

Université de Montréal

**Analyse des protéines cellulaires incorporées dans les
particules matures du virus de l'Herpès simplex de type 1**

par

Camille Stegen

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de *Magister Scientiæ*
en pathologie et biologie cellulaire
option biologie cellulaire

Avril, 2011

© Camille Stegen, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Analyse des protéines cellulaires incorporées dans les particules matures du virus de
l'Herpès simplex de type 1

Présenté par :
Camille Stegen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Therrien, président-rapporteur
Roger Lippé, directeur de recherche
Gregory Emery, membre du jury

Résumé

Les virus exploitent la machinerie cellulaire de l'hôte de façon très variée et plusieurs types vont même jusqu'à incorporer certaines protéines cellulaires. Nous avons récemment effectué la première analyse protéomique du virion mature de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1), ce qui nous a permis de déterminer que jusqu'à 49 protéines cellulaires différentes se retrouvaient dans ce virus (Loret, S. et al. (2008). "Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions." *J Virol* 82(17): 8605-18.). Afin de déterminer leur importance dans le cycle de réplication d'HSV-1, nous avons mis au point un système de criblage nous permettant de quantifier le virus produit et relâché dans le milieu extracellulaire en utilisant un virus marqué à la GFP ainsi que des petits ARN interférents (pARNi) ciblant spécifiquement ces protéines cellulaires. Cette approche nous a permis de démontrer que 17 des protéines identifiées précédemment jouaient un rôle critique dans la réplication d'HSV-1, suggérant ainsi que leur incorporation dans le virus n'est pas aléatoire. Nous avons ensuite examiné le rôle d'une de ces protéines, DDX3X (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked), une protéine multifonctionnelle connue pour son implication dans les cycles de réplication de plusieurs virus humains. À l'aide de pARNi ainsi que de différentes lignées cellulaires, dont une lignée DDX3X thermosensible, nous avons démontré que l'inhibition de DDX3X résultait en une diminution du nombre de capsides intracellulaires et induisait une importante diminution de l'expression des gènes viraux. Nous avons aussi démontré que la fraction de DDX3X incorporée dans le virion contribuait activement au cycle infectieux d'HSV-1. Ces résultats confirment l'intérêt de notre approche afin d'étudier les interactions hôte-pathogène en plus de démontrer la contribution des protéines cellulaires incorporées à HSV-1 dans l'infection virale.

Mots-clés : Herpès simplex de type 1, DDX3X, criblage, protéines cellulaires, pARNi

Abstract

Keywords : Herpes simplex type 1, cellular proteins, DDX3X, siRNA, screen

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Introduction.....	1
1. Généralités.....	1
1.1. Définition.....	1
1.2. Historique.....	1
2. Classification des herpèsvirus et pathologies associées.....	2
2.1. Classification.....	2
2.2. Pathologies associées et prévalence chez l'Homme.....	4
3. Composition du virus de l'herpès.....	7
3.1. Composition et organisation du génome d'HSV-1.....	7
3.2. La capside.....	8
3.3. Le tégument.....	9
3.4. L'enveloppe.....	10
3.5. Composition du virus mature d'HSV-1.....	10
4. Cycle de réplication.....	11
4.1. Attachement et entrée.....	11
4.2. Réplication.....	12
4.3. Transport et sortie.....	14
4.4. Latence et persistance.....	15
5. Incorporation de protéines de l'hôte dans le virus mature.....	16
6. Étude des interactions hôte-pathogène à l'aide d'ARNs d'interférence.....	19
7. Les fonctions de la protéine DDX3X et son rôle dans les infections virales.....	21

Résultats	23
1. Objectifs du projet.....	23
1. Notes sur le texte.....	23
1.1. Contribution des auteurs	23
2. Article.....	24
Abstract	25
Author Summary.....	26
Introduction.....	27
Discussion	56
Materials and Methods.....	61
Acknowledgments.....	67
References.....	68
Discussion.....	75
1. Validation de la méthode	75
2. Importance des protéines cellulaires retrouvées dans le virus mature pour son cycle de réplication.....	76
3. La protéine DDX3X : un nouvel acteur dans le cycle de réplication d’HSV-1	78
Perspectives et conclusion	81
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Principales pathologies associées aux sous-familles d'Herpesviridae.....	5
Tableau 2. Liste des protéines cellulaires, et de leurs isoformes, incorporées dans le virus mature d'HSV-1	17
Tableau 3. Protéines cellulaires incorporées dans HSV-1 retrouvées dans d'autres <i>Herpesviridae</i> [96, 97, 101, 102, 104].	19

Article

Table 1. Proteins tested in the siRNA screen.....	38
---	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Composition générale des herpesvirus.	3
Figure 2. Séroprévalence de l'Herpès simplex de type 1 et 2 en Ontario, en 2001.	6
Figure 3. Organisation du génome linéaire d'HSV-1.	8
Figure 4. Composition du virion mature d'HSV-1.	11
Figure 5. Réplication de l'ADN d'HSV-1.	13
Figure 6. Transport et assemblage du virus d'HSV-1 selon le modèle de ré-enveloppement.	15
Figure 7. Dégradation d'un ARNm à l'aide de pARNi.	20

Article

Figure 1. Screening method.	42
Figure 2. Validation of the assay.	44
Figure 3. siRNA screen against the host proteins identified in mature extracellular virions.	46
Figure 4. Impact of siRNA transfection by conventional plaque assays.	47
Figure 5. The impact of DDX3X is independent of the cell line.	48
Figure 6. DDX3X is necessary for HSV-1 replication.	49
Figure 7. Implication of the virion-incorporated DDX3X in HSV-1 replication.	51
Figure 8. Impact of DDX3X knockdown on intracellular virions.	52
Figure 9. Inhibition of DDX3X reduced the amount of assembly compartments in infected cells.	54
Figure 10. Impact of the inhibition of DDX3X on HSV-1 protein expression.	55
Figure 11. Cellular functions of virion-incorporated host proteins.	60

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIHV-1	Herpèsvirus alcelaphine type 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN d'interférence
ARNm	ARN messenger
Av. J.-C.	Avant Jésus-Christ
BFA	Brefeldin A
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E	Précoce (gène)
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ESCRT	Complexe d'adressage endosomal requis pour le transport
FCS	Sérum de veau foetal
gB/M/N	Glycoprotéine B (ou M, N, etc.)
GFP	Protéine fluorescente verte
HBV	Virus de l'hépatite B
HCMV	Cytomégalovirus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HHV-6	Herpèsvirus humain 6
HHV-8	Herpèsvirus humain 8
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
hpi	Heure post-infection
HSV	Virus de l'Herpès simplex
HSV-1	Virus de l'Herpès simplex de type 1
HSV-2	Virus de l'Herpès simplex de type 2
HVEM	Médiateur d'entrée des herpèvirus
ICP	<i>Infected cell protein</i>

IE	Immédiat-précoce (gène)
IR	<i>Inverted repeats</i>
IR _L	<i>Inverted repeats long</i>
IR _S	<i>Inverted repeats short</i>
KHSV	Herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi
kpb	Kilo de paires de bases
L	Tardif (gène)
LAT	<i>Latency Associated Transcript</i>
MCMV	Cytomégalovirus murin
MES	Acide morpholine-4-éthanesulfonique
MNT	Tampon MES, NaCl, Tris
MOI	Multiplicité d'infection
mRNP	<i>Messenger ribonucleoprotein particle</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
ORF	Cadre de lecture
Ori	Origine de réplication
PAA	Acide phosphonoacétique
pARNi	Petit ARN interférent
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate
PFU	Unité formatrice de plaque
PRV	Virus de la pseudorange
RFU	Unité de fluorescence relative
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RPG	Gènes des protéines ribosomales
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNC	Système nerveux central
TGN	Réseau trans-golgien
TR	<i>Terminal repeats</i>
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
U _L	<i>Unique long</i>
U _S	<i>Unique short</i>
UV	Ultraviolet
Vhs	<i>Virion host shutoff</i>
VP	<i>Viral protein</i>
VZV	Virus de la varicelle-zona

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Dr Roger Lippé, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet aussi stimulant ainsi que pour la liberté qu'il m'a accordée dans l'exécution du projet. Un gros merci à Johanne et Yordanka pour le coup de main que vous m'avez apporté dans la dernière ligne droite : je vous dois certainement ma santé mentale! Un immense merci à Sandra : sans ton travail, ce projet n'aurait jamais existé et sans ta présence, mes trois dernières années auraient été pas mal moins agréables. Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire, précédents et actuels, pour les commentaires, les suggestions, les encouragements et les fous rires.

Je remercie profondément ma mère, mon frère et mes amis pour leur soutien moral, financier et alimentaire constant, pour m'avoir parfois rappelé que la vie existe à l'extérieur du labo et parce que vous êtes toujours là, malgré mes longues absences ces trois dernières années: merci!

Introduction

1. Généralités

1.1. Définition

Le virus de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1) est l'agent étiologique des feux sauvages. Ce virus est responsable de l'une des principales infections virales chez l'Homme et n'est précédé en importance que par les infections causées par les virus de la grippe et du rhume (Influenza, Rhinovirus, Coronavirus et Adenovirus)

1.2. Historique

L'herpès est connu depuis au moins 2 500 ans av. J.-C. Le terme *herpes* (rampant) a tout d'abord été utilisé par Hippocrate pour décrire des lésions semblant ramper sur la peau des patients et dont la description correspond à celles causées par HSV. Des descriptions similaires ont été faites tout au cours de l'Histoire; l'empereur Tibère va jusqu'à bannir les baisers lors des rituels et des cérémonies afin de limiter la transmission de ce fléau [1, 2] et la maladie entre peu à peu dans la culture populaire : même Shakespeare fait allusion à cette plaie dans *Roméo et Juliette* [3]. Au 18^e siècle, alors que les prostituées étaient sous surveillance médicale, Jean Astruc, le médecin du roi Louis XV, fut un des premiers à décrire les lésions causées par l'herpès génital. Malgré cela, il fallut attendre jusqu'en 1893 pour que le dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal démontre la transmission de l'herpès d'un individu à l'autre et établisse un lien entre les lésions labiales et génitales [4, 5].

La recherche sur l'herpès s'active dès le début du XX^e siècle : les propriétés de latence du virus commencent à être étudiées à partir des années 30 et durant les décennies suivantes, les chercheurs ont pu constater la grande diversité des tissus pouvant être infectés par le virus [5]. La mise en place de lignées cellulaires stables permit une meilleure étude du virus et l'isolation de plusieurs membres de la famille des herpèsvirus infectant l'Homme a permis, entre autres, au Dr Karl Schneweis de démontrer l'existence de deux

virus de l'herpès simplex : l'un infectant principalement la région labiale et l'autre, les régions génitales [4, 6].

La recherche actuelle s'articule autour des découvertes effectuées dans les années 60 et 70, alors que le génome, l'architecture des particules virales et la régulation des protéines furent caractérisés [7-11]. La mise au point des techniques de clonage, de réaction de polymérase en chaîne, l'amélioration des techniques de séquençage d'ADN permettant du même coup le développement du génie génétique au cours des trente dernières années a entraîné un bond phénoménal des découvertes sur l'herpès [4, 5]. Ces découvertes conjuguées à l'essor du génie génétique ont par ailleurs permis de démontrer l'énorme potentiel des herpèsvirus comme agents prophylactiques et comme vecteurs pour la thérapie génique; d'agent responsable d'un mal honteux, le virus de l'herpès se révèle peu à peu l'allié incontournable de la recherche biomédicale [12-14]

2. Classification des herpèsvirus et pathologies associées

2.1. Classification

Le virus de l'Herpès simplex de type 1 a donné son nom à la grande famille des *Herpesviridae*, une famille qui comptait plus de 200 espèces pouvant infecter une importante variété d'organismes allant des invertébrés à l'Homme. Traditionnellement, les virus ont été classifiés comme faisant partie des herpèsvirus s'ils possédaient les caractéristiques suivantes : a) un cœur d'ADN bicaténaire linéaire de 125 à 290 kpb, b) une capsidie icosaédrale d'environ 125 nm de diamètre entourant l'ADN, c) une couche de protéines recouvrant la capsidie et d) une enveloppe bilipidique sur laquelle sont ancrées des glycoprotéines [15] (Figure 1). D'un point de vue génétique cependant, il a été démontré que les herpèsvirus sont divisés en trois catégories distinctes ne possédant que très peu d'homologie entre elles. Pour cette raison, la famille des *Herpesviridae* a récemment été clivée en trois familles distinctes réunies sous le nouvel ordre des *Herpesvirales*. La famille des *Herpesviridae* regroupe maintenant les virus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles, celle des *Alloherpesviridae*, regroupe les virus de poissons et de grenouilles tandis que la

famille *Malacoherpesviridae* ne compte présentement qu'un représentant infectant les bivalves [15, 16].

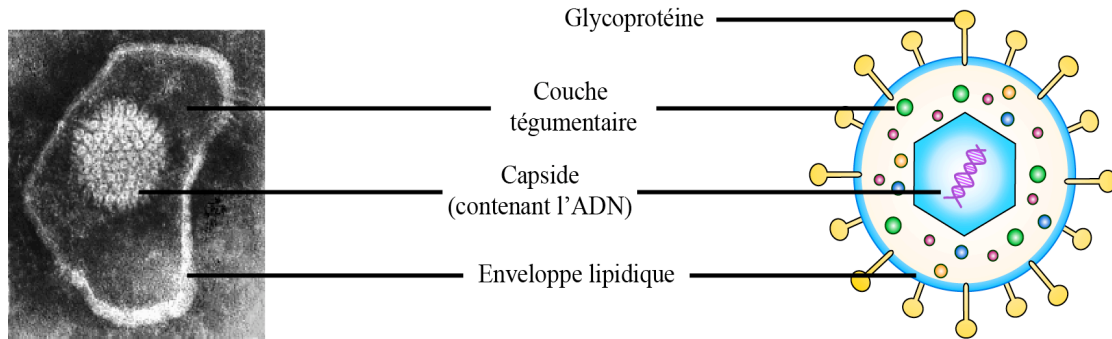


Figure 1. Composition générale des herpesvirus.

(Image de microscopie électronique tirée de <http://virology-online.com/viruses/HSV.htm>)

Compte tenu du nombre important de membres de la famille des herpesvirus ainsi que de la grande diversité des espèces qu'ils infectent, les virus ont été regroupés en trois sous-familles en se basant sur le type d'infection qu'ils causent. Les études de séquençage subséquentes supportent remarquablement bien cette classification qui demeure donc toujours pertinente.

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* regroupe des virus infectant un nombre restreint d'hôtes. Les membres de cette sous-famille possèdent un cycle de reproduction rapide en culture cellulaire, ils sont capables d'induire une lyse efficace des cellules infectées et ils possèdent la capacité d'établir une infection latente principalement, mais non exclusivement, dans les ganglions sensoriels. Cette sous-famille comprend les genres *Simplexvirus* (HSV-1), *Varicellovirus* (VZV) infectant les mammifères, les *Mardivirus* et *Itovirus*, infectant les oiseaux, ainsi que les *Herpesvirus* de reptiles (non catégorisés).

Les *Betaherpesvirinae* ont aussi un nombre restreint d'hôtes. Leur cycle de reproduction est plutôt long et en culture cellulaire, les cellules deviennent souvent hypertrophiées (cytomégalie). Ces virus peuvent établir des infections latentes principalement dans les glandes sécrétoires, les cellules lymphoréticulaires et les cellules

rénales. Cette sous-famille comprend entre autres les genres *Cytomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (MCMV) et *Roseolovirus* (HHV-6).

Les *Gammaherpesvirinae* n'infectent qu'un nombre d'hôtes très restreint (du même ordre ou famille que l'hôte naturel). En culture cellulaire, tous les membres ont la capacité d'infecter les cellules lymphoblastiques alors que seulement quelques membres peuvent causer des infections lytiques dans certaines lignes fibroblastiques et épithélioïdes. Les virus de cette sous-famille, qui ne comprend présentement que deux genres, les *Lymphocryptovirus* (EBV) et *Rhadinovirus* (HHV-8), infectent de manière spécifique les lymphocytes T ou B et induisent des infections latentes dans les tissus lymphoïdes [4].

2.2. Pathologies associées et prévalence chez l'Homme

Les virus regroupés dans ces trois sous-familles sont responsables d'un grand nombre de maladies. Des représentants de chacune des catégories sont associés à des pathologies humaines et un résumé des principales infections humaines causées par des herpesvirus se retrouve dans le Tableau 1. En plus de causer des lésions labiales, l'infection à HSV-1 est associée à de nombreuses autres pathologies dont la sévérité varie de l'infection asymptomatique à l'infection létale. L'infection à HSV-1 peut causer tout autant des dermatites, des ulcères de la cavité buccale, des lésions génitales, que des infections oculaires entraînant la perte de vision ou encore des encéphalites mortelles [4, 17]. Certaines études ouvrent même la porte à un possible rôle d'HSV-1 dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer [18, 19].

