d'acides aminés de VP5

Liste des Tableaux et figures présents dans l'article

- Table 1 Mass spectrometry analysis of immunoprecipitated VP5 from various viral intermediates
- Figure 1 Infected cell lysate contain multiple viral ubiquitinated proteins
- Figure 2 Mature extracellular virions and *in vitro* extranuclear capsids are ubiquitinated
- Figure 3 Immunoreactive band is VP5
- Figure 4 HA tagged ubiquitin labels VP5

- Figure 5 Cytosolic VP5 is detected with ubiquitin antibodies
- Figure 6 VP5 sensitivity to the proteasome inhibitor MG132 later in infection
- Figure 7 MG132 does not impact nuclear capsid egress and virion release from the cell
- Figure 8 Incorporation of HA tag ubiquitin constructs K48R, K63R and KO

Liste des abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxiribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHK	Cellule de rein de bébé hamster
BSA	Albumine du sérum de bovin
CD83	<i>Cluster of differentiation 83</i>
Cdc34	<i>Cell division cycle 34 (E2 enzyme)</i>
CENP-A	<i>Centromere protein A</i>
db	Double brin
DNA-PKCS	Sous-unité catalique de la protéine kinase AND-dépendante
DUB	Déubiquitinase
E1	<i>ubiquitin-activating enzyme</i>
E2	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>
E3	<i>ubiquitin-protein ligase</i>
EBV	Virus Epstein-Barr
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
g	Force g (Si précédé d'un nombre et d'un signe de multiplication)
g	Glycoprotéine (si suivi d'une lettre)
GaHV-1	<i>Gallid HV 1 or infectious laryngotracheis virus</i>
GaHV-2	<i>Gallid HV 2 or Marek disease HV 1</i>
GFP	Protéine verte fluorescente
h.p.i.	Heures suite à l'infection
HA	Hémagglutinine
HAT	Histone acétyltransférase
HCF	Facteur cellulaire humain
HCMV	Cytomegalovirus humain
Hela	Cellule épithéliale humaine provenant d'un cancer cervical
HHV-6	Herpèsvirus humain 6
HHV-8	Herpèsvirus humain 8
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSV-1	Virus herpes simplex de type 1

HSV-2	Virus herpes simplex de type 2
HVEM	Médiateur de l'entrée de l'HSV-1
ICP	Protéine d'une cellule infectée
KCl	Chloride de potassium
kDa	KiloDalton
KEHM	Tampon KCl, EGTA, Hepes et MgCl ₂
LAT	Transcrits associés à la latence
M	Molaire
MCMV	Cytomegalovirus murin
MDa	Million de Dalton
MDV	<i>Marek's disease virus</i>
mg	Miligramme
MG132	Z-leu-leu-leu-al
MgCl ₂	Chloride de magnésium
miRNA	Micro ARN
mM	MiliMolaire
NAF	Fluoride de sodium
ND10	Domaine nucléaire 10
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NH ₄ Cl	<i>Ammonium chloride</i>
nm	Nanomètre
MNT	Tampon MES, NaCl et Tris-HCl
MOI	Multiplicity of infection
MVB	<i>Multivesicular body</i>
Oct-1	Facteur-1 de transcription octamère
p53	Protéine 53 ou protéine de tumeur 53
PBS	Phosphate buffered saline
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	Mesure de l'acidité ou de l'alcalinité d'une solution : <i>power of hydrogen</i>
PKC	Protéine kinase C
PKD	Protéine kinase D
PML	<i>Promyelocytic leukaemia protein</i>
PVDF	Polyvinylidene fluoride

RNAP II	Polymérase ARN II
RP3	Chaîne légère de la dynéine rp3
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
Sp1	Facteur de transcription Sp1 (protéine spécifique 1)
Sp100	Antigène nucléaire Sp100
TBP	Protéine de liaison TATA
TCA	Acide trichloroacétique
Tctex1	Chaîne légère de la dynéine Tctex1
TFIIB	Facteur de transcription IIB
TFIIH	Facteur de transcription IIH
TGN	Réseau <i>trans</i> -Golgien
TNE	Tampon tris, EDTA et NaCl
u	Unité
Ub	Ubiquitine
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
U _L	Unique long
μm	Micromètre
μM	MicroMolaire
U _S	Unique court (<i>short</i>)
UV	Ultraviolet
Vero	Cellule de <i>African green monkey kidney</i>
Vhs	<i>Virion host shutoff protein</i>
vmw	<i>Virion molecular weight</i>
VP	Protéine virale
VZV	Virus varicella-zoster

Nomenclature

Dans la famille des Herpèsvirus, la nomenclature des gènes est relativement uniforme et celle des protéines est excessivement variable. À titre d'exemple, les gènes sont identifiés par rapport à la section du génome qui les encode (U_L , U_S , R_L , R_S) suivie d'un numéro les désignant. En contrepartie, les protéines sont désignées par VP, pour *virion protein*, ICP pour *infected cell protein*, g pour *glycoprotein*, $U_{S\text{ ou }L}$ pour *unique short or long*, $pU_{S\text{ ou }L}$ pour protéine codée par le gène $U_{S\text{ ou }L}$, etc. Ces désignations sont de plus suivies d'un « code », c'est-à-dire un numéro ou une lettre.

À des fins de simplification, la terminologie utilisée dans le texte qui suit se fera à l'aide de la terminologie la plus communément utilisée pour désigner une protéine virale. Aussi, pour éviter la confusion, les gènes seront présentés en italique.

Exemple : Le produit du gène *U_L48* est appelé dans la littérature U_L48 , pU_L48 , VP16, ICP25, α TIF et vmw65. Aujourd'hui, la communauté scientifique réfère généralement à cette protéine en la désignant VP16. VP16 sera donc utilisé pour désigner cette protéine virale.

Remerciements

Merci à tous ceux qui m'ont encouragé tout au long de ma Maîtrise, spécialement mes parents et amis, et merci, bien sûr, à toute l'équipe du laboratoire de m'avoir épaulé.

1 Introduction

1.1 La famille *Herpesviridae*

La famille des Herpèsvirus est une grande famille de virus qui compte à ce jour plus de 200 espèces infectant une grande variété d'organismes, des mollusques jusqu'à l'humain. Ce grand nombre d'espèces et cette grande diversité d'hôtes s'explique par les critères utilisés pour inclure un virus dans cette Famille. Ces critères sont strictement axés sur l'architecture des virus et, ni la pathologie causée par le virus ni la spécificité d'hôte ne sont considérées lors de cette classification. La séquence nucléotidique est également absente puisque les techniques de séquençage à grande échelle n'étaient pas disponibles à l'époque de l'élaboration de cette classification (16, 32, 74). Les quatre principaux critères sont les suivants : i) posséder un cœur d'ADN composé d'ADN double brin (db) linéaire, ii) avoir une capsidie icosaédrale d'approximativement 125 nm de diamètre, iii) détenir une couche protéique ayant une apparence amorphe, iv) et finalement posséder une enveloppe bilipidique (Figure 1) (32).

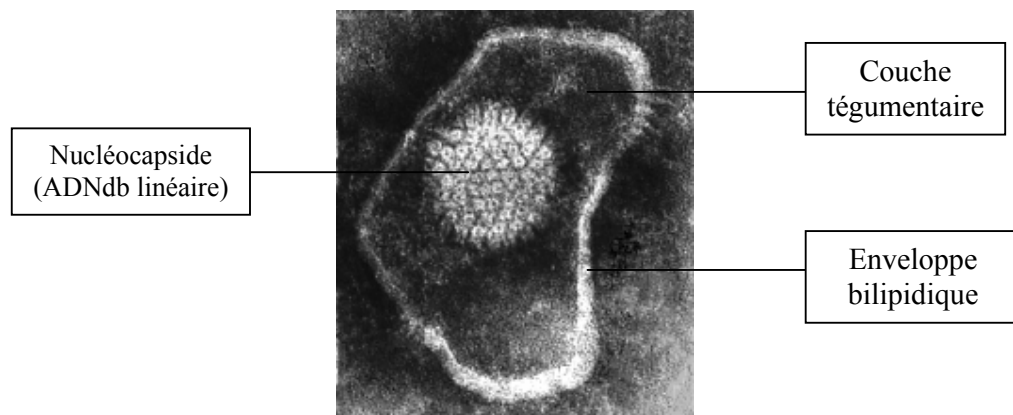


Figure 1. Photo du virus de l'Herpès simplex prise en microscopie électronique (Coloration négative). (<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>)

Bien qu'il existe aujourd'hui d'autres critères pouvant être utilisés pour classer davantage ces virus, par exemple, la composition de leur génome, leurs caractéristiques biologiques et épidémiologiques, trois sous-familles ont été créées sur la base du type d'infection causée par ceux-ci (32). D'abord, les

alphaherpesvirinae peuvent infecter un nombre variable d'hôtes, ils possèdent un cycle de reproduction rapide, détruisent efficacement les cellules infectées et présentent la capacité d'établir une infection latente principalement, mais non exclusivement, dans les ganglions sensoriels (HSV-1/2, VZV, GaHV-1/2, etc.) (32, 101).

Les *betaherpesvirinae* possèdent généralement un nombre restreint d'hôtes et un cycle de reproduction lent. La progression de l'infection est longue en culture et les cellules infectées deviennent fréquemment hypertrophiées (cytomegalia). Ces virus présentent également la capacité d'établir une infection latente, spécifiquement au niveau des glandes sécrétoires, des cellules lymphoréticulaires, du foie et d'autres tissus (HCMV, MCMV, HHV-6, etc.) (32, 101).

Les *gammaherpesvirinae* infectent exclusivement des hôtes appartenant au même Ordre ou à la même Famille phylogénétique. En culture *in vitro*, la totalité des membres de cette sous-famille a la capacité de se répliquer dans des cellules lymphoblastiques alors que seulement quelques-uns peuvent causer des infections lytiques chez certains types de cellules épithélioïdes et fibroblastiques. Les virus de ce groupe infectent généralement et spécifiquement des lymphocytes T et/ou B. Les infections latentes se produisent habituellement au niveau des tissus lymphoïdes (EBV, HHV-8, etc.) (32, 101).

Les pathogènes compris dans ces trois grandes sous-familles possèdent une grande diversité d'hôtes et causent de multiples infections. En ce qui concerne plus particulièrement l'humain, des membres de chacune d'entre elles sont associés à de nombreuses maladies. Les virus affectant l'humain ainsi que leurs principales pathologies associées sont illustrés dans le tableau 1. Bien que les principes de classification des différents virus au sein de la Famille ou des sous-familles mentionnées plus-haut soient toujours en vigueur, des techniques de classification plus précises sont utilisées. Par exemple, la classification des espèces, HSV-1 et HSV-2, n'est possible et apparente que lorsque les séquences génomiques et leurs sous-produits sont comparés entre eux.

Tableau 1 Sous-familles d'herpèsvirus humains et les principales pathologies associées.

Famille	Nom commun	Nom officiel	Principales pathologies associées
Alphaherpesvirinae			
	Herpès simplex 1	Herpèsvirus humain 1	Lésions faciales labiales et oculaires, encéphalites
	Herpès simplex 2	Herpèsvirus humain 2	Lésions génitales et anales
	Varicella-zoster	Herpèsvirus humain 3	Varicelle et zona
Betaherpesvirinae			
	Cytomégalovirus	Herpèsvirus humain 5	Anomalies congénitales, rejet de greffes
	Herpèsvirus humain 6 (type A et B)	Herpèsvirus humain 6 (type A et B)	Roséole, rejet de greffes, encéphalites
	Herpèsvirus humain 7	Herpèsvirus humain 7	Rejet de greffes
Gammaherpesvirinae			
	Epstein-Barr	Herpèsvirus humain 4	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngien
	Virus associé au sarcome de Kaposi	Herpèsvirus humain 8	Sarcome de Kaposi, maladie de Castleman, multicentrique, lymphome à effusion primaire

Références : <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm> et (32)

1.2 Virus herpès simplex de type 1

1.2.1 Pathologies associées et prévalence chez l'humain

L'HSV-1 est l'agent étiologique responsable des lésions herpétiques labiales, ou plus communément appelées « feux sauvages ». Bien que cette maladie cutanée lui soit généralement associée, ce virus est responsable de plusieurs autres maladies dont la sévérité varie grandement, allant d'une infection asymptomatique à une infection pouvant causer la mort. L'HSV-1 est ainsi responsable de cas de dermatites de toutes sortes, d'herpès génital, d'infections affectant l'appareil visuel, d'encéphalite, etc. (30-32, 87).

La prévalence chez l'humain varie énormément d'une maladie à l'autre, selon l'âge, l'état de santé de l'individu et ses pratiques sociales. L'humain est le réservoir principal de ce virus qui se transmet via un contact direct avec l'agent pathogène. Selon des études cliniques de séropositivité, il existe une corrélation directe entre la séroprévalence de l'HSV-1 et l'âge des personnes séropositives, passant de 20 % chez les enfants de moins de 5 ans à 90 % chez les individus âgés de près de 75 ans (Figure 2) (32).

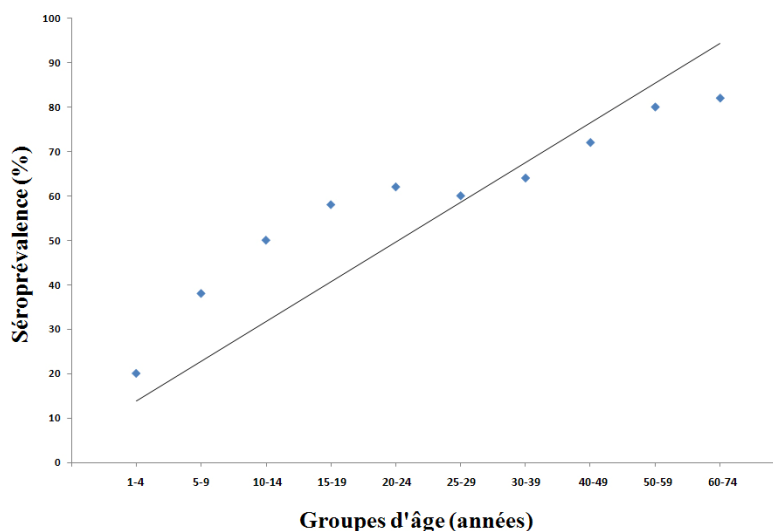


Figure 2. Séroprévalence de l'Herpès simplex de type 1 par tranche d'âge. Pourcentage de séroprévalence par rapport aux groupes d'âge des individus. Reproduction des résultats obtenus dans ((32) p.2553)

Bien qu'une grande proportion des individus infectés ne développe pas de symptômes, environ 40 % de cette population subit des épisodes de récurrence. Plusieurs facteurs influencent la réactivation des virus en latence (les divers facteurs seront abordés plus en détail à la section 1.2.2). Selon les individus, cette réactivation peut survenir à une fréquence se chiffrant en terme de mois ou d'années (32).

La gravité des pathologies causées par l'HSV-1 peut engendrer un impact considérable dans la vie des personnes atteintes. Aux États-Unis, l'incidence de kératoconjunctivites causées par l'HSV-1 est estimée à environ 300 000 cas par an et il s'agirait de la première cause de cécité en Amérique de Nord (32). De plus, une centaine de cas d'encéphalite pouvant causer un tort irréparable au système nerveux central sont aussi répertoriés annuellement. Il existe bien sûr d'autres maladies moins sévères, mais qui sont susceptibles d'avoir un impact majeur sur la qualité de vie des patients, par exemple, 10 % des cas d'herpès génitale seraient causés par l'HSV-1 (32).

Plusieurs agents antiviraux ont été développés au cours des dernières années. Cependant, aucun d'entre eux n'a permis d'éradiquer le virus. Parmi les agents antiviraux disponibles sur le marché, notons, entre autres, l'Acyclovir, le Penciclovir, le Ganciclovir et le Cidofovir, qui sont tous des analogues nucléosidiques, ainsi que le Foscarnet qui est un analogue de pyrophosphate. Comme pour plusieurs traitements antiviraux ciblant d'autres virus, l'HSV-1 peut développer une résistance à ces agents. De plus, puisque ces derniers ne ciblent que les virus en réplication, ils n'affectent pas les virus sous forme latente. Ceci explique qu'aucun des agents antiviraux disponibles sur le marché ne permet de guérir un individu infecté (32).

Il est donc d'une grande importance de parfaire nos connaissances sur l'HSV-1 à l'aide de la recherche fondamentale. Ceci pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques menant au développement de nouveaux remèdes ou même à la création d'un vaccin.

1.2.2 Tropisme, latence et persistance

L'HSV-1 peut avoir un cycle d'infection lytique dans des cellules épithéliales et un cycle latent dans des neurones sensoriels (Knipe 2008). L'établissement d'une infection par l'HSV-1 débute dans un tissu épithélial qui représente le site d'une infection primaire. À la suite de la production et de la dispersion, de cellules à cellules, de nouvelles particules virales, celles-ci parviendront à infecter des neurones sensoriels en fusionnant avec leurs extrémités axonales (les détails du cycle d'infection sont présentés à la section 1.2.5). Les capsides nues, c'est-à-dire sans enveloppe bilipidique, seront transportées au noyau présent dans le corps cellulaire des neurones via un transport axonal rétrograde pour y injecter leur ADN (32, 121). L'ADN viral persistera dans les noyaux sous forme d'épisome associé en nucléosomes (59). L'expression de gènes lytiques est réprimée, mais les *latency-associated transcript* (LAT), seront exprimés. Aucun virus en répllication ne peut être détecté dans les ganglions sensoriels durant une infection latente mais, dans une fraction de neurones contenant des virus latents, il peut se produire une réactivation périodique de l'HSV-1. Dans ces rares neurones, le virus sera transporté le long des axones dans un transport axonal antérograde, ce qui permettra au virus d'atteindre les tissus épithéliaux qui sont habituellement situés au site de l'infection primaire (Figures 3 et 4) (32, 59).

Le maintien de la latence de l'HSV-1 dans les neurones sensoriels est dépendant en grande partie des LAT. LAT est un précurseur de cinq miARN distincts qui possèdent des fonctions de répression des produits de différents gènes viraux. Il a été démontré que ces miARN régulent négativement la présence de deux activateurs transcriptionnels, ICP0 et ICP4, nécessaires lors de l'initiation d'une infection productive. La régulation négative de ces deux produits viraux inhibera ainsi le début de la transcription des gènes viraux, la répllication de l'ADN viral et par le fait même la production de nouvelles particules virales (91, 114, 116).

Chez l'humain, les virus latents dans les neurones sensoriels peuvent être réactivés à la suite d'un stimulus localisé comme par exemple une blessure au site de l'infection primaire. Cette réactivation peut également survenir à la suite de différents stimuli systémiques tels un stress émotionnel ou physique, une exposition aux rayons UV, un changement hormonal, de la fatigue, etc. Si une réactivation du virus a lieu, des symptômes risquent de réapparaître (32, 59, 61, 103).

La capacité de l'HSV-1 à produire des infections lytiques et latentes lui permet d'être conservé chez un individu durant toute une vie. Cela augmente grandement les possibilités de transmission du virus à un individu non infecté et explique pourquoi une si grande proportion de la population mondiale en est atteinte (32, 59).

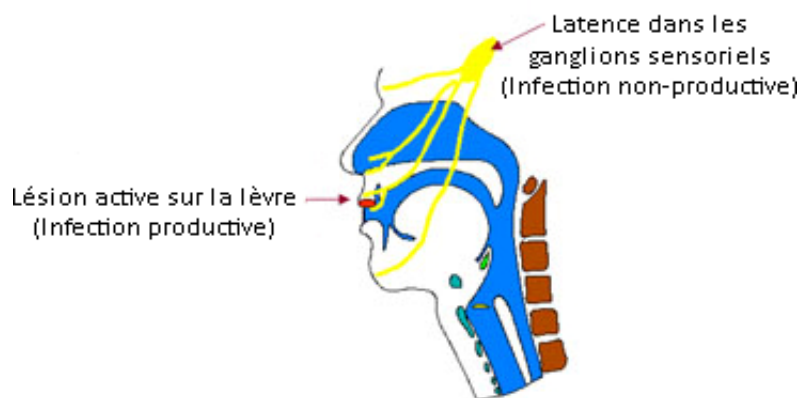


Figure 3. Exemple d'un site d'infection et de latence de l'HSV-1 chez l'humain. Dans ce cas, le site d'infection primaire où se produit une infection productive a lieu au niveau de la lèvre. Le schéma indique le lien existant entre la lèvre et les ganglions sensoriels; l'endroit où la latence ainsi que la réactivation du virus aura lieu. (<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>)

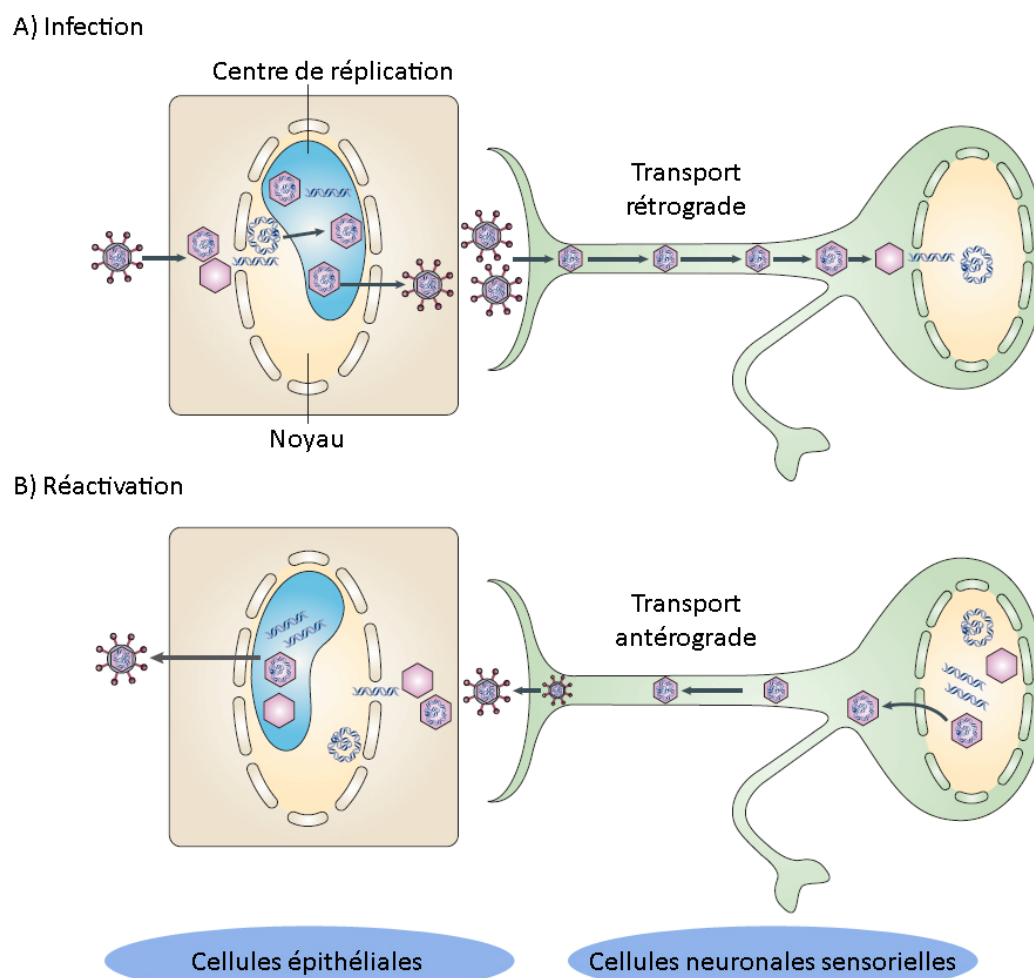


Figure 4. Schéma illustrant en A) l'infection d'une cellule épithéliale ainsi que le transport rétrograde dans un neurone, et en B) la réactivation d'un virus latent dans un neurone suivie de son transport antérograde ainsi que l'infection de nouvelles cellules épithéliales. Illustration modifiée et provenant de (59).