Le type de maladie causée par HSV-1 chez l'humain varie selon l'âge, l'état de santé et le mode de vie de l'individu. L'humain est le principal réservoir d'HSV-1 et celui-ci se transmet par contact direct avec l'agent pathogène. Il existe une importante corrélation entre la séroprévalence d'HSV-1 et l'âge des individus : le taux de séropositivité passe de 20% chez les enfants de moins de 5 ans à 90% chez les plus de 75 ans [4], bien que dans la plupart des cas, l'infection soit asymptomatique. Au Canada, une comparaison de la séroprévalence d'HSV-1 et HSV-2 selon l'âge et le sexe dans différentes régions de

l'Ontario parue en 2003 concluait qu'environ 55% des hommes et 89% des femmes de 44 ans étaient HSV-1 séropositifs [20] (Figure 2).

Tableau 1. Principales pathologies associées aux sous-familles d'Herpesviridae

Sous-famille	Nom (abréviation)	Pathologies associées
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpès simplex de type 1 (HSV-1)	Lésions faciales, labiales et oculaires, encéphalites
	Herpès simplex de type 2 (HSV-2)	Lésions génitales et anales
	Varicella-zoster (VSV)	Varicelle, zona
<i>Betaherpesvirinae</i>	Cytomégalovirus (HCMV)	Anomalies congénitales, rejet de greffe, mononucléose
	Herpèsvirus humain 6 de type A et B (HHV-6)	Roséole, hépatite, encéphalite, rejet de greffe
	Herpèsvirus humain 7 (HHV-7)	Syndrome de fatigue chronique
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV)	Sarcome de Kaposi, maladie de Castelman, lymphome à effusion primaire
	Epstein-Barr (EBV)	Mononucléose, lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngien

(D'après <http://pathmicro.med.sc.edu/viro1/herpes.htm> et [4])

L'impact des pathologies associées à HSV-1 peut être considérable. Aux États-Unis, il est estimé que 300 000 cas par an de conjonctivites résultent d'une infection par HSV-1; il s'agirait de la principale cause de cécité en Amérique du Nord. En Grande-Bretagne, une étude récente a démontré que l'incidence d'infections du système nerveux central (SNC) causées par HSV-1 était de 0,9 cas par 100 000 habitants soit l'équivalent de l'incidence d'infections du SNC causées par *Streptococcus pneumoniae* [21]. Il semblerait aussi que la proportion de cas d'herpès génital causés par HSV-1 soit en importante augmentation, particulièrement chez les jeunes adultes [22]; bien que les conséquences soient moins fâcheuses que pour les exemples rapportés précédemment, la qualité de vie d'une importante partie de la population se trouve tout de même fortement affectée.

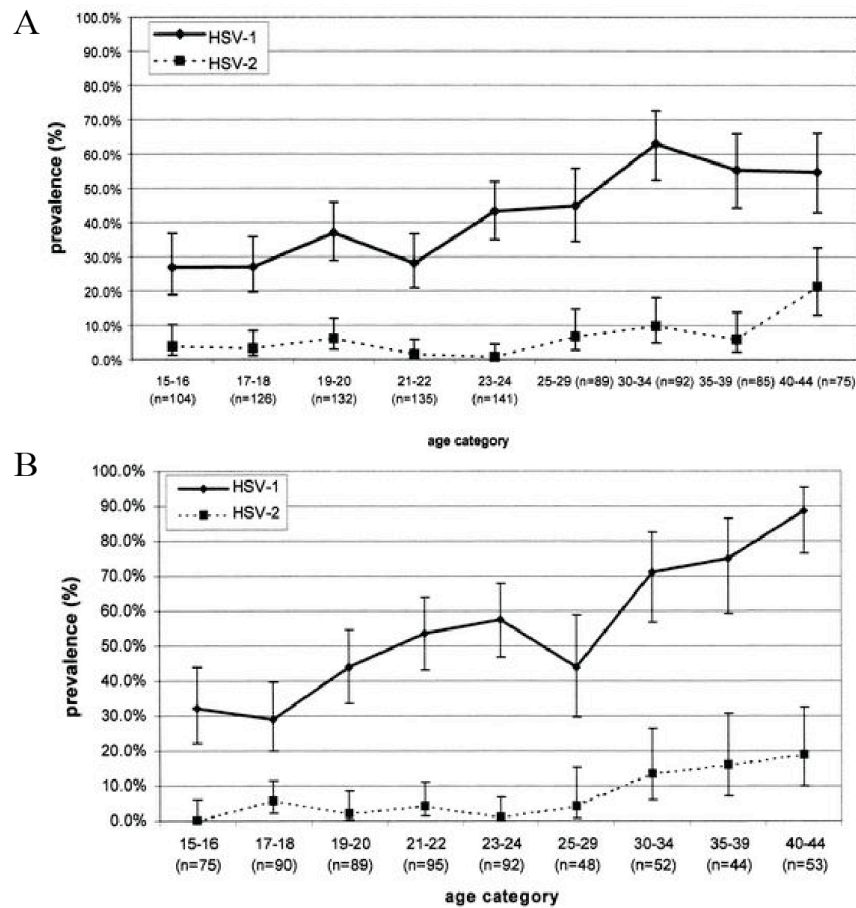


Figure 2. Séroprévalence de l'Herpès simplex de type 1 et 2 en Ontario, en 2001, par tranche d'âge chez (A) les hommes et (B) les femmes.

(Tiré de Howard, M. et al. J Clin Microbiol. 2003 January; 41(1): 84–89 [20])

De nombreux agents antiviraux ont été développés et mis en marché aux cours des dernières années. La plupart des antiviraux sont des analogues des nucléosides, parmi les plus connus notons l'acyclovir et ses dérivés, le valaciclovir, le penciclovir, le ganciclovir ainsi que le cidofovir. Le Foscarnet, un dérivé de l'acide phosphonoformique, est quant à lui un analogue du pyrophosphate. Bien qu'ils parviennent à réduire les symptômes lors des épisodes de réactivation du virus, aucun de ces agents n'entraîne une guérison complète

puisque aucun n'est capable de cibler les virus en phase latente; à la longue, le virus peut même venir à développer une certaine résistance à ces agents [4]. Afin de parvenir à une guérison complète, il s'avère primordial de mieux comprendre le fonctionnement d'HSV-1 ainsi que ses interactions avec son hôte. Cela pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques menant à l'élaboration de nouveaux antiviraux, voire, à la mise au point d'un vaccin.

3. Composition du virus de l'herpès

3.1. Composition et organisation du génome d'HSV-1

Le génome d'HSV-1 est constitué d'un double brin d'ADN d'environ 152 000 paires de bases (pb). Il est constitué d'au moins 80 cadres de lecture ouverts (*open reading frame*; ORF) et code pour au moins 84 protéines différentes. Deux segments d'ADN uniques, désignés *unique long* (U_L) et *unique court* (U_S) sont présents sur le génome, flanqués de séquences répétitives *a*, *b*, *c* appelées *terminal* (TR) ou *inverted repeats* (IR). Les séquences répétitives de la région U_L sont désignées par *ab* et *a'b'*, tandis que celles de la région U_S sont désignées par *a'c'* et *ca* (Figure 3). La séquence *a* est hautement conservée, le nombre de répétitions de la séquence varie d'une souche à l'autre. Tant les séquences uniques, courtes et longues, que les séquences répétitives codent pour des protéines virales; les séquences répétitives permettent aussi de circulariser l'ADN viral et participent à son encapsidation. Les gènes sont nommés selon leur emplacement sur le génome soit : U_L1-56 , U_S1-12 , IR_L1-2 et IR_S1 [4, 23, 24].

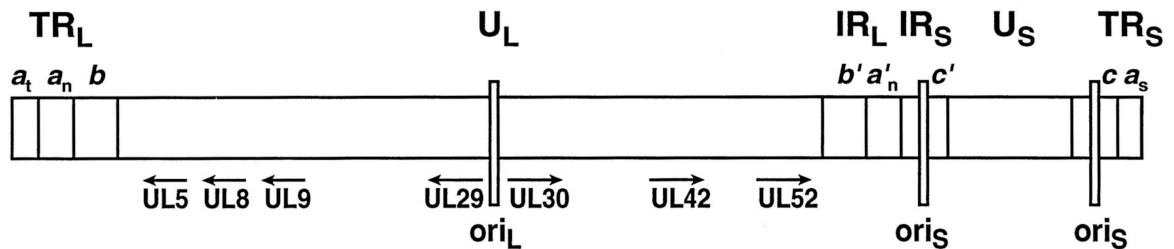


Figure 3. Organisation du génome linéaire d'HSV-1. Ce schéma met en évidence les régions uniques et répétitives du génome, les sites d'origine de réplication ainsi que les régions promotrices des gènes impliqués dans la réplication. TR : *terminal repeats*; IR : *inverted repeats*; ori : origine de réplication (adapté de Lehman I R , Boehmer P E J. Biol. Chem. 1999;274:28059-28062 [25]).

Lors de l'infection, les protéines virales sont exprimées de façon séquentielle. Les gènes sont divisés en trois catégories selon le moment où ils sont exprimés au cours de l'infection; l'expression des gènes de chaque groupe étant dépendante du produit du groupe de gènes qui le précède. Ainsi, les gènes α (*immediate early*; IE) sont exprimés en premier suivis par les gènes β (*early genes*; E) puis par les γ (*late genes*; L) qui sont généralement exprimés à la suite de la réplication de l'ADN viral [4, 26].

3.2. La capside

La capside mature d'HSV-1 est composée de 162 capsomères disposés de manière icosaédrale. La capside est composée de quatre protéines virales, VP5 (UL19), VP16 (UL35), VP23 (UL18) et VP19C (UL38). VP5, la protéine la plus abondante, est présente en cinq copies sur chaque penton et en six copies sur chaque hexon qui forme les capsomères. VP26 est regroupé en six copies formant un anneau sur les hexons, au-dessus des sous-unités de VP5. Deux copies de VP23 et une unité de VP19C forment des triplex reliant les capsomères entre eux. Chaque capside virale contient aussi 12 copies de la protéine UL6 qui forment le portal au travers duquel l'ADN viral est inséré [4, 27].

La procapside, la capsidie immature ne renfermant pas encore d'ADN, contient la protéine d'échafaudage VP22 (UL49) ainsi que les protéases VP24 et VP21, toutes deux codées par le gène UL26. Les procapsides ont une forme plus sphérique que la capsidie mature et s'angularisent suite à l'entrée de l'ADN viral. Trois types de capsides peuvent ainsi être isolées des cellules infectées : les capsides A, B et C. Les capsides A sont incomplètes et ne contiennent ni protéine d'échafaudage, ni ADN. Les capsides B ne contiennent pas ou peu d'ADN mais contiennent les protéines d'échafaudage dont les formes clivées d'UL26 tandis que les capsides C correspondent à la forme mature de la capsidie; ce sont ces capsides qui seront éventuellement utilisées pour la formation de nouveaux virions [4, 28-30].

3.3. Le tégument

Le tégument définit la couche protéique située entre la capsidie et l'enveloppe d'HSV-1. Longtemps qualifiée « d'amorphe » [16, 31], il a récemment été démontré que cette masse de protéines changeait de conformation dans le temps, passant d'un état relativement symétrique après l'assemblage des virions à une structure asymétrique et résistante au Triton X-100 de 24 à 64 heures suivant l'infection [32]. Les protéines composant le tégument ont des rôles variés mais plusieurs de ces protéines s'avèrent cruciales lors des premières étapes de l'infection. Par exemple, UL36 et UL37 vont diriger la capsidie de la membrane plasmique au noyau [33-35], la protéine VP16 (UL48), une protéine transactivatrice va permettre la traduction des gènes α , déclenchant de cette manière le cycle infectieux, alors que la protéine Vhs (UL41) va stabiliser ou empêcher l'expression de certaines protéines de l'hôte dès l'entrée du virus [36-41]. Plusieurs études semblent démontrer que l'acquisition du tégument se fait de façon séquentielle et ordonnée et l'incorporation des protéines tégumentaires semble avoir lieu à différents sites dans la cellule hôte : les liaisons entre la capsidie, les protéines du tégument et l'enveloppe seraient donc plus complexes qu'elles ne paraissent de prime abord [32, 42-48].

3.4. L'enveloppe

L'enveloppe des virions matures d'HSV-1 est enrichie de sphingomyéline et de phosphatidylsérine ce qui semble indiquer que cette enveloppe dérive des membranes du réseau trans-golgien de la cellule hôte [49, 50]. L'enveloppe des herpèsvirus est parsemée de glycoprotéines d'origine virale; dans le cas d'HSV-1, le virus mature contient 11 glycoprotéines (gB-gE et gG-gM) ainsi que deux protéines membranaires non glycosylées : UL20 et UL49A qui est aussi baptisée gN. Les glycoprotéines peuvent être divisées en deux catégories selon qu'elles soient essentielles ou non à la réplication du virus en culture cellulaire. Les glycoprotéines sont particulièrement importantes lors de l'adhésion et de l'entrée du virus dans la cellule hôte [51-54], lors de la sortie des capsides du noyau [55] ainsi que pour l'assemblage des virions [56, 57].

3.5. Composition du virus mature d'HSV-1

Bien que le génome viral d'HSV-1 code pour plus de 80 protéines, toutes ne sont pas incorporées dans le virus mature. Une analyse protéomique effectuée récemment par notre laboratoire a permis d'identifier les protéines composant le virus extracellulaire d'HSV-1. Cette étude a démontré que le virus mature était composé d'au moins huit protéines constituant la capside virale, 13 glycoprotéines et de 23 protéines constituant le tégument (Figure 4). De plus, jusqu'à 49 protéines distinctes de l'hôte ont été recensées par spectrométrie de masse dans les virions extracellulaires [58]. L'implication de ces protéines cellulaires dans le cycle infectieux d'HSV-1 et leurs répercussions sur notre compréhension des interactions entre HSV-1 et son hôte feront l'objet d'une étude approfondie plus loin.

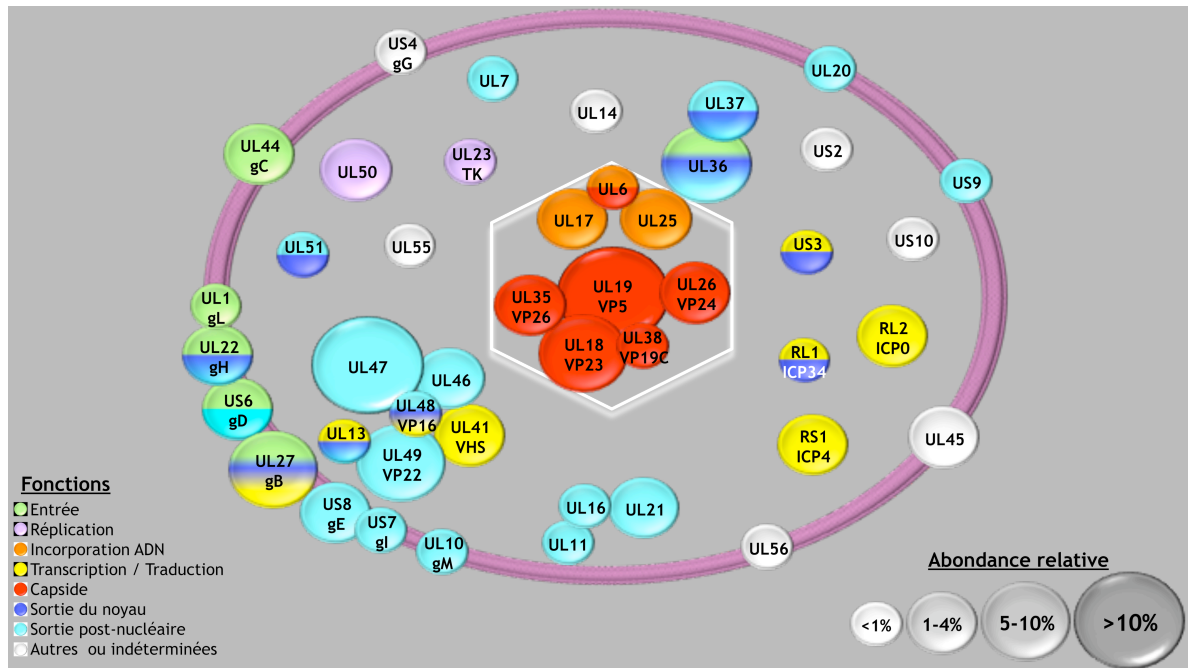


Figure 4. Composition du virion mature d'HSV-1. Schéma des protéines virales retrouvées dans le virus HSV-1 extracellulaire, de leurs fonctions et leur abondance relative. Jusqu'à 49 protéines cellulaires sont aussi retrouvées dans les virions.

(Adapté de Loret S. et al. Cover page (2008). J. Virol. 82(20) [58])

4. Cycle de réplication

4.1. Attachement et entrée

L'attachement du virus à une cellule hôte constitue la première étape de l'infection. L'infection initiale à HSV-1 a généralement lieu dans le tissu épithélial des muqueuses où quatre glycoprotéines, gB, gD, gH et gL, sont nécessaires pour permettre l'entrée d'HSV-1. La liaison des glycoprotéines gC et gB avec le sulfate d'héparan présent à la surface des cellules est une étape préliminaire à l'entrée du virus. Bien que réversible et non essentielle, cette étape augmente la probabilité d'une liaison de gD avec un récepteur ce qui augmente le potentiel d'infection [4]. La glycoprotéine gD peut se lier à trois types de récepteurs :

nectine-1 ou -2 (HveC et HveB), le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM) ou un sulfate d'héparan modifié par une 3-O-sulfotransférase [59-61]. La liaison entre gD et le récepteur entraîne un changement de conformation de la machinerie de fusion formée de gB et du complexe gH/gL entraînant une fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique de la cellule hôte selon un mécanisme qui demeure méconnu [4, 59, 62]. La capside virale est libérée dans le cytoplasme et certaines protéines du tégument, dont VP1-3, UL36 et UL37, demeurent attachées à la capside et interagissent avec les microtubules afin d'amener la capside au noyau pour y injecter l'ADN viral via les pores nucléaires [33, 35, 63-65]. En culture cellulaire, HSV-1 peut aussi entrer dans les cellules par endocytose, bien que cette méthode semble peu utilisée par le virus *in vivo* puisque peu des types cellulaires concernés risquent d'être rencontrés par le virus au cours d'une infection [66-69]. Une fois l'infection établie, le virus se propage généralement d'une cellule à l'autre sans diffusion dans le milieu extracellulaire [59].

4.2. Réplication

La transcription de l'ADN viral utilise l'ARN polymérase II de l'hôte combinée à certains facteurs viraux. Tel que mentionné précédemment, la synthèse des protéines virales se fait de manière séquentielle. La synthèse des protéines IE, soit les protéines ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47, a lieu dans les deux à quatre heures suivant l'entrée du virus. Leur synthèse est facilitée par la présence de la transactivatrice VP16 dans le tégument. Ces protéines vont à leur tour activer la transcription des protéines E, soit les protéines permettant la réplication du génome viral (Figure 5), dans les cinq à sept heures suivant le début de l'infection. L'initiation de la réplication va à son tour permettre la transcription des protéines L, des protéines essentiellement structurales incluant notamment les protéines de la capside, certaines glycoprotéines ainsi que des téguments [4, 25, 70-74].

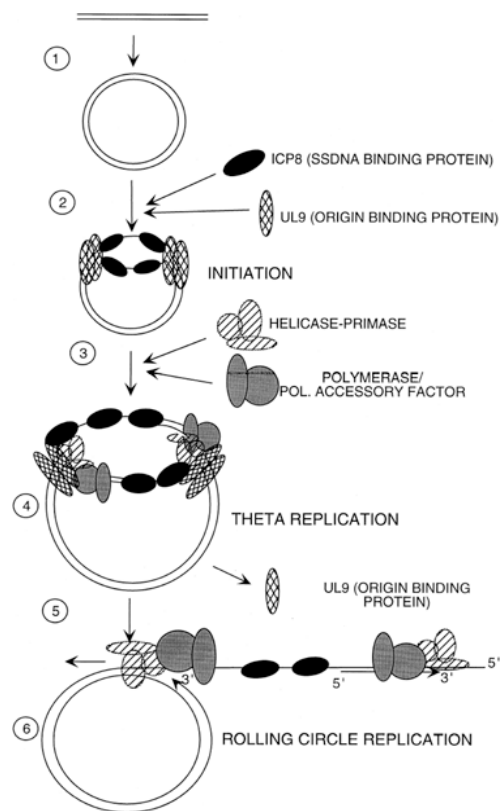


Figure 5. Réplication de l'ADN d'HSV-1. (1) Une fois entré dans le noyau, l'ADN se circularise. (2) Les protéines virales UL9 puis ICP8 s'associent à l'une des origines de réplication pour initier le déroulement l'ADN. (3) Divers facteurs de réplication sont recrutés. (4) Une première phase de réplication de type *thêta* (θ) débute afin d'obtenir une matrice d'ADN circulaire. (5-6) Cette matrice est nécessaire à la seconde phase de réplication de type *rolling circle* permettant la production de concatémères d'ADN qui seront par la suite clivés [4].

Les protéines E nouvellement synthétisées sont recrutées sur l'ADN parental dans des sites localisés près des domaines ND10, site d'initiation de la réplication [75]. L'ADN ainsi que les facteurs de réplication s'accumulent et forment un compartiment de réplication. La longue chaîne de concatémères du génome viral produite lors de la réplication (Figure 5) est clivée en unités qui vont être incorporées dans les procapsides

(capsides B) dans les compartiments d'assemblage [76-78]. Les nucléocapsides nouvellement formées sont alors prêtes à quitter le noyau et à poursuivre leur maturation.

4.3. Transport et sortie

Une fois formées, les nucléocapsides doivent sortir du noyau, acquérir leur tégument, obtenir leur enveloppe avant de pouvoir quitter la cellule et les moyens employés par le virus pour réaliser ces étapes demeurent controversés. Le modèle de ré-enveloppement (Figure 6), est le modèle le plus couramment admis. Il stipule que les nucléocapsides acquièrent une première enveloppe en traversant la membrane nucléaire interne pour se retrouver dans l'espace périplasmique. Les capsides traversent ensuite la membrane nucléaire externe; ce faisant, elles perdent leur enveloppe nouvellement acquise et se retrouvent « nues » ou dé-enveloppées dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les capsides transitent ensuite vers le TGN, lieu final d'assemblage, tout en acquérant une partie de leur tégument au cours du voyage. La plupart des glycoprotéines sont synthétisées selon la voie classique de synthèse des glycoprotéines et s'accumulent au TGN [50, 79]. Les capsides bourgeonnent dans la membrane du TGN, acquérant ainsi les téguments restants l'enveloppe finale et les glycoprotéines [79-81] et sortent ensuite des cellules via des vésicules de transport en suivant une voie conventionnelle impliquant une protéine cellulaire, la protéine kinase D (PKD), une protéine reconnue pour médier la fission au TGN de petits cargos destiné à rejoindre la membrane plasmique [82]. Ce modèle est en accord avec l'acquisition séquentielle du tégument et des glycoprotéines généralement observée. De plus, l'utilisation de virus mutants a démontré que les protéines virales US3, ICP34,5, gB, gD, gH et gL étaient impliquées dans la fusion des capsides enveloppés de l'espace périplasmique et leur relâche dans le cytoplasme [4, 79, 83]. Même si ce modèle est généralement accepté, nous ne connaissons pas pour l'instant le mécanisme permettant le transport des capsides cytoplasmiques vers le site d'assemblage final.

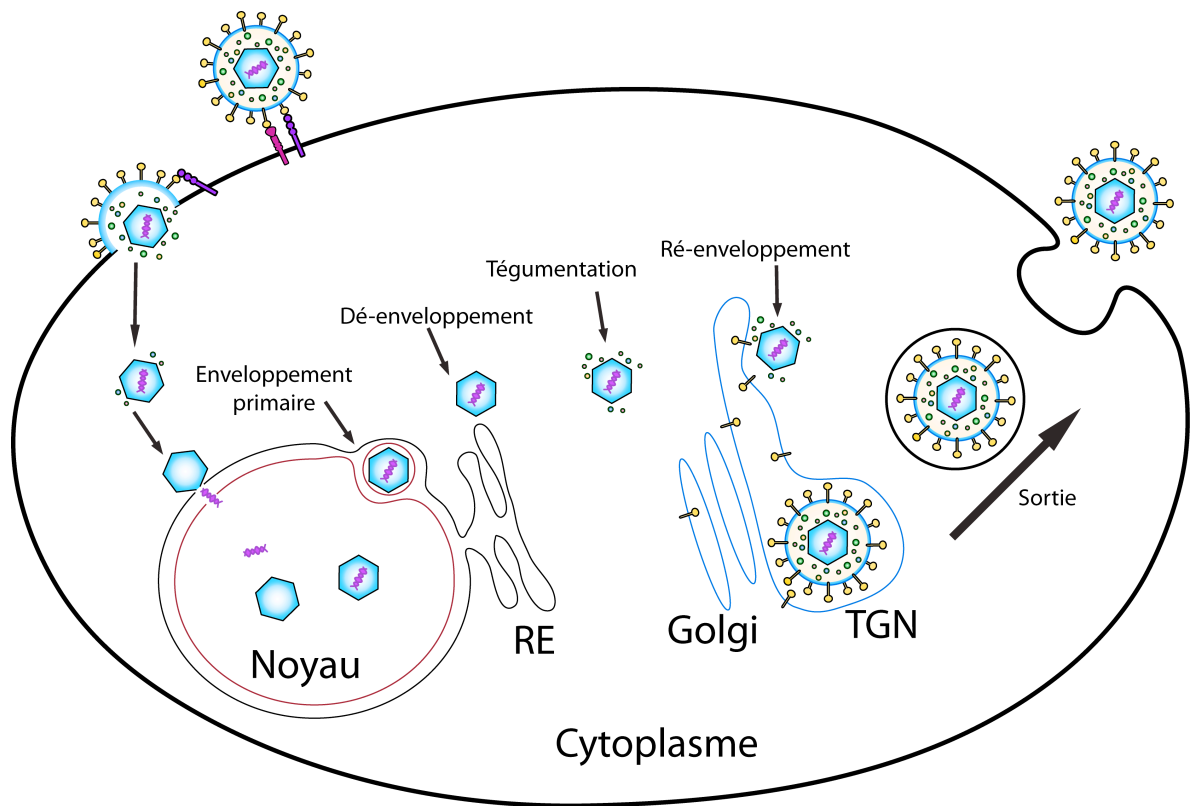


Figure 6. Transport et assemblage du virus d'HSV-1 selon le modèle de ré-enveloppement.

4.4. Latence et persistance

Une des caractéristiques les plus intrigantes des herpèsvirus est leur capacité à persister chez les individus infectés. L'infection lytique d'HSV-1 a généralement lieu dans les cellules épithéliales. Les virus nouvellement formés vont aller infecter les cellules avoisinantes et finissent par pénétrer les neurones sensoriels à l'extrémité des axones. Les capsides se déplacent par transport rétrograde jusqu'au corps cellulaire des neurones ganglionnaires et une infection persistante peut s'établir. Dans son état latent, le génome d'HSV-1 existe sous une forme circulaire et ne se réplique pas [84]. L'unité de transcription du gène LAT (*Latency Associated Transcript*) retrouvée dans la région répétitive inverse flanquée à la région U_L (région IR_L) produit un précurseur de cinq miARN par épissage. Ces transcrits répriment l'expression des protéines lytiques ICP0 et ICP4 dont l'expression est nécessaire pour l'initiation de la production virale [85, 86]. Lors

d'une réactivation, l'abondance des transcrits LAT diminue tandis que s'accumulent les transcrits des gènes lytiques; le génome finit par se linéariser et la production de nouveaux virus commence. Dans les neurones, les virus nouvellement formés voyagent par transport antérograde vers les tissus périphériques, généralement les tissus avoisinant le site de la primo infection [4, 84]. La fréquence de réactivation d'HSV-1 varie énormément d'un individu à l'autre : le statut immunitaire, un stress physique ou émotionnel, une exposition plus ou moins importante à la lumière UV, un déséquilibre hormonal sont autant de facteurs pouvant favoriser le passage de la latence à l'infection lytique [4]. Cette capacité de persister et les passages entre latence et réactivation augmentent les chances de transmission du virus, ce qui explique en partie la séroprévalence d'HSV-1 dans la population.

5. Incorporation de protéines de l'hôte dans le virus mature

Notre laboratoire a démontré l'incorporation de nombreuses protéines cellulaires dans les virions matures d'HSV-1 (Tableau 2; [58]). Les protéines retrouvées ont des rôles variés dans les cellules : certaines, comme les Rab ou les Arf, sont impliquées dans le transport vésiculaire, d'autres comme la cyclophilin A ou CD59 sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire alors qu'on retrouve aussi des protéines liées à la machinerie d'ubiquitinylation ainsi qu'à la régulation de l'expression génique, soit autant de fonctions pouvant être affectées par l'infection virale. L'incorporation de protéines de l'hôte n'est pas un phénomène unique au virus de l'herpès; il est souvent observé chez les virus enveloppés [87-90] et des études ont été effectuées afin de caractériser les protéines incorporées notamment dans le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [91], le virus de la vaccine [92], le virus influenza [93] ainsi que le virus de la stomatite vésiculaire [94, 95]. En ce qui concerne la famille des *Herpesviridae*, l'incorporation de protéines cellulaires a été observée et caractérisée chez HCMV [96, 97], MCMV [98], PRV [99], EBV [100] et KSHV [101] et chez l'herpèsvirus Alcelaphine type 1 (AIHV-1), un virus infectant principalement les ruminants [102].

Tableau 2. Liste des protéines cellulaires, et de leurs isoformes, incorporées dans le virus mature d'HSV-1

Nom	Gene ID	Symbole	Nom	Gene ID	Symbole
14-3-3 ϵ	7531	YWHAE	Peroxiredoxin-2	7001	PRDX2
14-3-3 γ	7532	YWHAG	Profilin-1	5216	PFN1
14-3-3 ζ/δ	7534	YWHAZ	Programmed cell death protein 6	10016	PDCD6
α -actin	58	ACTA1	Rab2a	5862	RAB2A
β -actin	60	ACTB	Rab2b	84932	RAB2B
γ -actin	71	ACTG1	Rab4b	53916	RAB4B
Annexin A1	301	ANXA1	Rab5a	5868	RAB5A
Annexin A2	302	ANXA2	Rab5b	5869	RAB5B
Annexin A5	308	ANXA5	Rab5c	5878	RAB5C
Arf1	375	ARF1	Rab6a	5870	RAB6A
Arf3	377	ARF3	Rab6b	51560	RAB6B
Arf4	378	ARF4	Rab6c	84084	RAB6C
Arf5	381	ARF5	Rab7A	7879	RAB7
ATP dependant RNA helicase DDX3X	1654	DDX3X	Rab10	10890	RAB10
Casein kinase 2	1457	CSNK2A1	Rab11a	8766	RAB11A
Cofilin 1	1072	CFL1	Rab11b	9230	RAB11B
Cyclophilin A	5478	PPIA	Rab15	376267	RAB15
Cystein-glycin rich protein 1	1465	CSRP1	Rab33B	83452	RAB33B
Eukaryotic translation initiation factor 4H	7458	EIF4H	Rab35	11021	RAB35
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	GAPDH	Rab-like protein 3	285282	RABL3
Growth factor receptor bound protein 2	2885	GRB2	S100 calcium protein binding A11	6282	S100A11
Heat Shock 70 protein 8	3312	HSPA8	SEC14-like 4	284904	SEC14L4
Keratin 1	3848	KRT1	Tetraspanin 13	27075	TSPAN13
Keratin 10	3858	KRT10	Transferrin Receptor (CD71)	7037	TFRC
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	84803	AGPAT9	Transgelin 2	8407	TAGLN2
Macrophage Migration Inhibitory Factor	4282	MIF	Translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog	92609	TIMM50
CD59	966	CD59	Triosephosphatase isomerase	7167	TPI1
NM23A	4830	NME1	Ubiquitin C	7316	UBC
NM23B	4831	NME2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	7332	UBE2L3
Peroxiredoxin-1	5052	PRDX1			

Bien que l'incorporation de protéines de l'hôte soit bien documentée, peu d'études ont été effectuées afin de déterminer les fonctions de ces protéines et leur rôle durant l'infection; les protéines de l'hôte ne sont souvent qu'inventoriées sans que leur présence dans les virions soit examinée plus avant. Nous savons toutefois que plusieurs virus enveloppés auraient tendance à incorporer des protéines de la machinerie de transport vésiculaire durant le processus d'enveloppement, c'est ainsi par exemple que le VIH s'approprierait la sous-unité Tsg101 du complexe ESCRT-1 [88]. Par ailleurs, l'incorporation de protéines de l'hôte peut s'avérer nécessaire pour la réalisation de certaines étapes cruciales du cycle infectieux. Ainsi, la protéine Staufen, une protéine liant l'ARN double brin, est incorporée dans les particules virales du VIH lors de l'encapsidation de l'ARN génomique et la quantité de Staufen incorporée est en corrélation avec la quantité d'ARN viral incorporée dans les nouveaux virions [88, 103]. À l'inverse, les virus ont aussi mis au point des systèmes empêchant l'incorporation de protéines cellulaires leur étant néfastes; la protéine Vif d'HIV empêche l'incorporation d'APOBEC3G qui pourrait causer des mutations létales du génome viral en se liant avec elle [88]. De plus, parmi les protéines retrouvées chez HSV-1, 21 ont aussi été répertoriées dans les virions d'HCMV [96, 97] et huit sont incorporées par KHSV (Tableau 3; [101, 104]). Tout cela tend à démontrer que l'incorporation de protéines cellulaires ne serait pas aléatoire; les virus ont développé au cours de l'évolution des stratégies leur permettant d'inclure ou au contraire d'éviter certaines protéines.