1.2.3 Architecture et composition du virus

Tel que précisé plus haut, les virions de l'HSV-1 sont composés de quatre éléments : un cœur contenant l'ADN viral (double brin et linéaire), une capsidie icosahédrale qui encercle le cœur d'ADN, une couche protéique amorphe qui entoure la capsidie, appelée le tégument, et une enveloppe externe bilipidique qui expose à sa surface des glycoprotéines virales (Figure 5). Les virions matures ont une taille d'environ 250 nm et sont formés d'une quarantaine de protéines virales en plus d'un nombre non négligeable de protéines cellulaires dont la composition a été peu caractérisée (32, 68).

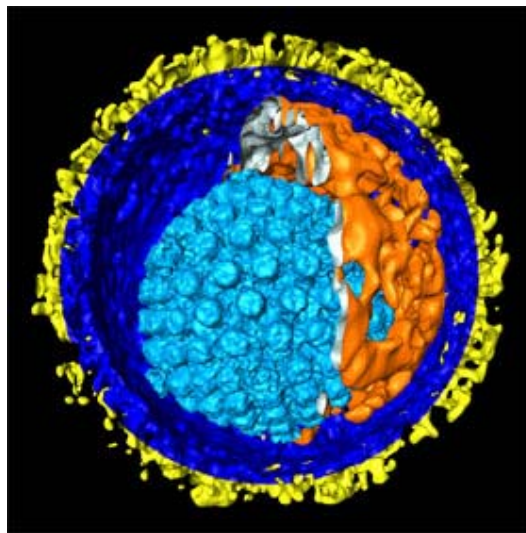


Figure 5. Illustration d'une particule mature de l'HSV-1. Bleu pâle : la capsidie virale contenant l'ADN double brin linéaire ; Orange : la couche tégumentaire ; Bleu foncé : l'enveloppe bilipidique ; Jaune : les glycoprotéines de surface.

(http://www.biochem.mpg.de/gruenewald/research/Fig_HSV_280.jpg)

1.2.4 Génome

1.2.4.1 Composition et organisation de l'ADN viral

Le génome de l'HSV-1 est composé d'un ADN double brin d'environ 152 mille paires de bases. Il possède plus de 80 cadres de lecture ouverts et code pour plus de 80 protéines différentes. Deux segments d'ADN uniques sont présents dans le génome et sont désignés « unique long » (U_L ; *unique long*) et « unique court » (U_S ; *unique short*). Ces régions uniques sont flanquées de séquences répétitives a , b et c , appelées *terminal or inverted repeats*. Les séquences répétitives de la région unique longue sont désignées, ab et $a'b'$, et les régions répétitives de la région unique courte, $a'c'$ et ca . Le nombre de séquences répétitives a à la jonction U_L - U_S et à la fin de la séquence U_L est variable. Le génome de l'HSV-1 peut donc être illustré tel que présenté à la figure 6. Les séquences, longues et courtes, codent pour les protéines virales tandis que les séquences répétitives et/ou inversées codent pour un nombre limité de protéines virales, mais surtout permettent de circulariser l'ADN viral et participent à leur encapsidation (32, 64, 81, 123).

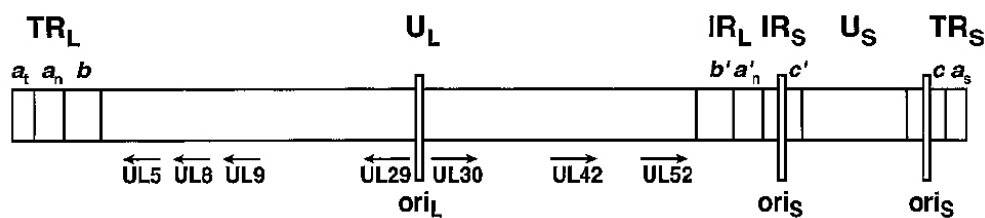


Figure 6. Schématisation linéaire du génome de l'HSV-1 démontrant l'organisation des sections géniques, les trois sites d'origine de réplication de l'ADN viral ainsi que l'endroit approximatif des promoteurs de certains gènes viraux. TR : *terminal repeats* ; IR : *inverted repeats* ; ori : *origine de réplication*. (64)

1.2.4.2 Transcription de l'ADN viral (cascade d'expressions géniques)

Lors d'une infection productive, une multitude de protéines virales sont exprimées séquentiellement. Ces protéines proviennent de trois catégories de gènes exprimés sous forme d'une cascade d'expressions géniques (32, 47, 64, 123). L'expression des différents groupes de gènes nécessite d'abord l'expression des

gènes α , *immediate-early genes*, suivie des gènes β , *early genes*, et finalement des gènes γ , *late genes*, où l'expression des gènes β et γ dépend de l'expression des produits des groupes de gènes qui les précèdent (Figure 7). Les gènes γ de l'HSV-1 peuvent être subdivisés en deux sous-groupes : les γ_1 appelés *leaky-late* et les γ_2 pour *true-late*. L'expression des gènes γ_2 nécessite le produit des gènes α et β ainsi qu'une réplication active de l'ADN viral tandis que les gènes γ_1 sont exprimés à de faibles taux avant la réplication de l'ADN viral (32, 102).

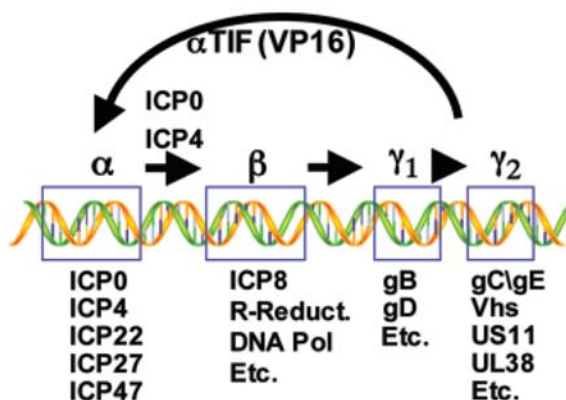


Figure 7. Activation de la transcription des gènes viraux. Une protéine structurale produite tard dans l'infection (VP16) va induire les gènes α . L'expression subséquente des gènes β et γ est provoquée par ICP0 et ICP4. L'expression optimale des gènes γ_1 et γ_2 requiert une synthèse active de l'ADN viral ainsi que ICP22 et ICP27 (102).

La transcription du génome de l'HSV-1 est entamée à l'aide de l'ARN polymérase II et de la protéine virale VP16, deux acteurs primordiaux qui sont respectivement des facteurs de transcription cellulaires et viraux. VP16, qui est relâchée dans la cellule à la suite de l'entrée du virus, interagit avec une protéine cellulaire, HCF. Le complexe ainsi formé est dirigé au noyau où il se lie avec Oct-1 et l'ARN polymérase II. La formation de ce complexe protéique permet le recrutement de facteurs de transcription et de leurs protéines accessoires pour ainsi permettre de lier les promoteurs viraux des gènes α . Il y a, entre autres, le recrutement de facteurs de transcription tels que TFIIB, TFIIF, TBP, Sp1 et HAT. En plus de son rôle de transactivateur, VP16 réduit le nombre d'histones H3 sur les promoteurs viraux pour ainsi rendre l'ADN viral accessible à la machinerie de

transcription. Les gènes α ou *immediate early genes* sont ainsi transcrits. Ils sont exprimés maximalement de deux à quatre heures suivant le début de l'infection. Ces gènes codent pour six protéines : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 et Us1.5 qui sont des transactivateurs des groupes de gènes β et γ (32). Ainsi VP16 induit et stimule la transcription des gènes α de l'HSV-1 (32, 102, 123, 132).

À la suite de la production des protéines α , la transcription du génome viral se poursuit. Plusieurs processus seront enclenchés afin de synchroniser le passage de l'expression des gènes α aux gènes γ . Par exemple, la protéine *vhs*, relâchée au moment de l'infection et qui possède un rôle d'endonucléase, participe au bon fonctionnement de la cascade d'expressions géniques. Son rôle a été démontré à l'aide de mutants *vhs* qui ont ralenti la progression de l'expression des gènes α à β et éventuellement des γ (32, 111). Aussi, ICP4, une protéine α nécessaire et essentielle à l'expression de tous les gènes post- α , va réguler négativement sa propre expression ainsi que celle d'ICP0 afin de réguler le taux d'expression des gènes α (32, 102). Cette répression est essentielle à une progression normale de la cascade d'expressions géniques.

L'expression des gènes β se produit principalement quatre à huit heures suivant le début de l'infection. L'implication d'ICP0 et d'ICP4 est nécessaire à la transcription de ces gènes tandis qu'ICP27 agit en tant que stimulateur de la transcription. ICP22 et ICP27 joue un rôle majeur au niveau de l'expression des gènes γ qui se produit à la suite de l'expression des gènes β et de l'initiation de la réplication du génome viral. Les protéines encodées par les gènes β comprennent des protéines nécessaires à la réplication du génome viral : une polymérase ADN, une protéine de liaison à l'ADN simple brin, une hélicase-primase, une protéine de liaison à l'origine de réplication et un groupe d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et dans le métabolisme de déoxynucléotides (32, 33, 55, 64, 89, 102, 132). Le rôle de ces protéines sera discuté plus en détail dans la section traitant de la réplication de l'ADN viral.

Après environ sept heures d'infection, les gènes γ sont transcrits. Ces derniers codent principalement pour des protéines structurales qui possèdent plusieurs fonctions. Dans une cellule infectée, il en existe environ une soixantaine. Elles jouent des rôles dans tout le cycle viral incluant l'entrée (gB, gC, gD, gH, gL), le transport (U_L36, VP26, etc.), la réplication et l'assemblage (VP5, VP16, VP19C, VP26, U_L6,

U_L26, U_S11, etc.), la sortie (U_L31, U_L34, U_S3, gK, gN, gM, etc.), etc. (32). Le rôle de certaines d'entre elles sera abordé dans les sections ultérieures.

1.2.4.3 Réplication de l'ADN viral

Le groupe de protéines transcrit par les gènes β est responsable de la réplication de l'ADN viral. Sept de ces protéines sont nécessaires et suffisantes pour permettre la réplication de l'ADN : U_L5, U_L8, U_L9, U_L29 (ICP8), U_L30, U_L42 et U_L52 (73, 131). Le complexe de l'ADN polymérase est formé d'U_L30 et d'U_L42. U_L30 possède l'activité polymérase tandis que son partenaire, U_L42, possède une capacité de liaison à l'ADN double brin. U_L9 est une protéine de liaison à l'origine de réplication. La protéine ICP8 possède une capacité de liaison à l'ADN simple brin et le complexe ADN hélicase-primase est constitué de trois protéines, U_L5, U_L8 et U_L52 (73, 131). D'autres enzymes virales non essentielles à la réplication de l'ADN viral (U_L12, thymidine kinase, etc.) et certaines enzymes cellulaires (ADN polymérase α -primase, la topoisomérase II, etc.) peuvent aussi être impliquées (32, 64).

Environ trente minutes à une heure après le début de l'infection, l'ADN viral est injecté dans le noyau via les pores nucléaires. L'ADN doit être circularisé, ce qui constitue un prérequis pour que puisse avoir lieu la réplication (32, 64). Cette dernière débute aux origines de réplication, oriS et/ou oriL, avec un mécanisme de réplication *theta* (θ) qui est suivi d'un mode de réplication *rolling circle* ; le mode de réplication prédominant. La synthèse de nouvelles molécules d'ADN forme un concatémère constitué de plusieurs unités de génomes viraux associés les uns aux autres via un nombre variable de séquences répétitives *a* (Figure 8) (32, 64).

Le génome de l'HSV-1 possède trois origines de réplication. Une copie de oriL qui est située entre les gènes U_L29 et U_L30, et deux copies de oriS qui sont situées dans les séquences *c*. Une région riche en AT est située au centre de chacune des origines de réplication et elle est flanquée de séquences inversées permettant la liaison de la protéine virale U_L9. Les deux copies oriS ne sont pas essentielles et le possible avantage conféré par la possession de trois origines de réplication dans le génome viral n'est pas connu (Figure 6) (32, 64).

L'initiation de la réplication de l'ADN viral se produit à l'aide d'U_L9 qui se lie sous forme d'homodimère à des séquences spécifiques flanquant les sites riches

en AT et présentes dans les origines de réplication. U_L9 possède une activité hélicase et sa liaison à l'ADN permet le recrutement d'ICP8. Ensemble, elles provoqueront l'ouverture des brins d'ADN pour ainsi permettre l'entrée du reste de la machinerie de réplication : le primosome et l'ADN polymérase. Le complexe ADN hélicase-primase, aussi appelé primosome, est formé de U_L5 et U_L52 qui possèdent à elles seules des activités ATPase ADN dépendante, hélicase et primase. À ce complexe se rajoute la protéine U_L8 qui stimule son activité pour ainsi en augmenter l'efficacité. Finalement, l'ADN polymérase, formée d'un hétérodimère d'U_L30 et d'U_L42, est recruté pour initier la synthèse des nouveaux brins d'ADN viraux. Le complexe U_L30 et U_L42, en plus de son activité ADN polymérase, possède des activités exonucléases 3' → 5' et RNase H lui permettant de compléter son travail correctement. Ce processus de réplication génère un concatémère qui, pendant l'encapsidation, sera clivé à des sites *a* particuliers pour ensuite générer des génomes viraux entiers et de taille normale (32, 64).

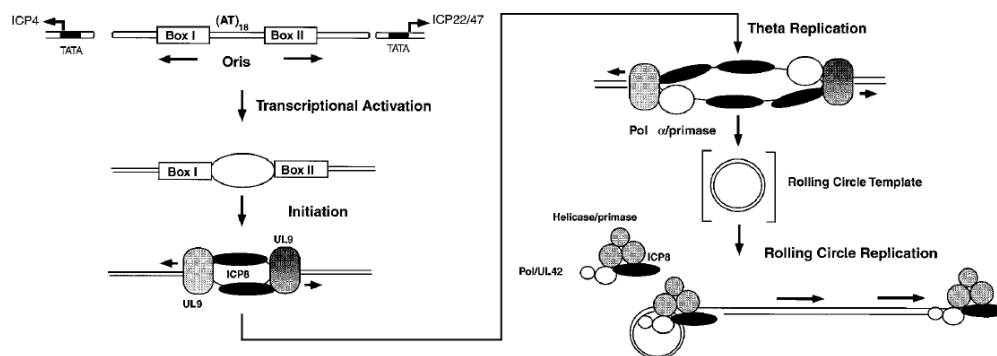


Figure 8. Modèle de réplication de l'ADN viral de l'HSV-1. L'ADN virale qui est transcrite activement va permettre le recrutement de différents facteurs de réplication du génome viral. La réplication débute par un mode de réplication *theta* qui est suivi d'un mode de réplication *rolling circle* (64).

1.2.5 Cycle viral

1.2.5.1 Adhésion et entrée

L'HSV-1 utilise deux modes d'entrée afin de pénétrer à l'intérieur d'une cellule et de l'infecter. Le mode d'entrée utilisé par le virus dépend du type cellulaire. Dans les neurones et les cellules Vero, le virus pénètre par fusion directe de la membrane virale avec la membrane plasmique des cellules alors que dans les kératinocytes et les cellules Hela, l'entrée se fait principalement par endocytose. Dans les deux cas le résultat est identique ; des capsides virales nues, c'est-à-dire sans enveloppe, sont relâchées dans le cytosol (72, 86, 110).

L'adhésion de l'HSV-1 à une cellule est effectuée à l'aide des glycoprotéines de surface virales gC et gB qui se lient à des sulphates d'héparan présents à la surface de la cellule. La glycoprotéine D (gD) interagit ensuite avec des récepteurs spécifiques, ce qui est suivi de la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane plasmique. La glycoprotéine D peut se lier à au moins trois récepteurs à la surface de la cellule, les nectines, l'*herpes virus entry mediator* (HVEM) et les 3-OS sulfates d'héparan. L'ectodomaine de gD contient deux domaines importants durant l'entrée ; le domaine de liaison avec les récepteurs de surface et un domaine de fusion. À la suite de la liaison du premier domaine aux récepteurs cellulaires, un changement de conformation dans gD est provoqué. Ceci permet d'exposer le deuxième domaine, le domaine de fusion (*profusion domain*). Le changement de conformation de gD permet ainsi l'interaction avec un triplet de glycoprotéines virales gB, gH/gL (Figure 9) (32, 43, 98).

Il a été démontré que le complexe de glycoprotéines gD, gB et gH/gL est nécessaire et suffisant pour provoquer la fusion des deux membranes adjacentes, c'est-à-dire la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique de la cellule. La fusion est provoquée par un peptide fusogénique et des *heptad repeats* présents sur gH. Le changement de conformation induit précédemment dans gD et l'activation par gB de la propriété fusogénique de gH vont induire le processus de fusion membranaire. Le rôle de gL dans cette mécanique de fusion serait aussi d'aider gH dans ses fonctions. Ainsi, cette interaction complexe entre les glycoprotéines virales et les récepteurs de surface cellulaires permet au virus de pénétrer dans la cellule (32, 43, 98).

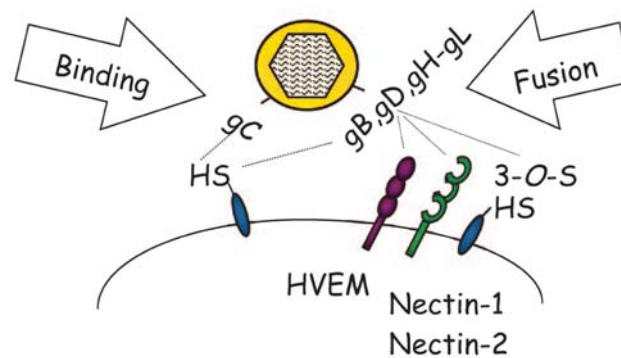


Figure 9. Récepteurs de surface cellulaire et ligands viraux qui participent à l'entrée de l'HSV-1 dans la cellule. Les glycoprotéines C et B à la surface du virus permettent l'adhésion à une cellule via ces récepteurs de surface, les sulfates d'héparan. La fusion du virus avec la membrane plasmique se produit à l'aide des glycoprotéines virale D, H et L qui interagissent avec les protéines de surface de la cellule, les HVEM et les nectines (109).

Le mode d'entrée par endocytose, tout comme le mode d'entrée via la membrane plasmique, implique des récepteurs membranaires cellulaires et des glycoprotéines virales. Le virus contenu dans un endosome doit fusionner avec la membrane endocytaire. Cette fusion est médiée par les mêmes glycoprotéines virales (gC, gD, gB et gH/gL) et les mêmes récepteurs cellulaires que ceux présentés dans le mode d'entrée par fusion. Mais, puisque la composition des endosomes est variable, différentes combinaisons de récepteurs cellulaires pourraient être impliquées. Une différence marquée et qui distingue le mode d'entrée par endocytose est le rôle du pH et de la phosphorylation de tyrosines cellulaires (43, 72, 86, 110).

À la suite de la fusion du virus avec la cellule, la majeure partie du tégment reste accrochée à la membrane plasmique. Dans le but de se procurer un moyen de transport, la capsid, maintenant présente dans le cytoplasme, exploite la machinerie de transport cellulaire (21, 72). Le transport des capsides jusqu'au noyau se fait sur les microtubules à l'aide de moteurs dynéines (108). Une protéine de la capsid, VP26, interagit avec ces moteurs protéiques en se liant aux chaînes légères des dynéines, RP3 et Tctex1 (21). Cependant, il a été démontré récemment qu'un mutant dépourvu de VP26 peut tout de même s'associer et engendrer le transport intracellulaire. Ceci indique que d'autres protéines de la capsid ou du tégment

participent au lien établi avec les moteurs protéiques. Il a été suggéré que la protéine majeure du tégument, U_L36; qu'une des protéines mineures de la capsid, U_L25, ainsi que U_S3, une kinase virale, pourraient être impliquées. Toutefois, ces protéines jouent probablement un rôle complémentaire à celui de VP26 (21).