Tableau 3. Protéines cellulaires incorporées dans HSV-1 retrouvées dans d'autres *Herpesviridae* [96, 97, 101, 102, 104].

Nom de la protéine	HCMV	KHSV	Alcelaphine
14-3-3 protein epsilon	X	X	
14-3-3 protein gamma		X	
14-3-3 protein zeta/delta	X	X	
actin (alpha)	X		X
actin (beta)	X	X	X
actin (gamma)			X
Annexin A1	X		X
Annexin A2	X	X	X
Annexin A5	X		
Arf1	X		
Casein kinase 2	X		
Cofilin 1	X		
Cyclophilin A	X	X	
DDX3X (dead box protein 3; ATP dependant RNA helicase)	X		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	X	X	
Growth factor receptor bound protein 2	X		
HSPa1L (DNAK-type molecular chaperone)	X		
Keratin 1	X		
Keratin 10	X		
Membrane attack complex inhibition factor (CD59)	X		
Profilin-1	X		
Rab7A		X	
Transgelin 2	X		
Triosephosphatase isomerase	X		
Total	21	8	5

6. Étude des interactions hôte-pathogène à l'aide d'ARNs d'interférence

Les petits ARNs interférents (pARNi) sont de courtes séquences d'ARN bicaténaire de 21 à 23 nucléotides additionnés de deux nucléotides à leurs extrémités 3' dont l'un des brins, le brin guide, est complémentaire à un ARNm. Une fois dans la cellule, le brin guide est incorporé dans un complexe protéique, le *RNA-induced silencing complex* (complexe RISC) ; il se lie à sa séquence complémentaire sur l'ARNm qui est par la suite clivé par RISC (Figure 7 ; [105, 106]). Comme l'ARNm est dégradé, il n'y a plus de protéine

synthétisée : le niveau de la protéine ciblée par le pARNi finit donc par diminuer au fur et à mesure que les protéines déjà produites sont dégradées ou transportées à l'extérieur de la cellule. La déplétion observée demeure cependant transitoire puisque le pARNi transfecté dans les cellules finit par être dilué au fil des divisions cellulaires.

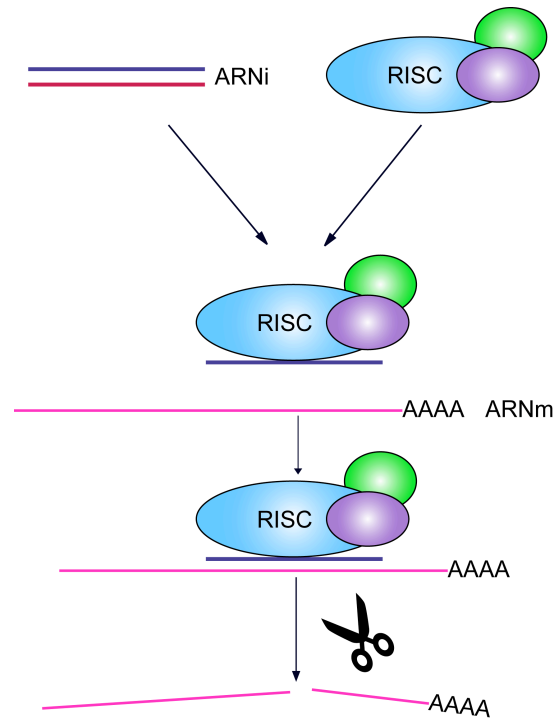


Figure 7. Dégradation d'un ARNm à l'aide de pARNi.

Traditionnellement, l'étude des interactions entre les virus et leurs hôtes s'est effectuée en utilisant des virus ou des lignées animales dont un gène a été inactivé, des molécules bloquant certaines voies métaboliques ou en étudiant les interactions directes entre les protéines virales et cellulaires par immunoprécipitation ou chez la levure, à l'aide de banques de doubles-hybrides. La démonstration, en 2001, de la possibilité d'inactiver spécifiquement un ARN messager (ARNm), donc d'inhiber la synthèse d'une seule protéine, dans des lignées cellulaires de mammifères en utilisant des pARNi [107, 108], suivie de la mise en marché des nombreuses banques d'ARNi ciblant des ARNm humains

ou animaux a toutefois élargi considérablement les possibilités scientifiques en permettant notamment la mise au point de systèmes de criblage à très grande échelle. Dans les années qui suivirent, des criblages du génome humain complet ont été effectués afin d'identifier les protéines cellulaires influençant les cycles de réplication du HIV [109-111], du virus du Nil occidental [112], du virus de l'influenza [113] et du virus de l'hépatite C (HCV; [114]). Bien que ces études à larges échelles aient parfois donné des résultats surprenants; très peu des protéines retrouvées par chacune des équipes ayant effectuée un criblage pour VIH se recourent d'une étude à l'autre par exemple [115], elles ont néanmoins permis de valider et baliser l'utilisation des ARNi pour l'étude des interactions virus-hôte [106, 116, 117]. Ainsi, afin d'étudier l'impact des protéines cellulaires au cours d'une infection virales et comme des résultats obtenus lors des criblages du génome entier sont difficilement reproductibles, il semble plus intéressant de ne cibler que quelques protéines dont des rôles potentiels dans l'infection ont été prédits par différentes méthodes.

De plus, l'utilisation d'ARNi ciblant spécifiquement certaines protéines cellulaires a mis en lumière le rôle de ces protéines dans le cycle de réplication d'HSV-1. Ainsi, plusieurs équipes ont récemment utilisé cette technologie afin de démontrer, par exemple, le rôle de la kinase cycline-dépendante 9 (cdk9) dans l'expression des gènes régulés par la protéine ICP22 [118], celui des protéines SRp20 et 9G8 dans l'export nucléaire d'ARNm viraux [119] et la nécessité de la liaison du facteur d'initiation de la traduction eIF4H à la protéine virale Vhs, pour que cette dernière joue son rôle de dégradation des ARNm cellulaires [37].

7. Les fonctions de la protéine DDX3X et son rôle dans les infections virales

La protéine *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked* (DDX3X; NM_024005) est classée comme étant une ARN hélicase à cause de son domaine DEAD, mais sa fonction précise dans la cellule demeure méconnue. DDX3X aurait un rôle à jouer dans la régulation de la croissance cellulaire ainsi que dans l'épissage, ayant été retrouvé

dans le spliceosome ainsi qu'associé aux ARNm matures [120]. La protéine interagit aussi avec Aly/REF et TAP ce qui laisse croire que la protéine pourrait aussi accompagner les complexes ARNm-protéines (mRNP) durant leur sortie du noyau [121]. Afin de jeter un peu de lumière sur les fonctions de DDX3X, il est aussi intéressant de noter que son homologue chez la levure, la protéine Ded1p, serait aussi impliqué dans l'initiation de la traduction ainsi que dans l'épissage des produits des gènes des protéines ribosomales (RPG) [122, 123]. Cette protéine est non seulement incorporée dans les virions d'HSV-1 et HCMV [58, 96], mais elle est aussi connue pour interagir avec au moins quatre autres virus, soit le HIV [120, 121, 124, 125], le virus de la vaccine [126, 127], le HCV [120, 123, 128] et le virus de l'hépatite B (HBV) [129]. Dans le cas d'HIV, DDX3X interagit avec la protéine virale Rev ainsi qu'avec le facteur d'export Crm1 afin de permettre l'export d'ARNm viraux vers le cytoplasme, ce qui supporte l'hypothèse que DDX3X aurait un rôle à jouer dans le transport des ARNm [121, 124]. DDX3X interagit aussi avec la protéine *core* d'HCV, mais bien que DDX3X augmente la production virale, il semblerait que sa liaison avec la protéine principale d'HCV ne soit pas nécessaire [128]. DDX3X aurait aussi un rôle à jouer dans la réponse antivirale de l'hôte puisque la liaison de la protéine K7 du virus de la vaccine avec DDX3X diminue la production d'interferon beta [127]. Par ailleurs, cette protéine peut aussi avoir un effet antagoniste sur la production virale puisque son incorporation dans la nucléocapside d'HBV diminue la synthèse d'ADN viral [129]. Le rôle de DDX3X semble donc plutôt complexe, compte tenu de son implication dans le cycle infectieux de nombreux virus n'appartenant pas aux mêmes familles, une meilleure compréhension de sa fonction dans le cycle infectieux d'HSV-1 devrait nous permettre d'une part, de mieux comprendre l'implication des protéines cellulaires dans la biologie de l'herpès et d'autre part, de mieux comprendre les rôles de DDX3X dans les cellules saines.

Résultats

1. Objectifs du projet

Notre laboratoire a récemment démontré que jusqu'à 49 protéines cellulaires distinctes étaient retrouvées dans les virions matures d'HSV-1. Compte tenu du nombre élevé de protéines retrouvées ainsi que de leurs rôles variés, il nous semble improbable qu'elles aient toutes été incorporées de façon totalement aléatoire, d'autant plus que certaines de ces protéines sont aussi incorporées dans d'autres herpèsvirus. L'objectif principal de ce projet de maîtrise est donc d'identifier parmi ces protéines, celles qui influencent significativement la production virale. Ces connaissances sont d'un grand intérêt puisqu'elles aideront ensuite à déterminer les rôles potentiels de certaines de ces protéines dans le cycle de réplication d'HSV-1.

1. Notes sur le texte

Cette section reproduit le texte intégral de l'article *Identification of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen*, par Camille Stegen et al., soumis à *PLoS Pathogens* le 18 mars 2011. Certaines modifications ont toutefois été apportées à la forme du manuscrit afin de mieux l'intégrer au présent mémoire.

1.1. Contribution des auteurs

Camille Stegen : Conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Yordanka Yakova : Réalisation des expériences d'infection avec les virus déplétés

Johanne Duron : Réalisation des expériences d'essais de plaques

Roger Lippé : Création et supervision du projet, conception des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article

2. Article

**Identification of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex
Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen**

by

Camille Stegen, Yordanka Yakova, Johanne Duron and Roger Lippé*

Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Running title : Novel HSV-1 Host Protein Interactions

**Corresponding author:
Dr. Roger Lippé*

Abstract

Viruses exploit the cellular machinery in many ways and several viruses specifically incorporate host proteins. To understand their biological relevance, we recently performed the first comprehensive characterization of the mature herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in which up to 49 distinct cellular proteins were identified by mass spectrometry. In the present study, we sought to identify which of these cellular factors are relevant for the HSV-1 life cycle. To this end, we performed a functional screen using small interfering RNA (siRNA) and a GFP-tagged virus and found that 17 of the host proteins altered HSV-1 proliferation in cell culture. These include several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction, gene regulation and immunity. Among them is the DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked protein (DDX3X), a multifunctional molecule previously linked to several other viruses. Its relevance for HSV-1 was orthogonally confirmed with different siRNA reagents and cell lines, including a DDX3X thermosensitive cell line. Closer examination revealed that DDX3X inactivation reduced the abundance of intracellular capsids via a strong inhibition of viral gene expression. Remarkably, both the cellular and virion-associated DDX3X actively contributed to viral propagation, highlighting the important contribution of host proteins within mature viral particles. Altogether, these findings hint at a powerful and biologically relevant approach to characterize novel host-pathogen interactions.

Author Summary

Viruses are strictly dependent on cells to propagate and many incorporate host proteins in their viral particles, but the significance of this incorporation is poorly understood. To address this issue, we explored by RNA interference the implication of the 49 cellular proteins we previously identified in mature herpes simplex virus type 1 virions. Seventeen of these proteins proved important for the efficient propagation of the virus including several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction, gene regulation and immunity. Further analysis of one of these proteins, the multifunctional DDX3X RNA helicase, orthogonally confirmed its relevance for the virus and revealed that its inactivation reduced intracellular capsid abundance via a strong inhibition of viral gene expression. Remarkably, both the cellular and virion-associated DDX3X actively contributed to viral propagation thus highlighting the important contribution of host proteins within mature viral particles.

Introduction

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is composed of a DNA core inside an icosahedral capsid surrounded by a heterogeneous and poorly characterized layer of proteins called tegument, itself wrapped by an envelope. Interestingly, several components of the tegument are critical at an early stage of the infection. For example, binding of incoming viral capsids to microtubules and their transport to the nucleus is dependent on components of the tegument, including the viral proteins UL36 and UL37 [1,2,3,4]. Furthermore, the incoming virion host shut off protein (Vhs; UL41) quickly downregulates the expression of several host proteins following viral entry [5,6] while ICP0, ICP4 and VP16, also tegument proteins, regulate the cascade of viral gene expression [7,8,9,10,11].

The importance and complexity of the tegument is illustrated by a recent mass spectrometry study of highly purified extracellular HSV-1 virions, which revealed 23 potential viral teguments and up to 49 distinct cellular proteins [12]. Although their presence is not surprising since host proteins have been found in the human immunodeficiency virus (HIV [13,14,15]), influenza [16], vesicular stomatitis virus [17], vaccinia [18], human cytomegalovirus (HCMV [19,20,21]), Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV [22]), pseudorabies virus (PRV [23]), Epstein-Bar virus (EBV [24]), alcelaphine herpesvirus 1 [25] and the murine cytomegalovirus (MCMV [26]), their biological relevance is, at best, unclear. Interestingly, viruses seemingly avoid the incorporation of proteins that could inhibit their replication. For example, the HIV protein Vif binds to APOBEC3G to prevent its inclusion into nascent virions and deamination of

the viral genome by this RNA editing protein [13]. It is thus very conceivable that the incorporation of host proteins in viruses is not random but rather a highly regulated process.

An analysis of the composition of mature extracellular virions [12] revealed that roughly half of the host proteins found in virions are proteins that have not yet been reported in herpesviruses. In contrast, the presence of members of the annexin and heat shock protein families as well as cyclophilin A, DDX3X and components of the cytoskeleton have been documented in other Herpesviridae [12,19,20,27], suggesting a common function for these proteins.. Interestingly, the host eukaryotic translation initiation factor 4H (eIF4H) incorporated into mature HSV-1 virions [12] modulates the early Vhs-induced degradation of cellular mRNAs upon HSV-1 entry [5]. Thus, the incorporation of some host proteins within the mature viral particles presumably benefits the virus and may jump-start its replication cycle. Unfortunately, only few studies have examined the relevance of this phenomenon in the course of an infection [15,18,28,29].

In the present study, we aimed to identify amidst the 49 host proteins found in HSV-1 mature particles those that influence its replication and proliferation. To this end, we designed and validated a functional screening assay using small interfering RNAs (siRNA) and a fluorescent-tagged virus as a probe. We now report that 17 of these proteins have a significant impact on HSV-1 propagation in cell culture, with limited siRNA-associated toxicity. Positive hits include proteins involved in vesicular transport, gene regulation, signaling and immunity. Among them, we analyzed in deeper details the DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked protein (DDX3X), a protein previously

known to impact the proliferation of HIV [30,31,32], vaccinia [33,34], hepatitis C (HCV [35,36]) and hepatitis B (HBV [37]) viruses. The implication of DDX3X for HSV-1 proliferation was further confirmed with different siRNA reagents and cell lines including temperature sensitive DDX3X cells. Furthermore, we demonstrated that the virion-incorporated pool of DDX3X actively contributes to the HSV-1 replication cycle. Finally, its mechanism of action was probed by fluorescence microscopy, Western blotting and conventional plaque assays, which revealed that the lack of functional DDX3X strongly reduced the amount of intracellular virions subsequent to the reduced expression of viral genes.

Results

Validation of the siRNA-based assay

Our strategy to examine the physiological relevance of the host proteins identified in mature HSV-1 virions involved a novel viral propagation assay based on RNA interference and HSV-1 K26GFP, a wild-type virus in which Aequorea victoria green fluorescent protein (GFP) is fused to the capsid protein VP26 [38] (Figure 1A). This approach enabled us to easily, rapidly and quantitatively screen large numbers of targets without resorting to the classical but cumbersome plaque assays to measure viral output. We selected a human cell line because it is the HSV-1 natural reservoir and for its compatibility with our previous proteomics report [12] as well as the human siRNA library available from our supplier. We opted for the human osteosarcoma-derived 143B cell line since it produces significantly greater quantities of viruses upon infection than the HeLa cells originally used in our proteomic study and is more amenable to further analysis since more resistant to the cytopathic effect of the virus ([39,40] and data not shown). Fortuitously, 143B cells had a greater than 80% siRNA transfection rate, an important criterion for this study (data not shown). Cell plating density, infection conditions, harvesting time, assay buffers, plate format and parameters of the plate reader software were all extensively optimized (data not shown) to ensure that the fluorescence read-out in the supernatant was accurate, linear and sufficiently sensitive to detect extracellular virions (Figure 1B).

We next sought to validate that the fluorescence read-out was sensible enough to detect the impact of known inhibitors of the HSV-1 life cycle. We therefore pretreated cells with MG132, an inhibitor of the proteasome which perturbs the post-entry delivery of HSV-1 to the nucleus [41], phosphonoacetic acid (PAA) which prevents viral replication [42] and Brefeldin A (BFA) which arrests viral egress of newly synthesized viral particles [43,44]. As expected, HSV-1 output was drastically lower in drug-treated cells than in untreated ones (Figure 2A). As a second control, cells were transfected with siRNA targeting an essential HSV-1 protein. The viral protein VP16 (pUL48) was chosen because its inhibition by siRNA was reported to efficiently reduce VP16 expression and viral production [11]. Cells were thus transfected for 48 hours prior to infection with the single most effective reported siRNA specifically targeting VP16 [11], the Non-Targeting negative control or Lipofectamine only. The knockdown of VP16 was verified by Western blotting and ImageJ, which revealed the high efficacy of the siRNA employed (88% inhibition; Figure 2B). Though the inhibition of VP16 was not absolute, the viral yield was significantly lower in the supernatants of infected cells transfected with siRNA against VP16 compared to the ones of cells treated with the transfection agent only, or the negative control (Figure 2C). Taken together these results demonstrate the sensibility and specificity of the assay.

Assessment of host proteins critical for the viral infection

To evaluate the functional relevance of the cellular proteins identified in mature, extracellular virions, we examined them all using the above siRNA screen. Since some of

the peptides that were identified in the course of the proteomic study are common to various isoforms of a protein, we decided to screen the different possible isoforms, thus lengthening our original list of proteins to 59 (Table 1). The siGENOME Non-Targeting Control and the siRNA targeting VP16 were respectively used as negative and positive controls. However, unlike VP16, we used a pool of four different siRNA duplexes against each human target identified in our proteomic study [12] to ensure the most effective knockdowns. These siRNA pools are commercially available and predefined by the manufacturer according to their proprietary algorithm (see Table 1 for catalogue numbers). Cells were transfected in triplicates with these siRNA pools for 48 hours, to allow endogenous levels of the host proteins to significantly decrease, and subsequently infected with GFP tagged HSV-1. Twenty four hours later, the virus-associated fluorescence was measured with a plate reader. Though both the intracellular and extracellular viral pools could be quantified, we opted to only probe the latter since it permitted to avoid the issue of free GFP-VP26 proteins that would inevitably be present in infected cells and contribute to a higher background. Each experiment was normalized to the mean fluorescence obtained in supernatants from cells transfected with the transfection agent only and results from three independent screens were compiled. This method allowed us to identify several cellular proteins whose absence significantly altered viral production. Interestingly, the inhibition of annexin A1 (ANXA1) stimulated viral release while the other proteins whose inhibition caused a significant fluctuation of fluorescence reproducibly reduced the viral output (Figure 3).

To evaluate the toxicity of the siRNA reagents and rule out nonspecific effects, the viability of the cells was monitored in parallel with the redox indicator AlamarBlue, a commercial kit that quantitatively monitors cell metabolism and consequently overall cell viability (Figure 3, dots). Of the proteins that altered viral output, only siRNA targeting ubiquitin C showed high cytotoxicity under our experimental conditions and was thus considered nonspecific. It is relevant to note that targeting some of the proteins resulted in lower cellular viability without any impact on viral production (e.g. Krt1 and Rab5c), further highlighting the genuine implication of the above cellular proteins on the HSV-1 viral life cycle.

Given that the GFP-based assay used in this study detects total viral particles rather than infectious virions, the positive hits were confirmed by conventional viral plaque assay to measure viral titers following siRNA treatment. 143B cells were transfected with siRNA then infected as before and the infectious particles in the supernatant were then titrated on Vero cells. While titers obtained for cells treated with siRNAs targeting Rab4B were inconsistent amongst repetitions, all other results were fully coherent with the GFP detection assay (Figure 4). We conclude from these experiments that at least 17 of the cellular proteins tested impact the replication cycle of HSV-1.

DDX3X: A novel player in the HSV-1 replication cycle

Among the host proteins identified in the course of this study, one of them, DDX3X, drew our attention. This protein is multifunctional and well conserved from yeast

to human [45]. While its exact function in the cell is still unknown, several reports have shown evidence of its implication in the cell cycle as well as in gene expression, translation, splicing and mRNA nuclear export [31,32,45,46]. This protein was drawn to our particular attention because of its known incorporation into mature HCMV, another herpesvirus, and its involvement in the proliferation cycle of some very different families of viruses. For instance, it binds the HIV protein Rev and its cellular cofactor Crm1, thus enabling the nuclear export of viral mRNA [31] and to the HCV core protein where it may be necessary for an efficient replication [35]. It additionally interacts with the vaccinia K7 protein, resulting in an inhibition of interferon-beta production [33,34], while the incorporation of DDX3 into HBV nucleocapsids causes an inhibition of viral replication by blocking reverse transcription [37]. DDX3X involvement in HSV-1 is therefore consistent with previous findings; hence, we wished to understand how this protein was interacting with HSV-1. First, analysis of DDX3X by RNA interference using the unrelated human HeLa cell line confirmed its relevance for the virus (Figure 5A). As for VP16 (Figure 2B), DDX3X knockdown was equally efficient in both 143B and HeLa cells (84% and 86 % inhibition respectively; Figure 5). The effects we report here are therefore independent of the cell line employed. Second, using a different pool of siRNA against DDX3X gave the same results as above (data not shown), making it unlikely that the effects on viral production were due to nonspecific off-target effects. Nonetheless, to insure this, an orthogonal validation was carried out. The DDX3X temperature-sensitive BHK21-derived cell line ET24 constituted an optimal choice, since DDX3X is inactive at 39,5oC but functional at 34oC [47]. Infection of the thermosensitive ET24 and parental BHK21 cell

lines with HSV-1 clearly showed that viral output was strongly reduced at the non-permissive temperature in the ET24 cell line (Figure 6). This definitely ruled out nonspecific off-targets and confirmed that DDX3X is indeed a modulator of HSV-1 life cycle.

Importance of the virus-incorporated DDX3X pool

Cellular proteins could be incorporated in virions because they play a role in the acquisition of its final envelope. In this case, their incorporation may be a secondary effect and may not be particularly important for the subsequent round of infection. Alternatively, their incorporation may promote the reinfection of neighboring cells. In that second scenario, the absence of DDX3X in both the cell and viral particles would stop or delay the next replication cycle much the same way the lack of VP16 from virions impairs the infection of a non-complementary cell line [48]. In an attempt to distinguish the impact of cellular and virion-incorporated pools of DDX3X, viruses were first harvested from control or siRNA treated cells to obtain DDX3X-depleted viral particles (Figure 7A). They were then titrated on Vero cells and used to reinfect a fresh monolayer of control or siRNA treated cells (acting as complementing or non complementing cells respectively) at an equal multiplicity of infection of 0.1. As control, VP16 was included since the presence of VP16 within the tegument was previously shown to be critical [48]. These experiments were possible because the siRNA did not completely block viral production and that virions produced by siRNA-treated cells were substantially depleted for VP16 or DDX3X (Figure 7A). As before, the infection of VP16 siRNA-treated cells with wild type virus reduced

viral yields (Figure 7B) but the infection of Lipofectamine-treated cells by VP16-depleted virions also strongly reduced viral yields. The inhibition of newly expressed VP16 by siRNA further reduced viral output when VP16 depleted virions were used thus confirming the importance of both newly expressed and virion-associated VP16 pools. Interestingly, the depletion of DDX3X from the cell or the virus also reduced the release of virions in the extracellular milieu (Figure 7C), while the ablation of both pools gave similar results as the depletion of DDX3X from the cell only. Consequently, given that equal amounts of infectious virions were used in every condition, it seems that both the intracellular and the virion-incorporated DDX3X participate in HSV-1 production.

Inhibition of DDX3X reduces HSV-1 protein expression

Although it was clear that DDX3X affected the replication cycle of the virus, it did not tell us how. Several experiments were performed to address this point. To first verify if the absence of DDX3X resulted in a diminution of viral production or an accumulation of viruses within the cells, siRNA pretreated and infected cells were collected and intracellular virions were titrated on Vero cells. Figure 8 shows that while the amount of infectious virions in control cells was substantial, the intracellular viral output was significantly reduced in siRNA treated cells and compared favorably to siRNA targeting the viral protein VP16. This indicates that the absence of DDX3X prevented the formation of intracellular infectious particles. To better define the site of action of DDX3X, the effect of its knockdown on HSV-1 replication cycle was then evaluated by fluorescence microscopy. As expected, the virus was present in the nucleus, cytoplasm and cell surface by 18 hours post

infection in control Lipofectamine or Non-Targeting siRNA infected cells, (Figure 9). In contrast, in cells treated with siRNA targeting either VP16 or DDX3X, the virus was essentially retained in the nucleus. There, it accumulated in fewer fluorescent speckles and the average overall fluorescent signal was respectively 78% and 62% lower than in the above controls. Since these speckles correspond to the assembly compartment [38], it hinted that DDX3X may act before or during nucleocapsid assembly. We consequently monitored the expression of the viral proteins in the presence or absence of siRNA targeting DDX3X. Lysates prepared from cells pretreated with Lipofectamine, siRNA targeting VP16 or DDX3X and infected with HSV-1 were harvested and analyzed by Western blotting using a pan polyclonal serum against HSV-1 particles [12]. As previously reported, this polyclonal antiserum recognized several HSV-1 proteins and was thus a good indicator of viral gene expression. The data revealed a significant inhibition of viral protein expression in cells treated with siRNA targeting either VP16 or DDX3X (Figure 10). Our results show a diminution of the expression of DDX3X following the inhibition of VP16. Since VP16 downregulates the activity of Vhs at intermediate to late times following infection [49], the observed diminution of DDX3X expression in cells transfected with siRNA against VP16 is probably caused by the increased activity of the viral endoribonuclease in these cells. Interestingly, viral expression was never totally abolished in cells transfected with siRNA against VP16 or DDX3X. Given the high penetrance of the siRNA (>80%), this meant that viral entry occurred in all cases. We therefore conclude that DDX3X modulates the expression of HSV-1 proteins.

Table 1. Proteins tested in the siRNA screen

Protein Name	Gene ID	Symbol	Catalog Number
14-3-3 protein epsilon	7531	YWHAE	M-017302-02
14-3-3 protein gamma	7532	YWHAG	M-008844-00
14-3-3 protein zeta/delta	7534	YWHAZ	M-003332-01
Alpha actin	58	ACTA1	M-011194-00
Beta actin	60	ACTB	M-003451-03
Gamma actin	71	ACTG1	M-005265-01
Annexin A1	301	ANXA1	M-011161-01
Annexin A2	302	ANXA2	M-010741-02
Annexin A5	308	ANXA5	M-011209-01
Arf1	375	ARF1	M-011580-01
Arf3	377	ARF3	M-011581-00
Arf4	378	ARF4	M-011582-01
Arf5	381	ARF5	M-011584-01
ATP dependant RNA helicase DDX3X	1654	DDX3X	M-006874-01
Casein kinase 2	1457	CSNK2A1	M-003475-03
Cofilin 1	1072	CFL1	M-012707-00
Cyclophilin A	5478	PPIA	M-004979-01
Cystein-glycin rich protein 1	1465	CSRP1	M-011839-02
Eukaryotic translation initiation factor 4H	7458	EIF4H	M-013054-00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	GAPDH	M-004253-02
Growth factor receptor bound protein 2	2885	GRB2	M-019220-00
Heat Shock 70 protein 8 ^a	3312	HSPA8	M-017609-01
Keratin 1	3848	KRT1	M-012865-02
Keratin 10	3858	KRT10	M-023057-00
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	84803	AGPAT9	M-010291-00
Macrophage Migration Inhibitory Factor	4282	MIF	M-011335-01

CD59 ^b	966	CD59	M-004537-01
NM23A ^c	4830	NME1	M-006821-01
NM23B ^c	4831	NME2	M-005102-02
Peroxiredoxin-1	5052	PRDX1	M-010338-00
Peroxiredoxin-2	7001	PRDX2	M-008178-03
Profilin-1	5216	PFN1	M-012003-01
Programmed cell death protein 6	10016	PDCD6	M-004440-03
Rab2a	5862	RAB2A	M-010533-01
Rab2b	84932	RAB2B	M-010370-00
Rab4b	53916	RAB4B	M-008780-03
Rab5a	5868	RAB5A	M-004009-00
Rab5b	5869	RAB5B	M-004010-01
Rab5c	5878	RAB5C	M-004011-01
Rab6a	5870	RAB6A	M-008975-01
Rab6b	51560	RAB6B	M-008548-02
Rab6c	84084	RAB6C	M-009031-02
Rab7A	7879	RAB7	M-010388-00
Rab10	10890	RAB10	M-010823-01
Rab11a	8766	RAB11A	M-004726-02
Rab11b	9230	RAB11B	M-004727-02
Rab15	376267	RAB15	M-031564-00
Rab33B	83452	RAB33B	M-008909-02
Rab35	11021	RAB35	M-009781-00
Rab-like protein 3	285282	RABL3	M-018128-01
S100 calcium protein binding A11	6282	S100A11	M-012138-00
SEC14-like 4	284904	SEC14L4	M-019246-00
Tetraspanin 13	27075	TSPAN13	M-012516-01
Transferrin Receptor (CD71)	7037	TFRC	M-003941-02
Transgelin 2	8407	TAGLN2	M-011468-02

Translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog	92609	TIMM50	M-023692-01
Triosephosphatase isomerase	7167	TPI1	M-009776-02
Ubiquitin C	7316	UBC	M-019408-01
Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	7332	UBE2L3	M-010384-01

^aHSP70 (Loret, 2008)

^bMembrane attack complex inhibition factor (Loret, 2008)

^cNucleoside diphosphate kinase A/B (Loret, 2008)

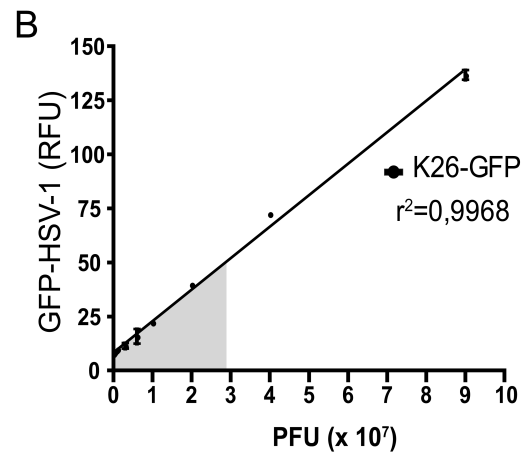
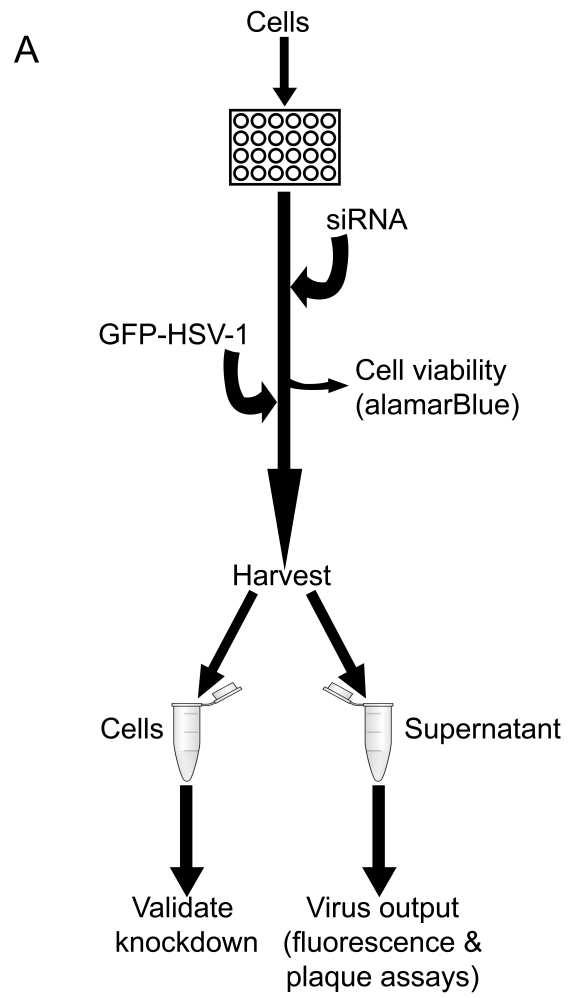


Figure 1. Screening method. **A)** 143B cells were seeded in 24-well plates 24 hours prior to transfection. Cells were then transfected with siRNA and incubated 48 hours before being infected with HSV-1 K26GFP for an additional 24 hours. Supernatants were collected and their fluorescence was measured using a spectrofluorometer. As a cytotoxicity control, cell viability was assessed in parallel using alamarBlue. In addition, the cells used for Westerns to validate the efficacy of the siRNA knockdowns. **B)** The fluorescence of pre-titered infectious HSV-1 K26GFP particles serially diluted in PBS was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The fluorescence obtained was linear with the titers through the entire selection ($r^2 = 0.9968$), thus demonstrating the advanced sensitivity of the device. The gray area denotes the typical range of the assay. RFU: relative fluorescence units.