Le transport des capsides nues le long des microtubules leur permet d'atteindre les pores nucléaires qu'elles utilisent pour injecter leur ADN dans le nucléoplasme. L'étude d'un mutant thermosensible tsB7, à une température non permissive, a permis d'observer que les capsides s'accumulaient sur les pores nucléaires et que leur ADN n'était pas relâché dans le noyau ; elles n'étaient donc pas désassemblées pour libérer leur ADN dans la cellule (5). Le mécanisme d'amarrage et d'injection de l'ADN n'est pas totalement compris, mais certains des facteurs cellulaires et viraux impliqués dans ce processus sont connus. Le modèle le plus récent suggère que suite à l'attachement de la capsid au pore nucléaire, U_L36, la plus grosse protéine du tégument, subit un clivage protéolytique qui libère un fragment de 55 kDa de son extrémité N-terminale. Ce clivage induit un changement de conformation de la capsid, ce qui permet la relâche de l'ADN viral et son injection dans le noyau (52). Pour que cela puisse avoir lieu, la capsid doit avoir une orientation particulière avec le pore nucléaire car l'ADN est relâché via un canal présent dans la capsid, appelé le *portal* (14). À partir d'un essai *in vitro* reconstituant l'amarrage et l'injection de l'ADN dans le noyau, des facteurs cellulaires impliqués dans ce processus ont été mis en lumière. Les capsides sont capables de se lier à la surface des pores nucléaires et d'injecter leur ADN dans le noyau si l'on rajoute dans l'essai du cytosol et de l'énergie. Il a été démontré que les importines β solubles ainsi que les Ran étaient nécessaires et suffisantes pour permettre l'amarrage des capsides aux pores nucléaires (88). Une fois l'ADN viral présent dans le noyau, la transcription de l'ADN ainsi que la réplication virale débute.

1.2.5.2 Assemblage des capsides

À la suite de la réplication du génome, les nouvelles capsides de l'HSV-1 s'assemblent dans le noyau des cellules infectées. Plusieurs méthodes en laboratoire ont permis de distinguer quatre différentes sortes de capsides pouvant être retrouvées dans le noyau au cours d'une infection. Trois d'entre elles sont considérées des

intermédiaires dans la maturation des nouvelles capsides (les procapsides, les capsides B et les capsides C) et une quatrième forme représente les capsides aberrantes (les capsides A) (4, 32, 37, 82).

Les capsides possèdent une morphologie bien définie. Elles présentent une structure icosaédrale constituée de seize facettes protéiques composées de 162 capsomères (12 pentons et 150 hexons formés de VP5) et de 320 structures supplémentaires qui se connectent aux pentons et hexons appelées les triplexes (formés d'un hétérotrimère de VP23 et VP19C). Les capsides nues ont une taille d'environ 125 nm de diamètre (4).

Les protéines virales nécessaires à la formation de nouvelles capsides sont synthétisées dans le cytosol et doivent être acheminées au noyau. Par exemple, VP5, la protéine majeure de la capsid, nécessite l'association avec des protéines chaperonnes, préVP22a et/ou VP19C, pour être importée au noyau (85, 100). Dans le but de promouvoir l'assemblage de nouvelles capsides, la protéine d'échafaudage préVP22a interagit avec différentes protéines virales dont la protéine majeure de la capsid (VP5), la protéase virale (U_L26), la protéine du *portal* (U_L6) ainsi qu'avec elle-même. Il y aura donc une agrégation de ces complexes, la formation de capsomères, l'incorporation du *portal* et le recrutement des triplexes (Figure 10). Ainsi, les précurseurs des capsides matures, les procapsides, sont créés (4, 49, 83, 92, 100).

La maturation des procapsides se fait via plusieurs étapes de protéolyse des protéines d'échafaudage et de la protéase virale. Le gène U_L26 code pour deux protéines, la protéase virale PRA et la protéine d'échafaudage préVP22a; cette dernière étant encodée par une section de ce même gène, $U_L26.5$ (47). Une des étapes définissant bien la maturation des capsides est l'angularisation des procapsides, c'est-à-dire le passage d'une forme plutôt sphérique à une forme icosaédrale. Pour que le changement de conformation de la capsid puisse avoir lieu, il y a autoprotéolyse de la protéase virale PRA en trois sections nommées VP24 (qui constitue la forme active de la protéase), VP21 et un peptide de 25 acides aminés. Ensuite, il y a clivage de la protéine d'échafaudage préVP22a qui génère VP22a et un peptide de 25 acides aminés. VP22a, VP21 et les résidus de 25 acides aminés seront relâchés au cours des étapes de maturation de la capsid et de l'encapsidation de l'ADN viral (Figure 10) (4, 22, 67, 122). Cette étape de maturation des procapsides donne forme aux capsides B qui ne contiennent toujours pas d'ADN.

Finalement, l'ADN viral doit être empaqueté dans les capsides néoformées. L'encapsidation nécessite plusieurs protéines virales qui incluent les produits des gènes *U_L6*, *U_L12*, *U_L15*, *U_L17*, *U_L25*, *U_L28*, *U_L32* et *U_L33*. Puisque la réplication de l'ADN viral crée un concatémère d'ADN, celui-ci devra être clivé en monomère pour reconstituer une unité simple du génome viral. Ce clivage s'effectue à la suite de l'encapsidation complète d'une unité d'ADN viral. L'ADN est inséré dans la capsidie via le *portal* composé de douze molécules de *U_L6*, et l'entrée se fait simultanément au déplacement et à la sortie hors de la capsidie des protéines d'échafaudage, VP21 et VP22a. Une fois une unité complète du génome insérée dans les capsidies, le complexe appelé « terminase » (formé de *U_L15*, *U_L28* et *U_L33*) clive le concatémère d'ADN viral au site *a* terminal (Figure 6 et 10). Pour empêcher une sortie non contrôlée de l'ADN viral, *U_L25*, qui agit comme un bouchon, est impliquée dans la rétention de l'ADN à l'intérieur de la capsidie (4, 32, 47, 64). Une fois l'empaquetage de l'ADN terminé, des capsidies matures sont obtenues, soient les capsidies C.

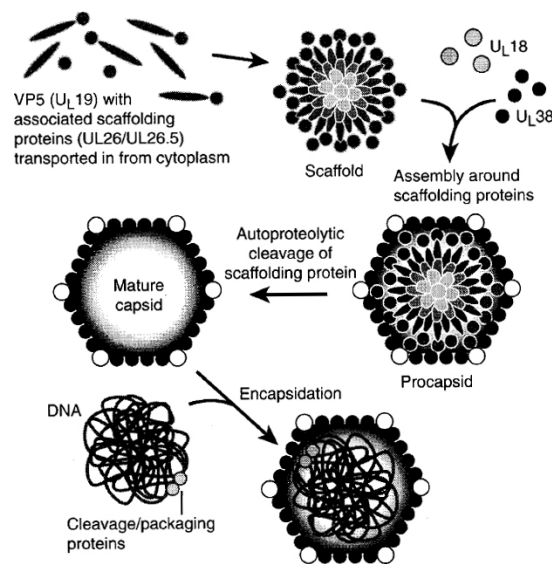


Figure 10. Modèle d'assemblage des capsidies et de l'encapsidation de l'ADN viral. Dans ce modèle, plusieurs protéines virales sont recrutées pour former la procapsidie. Cette capsidie subit ensuite des étapes de maturation qui permettent éventuellement à l'ADN viral d'être encapsidé (121).

1.2.5.3 Sortie du virus

Les nouvelles capsides virales de l'HSV-1, formées dans le nucléoplasme, doivent franchir de nombreuses étapes avant d'être relâchées hors de la cellule en tant que virus matures infectieux. Le parcours exact que va emprunter le virus dans la cellule lors des dernières étapes d'assemblage, de maturation et de transport sont encore aujourd'hui matière à controverse. Le début du périple du virus hors du noyau lui permet d'atteindre l'espace périnucléaire, c'est-à-dire l'espace compris entre la membrane nucléaire interne et externe. Cette étape du cycle viral est généralement acceptée et donne lieu à des virus enveloppés présents dans cet espace (4, 76, 78, 115). Pour que cela puisse se produire, le virus doit d'abord franchir la lamina nucléaire pour ensuite atteindre la membrane nucléaire interne où il bourgeonnera. Cela se produit grâce à la participation d'au moins trois protéines virales (U_L31 , U_L34 et U_S3) et une protéine cellulaire (PKC) (57, 76, 80). Bien que des étapes du parcours soient unanimement acceptées, trois modèles tentant d'expliquer la sortie des virus du noyau puis leur transport jusqu'au Golgi et réseau *trans*-Golgien (TGN) existent (32, 77, 78).

Le modèle luminaire (Figure 11) propose que les virions enveloppés présents dans l'espace périnucléaire migrent jusqu'au Golgi et TGN à l'aide de vésicules de transport. Ces virus enveloppés sont relâchés hors de la cellule via la route de sécrétion normale de la cellule (24, 65, 112, 126, 128). Le problème avec ce modèle réside dans la composition des virus périnucléaires lorsque comparée à la composition des virus extracellulaires. Par exemple, les protéines U_L31 et U_L34 qui sont présentes dans les virus périnucléaires ne sont pas retrouvées dans les virus extracellulaires. Aussi, la composition lipidique des virions extracellulaires ressemble à la composition des membranes cytoplasmiques plutôt que nucléaires. Finalement, ce modèle ne fournit aucune réponse expliquant la présence de capsides nues dans le cytoplasme (68, 99, 118).

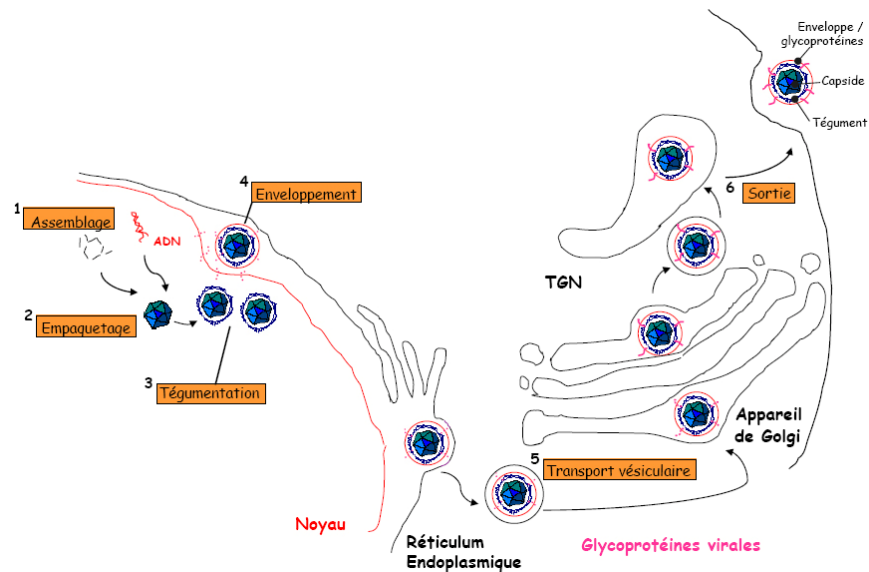


Figure 11. Modèle luminaire de la sortie de l'HSV-1 de la cellule. Dans ce modèle les capsides virales enveloppées présentes dans des vésicules de sécrétion sortent de la cellule en employant la voie de sécrétion de la cellule. (Modèle tiré du mémoire de Sophie Turcotte 2005)

Le modèle de ré-enveloppement (Figure 12) est le modèle ayant reçu le plus d'appuis. Dans ce modèle, les capsides enveloppées dans l'espace périnucléaire fusionnent avec la membrane nucléaire externe ce qui permet la relâche des capsides nues dans le cytoplasme. Les capsides migrent ensuite jusqu'au TGN dans lequel elles bourgeonnent pour ainsi obtenir leur enveloppe finale. Elles sont ensuite éjectées hors de la cellule à l'aide de vésicules de transport (4, 115). Ce modèle constitue le modèle le plus complet et résout les problèmes de composition qui existe entre les virus périnucléaires et les virus extracellulaires ; mais il n'est pas non plus sans défaut. Les problèmes avec ce modèle sont d'ordre mécanique, c'est-à-dire que certains des mécanismes impliqués et possédant des rôles clés dans le transport des capsides virales ne sont pas suffisamment définis ou prouvés. Il a été démontré, à l'aide de mutants possédant des délétions pour les glycoprotéines B et H (gB et gH), que ces virus ne peuvent traverser la membrane nucléaire externe et ainsi s'accumulent dans l'espace périnucléaire. D'un autre côté, ces glycoprotéines sont nécessaires pendant l'entrée du virus dans la cellule et elles doivent s'associer à des récepteurs présents à la surface cellulaire. Deux problèmes surviennent : premièrement, il n'a pas été démontré que leurs récepteurs pouvaient se trouver au

niveau de la membrane nucléaire externe ou tout autre récepteur avec lequel elles pourraient interagir et deuxièmement, si gB ou gH sont individuellement manquants, aucune accumulation de virus dans l'espace périnucléaire n'est observée (28, 29, 32, 39, 76, 106). Ce cas, parmi tant d'autres, démontre la nécessité de mieux comprendre les processus qui sont d'une extrême importance dans l'appui de ce modèle.

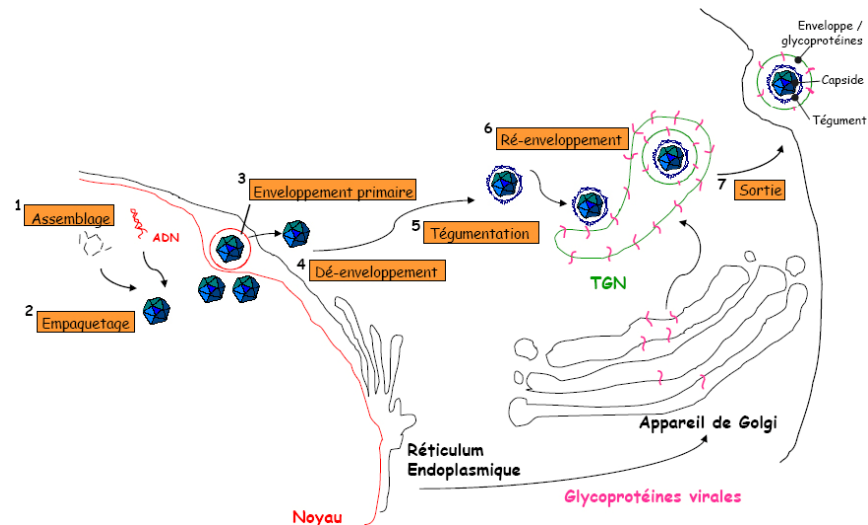


Figure 12. Modèle de ré-enveloppement de la sortie de l'HSV-1 de la cellule. La sortie des capsides virales hors de la cellule se fait en plusieurs étapes. D'abord les capsides présentes dans le noyau bourgeonnent dans l'espace périnucléaire et acquièrent leur enveloppe primaire. Elles fusionnent ensuite avec la membrane nucléaire externe et sont éjectées dans le cytoplasme sous forme nue. L'étape de ré-enveloppement se fait au TGN et les virus enveloppés sont sécrétés hors de la cellule à l'aide de vésicules de sécrétion. (Modèle tiré du mémoire de Sophie Turcotte 2005)

Le dernier modèle récemment proposé, le modèle de pores élargis (Figure 13), ajoute au modèle lumineux une voie alternative, ou seconde voie de sortie des capsides virales du noyau. Dans ce modèle, les capsides non enveloppées dans le noyau peuvent en sortir en empruntant des pores nucléaires dilatés. Les capsides nues présentes dans le cytoplasme pourraient ensuite bourgeonner dans tous les compartiments de la cellule, ce qui inclut l'espace périnucléaire, le réticulum endoplasmique et le Golgi. Peu importe où les capsides bourgeonnent, elles seront ensuite sécrétées hors de la cellule par la voie de sécrétion classique (65, 127). Ce

modèle se base particulièrement sur des observations obtenues en microscopie électronique. Étant donné la grande taille des capsides (environ 100 MDa), le passage de celles-ci à travers des pores nucléaires dilatés ne peut s'effectuer de façon passive. Il y aurait une perte de l'intégrité nucléaire et donc de la rétention des protéines nucléaires ; ce qui n'est pas observé lors d'une infection. Des études concernant le déplacement de certaines protéines virales lors de l'infection confirment que l'intégrité nucléaire est conservée. Dans ce sens, les protéines ICP27 et ICP0 se déplacent de façon coordonnée entre le nucléoplasme et le cytoplasme lors d'une infection; ce qui n'est pas le cas d'ICP8 qui est retenue au noyau. Cela ne supporte pas l'hypothèse de la sortie des capsides virales hors du noyau via des pores nucléaires élargies (6, 32, 75, 113, 119).

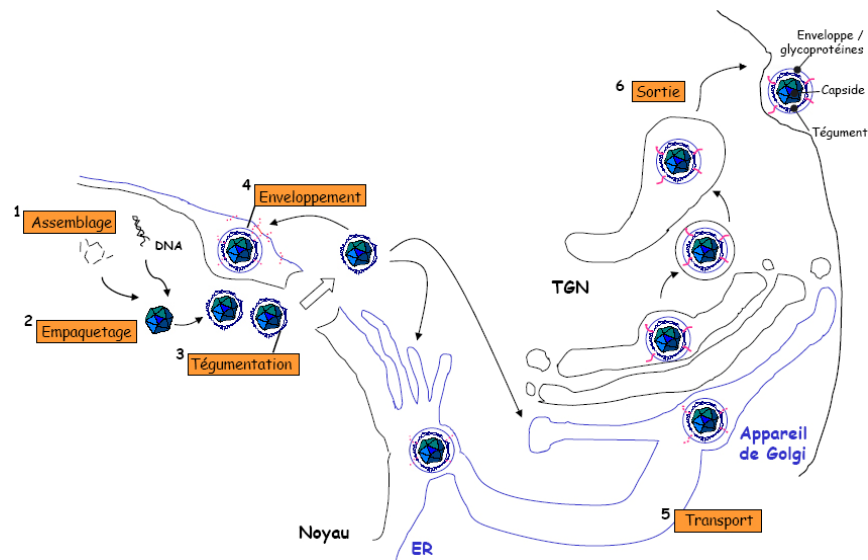


Figure 13. Modèle de pores élargis de la sortie de l'HSV-1 de la cellule. Ce modèle présente une voie alternative de la sortie des capsides du noyau. Pour se rendre au cytoplasme les capsides peuvent sortir du noyau à l'aide de pores nucléaires élargis. Elles pourront ensuite bourgeonner dans les compartiments cytoplasmiques et être éjectées hors de la cellule par la voie de sécrétion classique. . (Modèle modifié et tiré du mémoire de Sophie Turcotte 2005)

En se basant principalement sur le modèle de ré-enveloppement, plusieurs données concernant les étapes franchies par le virus lors de sa sortie de la cellule ont été recueillies. La plupart de ces données ont été générées à l'aide d'expériences

utilisant des mutants de l'HSV-1, l'expression de protéines virales seules ou en combinaison dans des cellules ou encore dans des essais *in vitro*. Ainsi, il a été démontré que les protéines virales (U_S3, gB, gD, gH, gL, ICP34.5) sont impliquées dans la fusion des virus enveloppés et présents dans l'espace périnucléaire avec la membrane nucléaire externe, ce qui permet la relâche de capsides nues dans le cytoplasme (10, 28, 29, 32, 58, 76, 77). Dans ce modèle, les capsides nues utilisent les microtubules et des moteurs protéiques, les kinésines, afin de migrer jusqu'au TGN où elles subissent une seconde étape d'enveloppement, c'est-à-dire l'enveloppement secondaire. Ceci est effectué par des protéines tégmentaires présentes à la surface des capsides, à l'aide, entre autres, de U_L36, U_L37, U_S9 et U_S11. (20, 69, 77, 105, 107). Durant ces étapes dites de tégmentation, des protéines tégmentaires sont rajoutées aux capsides et participent, durant le transport, à leur maturation et à l'enveloppement final au TGN. Il est important de noter que la tégmentation des capsides débute à l'intérieur du noyau, mais qu'elle est beaucoup plus importante dans les étapes de maturation cytoplasmique.

Il a été clairement démontré que le site principal d'accumulation final du virus était le Golgi et/ou le TGN. À cet endroit, plusieurs glycoprotéines virales s'accumulent indépendamment des capsides (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM, gN) (76, 115, 128). Ces protéines, en concert avec les protéines tégmentaires de la capside (U_S3, U_L11, U_L13, U_L16, U_L20, U_L21, U_L36-37, U_L46 à 49, U_L51.) interagissent ensemble afin de permettre aux capsides de bourgeonner dans ces compartiments. En bourgeonnant, les capsides acquièrent des protéines du tégment et leur enveloppe finale possédant les glycoprotéines de surface. Ainsi, les virus terminent leur processus de maturation (34, 35, 68, 69, 76, 77, 130).

Le résultat de l'enveloppement final est un virus mature contenu dans une vésicule de sécrétion du TGN qui pourra migrer jusqu'à la surface cellulaire et fusionner avec la membrane plasmique pour éjecter les virus hors de la cellule. Les processus qui régissent ces étapes du cycle viral ne sont pas, encore aujourd'hui, bien caractérisés. L'implication de deux protéines virales a par contre été démontrée, il s'agit de la protéine U_L20 et de la glycoprotéine K ainsi que d'une protéine cellulaire PKD ((2, 34, 36) et Rémillard-Labrosse et al., soumis).

1.3 Herpèsvirus et la machinerie d'ubiquitination

1.3.1 L'ubiquitination

Le rôle de l'ubiquitination était auparavant particulièrement associé à la dégradation de protéines par le protéasome. Ainsi, la dégradation de protéines ubiquitinées permet à la cellule de se débarrasser des protéines mal-repliées ou désuètes (1, 38, 95, 96). Aujourd'hui, une multitude de fonctions sont associées à ce type de modification post-traductionnelle. Il est de plus en plus clair que l'ubiquitination est impliquée dans plusieurs processus fondamentaux tels que le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la transcription, le transport intracellulaire, l'endocytose, l'apoptose, le *processing* d'antigènes, etc.(19, 38, 48, 50, 54, 62, 96, 124, 125).