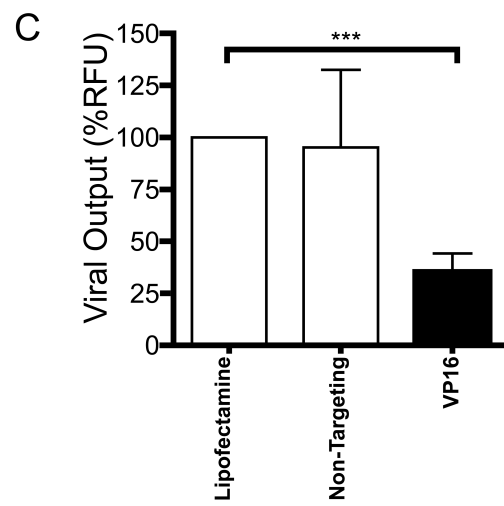
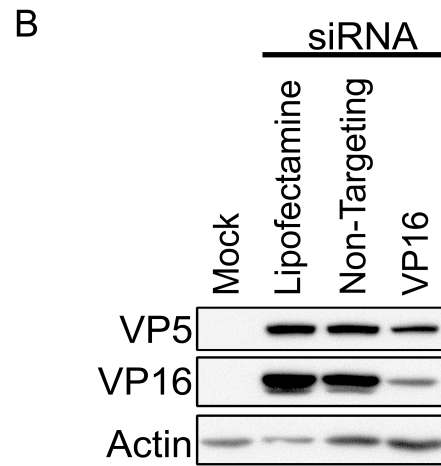
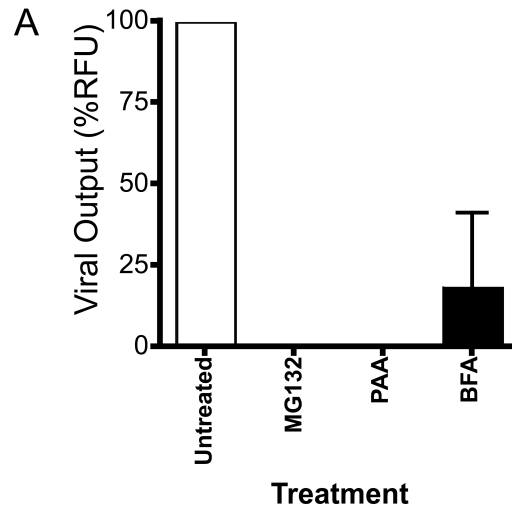


Figure 2. Validation of the assay. 143B cells were seeded in 24-well plates and infected with HSV-1 K26GFP and **A)** treated with drugs targeting HSV-1 post-entry (MG132), replication (PAA) and egress (BFA). **B-C)** As above except that cells were instead transfected for 48 hours prior to infection with Lipofectamine only, Non-Targeting negative control siRNA or siRNA targeting VP16. For panel A and C, the fluorescent viruses in the supernatants were concentrated by centrifugation at 24 hours post infection and quantified using a spectrofluorometer. For panel B, 25 μ g of proteins from cell lysates were tested by Western blotting for VP16 knockdown. γ -actin was used as loading control. The error bars show the standard deviations to the mean of three independent experiments. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the siRNA free control (***: $p < 0.0001$).

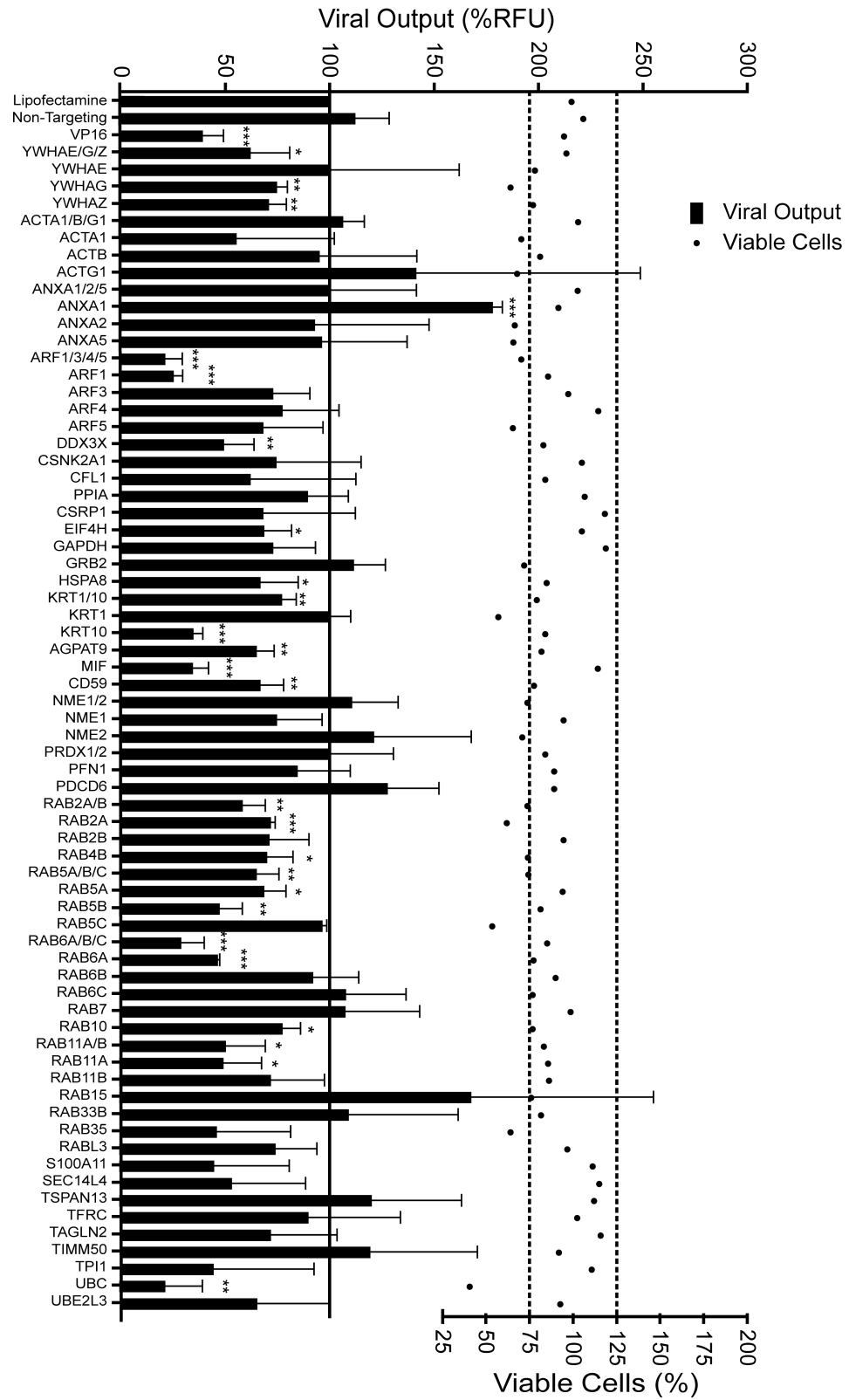


Figure 3. siRNA screen against the host proteins identified in mature extracellular virions. 143B cells were transfected for 48 hours with Lipofectamine alone or with siRNA duplexes targeting the indicated cellular proteins (gene names are indicated on the left). Forty-eight hours later, cellular viability was assessed by alamarBlue or cells were infected in parallel with K26GFP for a further 24 hours. The fluorescence in the supernatant was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The data was normalized to the mean value obtained with Lipofectamine only samples. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the Lipofectamine only control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ***: $p < 0.0001$). The solid line represents the relative fluorescence intensity of the Lipofectamine treated samples while the dotted lines indicate $\pm 25\%$ viability. The error bars show the standard deviations to the means of three independent experiments, each done in triplicates.

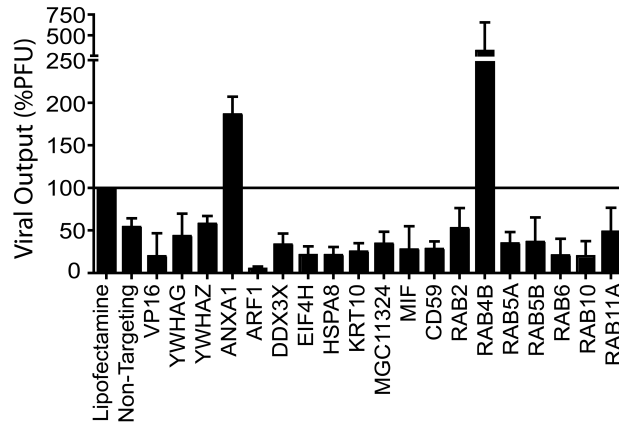


Figure 4. Impact of siRNA transfection by conventional plaque assays. 143B cells were transfected with siRNA and infected with K26GFP as before for the samples that were positive hits in Figure 3. Supernatants were individually collected and their viral content titrated on Vero cells. The titers were normalized to the mean value obtained with samples treated with Lipofectamine only. The error bars show the standard deviations to the means of three independent experiments. PFU: Plaque forming units

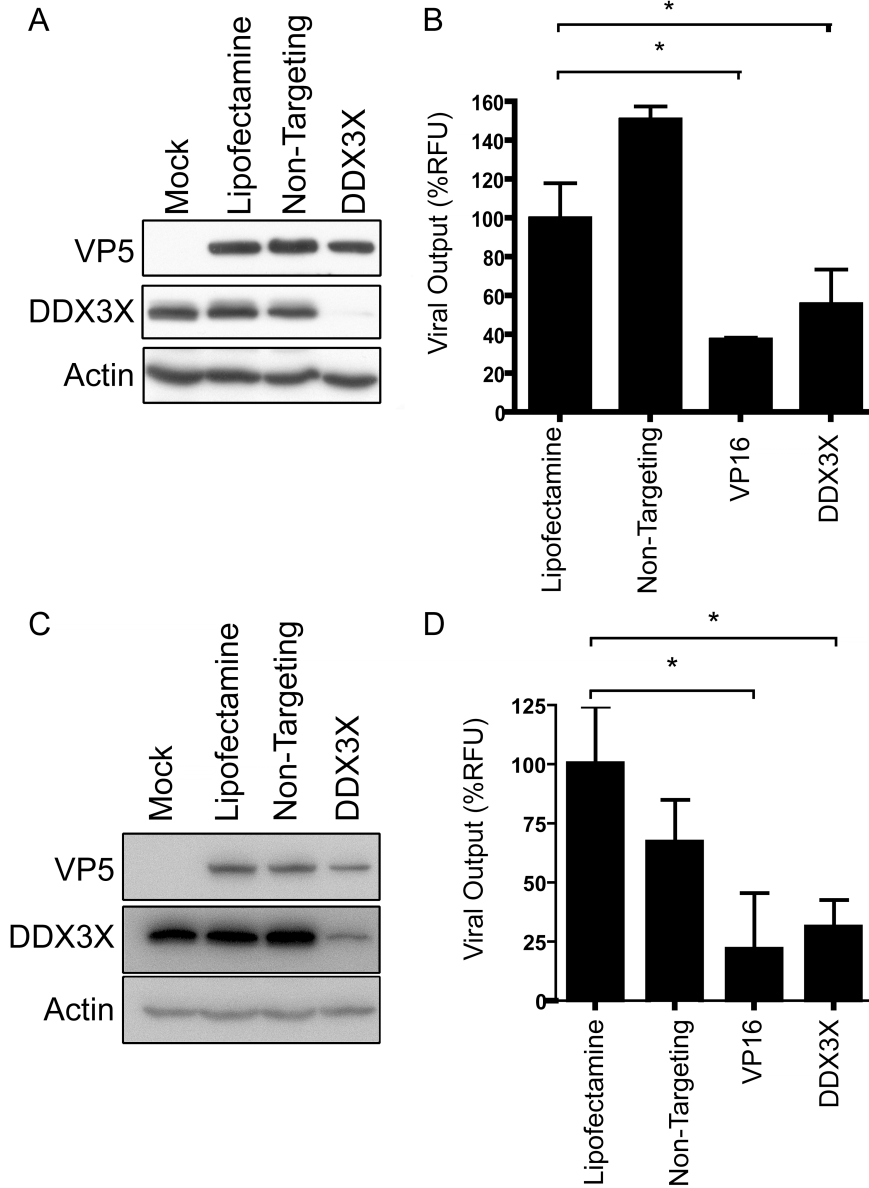


Figure 5. The impact of DDX3X is independent of the cell line. A-B) 143B and **C-D)** HeLa cells were transfected with Lipofectamine only, the Non-Targeting negative control or with siRNAs targeting VP16 or DDX3X and infected with K26GFP as before. Twenty-five micrograms of proteins from **A)** 143B or **C)** HeLa cell lysates were analyzed by Western blotting for DDX3X knockdown. γ -actin was analyzed as loading control. Extracellular virions produced in siRNA-transfected **B)** 143B or **C)** HeLa were quantified

by spectrofluorometry as previously. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the Lipofectamine only control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ***: $p < 0.0001$). The error bars show the standard deviations to the means of triplicates.

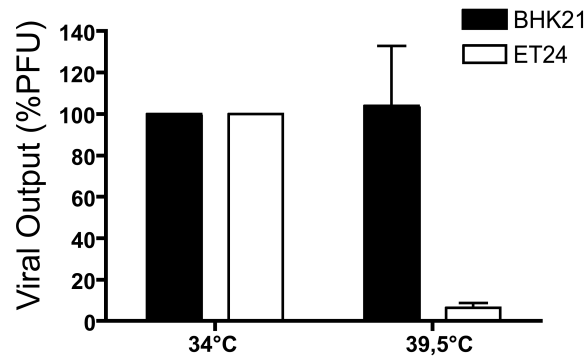


Figure 6. DDX3X is necessary for HSV-1 replication. The DDX3X thermosensitive ET24 and parental BHK21 cell lines were incubated for 24 hours prior to infection at the permissive (34°C) or non-permissive (39.5°C) temperature and infected for an additional 24 hours at that same temperature. Afterwards, supernatants were collected and titrated on Vero cells. Titers were normalized to the mean value obtained with samples infected at 34°C and represent the averages of two independent experiments, each titrated in duplicates. The error bars represent the standard deviations to the means.

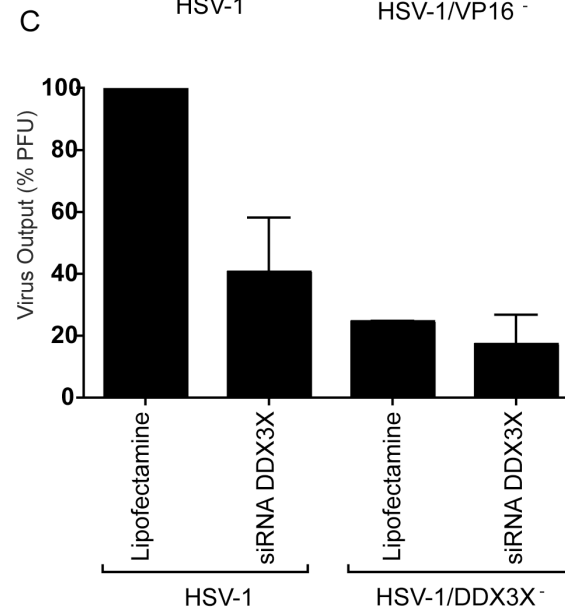
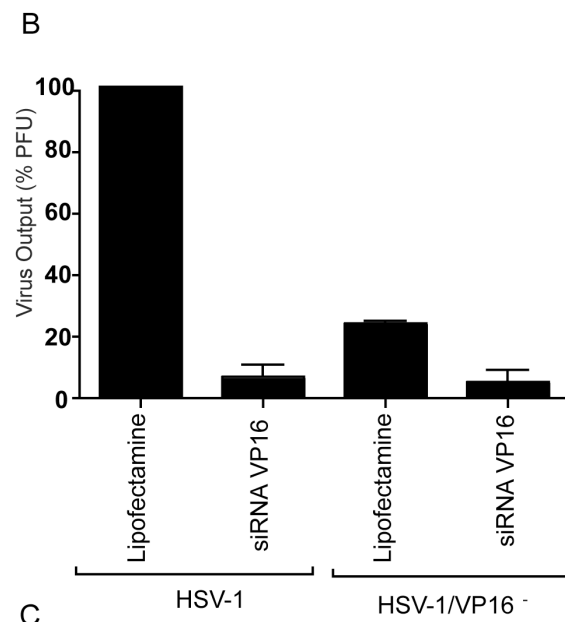
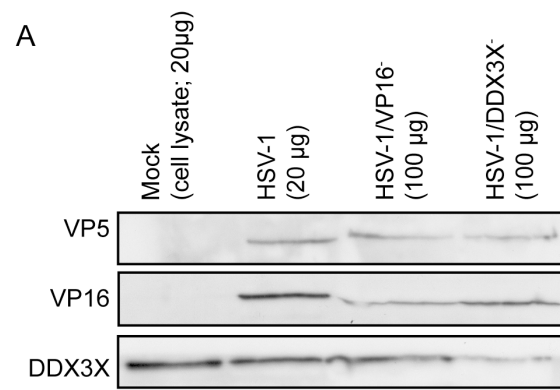


Figure 7. Implication of the virion-incorporated DDX3X in HSV-1 replication. 143B cells were transfected with Lipofectamine only or siRNAs against DDX3X or VP16 and then infected at a MOI of 5 with HSV-1 K26GFP. **A)** The absence of VP16 or DDX3X in the newly produced virions was confirmed by Western blotting. Equal amount of VP5 were analyzed and 20 μ g of Lipofectamine only treated cell lysate was used as control. **B-C)** The virions produced in this first infection were titrated on Vero cells and used to reinfect fresh 143B cells treated with Lipofectamine only or the above siRNA at a MOI of 0.1 for 48 hours. Viruses released in the extracellular medium in this second round of infection were finally titrated on Vero cells. The figure shows the mean results of this second round for two independent experiments. Results were normalized to the mean value of Lipofectamine-treated cells infected with HSV-1 also produced in Lipofectamine-treated 143B cells.

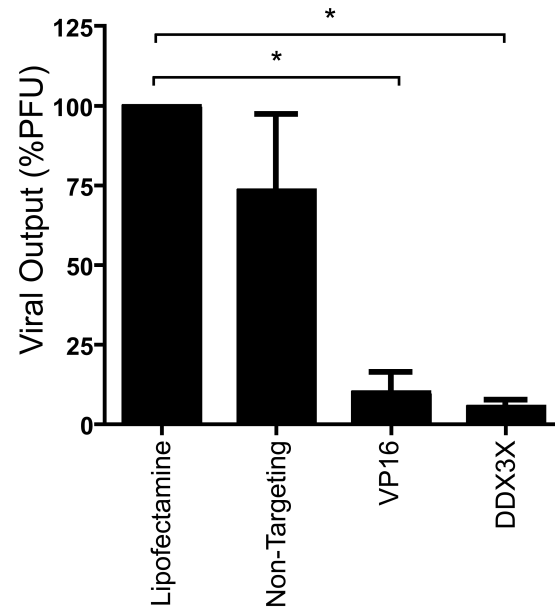


Figure 8. Impact of DDX3X knockdown on intracellular virions. 143B cells were transfected with siRNA targeting DDX3X or VP16 and infected with K26GFP as before. Cells were collected and lysed and viruses were titrated on Vero cells. The error bars show the standard deviations to the means of two independent experiments. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the Lipofectamine only control (*: $p < 0.05$).

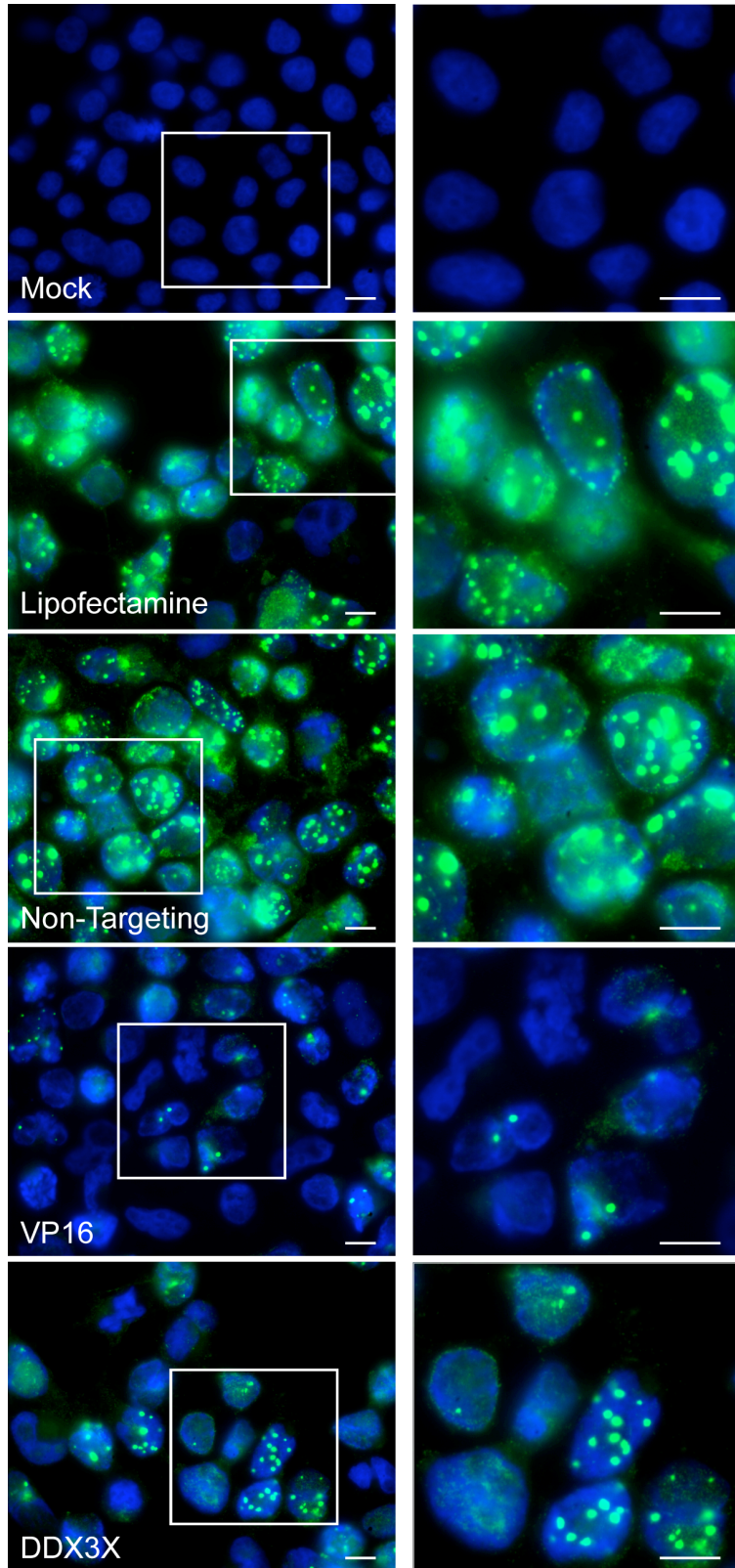


Figure 9. Inhibition of DDX3X reduced the amount of assembly compartments in infected cells. 143B cells were mock treated or transfected with Lipofectamine, Non-Targeting siRNA or siRNAs against DDX3X or VP16 as indicated and infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 for 18 hours. Cells were fixed and the nuclei stained with Hoechst 33342. Right panels are enlargements of the squared sections in the left panels. Scale bars: 10 μ m.

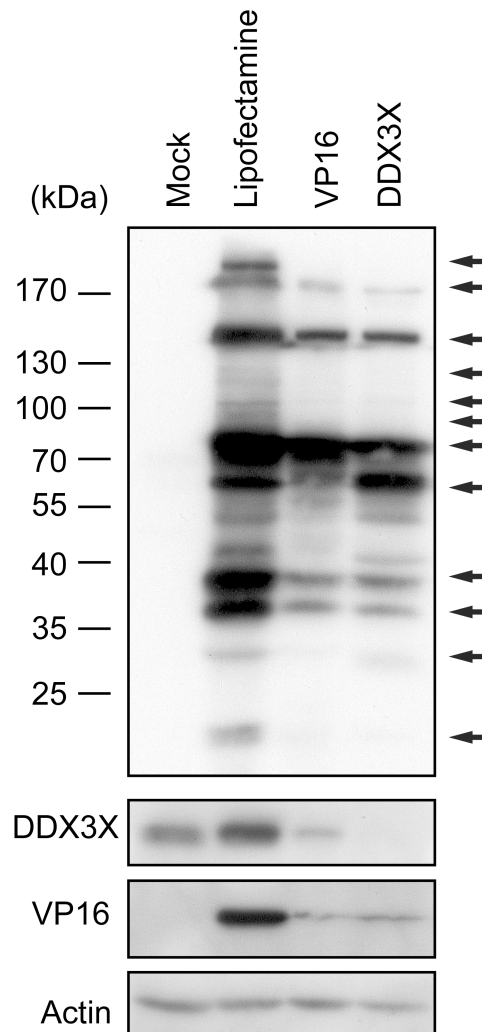


Figure 10. Impact of the inhibition of DDX3X on HSV-1 protein expression. 143B cells were transfected with Lipofectamine or siRNAs against VP16 or DDX3X as before and mock infected or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. Cells were collected at 24 hpi and analyzed by Western blotting for the expression of HSV-1 proteins, VP16 and DDX3X. γ -actin level was used as a loading control. Arrows indicates important diminution of protein expression in DDX3X siRNA-transfected cells compared to the Lipofectamine treated sample.

Discussion

Viruses are obligatory intracellular parasites that depend on many cellular functions to complete their life cycle. These interactions are complex and often poorly understood. While the contribution of host proteins to HSV-1 has been partially elucidated, genomic screens with other viruses suggest this may only be the tip of the iceberg [50,51,52,53,54]. Recently, we reported the detection of up to 49 distinct cellular proteins within mature extracellular HSV-1 virions [12], adding an additional layer of complexity to the already complex host-pathogen interactions. Since some of these proteins may play pivotal roles during the viral life cycle, they constitute prime targets to identify and characterize novel host pathogen interactions in the context of HSV-1.

The novel siRNA assay reported in this study is sensitive, rapid, linear and strongly correlates with classical plaque assays (Figures 2 and 4). The data demonstrate that at least 17 of the proteins tested are involved in the HSV-1 replication cycle in cell culture (Figure 3). In addition, the specificity of our assay was confirmed by the fact that it was possible to single out the protein isoforms that affect viral proliferation (Figure 3) and positive hits were confirmed by conventional plaque assays, strongly implying their relevance for the virus. Interestingly, the inhibition of annexin A1 (ANXA1) resulted in an increase of both total viral particles and infectious virion. (Figure 3 and 4) suggesting it negatively regulates HSV-1. However, the nature of this interaction is unclear at the moment as ANXA1 is involved in various functions (Figure 11). The lack of phenotype with some of the siRNA

with significant cytotoxic effects (for example Krt1, Rab5c; Figure 3) further supports the notion that the above targets are specifically involved in viral replication and not merely the results of less viable or unhealthy cells. In contrast, the inhibition of ubiquitin C, which perturbed HSV-1 output, correlated with siRNA cytotoxicity and was therefore not considered further, though it may still be relevant for the HSV-1 replication cycle. Similarly, it is important to note that the actual number of positive hits is likely higher than detected. Missed targets could include cellular proteins with long half-lives unperturbed by the siRNA, proteins that may be complemented by their virion-associated counterpart as well as proteins with more subtle impacts on the virus. Furthermore, the screen only considers host proteins involved in HSV-1 replication in tissue culture and may exclude some virulence factors or immune related proteins. In this context, the absence of phenotype upon depleting cyclophilin A, one of the proteins most commonly found into herpesvirions and other families of viruses [16,19,22,55,56,57], is not surprising but consistent with its implication in escaping the immune system [58]. Finally, the screen measured GFP output and consequently quantified total viral particle release rather than infectious virions as determined by plaque assays. It may thus be possible that some siRNA reduced the production of infectious particles without affecting the total viral particles. Despite these limitations, the positive rate from this study is very high. For comparison, genome wide siRNA screens for HIV, influenza and West Nile virus have positive rates below 1.5% [50,51,52,53,54,59]. The data thus constitute a strong validation of the relevance of our strategy to unmask novel cellular players by combining proteomics [12] and a targeted siRNA screen (this study). Furthermore, this study and those of others

[5,11,60,61,62,63] highlight the potency of siRNA as a useful tool to study HSV-1 host-pathogen interactions, despite of the ability of the virus to down regulate RNA-induced gene silencing [64].

The positive hits found in this study identified several potential players in the HSV-1 life cycle. Many of these proteins are involved in pathways that are most likely important for the infection process (Figure 11); among them, several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction were found. In view of the many transport events necessary for the production of individual viral proteins or mature virions, this makes good sense. Seven of the 17 proteins; 14-3-3 γ (YWHAG), 14-3-3 ζ/δ (YWHAZ), annexin A1 (ANXA1), Arf1 (ARF1), DDX3X, keratin 10 (KRT10) and CD59 have previously been found in HCMV and/or KSHV viral particles in addition to their incorporation into HSV-1 [19,20,22]. This suggests a potential common role for these proteins throughout the herpesvirus family. For instance, one positive hit was eIF4H, which significantly inhibited viral release into the extracellular medium (Figure 3; $p < 0.05$). This protein is known to play an important role during the HSV-1 infection and its depletion has been reported to prevent mRNA degradation by the Vhs protein [5]. Thus, the dual incorporation of Vhs and eIF4H into the mature virion is intuitive as it should favor the HSV-1 replication cycle and, once again, confirms the sensitivity and relevance of our approach. The present screen is therefore very useful to pursue novel host-pathogen interactions in the context of HSV-1 infections.

DDX3X is a multifunctional RNA helicase whose specific cellular functions remain unknown [30,45,46]. In our hands, it clearly modulates HSV-1 viral output in both the siRNA screen and classical plaque assays (Figures 3 and 4). This was further orthogonally confirmed using the DDX3X temperature-sensitive cell line ET24, where HSV-1 production was drastically diminished at the non-permissive temperature (Figure 6). Further analysis of the impact of DDX3X on HSV-1 highlighted a diminution of intracellular viral particles upon the depletion of DDX3X from both the cell (Figures 8 and 9) and the virus (Figure 7), thus highlighting the importance of the virion-incorporated pool of protein in HSV-1 replication cycle. Moreover, a closer look revealed that DDX3X modulates HSV-1 protein expression (Figure 10). Overall, the present data demonstrate the novel implication of DDX3X on the HSV-1 infection and clarify its site of action. DDX3X enables the transport of viral mRNAs from the nucleus to the cytoplasm during the course of an HIV infection as it binds to the cellular export factor Crm1 [31]. Since some of HSV-1 mRNAs, including UL47 and possibly ICP27, are thought to be sorted through the Crm1 pathway [65,66,67], DDX3X may be involved in a similar fashion in the case of HSV-1.

The present study highlights the very close relationship between HSV-1 and its host. However, the full extent of host-pathogen interactions between HSV-1 and the cell remains elusive at the moment. Our approach constitutes an innovative and powerful strategy that has already proved useful to identify several novel cellular proteins that modulate the HSV-1 life cycle. The characterization of their functions at the molecular level is therefore of the upmost interest. Since all of these proteins have previously been detected in mature extracellular HSV-1 virions [12], they constitute a new class of proteins to study as

potential therapeutic targets. In particular, it exposes DDX3X as a potential therapeutic target against a broad range of human viruses.

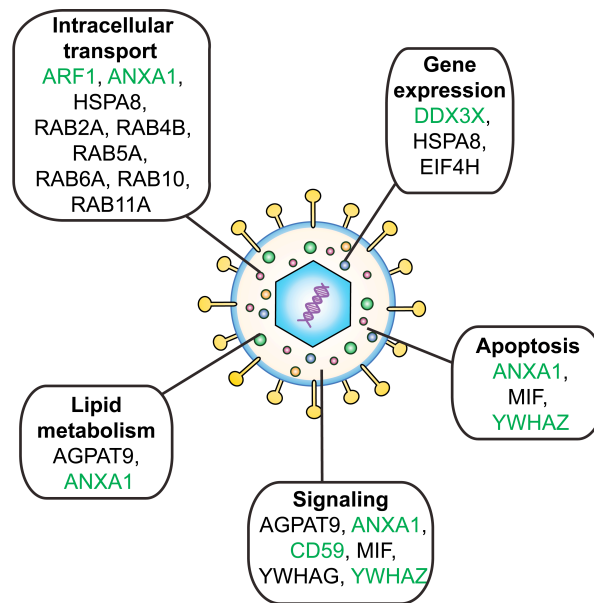


Figure 11. Cellular functions of virion-incorporated host proteins. Several of the positive hits of our functional screen are implicated in pathways that are most likely relevant for the virus. While all of them were found in HSV-1 mature viral particles, many of these proteins (in green) have also been found incorporated into other herpesviruses, suggesting a common role for these proteins throughout the family [19,20,22].

Materials and Methods

Cells and viruses. 143B tk-, Vero, HeLa, ET24 and BHK21 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, HyClone) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen) in 5% CO₂. 143B cells were also supplemented with 15µg/ml 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU; Sigma) except prior to transfection and infection. The ET24 thermosensitive and parental BHK21 cell lines (a kind gift from Dr Takeshi Sekiguchi) [47] were maintained at the permissive temperature of 34°C unless mentioned otherwise. The previously described HSV-1 K26GFP mutant (strain KOS) has been provided by Prashant Desai [38] and was propagated on BHK cells and titrated on Vero cells.