L'ubiquitine (Ub) est une protéine très conservée de 8.5 kDa (76 a.a.) qui lie de façon covalente une lysine de la protéine cible via une glycine située à son extrémité C-terminale (90, 125). L'ubiquitination se fait en trois étapes à l'aide d'une cascade enzymatique (Figure 14). L'*ubiquitin-activating enzyme*, appelée E1, interagit avec l'ubiquitine dans le but de la modifier et de l'activer dans un processus ATP-dépendant. Ensuite, la molécule d'ubiquitine pourra être transférée au partenaire de la E1, l'*ubiquitin-conjugating enzyme*, aussi appelée E2. Cette enzyme participe à l'ubiquitination spécifique des différentes protéines cibles en interagissant avec l'*ubiquitin-protein ligase*, ou E3. Il existe deux familles de E3 qui sont caractérisées par un domaine protéique conservé : les E3 possédant un domaine *HECT* et les autres possédant un domaine *RING FINGER*. Les E3 possédant un domaine *HECT* interagissent avec les E2-Ub (i.e. E2 possédant l'ubiquitine) et provoquent le transfert de l'ubiquitine sur elle-même. Ces mêmes E3 seront ensuite responsables du transfert de l'ubiquitine sur le substrat, c'est-à-dire la protéine cible, avec qui elles interagissent également. La seconde famille, les E3 possédant les domaines *RING FINGER*, interagit aussi avec les E2-Ub, mais dans ce cas, le transfert de l'ubiquitine sur le substrat est fait directement à partir de la E2-Ub (1, 124). Ainsi, le produit de cette cascade enzymatique est une protéine ubiquitinée.

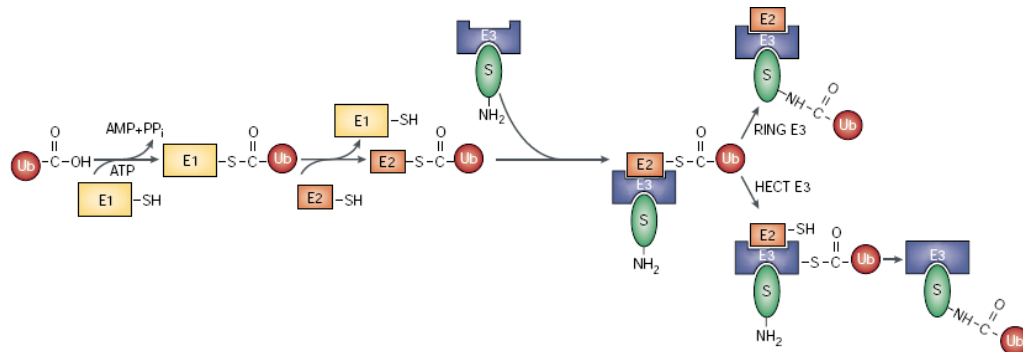


Figure 14. Cascade enzymatique de l'ubiquitination d'une protéine. Pour qu'une molécule d'ubiquitine puisse être ajoutée à une protéine, la E1 modifie et active l'ubiquitine par un processus ATP-dépendant. L'ubiquitine est ensuite passée à la E2 qui interagit avec une E3. Si la E3 est une *HECT* ligase, l'ubiquitine est transférée à celle-ci puis sur le substrat. S'il s'agit d'une *RING FINGER*, la molécule d'ubiquitine est transférée directement de la E2 au substrat. (124)

Les processus régulant l'ubiquitination et le choix des protéines cibles sont excessivement régulés et spécifiques. Cela est possible grâce à une importante variété d'enzymes catalysant l'ubiquitination, c'est-à-dire les E1, E2 et E3 (44, 124). Il existe une seule E1 connue (plus particulièrement deux isoformes) mais de vingt à trente E2 et des centaines de E3. La spécificité est conférée à l'aide des milliers de combinaisons et/ou d'interactions possibles entre les protéines constituant la machinerie d'ubiquitination et leurs protéines cibles (38, 45, 46, 124).

Les types d'ubiquitination sont variés de même que leurs fonctions. Les plus communs sont la monoubiquitination et la polyubiquitination. La monoubiquitination, qui représente la modification la plus simple, implique l'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible. L'autre type de modification post-traductionnelle, la polyubiquitination, est la formation d'une chaîne d'ubiquitine à partir d'une molécule d'ubiquitine initiale présente sur une protéine. L'ubiquitine possède sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui peuvent toutes, vraisemblablement, servir lors de la formation de ces chaînes. Ces lysines constituent donc des sites potentiels d'ubiquitination sur les molécules d'ubiquitine elles-mêmes. Qu'il s'agisse d'une monoubiquitination ou d'une polyubiquitination, les phénomènes auxquels elles mènent sont multiples. La monoubiquitination est impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que

l'endocytose, le triage endocytaire, la régulation des histones, la transcription et la réparation de l'ADN, etc. (44, 46). Les processus dans lesquels la polyubiquitination est impliquée varient selon la position et/ou le type de liens qui unit entre elles les lysines des ubiquitines formant la chaîne. Les plus connues sont les chaînes formées à partir des lysines 48 (K48) et 63 (K63). Les chaînes formées à partir des lysines 48 sont associées à la dégradation protéique via le protéasome et celles formées à partir des lysines 63 sont associées principalement à la réparation de l'ADN et au triage de protéines (46). Il a aussi été démontré que l'ubiquitination peut se produire sur des cystéines au lieu des lysines et que la formation de chaînes mixtes composées de liens K48 et K63 est possible (12, 46, 56, 94).

Le contrôle de l'ubiquitination, en plus des processus mentionnés ci-haut, et le recyclage de molécules d'ubiquitine sous forme monomérique se font à l'aide d'enzymes de dé-ubiquitination, les dé-ubiquitinases (DUB). Ce sont des protéases ubiquitine-spécifiques qui peuvent enlever les molécules d'ubiquitine présentes sur une protéine en clivant une seule ubiquitine (monoubiquitination) ou en désassemblant les chaînes de poly-ubiquitine. Leur rôle principal est le recyclage de molécules d'ubiquitine sous une forme libre et réutilisable. Ces dé-ubiquitinases sont donc responsables, entre autres, du maintien de la concentration de molécules monomériques d'ubiquitine dans la cellule. Tout comme la mécanique qui régit l'ubiquitination, les DUBs sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires (120, 129). Elles s'avèrent donc un complément de la machinerie d'ubiquitination.

1.3.2 Relation de l'HSV-1 avec la machinerie d'ubiquitination

La machinerie d'ubiquitination et l'ubiquitine sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Il n'est donc pas surprenant que cette machinerie soit utilisée par plusieurs virus, dont l'HSV-1, lors de leur cycle d'infection. L'HSV-1, en plus de prendre d'assaut ce réseau d'ubiquitination, imite quelques enzymes clés de cette machinerie. ICP0 et U_L36, deux protéines virales, sont des acteurs d'une grande importance en ce qui a trait à ce processus.

ICP0 est une protéine tégmentaire multifonctionnelle importante pour la transcription des gènes viraux, pendant la réactivation des virus en latence et lors de la réorganisation des sites nucléaires ND10 (25, 71, 102). Plus directement en lien

avec la machinerie d'ubiquitination, cette protéine virale possède deux domaines qui présentent une activité E3 ubiquitine ligase (41, 42). Cette activité induit l'auto-ubiquitination d'ICP0 et sa dégradation via le protéasome. Cependant, ICP0 interagit très fortement avec une dé-ubiquitinase cellulaire appelée USP7. Elle va également l'ubiquitiner et provoquer sa dégradation. Cela va créer une synergie entre ces deux partenaires, un jeu d'ubiquitination/dé-ubiquitination, et ainsi provoquer une stabilisation et une régulation de la quantité des ces protéines présentes dans la cellule au cours d'une infection (7). Le rôle d'ICP0 ne se limite pas à ce seul exemple. Cette protéine présente également la capacité d'interagir avec différentes *ubiquitin-conjugating enzymes* (E2), dont UbcH3, UbcH5a et UbcH6 (41, 42, 119). Il lui est donc possible de provoquer sa propre ubiquitination et sa propre dégradation ainsi que celle d'une panoplie de protéines cellulaires et virales.

La seconde protéine virale U_L36, une protéine tégumentaire, possède aussi une activité liée à la machinerie d'ubiquitination. Tout comme ICP0, U_L36 est responsable de plusieurs processus lors du cycle d'infection virale. Elle est impliquée dans le transport rétrograde et antérograde des capsides virales le long des microtubules, dans l'injection de l'ADN viral dans le noyau et participe à l'assemblage de la couche tégumentaire (52, 69, 76, 77, 130). En ce qui a trait à la machinerie d'ubiquitination, U_L36 possède en son extrémité N-terminale une activité dé-ubiquitinase qui est aussi conservée dans la famille *Herpèsviridea* (40, 53, 104). Les cibles protéines-ubiquitines de cette activité dé-ubiquitinase ne sont pas encore connues, mais la délétion de ce domaine provoque un ralentissement et une baisse de la production virale. (63)

Une étude récente en protéomique effectuée sur des virions extracellulaires hautement purifiés a aussi mis en lumière différents liens avec la machinerie d'ubiquitination. Il a été démontré que les virus matures possèdent en eux ICP0, U_L36, de l'ubiquitine libre et une *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2) cellulaire, UbcH7 (68). Le rôle de ces molécules présentes au sein du virus n'est pas connu, mais il existe inévitablement un lien direct avec la machinerie d'ubiquitination.

Dans une cellule infectée, plusieurs protéines virales sont ubiquitinées. C'est le cas de U_L6, la protéine constituant le *portal* de la capsid, de U_L9, la protéine de liaison à l'origine de répllication de l'ADN viral, de U_S9, une protéine tégumentaire impliquée dans la dégradation de protéines via le protéasome, ainsi que de ICP0 mentionnée précédemment. Il est clair que cette modification post-traductionnelle

permet de contrôler la quantité de protéines virales présente dans la cellule, de faciliter des interactions protéine-protéine, de promouvoir le transport intracellulaire, etc. Ceci suggère que l'ubiquitination de protéines virales est nécessaire et importante durant une infection et semble être impliquée dans une multitude d'étapes du cycle viral (7, 9, 11, 23). Cependant, la présence de ces protéines au sein du virus extracellulaire mature n'a pas encore été élucidée.

La machinerie d'ubiquitination est d'une importance capitale dans les cellules eucaryotes. Puisque plusieurs virus tels que l'HSV-1 utilisent cette machinerie, celle-ci doit nécessairement être importante au sein du cycle viral.

2 Article : La protéine majeure de la capsid de l'HSV-1 est ubiquitinée

2.1 Objectifs

Un lien étroit entre la machinerie d'ubiquitination et l'HSV-1 existe. Notre objectif est d'étudier le rôle que joue l'ubiquitination pour l'HSV-1. Puisqu'il existe des protéines virales qui imitent certaines enzymes impliquées dans les processus d'ubiquitination et que les virus matures possèdent de l'ubiquitine libre et des enzymes d'ubiquitination, il est d'un grand intérêt de connaître et de comprendre : i) si les enzymes d'ubiquitination présentes dans le virus sont fonctionnelles, ii) si elles jouent un rôle dans le cycle viral et iii) quelles protéines virales présentes au sein du virus sont ubiquitinées et leurs rôles potentiels dans le cycle de réplication virale. Le premier aspect qui sera étudié et qui représente la ligne directrice du présent mémoire est l'identification des protéines virales ubiquitinées dans les virus matures ainsi que leurs rôles potentiels.

2.2 Note sur le texte

Ce chapitre reproduit le texte intégral de l'article intitulé *Major HSV-1 capsid protein VP5 is ubiquitinated in the virion*, par Pascal Raymond et Roger Lippé. Cet article a été soumis à la revue *Journal of virology*. Quelques modifications au niveau de la forme de l'article ont été apportées afin de mieux intégrer ce manuscrit à l'ensemble du mémoire.

Major HSV-1 capsid protein VP5 is ubiquitinated in the virion

Pascal Raymond and Roger Lippé*

Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal,

Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Running title: HSV-1 VP5 is ubiquitinated

Word count for the abstract: 222

Word count for the text: 5461

**Corresponding author:*

*Dr. Roger Lippé
Department of Pathology and Cell Biology
University of Montreal
PO Box. 6128, Succursale Centre-Ville
Montreal, Quebec
Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-5616
Fax: (514) 343-5755
E-mail: roger.lippe@umontreal.ca*

2.3 Abstract

Ubiquitination is an omnipresent process that plays a central role in proteasomal degradation and a plethora of cellular functions. Not surprisingly, viruses have evolved to tap into this machinery. Hence the HSV-1 genome codes for an E3 ubiquitin ligase (ICP0) as well as a deubiquitinase (U_L36). Moreover, various HSV-1 proteins are subject to ubiquitination and/or are regulated by ubiquitin, while many cellular proteins are targeted for proteasomal degradation during an infection. Inhibition of the proteasome with MG132, a drug that also depletes free cytosolic ubiquitin, hinders HSV-1 delivery to the nucleus upon entry and alters the function and intracellular shuttling of some viral proteins. Finally, we recently identified ubiquitin related components in mature virions, suggesting ubiquitination may play a role within assembled virions. The present data take this one step further and show that the major HSV-1 capsid protein VP5 is an ubiquitinated substrate in those virions. Interestingly, VP5 protein levels were insensitive to MG132, indicating VP5 ubiquitination did not simply target the protein for degradation. Surprisingly, both cytosolic and nuclear VP5 were ubiquitinated while addition of MG132 after viral replication did not perturb capsid assembly or egress. A more detailed characterization of VP5 revealed that the bulk of the protein is mono-ubiquitinated. Finally, mass spectrometry revealed a potential differential ubiquitination status at lysines 810 and 1275 in cytosolic and virion associated VP5.

2.4 Introduction

Ubiquitin is a eukaryotic 8.5 kDa protein that is post-translationally added to select target proteins via a covalent bond between its terminal glycine and a lysine residue on the target protein (43). Free cytosolic ubiquitin is transferred onto its target by a complex apparatus that sequentially puts into play a unique E1 ubiquitin activating enzyme called UBE1 or UBA in mammals, an E2 conjugating enzyme (20-30 different E2 in mammals) and one of an estimated 500-600 mammalian E3 ligases (29). While addition of a single ubiquitin residue leads to mono-ubiquitination, the additional attachment of a ubiquitin chain to one of the seven lysines present on ubiquitin itself (amino acids 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) results in poly-ubiquitination. These ubiquitination events are important as they modulate the function of many proteins and cellular processes, including protein degradation, cell cycle, differentiation, intracellular transport, immune responses, DNA repair, chromatin structure and apoptosis (21, 25, 44, 51).

Given the pleiotropic roles of ubiquitination, many viruses have evolved to exploit it. However, the exact means by which they use this machinery is only now been unraveled. For instance, the Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome codes for the two ubiquitin related proteins ICP0 and U_L36. ICP0 is a multifunctional tegument protein essential for viral gene activation, latency and reorganization of ND10 nuclear sites (17, 18, 38). ICP0 incorporates two distinct E3 ubiquitin ligase domains (5, 23, 55). While auto-ubiquitination leads to ICP0 degradation, its interaction with the host USP7 deubiquitinase dampens this outcome. Conversely, USP7 is a substrate of the ICP0, hinting at a reciprocal modulation (3, 8). ICP0 also functionally interacts, at least *in vitro*, with the UbcH3, 5a and H6 E2 conjugating enzymes (5, 22). On the other hand, U_L36 is a large tegument protein whose amino terminus contains a deubiquitin activity that is conserved among other herpesviruses (19, 31, 48). Similar to ICP0, U_L36 is involved in numerous aspects of the viral life cycle, including delivery of the viral genome into the nucleus, transport along microtubules, bridging the capsid with the teguments and viral egress (14, 28, 32, 40, 50). In addition to ICP0 and U_L36, a recent proteomic study has also highlighted the potential incorporation of free ubiquitin and the cellular ubiquitin E2 conjugating enzyme UbcH7 in mature virions (37). It is therefore clear that HSV-1 virions incorporate several ubiquitin players.

Aside from ICP0 and U_L36, the importance of ubiquitination during the HSV-1 infection is highlighted by various reports. Hence, the virus modulates through ubiquitination the activity of several host proteins, including CD83, NF_κB, Cdc34, PML, Sp100, p53, CENP-A, DNA-PKCS and RNAP II (4, 9, 11, 15, 20, 22, 33, 35, 36, 41, 55, 57). Conversely, several viral proteins are known ubiquitin substrates in the cell, including U_L6, U_L9, U_S9 and the aforementioned ICP0 (6-8, 16). HSV-2 U_L56 also binds to and increases the ubiquitination of Nedd4, an ubiquitin related molecule (54). Addition of MG132, a drug that blocks the degradation of polyubiquitinated proteins by the proteasome and thus prevents the recycling of free ubiquitin (2, 24, 39, 42, 49, 52), impairs an HSV-1 post entry step (12). Once the virus is in the nucleus, MG132 further prevents the late cytoplasmic relocalization of the critical ICP0 viral transactivator (30). Viral gene transactivation by the VP16 viral protein also depends on an ubiquitination activity (47, 58). In addition, the U_L36 deubiquitinase appears to be essential for MDV growth and oncogenicity (27). Finally replication and transcription of the related human cytomegalovirus is inhibited by the drug (45). Altogether, these observations strongly hint at the active use of the ubiquitin machinery by HSV-1.

Given the importance of ubiquitination for HSV-1 and the presence of ubiquitin enzymes in virions, the presence of ubiquitinated substrates in the assembled virus was evaluated to decipher the potential role of this machinery in the mature virus. The present study identified VP5, the major constituent of HSV-1 capsid, as a significant ubiquitinated species in purified mature virions. These results were confirmed by Western blotting, immunoprecipitation and with HA tagged ubiquitin constructs. Treatment of infected cells with the MG132 proteasomal inhibitor suggested ubiquitination does not target VP5 for degradation and hence likely affects some other VP5 properties. However, the modification was not an obvious signal for VP5 transport or incorporation into the virion as VP5 was always found to be ubiquitinated. In fact, the vast majority of the VP5 pool was similarly mono-ubiquitinated, with only 15% of VP5 not showing evidence of ubiquitination. Furthermore, capsid assembly and egress of newly assembled capsids were also unaltered by MG132. Finally, to understand the putative role of ubiquitin on VP5, mass spectrometry was performed to identify which residues might be ubiquitinated. This analysis revealed two potential ubiquitination sites at lysines 810 and 1275 on

virion associated VP5. Surprisingly, ubiquitination was only detected on lysine 1275 on cytosolic VP5, suggesting a possible mechanism of regulation.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Cells and viruses.

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Mediacorp), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Wild type HSV-1 strain 17⁺ and HSV-1 K26 GFP viruses, provided respectively by Beate Sodeik and Phashant Desai, were propagated on BHK cells and titrated on Vero cells as before (37, 46, 53). All infections were usually done on sub-confluent cells at a multiplicity of infection (MOI) of 5, unless otherwise indicated.

2.5.2 Antibodies.

Anti-ICP5 is a monoclonal antibody (EastCost Bio) specific for the HSV-1 major capsid protein VP5. The Remus polyclonal antibody, generously provided by Beate Sodeik, was raised against enriched capsids and thus recognizes multiple viral proteins including VP5 (37, 40). Mouse monoclonals against ubiquitin and hemagglutinin were acquired from Santa Cruz biotechnology. A second unrelated rabbit polyclonal against ubiquitin was also used (Boston Biochem). A gamma actin specific antibody was purchased from Chemicon while a mouse monoclonal antibody directed against all forms of the RNA polymerase II was purchased from Fitzgerald. All primary antibodies were diluted 1:1000 and appropriate secondary antibodies coupled to HRP were diluted 1:20,000 (Jackson ImmunoResearch).

2.5.3 Transfection of HeLa cells with ubiquitin constructs.

HeLa cells were transfected according to manufacturer's instructions with lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) and plasmids (generous gifts from Ted Dawson and Eric Cohen) expressing either wt HA tagged ubiquitin (pRK5 HA-Ub), single point mutants (pRK5 HA-Ub K48R or K63R) or a ubiquitin variant with all its lysines mutated to arginines (pRK5 HA-Ub KO). Twenty four hours later, they were infected at a MOI of 5. Twenty four hours post infection (hpi), cells were harvested and VP5 immunoprecipitated as described below.

2.5.4 Cell lysates.

Infected HeLa cells were washed once 24 hpi with ice cold PBS and harvested with a cell scraper in ice cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, and a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich)). The lysates were clarified by centrifuging at 18,000 x g for 30 minutes at 4°C and the supernatant collected and stored at -80°C.

2.5.5 *In vitro* nuclear egress assay and preparation of extranuclear capsids.

The assay was performed as described elsewhere (46). Briefly, nuclei were purified from HeLa cells infected with HSV-1 and radiolabelled with 25 μ Ci/ml of 3 H thymidine (Perkin Elmer). These nuclei were then incubated for 6 hours *in vitro* with 2 mg/ml cytosol, an energy regenerating system (17.3 mM creatine phosphate, 87 μ g/ml creatine kinase, 2.17 mM adenosine triphosphate; Roche) and a nuclear buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl and 1 mM dithiothreitol). Capsids released from the nuclei were separated from the nuclei over a 0.45 μ m filter (Costar), treated with 500 u/ml of DNase I (Roche) for 30 minutes at 37°C, TCA precipitated and quantified by liquid scintillation on a Packard 1900TR beta counter. For Western blot analyses, non radio-labelled capsids from the above 0.45 μ m flowthrough were centrifuged at 18,000 x g for 1 hour, resuspended in 50 μ l TNE buffer (0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.5) and loaded on SDS-PAGE gels. When indicated, a parallel nuclei preparation from uninfected cells served as control.

2.5.6 Cytosol and extracellular virions.

Cytosol was prepared as previously described (46). Briefly, uninfected HeLa cells were washed with PBS / 5 mM MgCl₂ then mechanically broken in KEHM (50 mM KCl, 10 mM EGTA, 50 mM Hepes pH 7.4, 2 mM MgCl₂) supplemented with 1 mM dithiothreitol and a cocktail of proteases inhibitors (Sigma-Aldrich). Intact cells and nuclei were removed by low speed centrifugation (800 x g) for 20 minutes. The supernatant was then centrifuged at 267,000 x g for 30 minutes. The resulting

cytosol, devoid of capsids and virions, was stored at -80°C . Extracellular virions were prepared as recently described (37).

2.5.7 Immunoprecipitation of VP5.

A two step procedure was used to first remove non specific contaminants then immunoprecipitate VP5. Hence, 1 mg of cytosol generated as above but prepared from infected cells at 8 hpi was incubated without antibody with 50 μl of protein G-agarose beads (Roche) for 1 hour at 4°C with end-over-end rotation. These beads were then removed by brief centrifuge and replaced with 50 μl of fresh beads along with VP5 antibodies (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti ICP5 monoclonal or 1:50 dilution of the Remus polyclonal antibody). Following an overnight incubation at 4°C , the beads were harvested by centrifugation and the unbound proteins discarded. The beads were then washed twice with wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.2% Nonident P-40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF) and once with lysis buffer (see cell lysates). 2X sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulfate, 0.2 % bromophenol blue, 20% glycerol, 4% β -mercaptoethanol) was added to the beads, the samples boiled for 10 minutes and the proteins loaded on 8% SDS-PAGE gels. For mass spectrometry, 5 mg of infected cell lysates, 250 μl beads and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ICP5 antibody were used.

2.5.8 MG132 treatment.

To test the impact of this proteasome inhibitor, 25 μM MG132 (12, 54) was added to the culture medium at different times post infections (as indicated in the figure legends). For the 0 hour time point, the drug was added 15 minutes prior to inoculation with the virus. When used in the *in vitro* nuclear egress assay, MG132 was present throughout the full 6 hour duration of the assay.

2.5.9 VP5 stability assay.

To test if inhibition of the proteasome had an overall effect on VP5 protein levels, cells were infected at an MOI of 10 and MG132 added at 0, 3 and 6 hpi. At 10 hpi, the cells were washed twice with ice cold PBS and harvested with a cell scraper

in lysis buffer. For each samples, 25 µg of total cell lysate was resolved on a 8% SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane and probed with ICP5, γ actin or RNAP II antibodies as described below.

2.5.10 SDS-PAGE and Western blots.

Naked cytoplasmic capsids produced *in vitro* (see above), highly purified extracellular virions, cell lysates and immunoprecipitation samples were mixed with sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, and 2% β-mercaptoethanol), boiled for 10 minutes and migrated on 8% SDS-PAGE gels. After transfer to PVDF membranes, the samples were analysed probed by Western blots with the appropriate antibodies and revealed with West Pico (Pierce). Where indicated, the images were quantified with Image J version 1.40g using the integrated density tool. To evaluate the relative abundance of the two VP5 bands seen in sufficiently exposed gels, the sum of the two bands was set to 100%. To measure the impact of MG132 on protein levels, net relative values were calculated as follows: (Band of interest – background) / (corresponding actin band – background).

2.5.11 Fluorescence microscopy.

Cells were infected at an MOI of 5 with HSV-1 mutant K26GFP and viruses allowed to proliferate for 24 hours. MG132 treatments were done as indicated in the figure legends and as mentioned in materials and method section “MG132 treatment”. At 24 hpi cells were washed twice with ice cold PBS and fixed on ice for 30 minutes with a solution of 3% paraformaldehyde diluted in PBS. They were then neutralized with 50 mM NH₄Cl for 30 minutes at room temperature. Cells were subsequently washed twice with PBS and once in ultrapure water and mounted on glass slides with Moviol containing 0.1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide-field fluorescence microscope (Zeiss). The images were processed with Adobe Photoshop.

2.5.12 Plaque assays.

Plaque assays were performed using extracellular virions isolated from 10 cm dishes containing Hela cells infected with HSV-1 strain 17⁺ at an MOI of 3. MG132 was added at 0, 4 or 8 hpi. At 20 hpi, the culture mediums were harvested and centrifuged at 300 x g for 5 minutes at 4°C to get rid of cells. The extracellular virions present in the supernatant were concentrated by centrifugation at 37 000 x g for 1 hour at 4°C and resuspended in 50 µl MNT buffer (30 mM MES, 100 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 7.4). Decimal dilutions of all samples were done and titrated using Vero cells cultured in 6 well dishes.

2.5.13 Mass spectrometry.

Following VP5 immunoprecipitations (see above), the samples were loaded on 8% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie Brilliant Blue G (Sigma) and the 150 kDa VP5 band excised by hand and trypsin treated by an automated protein digestion station (ProPrep, Perkin-Elmer). The material was subsequently injected in a capillary liquid chromatography system coupled with Q-Tof micro hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer. The peptides were finally identified with the Mascot and Mascot Deamon search engines (Matrix science) against a human and a HSV-1 database.

2.6 Results

2.6.1 Presence of ubiquitinated species in the virus.

Mature virions incorporate a number of ubiquitin related enzymes (37). To quickly evaluate whether structural viral proteins may be ubiquitinated substrates, a polyclonal antibody raised against capsids was used to immunoprecipitate these viral proteins from a cell lysate (37, 40). Probing of this material with ubiquitin specific antibodies revealed multiple bands, consistent with the possible incorporation of ubiquitinated proteins in the virus (fig. 1). To more directly test this hypothesis, a highly purified mature extracellular virion preparation was generated by a protocol recently developed for mass spectrometry (37). Analysis of these virions by SDS-PAGE and Western blotting once again detected several ubiquitinated bands (fig. 2A). Note that the major band at around 60-65 kDa seen above was not observed, suggesting it is perhaps not a true viral component. In contrast, several ubiquitinated bands were enriched in the virions when comparing to cell lysates, confirming that several ubiquitinated substrates were indeed present in virions.

Since the ubiquitinated proteins could be in any of the different viral layers (capsid, tegument, envelope), capsids were then analysed to see if they also contain ubiquitinated proteins. To circumvent the potential stripping of ubiquitinated proteins by detergents and/or salts, another recently developed assay, which reconstitutes *in vitro* the release of HSV-1 capsids from the nucleus was used (46). In this assay, capsids released from infected nuclei are exclusively naked and therefore without an envelope. Furthermore, none of the secondary teguments normally added in the cytoplasm is present onto these capsids, when produced in the presence of mock cytosol. This system was therefore perfectly suited to examine the presence of ubiquitinated substrates on this specific viral intermediate. Usually the infected nuclei are incubated in the test tube with energy and mock cytosol and the capsids released *in vitro* separated from the nuclei over a 0.45 μm filter. However for the purpose of this study, a more suitable approach was used to reduce the background of ubiquitinated proteins normally present in the cytosol. These cellular proteins would co-elute with the capsids in this assay and mask viral ubiquitinated proteins. Thus, the cytosol was replaced with BSA at an equivalent concentration. Under such conditions, egress is significantly hampered, but nonetheless possible (46). As

control, the assay was performed in parallel with nuclei isolated from uninfected cells to identify capsid specific ubiquitinated proteins. Western blot analysis of these samples with ubiquitin antibodies revealed a major high molecular band around 150 kDa which was specific to the infected condition (fig. 2B). Thus one of the ubiquitinated bands in virions constituted an important component of capsids. Given its abundance in the capsids, this ubiquitinated substrate was further studied.

2.6.2 Main immunoreactive band is VP5.

Considering the size and abundance of the ubiquitinated band on the above capsids and virions, an obvious candidate was the major capsid protein VP5, also referred to as U_L19 or ICP5. To specifically address this issue, capsids and mature extracellular virions were probed with a monoclonal antibody directed against VP5. As expected, the VP5 antibody proved specific (fig. 3; compare mock and HSV infected lanes) and confirmed the identity of the high molecular weight ubiquitinated band found on the capsids and virions. Moreover, reprobing of the blots with a second unrelated ubiquitin antibody confirmed VP5 ubiquitination status (data not shown).

To independently test if VP5 is ubiquitinated, cells were transfected with an HA tagged ubiquitin construct, a cell lysate prepared, VP5 immunoprecipitated with anti-ICP5 and the protein analyzed by Western blotting with HA or VP5 antibodies. Figure 4 shows that VP5 was indeed tagged with the HA construct, confirming that VP5 was ubiquitinated. These results were also confirmed with the HSV-1 polyclonal Remus antibody, which was raised against assembled capsids (40). Note the latter antibody proved more efficient than the ICP5 monoclonal to pull down VP5. The HSV-1 major capsid protein was thus ubiquitinated in assembled capsids and virions.

2.6.3 Free cytosolic VP5 is also ubiquitinated.

To evaluate whether VP5 ubiquitination might be a signal for its incorporation in the virus, cytosolic VP5 was analysed. It is worth noting that the cytosol preparations were free of cells, nuclei, capsids, virions and even subcellular organelles as they were prepared at high speed centrifugation (267 000 x g) (46).

Cytosolic VP5 was thus immunoprecipitated with anti-ICP5 antibodies and probed for the presence of ubiquitin by Western blotting. Although the VP5 antibody did not efficiently bring down the viral protein, the anti-ubiquitin antibodies once again detected VP5, indicating that cytosolic VP5 was also ubiquitinated (fig. 5). This hinted VP5 ubiquitination may not be an obligatory signal for its incorporation into the capsid.

2.6.4 Ubiquitination does not target VP5 for degradation.

Poly-ubiquitination, particularly on lysine 48, often targets proteins for degradation by the proteasome (26). To examine if VP5 might be degraded by the proteasome, its protein level was evaluated in the presence and absence of the MG132 inhibitor, a drug that inhibits the proteasome (34). When added at the beginning of the infection and for the remainder of the infection, MG132 strongly reduced VP5 levels (fig. 6). However, this was anticipated and merely confirmed published reports that the drug prevents the delivery of the virus to the nucleus (12), hence preventing VP5 expression altogether. This was consequently good evidence the drug performed well. Similarly, addition of the drug at 3 hpi gave an intermediate level of VP5 expression. Most importantly, the level of VP5 upon the addition of MG132 at 6 hpi was nearly identical to the untreated sample. In fact the drug resulted in a modest increase of only $12\% \pm 3$ when the blots were quantified by Image J (values normalized to the levels of actin expression). In contrast, the level of RNA polymerase II, whose higher phosphorylated form is particularly targeted for proteasomal degradation by HSV-1 (11, 35), increased substantially when the drug was present sufficiently early during the infection (increase of $147\% \pm 21$ when MG132 was added at 6 hpi compared to no drug). To rule out VP5 was indeed degraded by the proteasome but quickly replenished by de novo protein expression, cycloheximide was added at 6 hpi, with or without MG132. Note that the same amount of VP5 could be detected in both samples. This confirmed that VP5 ubiquitination did not target the protein for degradation by the proteasome.

2.6.5 Ubiquitination does not impact viral egress.

Given the stable amounts of VP5 proteins in the presence of MG132, we sought to test whether ubiquitination might affect viral egress. Since inhibition of the proteasome depletes the free pool of ubiquitin in the cell as it can no longer be recycled (2, 24, 39, 42, 49, 52), MG132 is commonly used to not only probe the role of the proteasome but also ubiquitin dependence. To first evaluate if the drug alters nuclear egress, MG132 was first added to the *in vitro* nuclear egress assay. As shown in fig. 7A, the drug had no impact whatsoever on the release of the capsids, suggesting neither proteasomal activity nor ubiquitination were necessary for the capsids to traverse the two nuclear leaflets.

To evaluate if egress could be hampered further down the road, cells were infected with K26GFP and monitored by fluorescence microscopy. In this HSV-1 construct, the minor VP26 capsid protein has been tagged with GFP and manifests itself as punctuated structures only once incorporated into assembled capsids (10, 13). Not surprisingly, addition of MG132 to K26GFP infected cells early in the infection strongly inhibited new capsid formation in the nucleus (fig. 7B). In contrast, more and more capsids were visible in the nucleus when the drug was added later on, indicating the capsids were normally assembled. By 6 hpi, the addition of MG132 had little impact on the egress of the virus as it could be detected throughout the cell to the same extent seen in the absence of drug. To further confirm this was the case, the extracellular release of the virus was monitored by plaque assays. Once again, MG132 only had an impact when added early before viral delivery in the nucleus (fig. 7C). These results inferred that VP5 expression, transport to the nucleus as well as capsid egress were all insensitive to MG132 once the virus reached the nucleus and initiated its replication.

2.6.6 VP5 is mono-ubiquitinated.

Thus far, all attempts to decipher the role of ubiquitination of VP5 failed. Hence, to better understand this process, VP5 ubiquitination was analysed in greater detail. Poly-ubiquitination leads to a typical protein ladder, indicative of multiple ubiquitination species. However, such ladders were never seen in our hands, strongly suggesting VP5 may be mono-ubiquitinated. In fact, upon sufficient exposure of the

blots, a faint non ubiquitinated lower band could be detected (fig. 3-6). Quantification by densitometry revealed that the lower band represented 15% of the total VP5 signal, with 85% of VP5 being ubiquitinated. Thus, the data are most consistent with mono-ubiquitination.

To independently ascertain VP5 ubiquitination status, we used ubiquitin expression constructs that either code for wild type HA tagged ubiquitin, point mutants of the most commonly used lysines for poly-ubiquitination (K48R or K63R) or a construct (KO) where all poly-ubiquitination events are impossible due to the mutation of all seven lysines in ubiquitin. The rationale is that overexpression of wild type ubiquitin should favour the detection of poly-ubiquitination species (i.e. multiple VP5 bands). Furthermore, if poly-ubiquitination occurs, it should be prevented by mutating the lysine(s) involved. Consequently, cells were transfected for 24 hours with the various ubiquitin constructs, subsequently infected with HSV-1 and VP5 immunoprecipitated from total cell lysates. For greater sensitivity, the more efficient Remus antibody was used to immunoprecipitate VP5 (see above). Analysis with a HA antibody revealed that all constructs, including the KO mutant, equally labelled VP5, with no evidence of a poly-ubiquitinated ladder (fig. 8). This confirmed that VP5 was most likely mono-ubiquitinated.

2.6.7 VP5 has two putative ubiquitination sites.

As mentioned above, ubiquitin is typically coupled to a protein via its carboxyl terminal glycine. Given the last three amino acids of ubiquitin are RGG (Swissprot # P62988), cleavage with trypsin at arginines and lysines not only cuts the ubiquitin in several fragments but also leaves a diagnostic diglycine signature on all ubiquitinated peptides (43). Thus, to confirm VP5 ubiquitination and to map where on VP5 ubiquitination occurs, VP5 was first immunoprecipitated with the ICP5 monoclonal antibody from infected cell lysates, cut out from a SDS-PAGE gel, digested with trypsin and analysed by mass spectrometry. Sixty one individual peptides positively confirmed the presence of VP5 in the band (Table 1). These covered an extensive portion of the protein (43%) and all but the VP5 K236 residue. Interestingly, two characteristic diglycine signatures were found on VP5 at amino acids 810 and 1275. We also found evidence for diglycines at other positions, but this was not reproducible. When the more efficient Remus polyclonal antibody was

used to immunoprecipitate VP5, 133 peptides were detected by mass spectrometry and covered 83% of the protein. Once again, diglycine signature was detected on amino acids 810 and 1275.

To evaluate if VP5 ubiquitination was different in various cellular compartments, VP5 was immunoprecipitated with the Remus antibody from cytosol, the nucleus as well as from purified virions solubilised with detergents. On average, 140 peptides covered 85% of the VP5 in each sample and all confirmed the presence of diglycines at lysines 810 and 1275 on virions and in the nuclear extract (Table 1). In contrast, only lysine 1275 seemed ubiquitinated on cytosolic VP5, with no trace of ubiquitination at lysine 810. In all samples ubiquitin fragments were detected, confirming the nature of the modifications. Note that in most cases, a mixture of modified and unmodified peptides were detected, indicating the amino acids were not always ubiquitinated (data not shown). Given these results, we conclude that VP5 is most likely ubiquitinated at positions 810 and 1275 in capsids and virions but that cytosolic VP5 is only modified at amino acid 1275.

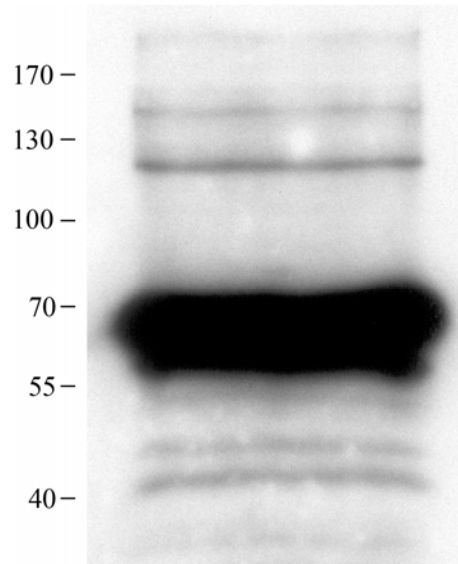


Fig. 1 Infected cell lysate contain multiple viral ubiquitinated proteins. A cell lysate was prepared from HSV-1 infected cells as per materials and methods and immunoprecipitated with the Remus polyclonal raised against whole capsids. The proteins were then resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF and analysed with a monoclonal antibody against ubiquitin. The molecular weight standard is indicated to the left of the blot (kDa).

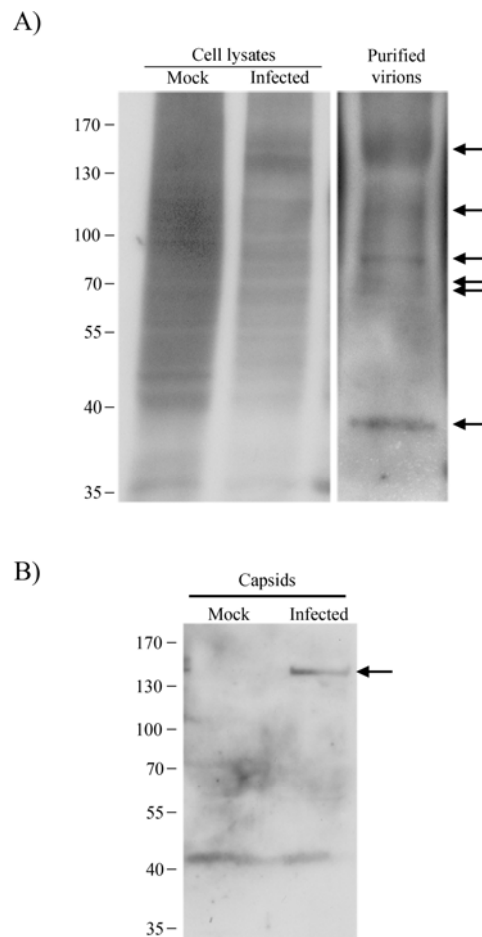
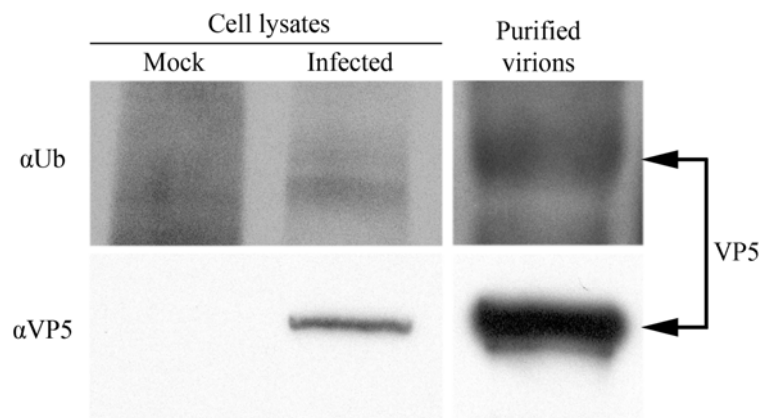


Fig. 2 Mature extracellular virions and *in vitro* extranuclear capsids are ubiquitinated. **A)** Ten micrograms of highly purified virions were analysed by SDS-PAGE and probed by Western blot with ubiquitin specific antibodies. As controls, 25 μ g of total cell lysates prepared from mock or infected HeLa cells were also loaded. Note the weak but reproducible ubiquitination signals in the lysates and purified virions. The arrows indicate virion specific bands. **B)** Capsids released *in vitro* from HSV-1 infected nuclei were probed for ubiquitination. Following a standard 6 hour incubation, all the capsids produced were separated from the nuclei and concentrated by high speed centrifugation. They were then loaded on a SDS-PAGE gel, transferred to PVDF and analysed with a monoclonal antibody against ubiquitin. As control, mock nuclei isolated from uninfected cells were treated the same way in parallel. Note the presence of a single high molecular weight band specific to the infected sample (arrow). The molecular weight marker (kDa) is indicated to the left of the figures.

A) Purified virions



B) Extranuclear capsids

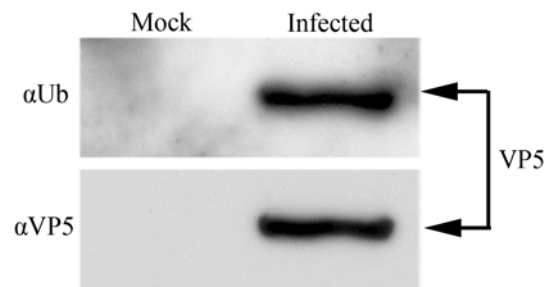


Fig. 3 Immunoreactive band is VP5. (A) Purified virions (same blot as in figure 2A) and (B) extranuclear capsids were reanalysed as in fig. 2 by SDS-PAGE and Western blotting. The blots were sequentially blotted with the monoclonal ubiquitin antibodies then stripped and reprobed with a monoclonal antibody directed against the major capsid protein VP5.

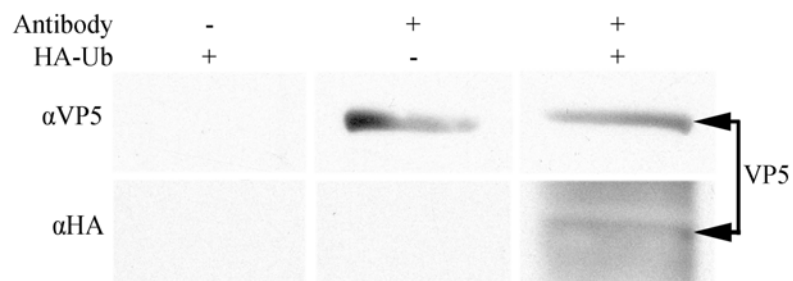
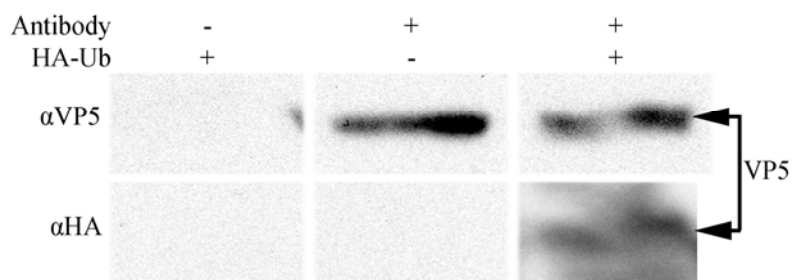
A) α VP5 IPB) α HSV-1 IP

Fig. 4 HA tagged ubiquitin labels VP5. To verify the specificity of the ubiquitin antibodies, cells were transfected with a pRK5 HA-ubiquitin wild type construct and subsequently infected with HSV-1. VP5 was then immunoprecipitated from cell lysates with **A)** the VP5 monoclonal or **B)** the Remus polyclonal. All samples were then loaded on a SDS-PAGE gel and analysed by Western blotting with a VP5 or hemmagglutinin specific antibody. Controls included no antibody (left lane) and untransfected cells (center lane).

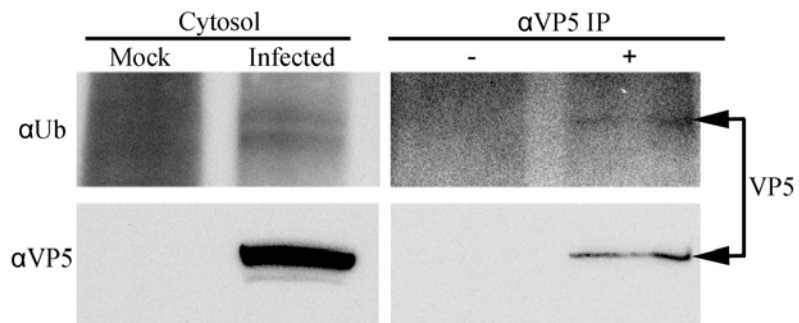


Fig. 5 Cytosolic VP5 is also ubiquitinated. Mock and infected cytosols were prepared and either directly loaded on 8% gels (25 μ g per well) or immunoprecipitated with monoclonal antibodies against VP5 (α VP5 IP). The samples were finally probed by Western blotting with VP5 or ubiquitin antibodies (indicated to the left of the figure). -/+ : presence or absence of VP5 antibody present during the immunoprecipitation.

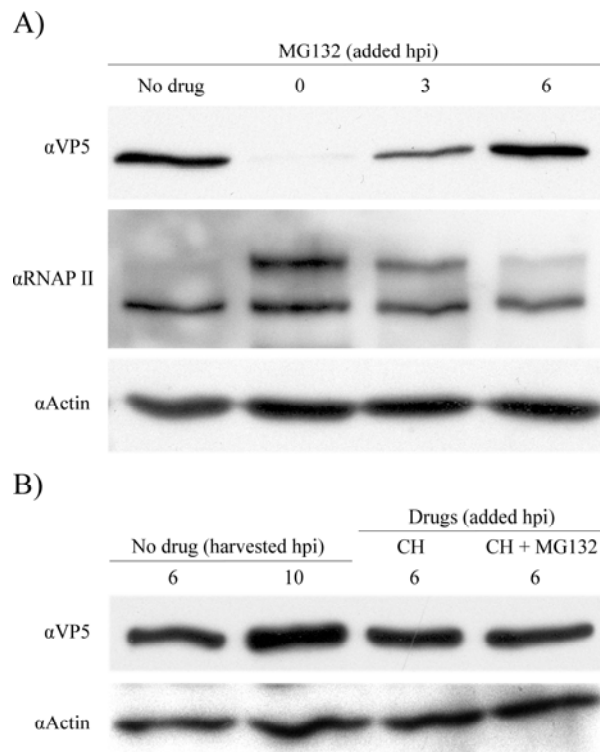


Fig. 6 VP5 sensitivity to the proteasome inhibitor MG132. A) Twenty five micromolar of MG132 was added to HSV-1 infected cells at 0, 3 or 6 hpi and total cell lysates harvested at 10 hpi. As control, cells were incubated in the absence of drug. The lysates were then loaded (25 μ g each) on a SDS-PAGE gel and transferred onto PVDF. The samples were finally probed by Western blot with antibodies against VP5 (top panel). As positive control, the level of RNA polymerase II was also probed with an antibody that recognized all forms of the protein (see stars; middle panel). Finally, γ actin was probed as loading control (bottom panel). B) Untreated (No drug) infected cells were harvested at 6 or 10 hpi to evaluate the normal levels of VP5. In parallel, cycloheximide (CH = 25 μ g/ml) was added to the infected cells at 6 hpi, with or without MG132 (25 μ M), and cells harvested at 10 hpi. Cell lysates were treated for western blotting as in panel A). Note that in either experimental conditions VP5 protein levels were unaltered by MG132 when added after viral replication (> 6 hpi), but was completely inhibited when added at the beginning of the infection (0 hpi) or was partly reduced when added at 3 hpi.

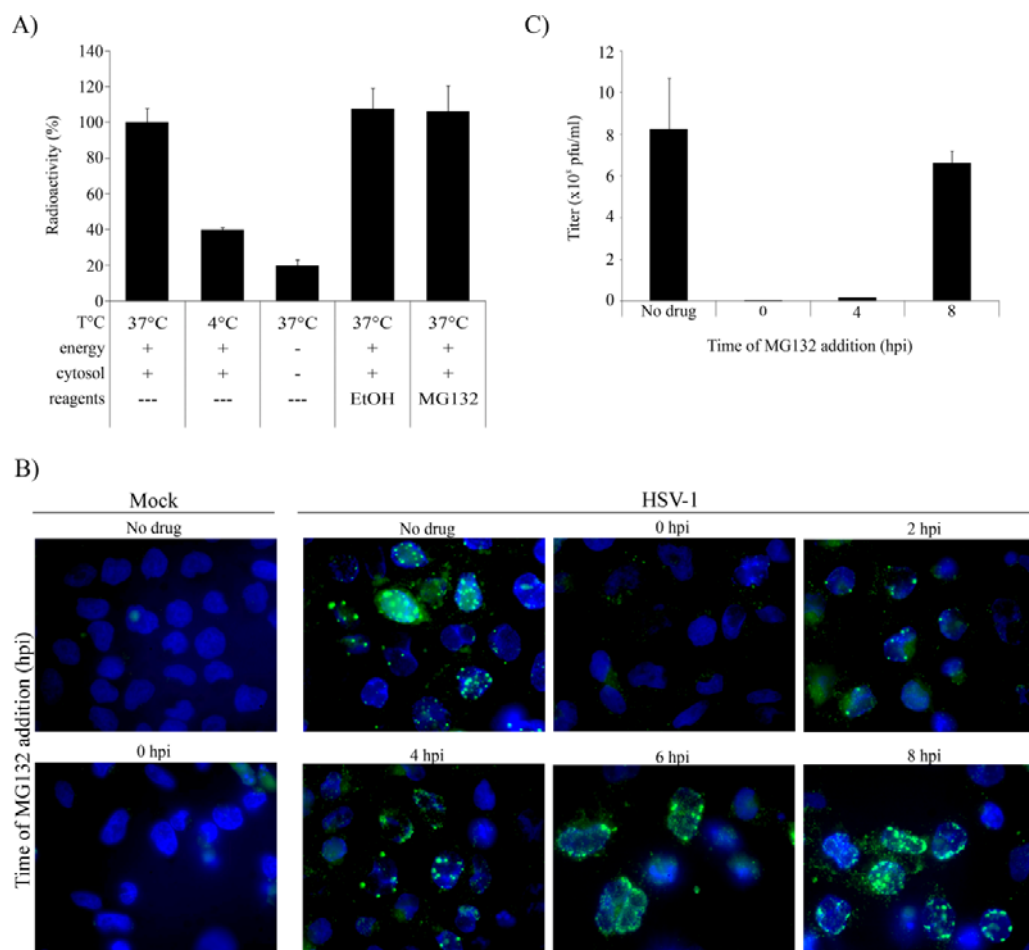


Fig. 7 MG132 does not impact nuclear capsid egress and virion release from the cell. Egress of HSV-1 from the nucleus to the cell surface was evaluated by three different approaches. **A) Nuclear egress assay.** To quantify the impact of MG132 on capsid egress out of the nuclei, an *in vitro* assay that reconstitutes nuclear capsid egress was performed (see materials and methods). Twenty five micromolars of MG132, dissolved in 95% ethanol, was added directly to the assay for the entire duration of the assay (6 hours). Controls included an incubation without drug at 37°C with energy and cytosol (basal release of capsids), an incubation at 4°C with energy and cytosol (negative control) and an incubation at 37°C without energy and cytosol (negative control). Finally, ethanol was also added to rule out any impact of the MG132 solvent. Results were averaged from three independent experiments, each done in duplicates, and are represented as percentage of radiolabelled encapsidated viral DNA (see materials and methods). The error bars are the standard deviations from the means. **B) Immunofluorescence.** Cells were mock treated or infected with a GFP tagged HSV-1 virus. MG132 (25 μ M) was then added to the cells at different

times post infection until 10 hpi. Samples were then fixed and processed for immunofluorescence. Green: HSV-1; Blue: nuclei stained with Hoechst. **C) Plaque assays.** Cells were infected with wild type HSV-1 and treated with MG132 (25 μ M) at either 0, 4 or 8 hours post infection until harvested at 20 hpi. The extracellular medium was then collected and its viral content titrated by plaque assays. The results show the average of 2 independent experiments, each done in duplicates (means \pm standard errors). There was no statistically significance difference between the “No drug” and “8 hpi” samples (Student’s T test; $p = 0,53$).

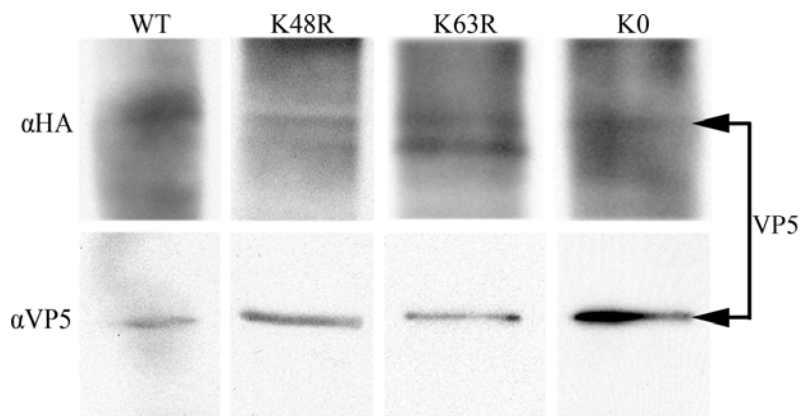


Fig. 8 Incorporation of HA tag ubiquitin constructs by VP5. To examine the state of VP5 ubiquitination, cells were transfected for 24 hours with pRK5 HA-ubiquitin constructs (wt, K48R, K63R or KO) and subsequently infected with wild type HSV-1. VP5 was then immunoprecipitated from cell lysates using the anti-HSV1 Remus polyclonal antibody, loaded on a SDS-PAGE gel and analysed by Western blotting with a VP5 monoclonal or hemmagglutinin specific antibody.

**Table 1. Mass spectrometry analysis of immunoprecipitated VP5
from various viral intermediates**

Samples	Antibody (IP)	No of VP5 peptides found	VP5 coverage (%)	Diglycine signature (position)	Ubiquitin (+/-)
Cell lysate	ICP5	61	43	K810, K1275	+
Cell lysate	Remus	133	83	K810, K1275	+
Infected cytosol	Remus	128	82	K1275	+
Nuclear extract	Remus	145	90	K810, K1275	+
Extracellular virions	Remus	156	86	K810, K1275	+

IP: Immunoprecipitation; +/-: presence or absence in samples

2.7 Discussion

2.7.1 VP5 is ubiquitinated.

The multiple interactions between HSV-1 and the cellular ubiquitin machinery prompted us to examine the potential ubiquitination of virion proteins. As anticipated, ubiquitinated proteins were found upon immunoprecipitation of viral proteins with the Remus polyclonal from cell lysates (fig. 1). More important, many ubiquitinated species were present in mature extracellular virions (fig. 2A). Moreover, a virus specific band was particularly evident on capsids freshly released from the nuclei (fig. 2B). Western blotting with two independent ubiquitin antibodies, two antibodies recognizing VP5, HA-ubiquitin constructs, immunoprecipitation and mass spectrometry confirmed this abundant protein was HSV-1 VP5, the main constituent of the viral capsid (fig. 3-4, Table 1). Further analysis showed this post-translational modification was not unique to VP5 associated with capsids or virions, since cytosolic VP5 was also ubiquitinated (fig. 5). Thus all forms of VP5 analysed were ubiquitinated.

The results were unlikely an artefact of the approach as the majority of the VP5 residues were devoid of ubiquitin (there are 19 lysines in VP5). Unfortunately, it was not possible to evaluate the proportion of ubiquitinated VP5 with statistical certainty, as only a few peptides were found for each lysine. For this reason, it was also not possible to determine whether both lysine 810 and 1275 were modified as a pair or were mutually exclusive. Finally, it should be pointed out that among all samples analysed (684 peptides in total), a single ubiquitinated tryptic peptide spanning the VP5 lysine at position 1285 was found. Based on the sequence of VP5, one predicts a mere 10 amino acid tryptic fragment, which is likely too small for efficient detection by mass spectrometry. We therefore cannot formally exclude a third ubiquitination site.

2.7.2 Putative role of VP5 modification.

As previously mentioned, ubiquitination modulates many cellular functions, including proteasomal degradation. The latter outcome seems unlikely as inhibition of the proteasome had no impact on VP5 protein levels (fig. 6). Furthermore, the

single VP5 bands observed, indicative of mono-ubiquitination, are inconsistent with proteasomal degradation. Given the essential role of VP5 for the virus, it would also be counterintuitive. This implies that the VP5 post-translational modification may be desirable for the virus. Interestingly, Delboy and colleagues (12) have shown that MG132 perturbs HSV-1 delivery to the nucleus at a post-entry step, but have not clarified how this occurs or whether this is related to VP5 at all. In that scenario, one potential role of VP5 ubiquitination could be during the interaction of the capsid with the nuclear pore (40), but this remains to be evaluated. MG132 also perturbs MCMV replication and transcription, a phenomenon the authors claim does not occur for HSV-1 under their experimental conditions (45). The reduced levels of VP5 observed in the present study upon addition of MG132 after viral entry (>1 hpi), but before viral replication (< 6 hpi), could however underline a role for the proteasome and/or ubiquitin during HSV-1 replication or transcription (fig. 6, 7). Despite this, it seems unlikely to involve VP5.

Other putative roles for VP5 ubiquitination may be its intracellular transport, the promotion of protein-protein interactions during capsid assembly, the regulation of viral egress and/or modulation of capsid re-envelopment. Attempts to address these various scenarios did not reveal so far a clear role for VP5 ubiquitination. Hence, ubiquitination was not an overt signal for VP5 incorporation into the capsid as all forms of VP5 examined were ubiquitinated (fig. 3-5). Similarly capsids were normally assembled and transported in the presence of MG132 (fig. 7). However, mass spectrometry revealed an interesting differential ubiquitination pattern for VP5 (Table 1). Thus two putative ubiquitination sites at amino acids 810 and 1275 were found on VP5 isolated from nuclear extracts and mature extracellular virions, while only amino acid 1275 showed evidence for ubiquitination on cytosolic VP5. It is therefore tempting to speculate that lysine 810 finely regulates some aspects of VP5 after all. Unfortunately, these are difficult issues to prove with certainty as a mixture of ubiquitinated and unmodified tryptic fragments were detected for the two lysines in VP5 (data not shown). Thus the exact function of VP5 ubiquitination remains a mystery for the moment. It is noteworthy that although the two VP5 ubiquitination sites fall well outside the amino terminal region known to interact with the scaffold during capsid assembly (56), the first one (K810) is in the vicinity of a potential interaction loop with VP26 (1). Reconstitution of virions with VP5 mutants

will hopefully revolve this issue, but may prove difficult given the multiple VP5 interactions.

The present study shows convincing evidence that the HSV-1 major capsid protein VP5 is ubiquitinated at two potential sites. To our knowledge, this is the first report of a ubiquitinated substrate identified within herpes virions. It will be interesting to identify the other ubiquitinated substrates detected in this study (fig. 1-2) and find out where in the cell VP5 ubiquitination occurs. Finally, it is critical to identify the functional relevance of VP5 ubiquitination. Altogether, this opens up exciting new research avenues that may prove most revealing.

2.8 Acknowledgements

We wish to thank Beate Sodeik, Phashant Desai, Christiane Rondeau and Michel Desjardins for viruses and antibodies. We would also like to thank Ted Dawson and Eric Cohen for the ubiquitin reagents. Special thanks to Eric Bonneil and Pierre Thibault of the mass spectrometry platform of the IRIC research center for their help in analysing VP5 ubiquitination. We are indebted to Sandra Loret for providing ultra pure virion samples as well as Joël Lanoix and Eric Cohen for critical reading of the manuscript. This research was funded by the CIHR (RL).

2.9 References

1. **Baker, M. L., W. Jiang, W. J. Wedemeyer, F. J. Rixon, D. Baker, and W. Chiu.** 2006. Ab initio modeling of the herpesvirus VP26 core domain assessed by CryoEM density. *PLoS Comput Biol* **2**:e146.
2. **Bieniasz, P. D.** 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**:55-63.
3. **Boutell, C., M. Canning, A. Orr, and R. D. Everett.** 2005. Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7. *J Virol* **79**:12342-54.
4. **Boutell, C., and R. D. Everett.** 2003. The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53. *J Biol Chem* **278**:36596-602.
5. **Boutell, C., S. Sadis, and R. D. Everett.** 2002. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J Virol* **76**:841-50.
6. **Brandimarti, R., and B. Roizman.** 1997. Us9, a stable lysine-less herpes simplex virus 1 protein, is ubiquitinated before packaging into virions and associates with proteasomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13973-8.
7. **Burch, A. D., and S. K. Weller.** 2004. Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**:7175-85.
8. **Canning, M., C. Boutell, J. Parkinson, and R. D. Everett.** 2004. A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *J Biol Chem* **279**:38160-8.
9. **Chelbi-Alix, M. K., and H. de The.** 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* **18**:935-41.

10. **Chi, J. H., and D. W. Wilson.** 2000. ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J Virol* **74**:1468-76.
11. **Dai-Ju, J. Q., L. Li, L. A. Johnson, and R. M. Sandri-Goldin.** 2006. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J Virol* **80**:3567-81.
12. **Delboy, M. G., D. G. Roller, and A. V. Nicola.** 2008. Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol* **82**:3381-90.
13. **Desai, P., and S. Person.** 1998. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* **72**:7563-8.
14. **Desai, P. J.** 2000. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* **74**:11608-18.
15. **Diao, L., B. Zhang, J. Fan, X. Gao, S. Sun, K. Yang, D. Xin, N. Jin, Y. Geng, and C. Wang.** 2005. Herpes virus proteins ICP0 and BICP0 can activate NF-kappaB by catalyzing IkappaBalpha ubiquitination. *Cell Signal* **17**:217-29.
16. **Eom, C. Y., and I. R. Lehman.** 2003. Replication-initiator protein (UL9) of the herpes simplex virus 1 binds NFB42 and is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9803-7.
17. **Everett, R. D.** 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**:761-70.
18. **Everett, R. D., and G. G. Maul.** 1994. HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J* **13**:5062-9.
19. **Gredmark, S., C. Schlieker, V. Quesada, E. Spooner, and H. L. Ploegh.** 2007. A functional ubiquitin-specific protease embedded in the large tegument protein (ORF64) of murine gammaherpesvirus 68 is active during the course of infection. *J Virol* **81**:10300-9.

20. **Gu, H., and B. Roizman.** 2003. The degradation of promyelocytic leukemia and Sp100 proteins by herpes simplex virus 1 is mediated by the ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8963-8.
21. **Haas, A. L., and T. J. Siepmann.** 1997. Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* **11**:1257-68.
22. **Hagglund, R., and B. Roizman.** 2003. Herpes simplex virus 1 mutant in which the ICP0 HUL-1 E3 ubiquitin ligase site is disrupted stabilizes cdc34 but degrades D-type cyclins and exhibits diminished neurotoxicity. *J Virol* **77**:13194-202.
23. **Hagglund, R., C. Van Sant, P. Lopez, and B. Roizman.** 2002. Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:631-6.
24. **Harty, R. N., M. E. Brown, J. P. McGettigan, G. Wang, H. R. Jayakar, J. M. Huibregtse, M. A. Whitt, and M. J. Schnell.** 2001. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol* **75**:10623-9.
25. **Hershko, A., and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-79.
26. **Hoeller, D., C. M. Hecker, and I. Dikic.** 2006. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **6**:776-88.
27. **Jarosinski, K., L. Kattenhorn, B. Kaufer, H. Ploegh, and N. Osterrieder.** 2007. A herpesvirus ubiquitin-specific protease is critical for efficient T cell lymphoma formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:20025-30.
28. **Jovasevic, V., L. Liang, and B. Roizman.** 2008. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for the release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol*.
29. **Kaiser, P., and L. Huang.** 2005. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol* **6**:233.

30. **Kalamvoki, M., J. Qu, and B. Roizman.** 2008. Translocation and colocalization of ICP4 and ICP0 in cells infected with herpes simplex virus 1 mutants lacking glycoprotein E, glycoprotein I, or the virion host shutoff product of the UL41 gene. *J Virol* **82**:1701-13.
31. **Kattenhorn, L. M., G. A. Korbel, B. M. Kessler, E. Spooner, and H. L. Ploegh.** 2005. A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae. *Mol Cell* **19**:547-57.
32. **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.
33. **Kummer, M., N. M. Turza, P. Muhl-Zurbes, M. Lechmann, C. Boutell, R. S. Coffin, R. D. Everett, A. Steinkasserer, and A. T. Prechtel.** 2007. Herpes simplex virus type 1 induces CD83 degradation in mature dendritic cells with immediate-early kinetics via the cellular proteasome. *J Virol* **81**:6326-38.
34. **Lee, D. H., and A. L. Goldberg.** 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**:397-403.
35. **Li, L., L. A. Johnson, J. Q. Dai-Ju, and R. M. Sandri-Goldin.** 2008. Hsc70 focus formation at the periphery of HSV-1 transcription sites requires ICP27. *PLoS ONE* **3**:e1491.
36. **Lomonte, P., K. F. Sullivan, and R. D. Everett.** 2001. Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J Biol Chem* **276**:5829-35.
37. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.
38. **Maul, G. G., and R. D. Everett.** 1994. The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J Gen Virol* **75 (Pt 6)**:1223-33.

39. **Mimnaugh, E. G., H. Y. Chen, J. R. Davie, J. E. Celis, and L. Neckers.** 1997. Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry* **36**:14418-29.
40. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
41. **Parkinson, J., S. P. Lees-Miller, and R. D. Everett.** 1999. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *J Virol* **73**:650-7.
42. **Patnaik, A., V. Chau, and J. W. Wills.** 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13069-74.
43. **Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, and S. P. Gygi.** 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**:921-6.
44. **Pickart, C. M.** 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**:503-33.
45. **Prosch, S., C. Priemer, C. Hoflich, C. Liebenthaf, N. Babel, D. H. Kruger, and H. D. Volk.** 2003. Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir Ther* **8**:555-67.
46. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
47. **Salghetti, S. E., A. A. Caudy, J. G. Chenoweth, and W. P. Tansey.** 2001. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**:1651-3.

48. **Schlieker, C., G. A. Korb, L. M. Kattenhorn, and H. L. Ploegh.** 2005. A deubiquitinating activity is conserved in the large tegument protein of the herpesviridae. *J Virol* **79**:15582-5.
49. **Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H. G. Krausslich, and J. W. Yewdell.** 2000. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13057-62.
50. **Shanda, S. K., and D. W. Wilson.** 2008. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. *J Virol* **82**:7388-94.
51. **Strous, G. J., and R. Govers.** 1999. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* **112 (Pt 10)**:1417-23.
52. **Taylor, G. M., P. I. Hanson, and M. Kielian.** 2007. Ubiquitin depletion and dominant-negative VPS4 inhibit rhabdovirus budding without affecting alphavirus budding. *J Virol* **81**:13631-9.
53. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
54. **Ushijima, Y., T. Koshizuka, F. Goshima, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** 2008. Herpes simplex virus type 2 UL56 interacts with the ubiquitin ligase Nedd4 and increases its ubiquitination. *J Virol* **82**:5220-33.
55. **Van Sant, C., R. Hagglund, P. Lopez, and B. Roizman.** 2001. The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8815-20.
56. **Warner, S. C., G. Chytrova, P. Desai, and S. Person.** 2001. Mutations in the N-terminus of VP5 alter its interaction with the scaffold proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **284**:308-16.

57. **Xu, Y., J. H. Ahn, M. Cheng, C. M. apRhys, C. J. Chiou, J. Zong, M. J. Matunis, and G. S. Hayward.** 2001. Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *J Virol* **75**:10683-95.
58. **Zhu, Q., J. Yao, G. Wani, J. Chen, Q. E. Wang, and A. A. Wani.** 2004. The ubiquitin-proteasome pathway is required for the function of the viral VP16 transcriptional activation domain. *FEBS Lett* **556**:19-25.

3 Discussion générale

3.1 VP5 est ubiquitinée

Les résultats présentés dans l'article soumis au *Journal of virology*, *Major HSV-1 capsid protein VP5 is ubiquitinated in the virion*, nous ont permis d'identifier une bande ubiquitinée détectée à environ 150 kDa et qui était présente dans les virus matures et les capsides extranucléaires. Une seule protéine virale possède ce poids moléculaire, c'est-à-dire la protéine majeure de la capsid, VP5. Il était donc évident de tester par *western blot* VP5 afin de déterminer si elle correspondait à la bande de la protéine ubiquitinée unique présente dans les deux échantillons viraux, ce qui était le cas. De plus, il a été possible de confirmer ces résultats en immunoprécipitant VP5 produite dans des cellules transfectées avec une construction HA-Ub et en spectrométrie de masse. Cela a permis de vérifier par *western blot* que VP5 possédait le *tag* HA et, par spectrométrie de masse, que certains peptides de VP5 possédaient une signature propre à l'ubiquitination d'une protéine (i.e. un tag Gly-Gly) (Figure 4 et tableau 1 de l'article) (66, 90). Ainsi, il a été démontré que VP5 est la protéine ubiquitinée présente à 150 kDa.

VP5 constitue le squelette de la capsid en formant les pentons et hexons des capsomères et représente ainsi une protéine essentielle pour la réplication du virus; sans elle aucune capsid n'est formée (18). La séquence en acides aminés (a.a.) de VP5 (Figure 15) révèle que celle-ci est constituée de 1374 acides aminés et qu'elle possède 17 lysines dont deux ont été identifiées par spectrométrie de masse comme étant des sites potentiels d'ubiquitination (K810 et K1275). En plus, elle possède un motif PPXY qui peut être impliqué dans des processus liés à la machinerie d'ubiquitination. Ce second sujet sera abordé dans la section traitant des perspectives d'avenir du présent projet.

MAAPNRD	PPG	YRYAAAMVPT	GSLNSTIEVA	SHRRLEDFFS	RVRSDANSLY	51
DVEFDALLGS		YCNLTLSLVRF	LELGLSVACV	CTKFPPELAYM	NEGRVQFEVH	101
QPLIARDGPH		PIEQPTHNYM	TKIIDRRALN	AAFSLATEAI	ALLTGEALDG	151
TGIGAHRQLR		AIQQIARNVQ	AVLGAFERGT	ADQMLHVLE	KAPPLALLLP	201
MQRYLDNGRL		ATRVARATLV	AELKRSFCET	SFFLGKAGHR	REAVEAWLVD	251
LTTATQPSVA		VPRLTHADTR	GRPVDGVLVT	TAPIKQRLQ	SFLKVEDTEA	301
DVPVTYGEMV		LNGANLVLTAL	VMGKAVERSLD	DVGRHLEMVQ	EEQLDLNRQT	351
LDELESAPQT		TRVRADLVSI	GEKLVFLEAL	EKRIYAATNV	PYPLVGAMD	401
TFVLPLGLFN		PVMERFAAHA	GDLVPAPGHP	DPRAFFPPQL	FFWGKDRQVL	451
RLSLEHAIGT		VCHPSLMNVD	AAVGGLNDRP	VEAANPYGAY	VAAPAGPAAD	501
MQQFLNNAWG		QRLAHGRVRW	VAEQMTPEQ	FMQPDNANLA	LELHPAFDFF	551
VGVADVELPG		GDVPPAGPGE	IQATWRVUNG	NLPLALCPAA	FRDARGLELG	601
VGRHAMAPAT		IAAVRGAFFD	RNYPAVFYLL	QAAIHGSEHV	FCALARLVVQ	651
CITSYWNTR		CAAFVNDYSL	VSYVVTYLGG	DLPEECMAVY	RDLVAHVEAL	701
AQLVDDFTLT		GPELGGQAQA	ELNHLMRDPA	LLPPLVWDCD	ALMRRALDR	751
HRDCRVSAGG		HDPVYAAACN	VATADFNRND	GQLLHNTQAR	AADAADDRPH	801
RGADWTVH	K	IYYVMVPAF	SRGRCTAGV	RFDRVYATLQ	NMVVPEIAPG	851
EECPDPTVD		PAHPLHPANL	VANTVNAMFH	NGRVVVDGPA	MLTLQVLAHN	901
MAERTTALLC		SAAPDAGANT	ASTTNMRFID	GALHAGILLM	APQHLDTIQ	951
NGDYFYPLPV		HALFAGADHV	ANAPNFPPAL	RDLRSQVPLV	PPALGANYFS	1001
SIRQPVVQHV		RESAAGENAL	TYALMAGYFK	ISPVALHHQL	KTGLHPGFGF	1051
TVVRQDRFVT		ENVLFSEAS	EAYFLGQLQV	ARHETGGGVN	FTLTQPRANV	1101
DLGVGYTAVV		ATATVRNPVT	DMGNLPQNFY	LGRGAPLLD	NAAAVYLRNA	1151
VVAGNRLGPA		QPVPVFGCAQ	VPRRAGMDHG	QDAVCEFIAT	PVSTDVNYFR	1201
RPCNPRGRAA		GGVYAGDKEG	DVTALMYDHG	QSDPSRAFAA	TANPWASQRF	1251
SYGDLLYNGA		YHLNGASPVL	SPCFKFF TSA	DIAIKR	RLIVETGSAV	1301
STATAASDVQ		FKRPPGCREL	VEDPCGLFQE	AYPLTCASDP	ALLRSARNGE	1351
AHARETHFAQ		YLVDASPLK	GLAL			




-  Lysines dans VP5
-  Sites d'ubiquitination identifiés (K810, K1275)
-  Motif PPXY

Figure 15. Séquence d'acides aminés de VP5. Cercles turquoise : lysines dans VP5; Cercles oranges et rouges : lysines ubiquitinées identifiées dans VP5; Rectangle jaune : motif PPXY présent dans VP5. (Source de la séquence d'a.a. de VP5 : UniProtKB/Swiss-Prot : P06491)

Pour être en mesure de déterminer rapidement si l'ubiquitination de VP5 cible cette protéine au protéasome pour être dégradée, le MG132 a été utilisé pour inhiber ce dernier. En principe, cette inhibition augmente la quantité de toute protéine normalement dégradée par cette voie (46, 62). Tel que démontré à la figure 6 de l'article, si des cellules infectées sont traitées au MG132 à un moment qui n'affecte plus la transcription et/ou la réplication de l'ADN viral, la quantité de VP5 présente dans la cellule reste inchangée. Donc, le type d'ubiquitination présent sur VP5 n'a pas pour fonction de marquer cette protéine pour la dégradation. Une autre observation permettant de déterminer si VP5 subit une monoubiquitination ou une polyubiquitination consiste à regarder le patron de VP5 en *western blot*. Si celui-ci démontre une échelle de VP5 de poids moléculaires différents, ceci serait cohérent avec une polyubiquitination puisque l'ajout de chaque ubiquitine augmenterait son poids de 8,5 kDa. Ainsi, aucune échelle de VP5 n'a été observée au cours des

différentes expériences, ce qui signifie qu'il s'agit vraisemblablement d'une monoubiquitination.

3.2 Rôles de l'ubiquitine et mécanisme d'ubiquitination de VP5

Pour l'instant, le rôle de l'ubiquitination de VP5 est inconnu. Il a été démontré (figure 6 de l'article) que cette modification post-traductionnelle ne cible pas cette protéine virale au protéasome. Si l'ubiquitination de VP5 n'a pas pour fonction de la marquer dans le but de la dégrader, elle doit jouer un rôle dans le cycle viral et ainsi être nécessaire au virus. Dans le cytosol, cette protéine virale s'associe avec des chaperonnes virales (préVP22a et VP19C) pour être transportée au noyau où elle interagit avec elle-même et une multitude de protéines virales. Elle est importante pour le recrutement de plusieurs facteurs viraux pendant l'assemblage des capsides et directement ou indirectement impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral (4). Aussi, lors des étapes subséquentes de transport intranucléaire et cytoplasmique, plusieurs protéines tégumentaires interagiront avec la capside. Ceci permet aux capsides d'être transportées dans le noyau, de passer à travers les deux membranes nucléaires et permet également l'assemblage final de la couche tégumentaire dans le cytoplasme qui est nécessaire lors de l'enveloppement final au TGN (21, 32, 76, 77, 105, 107, 115). Il est clair que VP5 possède de multiples fonctions au sein du cycle viral. La contribution de l'ubiquitination de VP5 à ces mêmes fonctions pourrait donc avoir un effet à divers moments du cycle viral.

Un indice du rôle de l'ubiquitination de VP5 découle du fait que lors d'une infection, VP5, tout comme les autres protéines normalement synthétisées dans une cellule, est produite dans le cytosol. Ceci implique qu'elle peut être retrouvée « libre » ou assemblée en capside dans une cellule infectée. Pour examiner si VP5 est ubiquitinée lorsqu'elle est libre ou assemblée en capside et où cela se produit dans la cellule, nous avons procédé à l'analyse en spectrométrie de masse d'échantillons provenant de différentes sources. Ainsi, du cytosol purifié a été utilisé comme source de VP5 libre cytosolique, des capsides extranucléaires isolées comme source de VP5 cytosolique assemblée en capside, un extrait nucléaire comme source de VP5 nucléaire libre et assemblée en capside, des virus extracellulaires matures purifiés comme source de VP5 « mature » assemblée en capside et un lysat cellulaire total pour avoir un échantillon possédant toutes les formes confondues. Les résultats

obtenus (Tableau 1 de l'article) nous ont permis de déterminer que VP5 est ubiquitinée dans tous les échantillons analysés. Ainsi, cette protéine est probablement ubiquitinée rapidement à la suite de sa synthèse dans le cytosol. Par contre, dans l'échantillon de VP5 libre provenant du cytosol, seulement un site d'ubiquitination a été observé, en position K1275. Ceci suggère que des étapes d'ubiquitination séquentielles pourraient être impliquées dans la régulation de VP5 lors du cycle de réplication virale. Il est donc possible que le second site d'ubiquitination soit nécessaire pour son transport au noyau, pour jouer un rôle dans l'assemblage des capsides et/ou promouvoir le transport de celles-ci.

Un second indice provient de l'examen de la séquence protéique de VP5 qui révèle que cette dernière possède un motif PPXY (Figure 15). Ce motif recrute certaines HECT ubiquitines ligases qui induisent l'ubiquitination des domaines *Late* des précurseurs Gag chez certains rétrovirus (70, 79). Aussi, il a été récemment découvert que chez l'HSV-2, la protéine U_L56 possède de tels motifs qui recrutent et stimulent l'ubiquitination de Nedd4, une E3 ubiquitine ligase cellulaire (117). Bien que ces observations aient été effectuées sur d'autres virus, elles pourraient être liées directement au mécanisme d'ubiquitination de VP5. Il est donc possible que VP5 recrute une ubiquitine ligase à l'aide de son motif PPXY et provoque ainsi sa propre ubiquitination, ou bien, l'ubiquitination de partenaires avec lesquels elle interagit.

Finalement, certains parallèles entre nos données et les rétrovirus sont forts intéressants et permettent d'émettre des hypothèses sur d'autres rôles que pourrait jouer l'ubiquitination de VP5. Il a été démontré qu'un mutant dominant négatif de Vps4 induit l'accumulation de capsides nues de HSV-1 dans le cytoplasme et affecte donc la relâche de nouvelles capsides virales hors de la cellule (13, 15). Vps4 est une protéine qui désassemble et recycle les complexes ESCRT, qui reconnaissent les protéines ubiquitinées et sont essentiels à la biogénèse des MVB. Ainsi, l'expression de la forme mutante de Vps4 induit une aberration dans la formation et le bon fonctionnement des MVB (3). Chez les rétrovirus, cette machinerie est aussi largement exploitée pendant l'enveloppement et la relâche de virions. Par ailleurs, il a été démontré que l'ubiquitination des domaines *Late* des précurseurs Gag chez certains rétrovirus facilite l'interaction de Gag avec des composantes des ESCRT (70, 79). Finalement, certaines HECT ubiquitines ligases peuvent faire le pont entre les domaines *Late* qui contiennent des motifs PPXY et la machinerie des MVB. En ce sens, le motif PPXY présent dans VP5 pourrait lui attribuer des fonctions

semblables. Bien que le site d'enveloppement secondaire de l'HSV-1 soit principalement situé au TGN, il a été suggéré que cela peut aussi se produire au niveau des endosomes (27, 51, 78, 115). Alternativement, il se pourrait que l'ubiquitination de VP5 puisse provoquer la relocalisation aux sites de ré-enveloppement de certains constituants de la machinerie des MVB. L'utilisation de l'ubiquitine et de la machinerie des MVB par l'HSV-1 pourrait ainsi servir dans des interactions protéine-protéine permettant au virus de créer un site préférentiel de bourgeonnement.

3.3 Autres protéines virales ubiquitinées

Au-delà de 80 protéines virales sont produites lors de l'infection, mais seulement environ la moitié d'entre elles sont retrouvées dans les virus extracellulaires matures (32, 68). De la même manière, plusieurs protéines virales sont ubiquitinées lors de l'infection et seulement quelques-unes d'entre elles se retrouvent dans les virus matures (Comparer figure 1 et 2A de l'article). L'article suggère toutefois qu'il existe plusieurs protéines ubiquitinées présentes dans les virus extracellulaires purifiés (Figures 2A). Étonnamment, une seule de ces protéines ubiquitinées (VP5) a été retrouvée dans les capsides extranucléaires. Deux facteurs expliquent vraisemblablement cette différence. D'une part, toutes les glycoprotéines de l'enveloppe seront absentes dans les capsides extranucléaires. D'autre part, les capsides extranucléaires utilisées dans cette étude sont produites à partir d'un essai *in vitro* qui reconstitue la sortie des capsides virales du noyau (97). À des fins pratiques pour cette étude, le cytosol habituellement ajouté à l'essai a été remplacé par de la BSA puisque les protéines ubiquitinées cytosoliques auraient « contaminé » l'échantillon. Ainsi, le grand nombre de protéines ubiquitinées présentes dans le cytosol auraient pu masquer les « vrais » signaux des protéines virales ubiquitinées présentes dans les capsides extranucléaires. Toutefois, toute forme de tégumentation supplémentaire, pouvant avoir lieu hors du noyau, est impossible en présence de BSA. Puisque la majeure partie des téguments sont rajoutés dans le cytosol et pendant l'enveloppement secondaire, ces capsides virales extranucléaires sont dépourvues d'une grande quantité de protéines comparativement aux virus extracellulaires (32, 76, 115). Ceci pourrait donc expliquer en grande partie la

différence qui existe entre le profil des protéines ubiquitinées retrouvées dans les virus matures et celui des capsides extranucléaires.

La protéine majeure de la capside de l'HSV-1, VP5, a été identifiée et est retrouvée dans les virus extracellulaires et dans les capsides extranucléaires. En lien avec les raisons mentionnées ci-dessus, il est fort probable que les autres protéines ubiquitinées retrouvées dans les virus extracellulaires fassent partie de la couche tégumentaire ou bien de l'enveloppe virale. Par contre, il est possible que d'autres constituants ubiquitinés faisant partie de la capside n'aient pas été détectés lors des *Western blots* dirigés contre l'ubiquitine. La détection de ces protéines par l'anticorps anti-ubiquitine peut être affectée par la quantité et le poids moléculaire des protéines recherchées ainsi que par le nombre d'ubiquitines qui leur sont ajoutées. Ceci pourrait expliquer que nous ayons facilement identifié VP5, car il s'agit d'une grosse protéine très abondante présente à environ 900 copies par capside (8, 18, 84). Il serait intéressant de faire la purification des protéines ubiquitinées présentes dans ces virus à l'aide d'une colonne d'affinité et ensuite de les identifier par spectrométrie de masse.

3.4 Effet du MG-132 sur la transcription et la réplication virale

Le MG132 est un inhibiteur spécifique du protéasome (62). Il a été utilisé dans cette étude afin de déterminer s'il existe un lien entre l'ubiquitination de VP5 et la machinerie ubiquitine-protéasome. Nos données indiquent que l'ubiquitination de VP5 n'amène pas sa dégradation. Toutefois, le MG132 semble affecter la transcription et la réplication virale lorsque ajouté après l'entrée du virus (< 1-3 h.p.i.) mais avant que la réplication de nouvelles capsides ait lieu (< 6-8 h.p.i.). Nous pouvons donc observer que la production de VP5 est fortement inhibée si le MG132 est ajouté au début de l'infection ou à 3 h.p.i., mais qu'elle est normale si le MG132 est ajouté après 6 h.p.i (Figure 6 de l'article). De plus, la synthèse de VP26 est affectée d'une façon quasi identique à celle de VP5 (Figure 7B de l'article). Finalement, pratiquement aucun virus infectieux n'est produit si le MG132 est ajouté à 0 et 4 h.p.i. (Figure 7C de l'article). Ceci n'est pas surprenant puisqu'il est connu que l'ajout de MG132 affecte l'HSV-1 au tout début de l'infection (< 1 h.p.i.) en empêchant le virus de se rendre au noyau pour y injecter son ADN (17). Des études effectuées sur le virus HCMV, un autre herpesvirus, indiquent aussi que cette drogue

inhibe la réplication de l'ADN viral et l'assemblage de nouvelles capsides (93). Ceci s'explique possiblement par le dérèglement de plusieurs facteurs viraux et cellulaires qui sont normalement modulés par le protéasome au cours d'une infection pour que, par exemple, puisse avoir lieu le passage de la transcription des gènes α aux β puis aux γ . Si le MG132 est ajouté tard dans l'infection, plus particulièrement à la suite de l'assemblage des nouvelles capsides, la cascade d'expressions géniques ne devrait pas être affectée (Figure 7 de l'article). Toutefois, dans l'étude précédente avec les HCMV (93), les auteurs indiquent que sous leurs conditions expérimentales ils n'ont pas observé le même effet chez l'HSV-1, ce qui est contraire à ce que nous avons observé. D'autres études appuient pourtant les résultats que nous avons obtenus. Ainsi, une étude stipule que les inhibiteurs de protéasomes réduisent l'expression des protéines virales *immediate early* (α) et *late* (γ) de l'HSV-1 (60). Il est aussi rapporté dans la littérature que le type cellulaire et la MOI utilisés lors d'une infection affectent les résultats obtenus à la suite d'un traitement avec des inhibiteurs du protéasome (26). Ceci signifie que les conditions sous lesquelles sont effectuées les différentes expériences peuvent influencer grandement les résultats obtenus. En ce sens, il est possible que les différences rapportées par différents groupes quant aux effets du MG132 soient le résultat des conditions expérimentales utilisées. Puisque l'assemblage des nouvelles capsides d'HSV-1 est très actif entre 6 et 8 h.p.i., cela signifie que l'effet du MG132 est particulièrement marqué avant cette période et n'affecte pas la sortie du virus en employant des cellules Hela et une MOI élevée (5 ou 10). Sous ces conditions, si le MG132 est ajouté avant l'assemblage des nouvelles capsides, la réplication virale est fortement affectée.

3.5 Perspectives d'avenir

L'étude des protéines ubiquitinées dans les virus extracellulaires matures a révélé que la protéine majeure de la capside chez l'HSV-1 est mono-ubiquitinée à deux sites potentiels, soit sur ses lysines K810 et/ou K1275. Le rôle de cette modification post-traductionnelle n'est toutefois pas encore connu. Pour élucider cette énigme, des mutations devront être insérées dans le gène codant VP5, c'est-à-dire *UL19*. En ce sens, les lysines de VP5 en position K810 et K1275 devront être mutées en arginine (soit une des deux mutations à la fois ou les deux en même temps). En substituant les lysines par des arginines, l'ubiquitination de VP5 sur ces

acides aminés deviendra alors impossible. Il importera alors de vérifier si l'ubiquitination est encore présente sur cette protéine. Ensuite, il sera important d'observer si les mutants ainsi créés auront un effet sur le cycle viral et, si oui, quelle étape sera affectée ; l'entrée, le transport, l'assemblage, la sortie, etc. L'effet sur le cycle viral pourra alors être évalué par diverses techniques (microscopie à fluorescence, électronique, essais de plaques, etc.).

Au-delà de l'ubiquitination de VP5 et du rôle possible que peut avoir cette modification post-traductionnelle, plusieurs autres protéines virales ubiquitinées ont été détectées dans les virus extracellulaires matures. Dans une cellule infectée, il a déjà été démontré qu'il existait quelques protéines virales qui étaient ubiquitinées. De ces protéines, notons U_L6, U_L9, U_S9 et ICP0 (7, 9, 11, 23). Les fonctions de ces protéines ont déjà été étudiées dans le contexte de l'infection, mais une question demeure; sont-elles incorporées sous forme ubiquitinée dans les virus matures? Il serait ainsi facile de déterminer par *western blot* si ces protéines correspondent à certaines des protéines virales ubiquitinées retrouvées dans les échantillons de virus extracellulaires hautement purifiés utilisés au cours de la présente étude (Figure 1 de l'article). Outre ces protéines, il serait intéressant d'identifier les autres protéines ubiquitinées présentes dans ces virus. Enfin, l'ubiquitination de ces protéines dans les virus jouent-elles un rôle directement au sein des virus et/ou jouent-elles un rôle durant l'entrée du virus dans une cellule?

Une autre avenue qui pourrait être intéressante serait de déterminer avec quelles protéines virales ou cellulaires ces protéines interagissent et co-localisent dans le contexte d'une transfection et d'une infection. Par exemple, VP5 doit obligatoirement interagir avec des facteurs qui provoquent son ubiquitination. Ainsi, cette protéine virale pourrait être transfectée dans des cellules non infectées et une co-immunoprécipitation pourrait alors être effectuée pour tenter de déterminer si elle interagit avec des protéines de la machinerie d'ubiquitination. De même, cette procédure pourrait être répétée dans le contexte d'une infection pour déterminer si elle est ubiquitinée par une protéine cellulaire ou virale. Les résultats obtenus pourraient ainsi permettre de mettre en lumière les partenaires qui régissent l'ubiquitination de ces protéines. Il serait aussi intéressant d'approfondir les connaissances de l'implication de la machinerie des MVB dans le cycle viral. À l'aide de techniques d'immunofluorescence, il serait possible d'évaluer si des constituants de cette machinerie sont relocalisés au site d'enveloppement final.

4 Conclusion

Les infections causées par l'HSV-1 sont d'une grande importance pour la population mondiale. Encore aujourd'hui, il n'existe aucun médicament ou vaccin capable d'éradiquer ou de prévenir les infections herpétiques. La progression des connaissances fondamentales sur ce virus est donc primordiale pour permettre le développement de stratégies thérapeutiques efficaces.

L'étude de l'HSV-1 passe par au moins deux concepts de taille, c'est-à-dire la compréhension du cycle de réplication virale et la caractérisation de la composition des virus matures infectieux. Au cours du cycle de réplication virale, l'HSV-1 utilise la machinerie d'ubiquitination de la cellule hôte et les virus matures extracellulaires possèdent des protéines liées directement à cette machinerie. Un lien étroit semble donc exister entre les processus d'ubiquitination de la cellule ainsi que le cycle viral et la composition des virus matures. Ces constatations nous ont mené à étudier le rôle que joue l'ubiquitination pour l'HSV-1. Nous avons donc entrepris l'identification des protéines virales ubiquitinées présentes au sein des virus matures ainsi que leurs rôles potentiels dans le cycle de réplication virale.

L'étude de la composition des protéines ubiquitinées présentes dans les virus extracellulaires a démontré qu'ils étaient constitués de quelques protéines ubiquitinées. Plus particulièrement, la protéine majeure de la capsid de l'HSV-1, VP5, a été identifiée en tant que protéine ubiquitinée incorporée dans les virus matures extracellulaires. Il a également été conclu que cette protéine est potentiellement monoubiquitinée sur deux de ces 17 lysines, soit K810 et K1275. Cette découverte représente l'identification et l'incorporation d'une première protéine virale ubiquitinée présente au sein des virus matures extracellulaires de l'HSV-1.

Le rôle de cette modification post-traductionnelle dans le cycle viral a été étudié à l'aide d'une drogue inhibant le protéasome, le MG132. Il était déjà connu que cette drogue avait un effet au début du cycle viral, mais les étapes affectées n'avaient pas totalement été identifiées. Il a ainsi été conclu que l'inhibition du protéasome n'a aucun effet sur la sortie du virus à la suite de l'assemblage de nouvelles capsides virales, soit après environ sept heures d'infection, mais qu'il y avait un effet d'inhibition de la transcription et/ou de la réplication virale avant cette période.

L'étude des protéines ubiquitinées présentes dans les virus matures extracellulaires est ainsi entamée. L'identification des autres protéines ubiquitinées retrouvées dans ces virus reste une question intéressante à résoudre et qui permettra une meilleure compréhension du rôle de l'ubiquitination chez l'HSV-1. La protéine majeure de la capsid, VP5, a été identifiée en tant que protéine virale ubiquitinée présente dans ces virus mais, son rôle au sein du cycle viral n'a pas encore été établi. Puisque VP5 est potentiellement ubiquitinée sur deux de ses lysines, K810 et K1275, il sera très intéressant d'étudier les conséquences de la substitution de ces lysines par des arginines sur la réplication virale. Ces substitutions, en empêchant toute forme d'ubiquitination, permettraient l'étude du rôle de l'ubiquitination de VP5 dans le cycle viral.

Bibliographie

1. **Alberts, B.** 2004. *Biologie moléculaire de la cellule*, 4e éd. ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
2. **Avitabile, E., G. Lombardi, T. Gianni, M. Capri, and G. Campadelli-Fiume.** 2004. Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J Virol* **78**:8015-25.
3. **Babst, M.** 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**:2-9.
4. **Baines, J., and C. Duffy.** 2006. Nucleocapsid Assembly and Envelopment of Herpes Simplex Virus, p. 175-204. *In* R. M. Sandri-Goldin (ed.), *Alpha Herpesviruses. Molecular and Cellular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk.
5. **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.
6. **Booy, F. P., B. L. Trus, W. W. Newcomb, J. C. Brown, J. F. Conway, and A. C. Steven.** 1994. Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5652-6.
7. **Boutell, C., M. Canning, A. Orr, and R. D. Everett.** 2005. Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7. *J Virol* **79**:12342-54.
8. **Bowman, B. R., M. L. Baker, F. J. Rixon, W. Chiu, and F. A. Quijoch.** 2003. Structure of the herpesvirus major capsid protein. *EMBO J* **22**:757-65.
9. **Brandimarti, R., and B. Roizman.** 1997. Us9, a stable lysine-less herpes simplex virus 1 protein, is ubiquitinated before packaging into virions and associates with proteasomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13973-8.
10. **Brown, S. M., A. R. MacLean, J. D. Aitken, and J. Harland.** 1994. ICP34.5 influences herpes simplex virus type 1 maturation and egress from infected cells in vitro. *J Gen Virol* **75 (Pt 12)**:3679-86.

11. **Burch, A. D., and S. K. Weller.** 2004. Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **78**:7175-85.
12. **Cadwell, K., and L. Coscoy.** 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**:127-30.
13. **Calistri, A., P. Sette, C. Salata, E. Cancellotti, C. Forghieri, A. Comin, H. Gottlinger, G. Campadelli-Fiume, G. Palu, and C. Parolin.** 2007. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol* **81**:11468-78.
14. **Cardone, G., D. C. Winkler, B. L. Trus, N. Cheng, J. E. Heuser, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2007. Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography. *Virology* **361**:426-34.
15. **Crump, C. M., C. Yates, and T. Minson.** 2007. Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *J Virol* **81**:7380-7.
16. **Davison, A. J.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**:69-88.
17. **Delboy, M. G., D. G. Roller, and A. V. Nicola.** 2008. Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol* **82**:3381-90.
18. **Desai, P., N. A. DeLuca, J. C. Glorioso, and S. Person.** 1993. Mutations in herpes simplex virus type 1 genes encoding VP5 and VP23 abrogate capsid formation and cleavage of replicated DNA. *J Virol* **67**:1357-64.
19. **Di Fiore, P. P., S. Polo, and K. Hofmann.** 2003. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:491-7.
20. **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.
21. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, M. W. Douglas, and A. L. Cunningham.** 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* **18**:35-51.
22. **DiIanni, C. L., C. Mapelli, D. A. Drier, J. Tsao, S. Natarajan, D. Riexinger, S. M. Festin, M. Bolgar, G. Yamanaka, S. P. Weinheimer, and**

- et al.** 1993. In vitro activity of the herpes simplex virus type 1 protease with peptide substrates. *J Biol Chem* **268**:25449-54.
23. **Eom, C. Y., and I. R. Lehman.** 2003. Replication-initiator protein (UL9) of the herpes simplex virus 1 binds NFB42 and is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9803-7.
24. **Epstein, M. A.** 1962. Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* **12**:589-97.
25. **Everett, R. D.** 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**:761-70.
26. **Everett, R. D., A. Orr, and C. M. Preston.** 1998. A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **17**:7161-9.
27. **Farnsworth, A., K. Goldsmith, and D. C. Johnson.** 2003. Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *J Virol* **77**:8481-94.
28. **Farnsworth, A., T. W. Wisner, and D. C. Johnson.** 2007. Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J Virol* **81**:319-31.
29. **Farnsworth, A., T. W. Wisner, M. Webb, R. Roller, G. Cohen, R. Eisenberg, and D. C. Johnson.** 2007. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10187-92.
30. **Fatahzadeh, M., and R. A. Schwartz.** 2007. Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol* **32**:625-30.
31. **Fatahzadeh, M., and R. A. Schwartz.** 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* **57**:737-63; quiz 764-6.
32. **Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley.** 2007. *Fields virology*, 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. ; London.

33. **Fontaine-Rodriguez, E. C., and D. M. Knipe.** 2008. Herpes simplex virus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. *J Virol* **82**:3538-45.
34. **Foster, T. P., and K. G. Kousoulas.** 1999. Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J Virol* **73**:8457-68.
35. **Fuchs, W., H. Granzow, B. G. Klupp, M. Kopp, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* **76**:6729-42.
36. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 1997. The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J Virol* **71**:5639-46.
37. **Gibson, W., and B. Roizman.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol* **10**:1044-52.
38. **Glickman, M. H., and A. Ciechanover.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**:373-428.
39. **Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**:3675-84.
40. **Gredmark, S., C. Schlieker, V. Quesada, E. Spooner, and H. L. Ploegh.** 2007. A functional ubiquitin-specific protease embedded in the large tegument protein (ORF64) of murine gammaherpesvirus 68 is active during the course of infection. *J Virol* **81**:10300-9.
41. **Hagglund, R., and B. Roizman.** 2002. Characterization of the novel E3 ubiquitin ligase encoded in exon 3 of herpes simplex virus-1-infected cell protein 0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7889-94.
42. **Hagglund, R., C. Van Sant, P. Lopez, and B. Roizman.** 2002. Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:631-6.
43. **Heldwein, E. E., and C. Krummenacher.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:1653-68.

44. **Hicke, L.** 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:195-201.
45. **Hicke, L., H. L. Schubert, and C. P. Hill.** 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:610-21.
46. **Hoeller, D., C. M. Hecker, and I. Dikic.** 2006. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **6**:776-88.
47. **Homa, F. L., and J. C. Brown.** 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**:107-122.
48. **Huang, T. T., and A. D. D'Andrea.** 2006. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:323-34.
49. **Huffman, J. B., W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 2008. Amino acids 143 to 150 of the herpes simplex virus type 1 scaffold protein are required for the formation of portal-containing capsids. *J Virol* **82**:6778-81.
50. **Jesenberger, V., and S. Jentsch.** 2002. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:112-21.
51. **Johnson, D. C., and M. T. Huber.** 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* **76**:1-8.
52. **Jovasevic, V., L. Liang, and B. Roizman.** 2008. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol* **82**:3311-9.
53. **Kattenhorn, L. M., G. A. Korb, B. M. Kessler, E. Spooner, and H. L. Ploegh.** 2005. A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae. *Mol Cell* **19**:547-57.
54. **Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr.** 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:893-905.
55. **Kim, D. B., S. Zabierowski, and N. A. DeLuca.** 2002. The initiator element in a herpes simplex virus type 1 late-gene promoter enhances activation by ICP4, resulting in abundant late-gene expression. *J Virol* **76**:1548-58.
56. **Kirkpatrick, D. S., N. A. Hathaway, J. Hanna, S. Elsassner, J. Rush, D. Finley, R. W. King, and S. P. Gygi.** 2006. Quantitative analysis of in vitro

- ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol* **8**:700-10.
57. **Klupp, B. G., H. Granzow, W. Fuchs, G. M. Keil, S. Finke, and T. C. Mettenleiter.** 2007. Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:7241-6.
58. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* **82**:2363-71.
59. **Knipe, D. M., and A. Cliffe.** 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* **6**:211-21.
60. **La Frazia, S., C. Amici, and M. G. Santoro.** 2006. Antiviral activity of proteasome inhibitors in herpes simplex virus-1 infection: role of nuclear factor-kappaB. *Antivir Ther* **11**:995-1004.
61. **Laycock, K. A., S. F. Lee, R. H. Brady, and J. S. Pepose.** 1991. Characterization of a murine model of recurrent herpes simplex viral keratitis induced by ultraviolet B radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**:2741-6.
62. **Lee, D. H., and A. L. Goldberg.** 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**:397-403.
63. **Lee, J. I., G. W. Luxton, and G. A. Smith.** 2006. Identification of an essential domain in the herpesvirus VP1/2 tegument protein: the carboxy terminus directs incorporation into capsid assemblons. *J Virol* **80**:12086-94.
64. **Lehman, I. R., and P. E. Bohmer.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **274**:28059-62.
65. **Leuzinger, H., U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild.** 2005. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**:13047-59.
66. **Lim, K. L., K. C. Chew, J. M. Tan, C. Wang, K. K. Chung, Y. Zhang, Y. Tanaka, W. Smith, S. Engelender, C. A. Ross, V. L. Dawson, and T. M. Dawson.** 2005. Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* **25**:2002-9.

67. **Liu, F., and B. Roizman.** 1993. Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J Virol* **67**:1300-9.
68. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.
69. **Luxton, G. W., J. I. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith.** 2006. The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J Virol* **80**:201-9.
70. **Martin-Serrano, J.** 2007. The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic* **8**:1297-303.
71. **Maul, G. G., H. H. Guldner, and J. G. Spivack.** 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* **74 (Pt 12)**:2679-90.
72. **Maurer, U. E., B. Sodeik, and K. Grunewald.** 2008. Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:10559-64.
73. **McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. Dolan, D. McNab, L. J. Perry, P. Taylor, and M. D. Challberg.** 1988. Structures of herpes simplex virus type 1 genes required for replication of virus DNA. *J Virol* **62**:444-53.
74. **McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**:90-104.
75. **Mears, W. E., and S. A. Rice.** 1998. The herpes simplex virus immediate-early protein ICP27 shuttles between nucleus and cytoplasm. *Virology* **242**:128-37.
76. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**:167-80.
77. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**:423-9.
78. **Mettenleiter, T. C., and T. Minson.** 2006. Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* **80**:1610-1; author reply 1611-2.
79. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:395-425.

80. **Mou, F., T. Forest, and J. D. Baines.** 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol* **81**:6459-70.
81. **Nagel, C. H., K. Dohner, M. Fathollahy, T. Strive, E. M. Borst, M. Messerle, and B. Sodeik.** 2008. Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J Virol* **82**:3109-24.
82. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, F. P. Booy, B. L. Trus, A. C. Steven, J. V. Spencer, and J. C. Brown.** 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J Mol Biol* **263**:432-46.
83. **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.
84. **Newcomb, W. W., B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, J. S. Wall, and J. C. Brown.** 1993. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol* **232**:499-511.
85. **Nicholson, P., C. Addison, A. M. Cross, J. Kennard, V. G. Preston, and F. J. Rixon.** 1994. Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *J Gen Virol* **75 (Pt 5)**:1091-9.
86. **Nicola, A. V., J. Hou, E. O. Major, and S. E. Straus.** 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol* **79**:7609-16.
87. **Nishiyama, Y.** 2004. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Med Virol* **14**:33-46.
88. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
89. **Olesky, M., E. E. McNamee, C. Zhou, T. J. Taylor, and D. M. Knipe.** 2005. Evidence for a direct interaction between HSV-1 ICP27 and ICP8 proteins. *Virology* **331**:94-105.

90. **Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, and S. P. Gygi.** 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**:921-6.
91. **Peng, W., O. Vitvitskaia, D. Carpenter, S. L. Wechsler, and C. Jones.** 2008. Identification of two small RNAs within the first 1.5-kb of the herpes simplex virus type 1-encoded latency-associated transcript. *J Neurovirol* **14**:41-52.
92. **Preston, V. G., and I. M. McDougall.** 2002. Regions of the herpes simplex virus scaffolding protein that are important for intermolecular self-interaction. *J Virol* **76**:673-87.
93. **Prosch, S., C. Priemer, C. Hoflich, C. Liebentha, N. Babel, D. H. Kruger, and H. D. Volk.** 2003. Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir Ther* **8**:555-67.
94. **Ravid, T., and M. Hochstrasser.** 2007. Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol* **9**:422-7.
95. **Ravid, T., and M. Hochstrasser.** 2008. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:679-90.
96. **Reed, S. I.** 2003. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:855-64.
97. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
98. **Reske, A., G. Pollara, C. Krummenacher, B. M. Chain, and D. R. Katz.** 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* **17**:205-15.
99. **Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller.** 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**:8803-17.
100. **Rixon, F. J., C. Addison, A. McGregor, S. J. Macnab, P. Nicholson, V. G. Preston, and J. D. Tatman.** 1996. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol* **77 (Pt 9)**:2251-60.

101. **Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201-17.
102. **Roizman, B., H. Gu, and G. Mandel.** 2005. The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle* **4**:1019-21.
103. **Sawtell, N. M., and R. L. Thompson.** 1992. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* **66**:2150-6.
104. **Schlieker, C., G. A. Korb, L. M. Kattenhorn, and H. L. Ploegh.** 2005. A deubiquitinating activity is conserved in the large tegument protein of the herpesviridae. *J Virol* **79**:15582-5.
105. **Shanda, S. K., and D. W. Wilson.** 2008. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. *J Virol* **82**:7388-94.
106. **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.
107. **Snyder, A., K. Polcicova, and D. C. Johnson.** 2008. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol* **82**:10613-24.
108. **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.
109. **Spear, P. G.** 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**:401-10.
110. **Stiles, K. M., R. S. Milne, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and C. Krummenacher.** 2008. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after trans-interaction with glycoprotein D. *Virology* **373**:98-111.
111. **Taddeo, B., and B. Roizman.** 2006. The virion host shutoff protein (UL41) of herpes simplex virus 1 is an endoribonuclease with a substrate specificity similar to that of RNase A. *J Virol* **80**:9341-5.

112. **Taylor, T. J., M. A. Brockman, E. E. McNamee, and D. M. Knipe.** 2002. Herpes simplex virus. *Front Biosci* **7**:d752-64.
113. **Taylor, T. J., and D. M. Knipe.** 2003. C-terminal region of herpes simplex virus ICP8 protein needed for intranuclear localization. *Virology* **309**:219-31.
114. **Thompson, R. L., and N. M. Sawtell.** 2001. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *J Virol* **75**:6660-75.
115. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
116. **Umbach, J. L., M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen.** 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**:780-3.
117. **Ushijima, Y., T. Koshizuka, F. Goshima, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** 2008. Herpes simplex virus type 2 UL56 interacts with the ubiquitin ligase Nedd4 and increases its ubiquitination. *J Virol* **82**:5220-33.
118. **van Genderen, I. L., R. Brandimarti, M. R. Torrisi, G. Campadelli, and G. van Meer.** 1994. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* **200**:831-6.
119. **Van Sant, C., R. Hagglund, P. Lopez, and B. Roizman.** 2001. The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8815-20.
120. **Ventii, K. H., and K. D. Wilkinson.** 2008. Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J* **414**:161-75.
121. **Wagner, E. K., and M. J. Hewlett.** 2004. *Basic virology*, 2nd ed. Blackwell Science, Malden, MA.
122. **Weinheimer, S. P., P. J. McCann, 3rd, D. R. O'Boyle, 2nd, J. T. Stevens, B. A. Boyd, D. A. Drier, G. A. Yamanaka, C. L. DiIanni, I. C. Deckman, and M. G. Cordingley.** 1993. Autoproteolysis of herpes simplex virus type 1 protease releases an active catalytic domain found in intermediate capsid particles. *J Virol* **67**:5813-22.

123. **Weir, J. P.** 2001. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* **271**:117-30.
124. **Weissman, A. M.** 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:169-78.
125. **Welchman, R. L., C. Gordon, and R. J. Mayer.** 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:599-609.
126. **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.
127. **Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther.** 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**:1071-83.
128. **Wild, P., E. M. Schraner, D. Cantieni, E. Loepfe, P. Walther, M. Muller, and M. Engels.** 2002. The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy. *Micron* **33**:327-37.
129. **Wilkinson, K. D.** 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* **11**:1245-56.
130. **Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-37.
131. **Wu, C. A., N. J. Nelson, D. J. McGeoch, and M. D. Challberg.** 1988. Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *J Virol* **62**:435-43.
132. **Zhou, C., and D. M. Knipe.** 2002. Association of herpes simplex virus type 1 ICP8 and ICP27 proteins with cellular RNA polymerase II holoenzyme. *J Virol* **76**:5893-904.