Antibodies. Primary antibodies were provided and diluted as follows: the anti-DDX3 R648 (1:1000) was a kind gift from Dr A. Patel [35], while anti-VP16 (1:1000) and the Remus V anti-HSV-1 antibodies were kindly provided by Dr H. Browne and Dr B. Sodeik respectively. Other antibodies were purchased from commercial sources, including anti-VP5 (1:2000; Cedarlane), and anti γ -actin (1:1000; Chemicon). Goat anti-mouse, anti-rabbit and anti-sheep secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch.

Inhibition of HSV-1 life cycle by drugs. 143B cells were seeded overnight in a 24-well plate at a 2.5×10^5 cells/well density. Cells were then mock treated or infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5 with HSV-1 K26GFP. After absorption, cells were washed twice in PBS and fed complete DMEM containing MG132 (25 μ M, Calbiochem), phosphonoacetic acid (PAA; 400 μ g/ml; Sigma-Aldrich) or Brefeldin A (BFA; 5 μ g/ml; Sigma-Aldrich). In the case of cells treated with MG132, the drug was first added 15 minutes prior to infection and during absorption in order to prevent the transport of capsids to the nucleus. The infection proceeded for 24 hours at which time supernatants were collected and viral output measured as below (siRNA screen).

siRNA screen. siGENOME SMARTpool and select ON-TARGETplus siRNAs targeting the human proteins previously identified in mature extracellular virions [12] were purchased from Dharmacon (Table 1; Thermo Fisher Scientific). siGENOME Non-Targeting #2 siRNA was used to measure off-target effects while the published siRNA targeting the HSV-1 protein VP16 was used as a positive control [11]. Twenty-four hours prior to transfection, 143B cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 5×10^4 cells/well. siRNA transfections were then performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2 μ l/well of Lipofectamine 2000 was diluted in Opti-MEM (Invitrogen) and incubated for 5 minutes before its incorporation into 100 nM/well of siRNA diluted in Opti-MEM or only Opti-MEM as control. The mixes were allowed to incubate 20 minutes during which time the

cells' medium was replaced by Opti-MEM. The siRNA were then added to the cells, incubated for 5 hours before the medium was replaced by DMEM (with 10% FCS and L-glutamine) and incubated for 43 more hours for a total of 48 hours of transfection. At that point, cells were mock treated or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. After a one hour absorption period, cells were washed twice in PBS, completed DMEM was added to the wells and the cells were incubated for a further 24 hours. Cells and supernatants were then collected. The viruses in supernatants were inactivated using formaldehyde (Sigma), concentrated 2 hours at $18000 \times g$ and the resulting viral pellets resuspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) pH 8. They were then transferred into a 96-well black bottom μ Clear plate (Greiner Bio-One) and their fluorescence was measured using a Gemini EM spectrofluorometer and SoftMax Pro 4 (Molecular Devices). Each experiment was performed in triplicates and repeated three times.

Viability assay. 143B cells were mock treated with Lipofectamine alone or transfected with siRNA for 44 hours. Cells were washed twice and the medium replaced. AlamarBlue (AbD Serotec) was subsequently added to the cells or to DMEM only as a control according to the manufacturer's instruction. The cells were finally incubated for an additional 4 hours before viability was measured by spectrofluorometry

Western blotting. To verify the efficacy of the siRNA reagents and transfection on the expression of the targeted proteins, 143B cells transfected for 48 hours with Lipofectamine

alone or siRNAs were mock treated or infected with K26GFP at a MOI of 5 for an additional 24 hours. Supernatants were concentrated for 2 hours at $18\,000 \times g$ and resuspended in 10 μ l of PBS while cells were then collected, washed in PBS and lysed by 3 cycles of rapid freeze-thaw. Unless specified otherwise, equal amount of proteins were then analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting [12], using antibodies against HSV-1, the VP5 and VP16 viral proteins or the DDX3X and γ -actin human proteins. When indicated, protein expression levels were quantified using ImageJ (version 1.45b).

Plaque assays. 143B cells were transfected with siRNAs and infected with HSV-1 K26GFP as described above. Supernatants were collected, the viruses concentrated for 2 hours at $18000 \times g$ and the pellets suspended in MNT (30 mM morpholineethanesulfonic acid (MES; Sigma), 100 mM NaCl (ThermoFisher Scientific), and 20 mM Tris (Rose Scientific) at pH 7.4). The viruses were finally titrated on Vero cells as in [39].

Analysis of siRNA transfected cells by fluorescence microscopy. 143B cells were transfected as described previously and infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 for 18 hours. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde in PBS, washed with PBS and treated with 50 mM NH₄Cl in PBS. Samples were mounted on glass slides in Mowiol containing 0.1 g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide-field fluorescence microscope (Zeiss) equipped with

filters and a Retiga 1300 camera (Q Imaging). The images were acquired with Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging) and processed with Photoshop CS5 (Adobe).

Importance of the virion-incorporated cellular proteins. 143B cells were transfected as in the siRNA screen or with the transfection agent only. Cells were then infected for a further 24 hours with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. Supernatants were collected and titrated on Vero cells. Fresh 143B cells were mock treated or transfected with the siRNA for 48 hours. They were then infected with the titrated supernatants from the previous round of transfection-infection at an MOI of 0.1 for an additional 48 hours. The supernatants from this second round of transfection/infection were collected and titrated on Vero cells.

Inhibition of HSV-1 life cycle in thermosensitive cell line. Thermosensitive ET24 and parental BHK21 cells were plated in 6-well plates and incubated at the permissive temperature of 34°C or the non-permissive temperature of 39.5°C for 24 hours. The cells were then mock treated or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 at 34°C or 39.5°C. Cells and supernatants were collected at 24 hours post-infection (hpi) and HSV-1 production titrated by plaque assays.

Impact of DDX3X on HSV-1 protein expression. 143B cells were transfected for 48 hours with Lipofectamine or siRNAs against VP16 or DDX3X and subsequently infected

with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. Cells were collected at 24 hpi and the protein levels of DDX3X and various viral gene products was assessed by Western blotting using the HSV-1 Remus V antibody.

Statistical analysis. Fluorescence and virus titers were normalized to the values obtained for the controls as indicated in the figure legends. Bilateral Student T tests were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

Acknowledgments

We are indebted to Drs Arwind Patel, Takeshi Sekiguchi, Helena Browne and Beate Sodeik for antibodies, viruses and cell lines. We would also like to thank members of the laboratory for their critical reading of the manuscript and suggestions. This work was funded by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82921). Y. Y. was supported by a Canada Frederick Banting and Charles Best studentship from the CIHR.

References

1. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, et al. (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13: 2795-2809.
2. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136: 1007-1021.
3. Luxton GW, Haverlock S, Coller KE, Antinone SE, Pincetic A, et al. (2005) Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5832-5837.
4. Beniya H, Braunagel SC, Summers MD (1998) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology* 240: 64-75.
5. Sarma N, Agarwal D, Shiflett LA, Read GS (2008) Small interfering RNAs that deplete the cellular translation factor eIF4H impede mRNA degradation by the virion host shutoff protein of herpes simplex virus. *J Virol* 82: 6600-6609.
6. Lam Q, Smibert CA, Koop KE, Lavery C, Capone JP, et al. (1996) Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J* 15: 2575-2581.
7. Everett RD (2000) ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* 22: 761-770.
8. Halford WP, Kemp CD, Isler JA, Davido DJ, Schaffer PA (2001) ICP0, ICP4, or VP16 expressed from adenovirus vectors induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in primary cultures of latently infected trigeminal ganglion cells. *J Virol* 75: 6143-6153.
9. Hancock MH, Corcoran JA, Smiley JR (2006) Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology* 352: 237-252.

10. Ellison KS, Maranchuk RA, Mottet KL, Smiley JR (2005) Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. *J Virol* 79: 4120-4131.
11. Zhang YQ, Lai W, Li H, Li G (2008) Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA. *Clin Exp Dermatol* 33: 56-61.
12. Loret S, Guay G, Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 82: 8605-8618.
13. Cantin R, Methot S, Tremblay MJ (2005) Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses. *J Virol* 79: 6577-6587.
14. Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Reviews in Medical Virology* 18: 159-175.
15. Gurer C, Cimarelli A, Luban J (2002) Specific Incorporation of Heat Shock Protein 70 Family Members into Primate Lentiviral Virions. *J Virol* 76: 4666-4670.
16. Newcomb WW, Brown JC (2009) Time-dependent transformation of the herpesvirus tegument. *J Virol* 83: 8082-8089.
17. Moerdyk-Schauwecker M, Hwang SI, Grdzlishvili VZ (2009) Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach. *Virology* 396: 166.
18. Krauss O, Hollinshead R, Hollinshead M, Smith GL (2002) An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J Gen Virol* 83: 2347-2359.
19. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, et al. (2004) Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J Virol* 78: 10960-10966.
20. Spear G, Lurain N, Parker C, Ghassemi M, Payne G, et al. (1995) Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *The Journal of Immunology* 155: 4376-4381.

21. Baldick CJ, Jr., Shenk T (1996) Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 70: 6097-6105.
22. Zhu FX, Chong JM, Wu L, Yuan Y (2005) Virion Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 79: 800-811.
23. Del Rio T, Ch'ng TH, Flood EA, Gross SP, Enquist LW (2005) Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* 79: 3903-3919.
24. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, et al. (2004) Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16286-16291.
25. Dry I, Haig DM, Inglis NF, Imrie L, Stewart JP, et al. (2008) Proteomic Analysis of Pathogenic and Attenuated Alcelaphine Herpesvirus 1. *J Virol* 82: 5390-5397.
26. Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, et al. (2004) Identification of Proteins Associated with Murine Cytomegalovirus Virions. *J Virol* 78: 11187-11197.
27. Bechtel JT, Winant RC, Ganem D (2005) Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* 79: 4952-4964.
28. Lodish HF, Porter M (1980) Specific incorporation of host cell surface proteins into budding vesicular stomatitis virus particles. *Cell* 19: 161-169.
29. Zhang C, Xue C, Li Y, Kong Q, Ren X, et al. (2010) Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomics analysis. *Virology Journal* 7: 242.
30. Cullen BR (2005) Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* 433: 26-27.
31. Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi Y-h, Kleiman L, Jeang K-T (2004) Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* 119: 381-392.
32. Kwong AD, Rao BG, Jeang KT (2005) Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat Rev Drug Discov* 4: 845-853.

33. Kalverda AP, Thompson GS, Vogel A, Schroder M, Bowie AG, et al. (2009) Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3. *J Mol Biol* 385: 843-853.
34. Schroder M, Baran M, Bowie AG (2008) Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* 27: 2147-2157.
35. Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, et al. (2010) Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol* 91: 122-132.
36. Fossum E, Friedel CC, Rajagopala SV, Titz B, Baiker A, et al. (2009) Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog* 5: e1000570.
37. Wang H, Kim S, Ryu WS (2009) DDX3 DEAD-Box RNA helicase inhibits hepatitis B virus reverse transcription by incorporation into nucleocapsids. *J Virol* 83: 5815-5824.
38. Desai P, Person S (1998) Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* 72: 7563-7568.
39. Turcotte S, Letellier J, Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79: 8847-8860.
40. Campadelli-Fiume G, Brandimarti R, Di Lazzaro C, Ward PL, Roizman B, et al. (1993) Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2798-2802.
41. Delboy MG, Roller DG, Nicola AV (2008) Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol* 82: 3381-3390.
42. Hay J, Brown SM, Jamieson AT, Rixon FJ, Moss H, et al. (1977) The effect of phosphonoacetic acid on herpes viruses. *J Antimicrob Chemother* 3 Suppl A: 63-70.
43. Dasgupta A, Wilson DW (2001) Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J Gen Virol* 82: 1561-1567.

44. Cheung P, Banfield BW, Tufaro F (1991) Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *J Virol* 65: 1893-1904.
45. Tarn WY, Chang TH (2009) The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human. *RNA Biol* 6: 17-20.
46. Schroder M (2010) Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation. *Biochem Pharmacol* 79: 297-306.
47. Sekiguchi T, Iida H, Fukumura J, Nishimoto T (2004) Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation. *Exp Cell Res* 300: 213-222.
48. Weinheimer SP, Boyd BA, Durham SK, Resnick JL, O'Boyle DR, 2nd (1992) Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 66: 258-269.
49. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 74: 6287-6299.
50. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, et al. (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463: 813-817.
51. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, et al. (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319: 921-926.
52. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner K-P, Artarini A, et al. (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463: 818-822.
53. König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GMC, et al. (2008) Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication. *Cell* 135: 49-60.
54. Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, et al. (2008) RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455: 242-245.

55. Towers G (2007) The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4: 40.
56. Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Cowan S, Bieniasz P (2005) Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J Virol* 79: 176 - 183.
57. Bose S, Mathur M, Bates P, Joshi N, Banerjee AK (2003) Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J Gen Virol* 84: 1687-1699.
58. Braaten D, Luban J (2001) Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J* 20: 1300-1309.
59. Clemente R, Sisman E, Aza-Blanc P, de la Torre JC (2010) Identification of host factors involved in borna disease virus cell entry through a small interfering RNA functional genetic screen. *J Virol* 84: 3562-3575.
60. Bhuyan PK, Kariko K, Capodici J, Lubinski J, Hook LM, et al. (2004) Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J Virol* 78: 10276-10281.
61. Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, et al. (2008) Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol* 153: 1401-1406.
62. Durand LO, Roizman B (2008) Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* 82: 10591-10599.
63. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, et al. (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 10: 480-487.
64. Wu Z, Zhu Y, Bisaro DM, Parris DS (2009) Herpes simplex virus type 1 suppresses RNA-induced gene silencing in mammalian cells. *J Virol* 83: 6652-6663.
65. Chen I-HB, Li L, Silva L, Sandri-Goldin RM (2005) ICP27 Recruits Aly/REF but Not TAP/NXF1 to Herpes Simplex Virus Type 1 Transcription Sites although TAP/NXF1 Is Required for ICP27 Export. *J Virol* 79: 3949-3961.

66. Verhagen J, Donnelly M, Elliott G (2006) Characterization of a Novel Transferable CRM-1-Independent Nuclear Export Signal in a Herpesvirus Tegument Protein That Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm. *J Virol* 80: 10021-10035.
67. Soliman TM, Silverstein SJ (2000) Herpesvirus mRNAs Are Sorted for Export via Crm1-Dependent and -Independent Pathways. *J Virol* 74: 2814-2825.

Discussion

1. Validation de la méthode

La mise en marché de nombreuses banques d'ARNi au cours des dernières années a grandement contribué aux avancées dans l'étude des interactions entre les virus et leurs hôtes. Les études à très grande échelle réalisées ont toutefois mis en lumière d'importantes disparités dans les résultats obtenus entre différents criblages effectués contre un même virus [115] soulignant ainsi l'importance de prendre en considération le protocole expérimental utilisé lors de l'interprétation des résultats. En effet, le choix de la ou des lignées cellulaires employées, la stabilité de la protéine ciblée, l'absence de redondance fonctionnelle ou de toxicité associée à l'inhibition de la protéine ou au vecteur de transfection des ARNi ainsi que le moment des lectures sont autant de facteurs qui peuvent influencer les résultats obtenus [106, 116, 117, 130].

L'essai que nous avons mis au point en combinant des pARNi à un virus dont l'une des protéines de la capsid est marquée à la GFP s'est avéré assez sensible pour nous permettre de détecter des variations dans la quantité de virions relâchés dans le milieu de culture suite à la transfection et ces variations sont en corrélation avec les titres obtenus par la méthode classique de l'essai de plaques (Figures 3 et 4 de l'article). Les risques de détections de faux positifs et des faux négatifs ont aussi été réduits au maximum d'une part, à cause du nombre plutôt limité de protéines étudiées qui nous a permis d'effectuer un criblage à moyenne échelle, moins sensible aux variations biologiques qu'un criblage à grande échelle effectué dans un système miniaturisé. D'autre part, le fait que nous ayons choisi d'utiliser des mélanges de pARNi ciblant des séquences différentes sur les ARNm de chacune des protéines étudiées réduit les risques que l'effet observé soit dû à une association non spécifique entre pARNi et ARNm [117, 130]. De plus, des mesures de cytotoxicité ont été effectuées afin de s'assurer que les pARNi utilisés n'affectaient que peu le métabolisme cellulaire, ce qui aurait assurément influencé la production virale.

Notre essai nous a permis de détecter une fluctuation dans la prolifération d'HSV-1 d'une protéine cellulaire, eIF4H, déjà reconnue pour jouer un rôle dans la biologie du virus [37]. Le fait nous ayons été capables de reconnaître une diminution de la production virale suite à l'inhibition d'eIF4H, tend à démontrer la puissance et la sensibilité de notre essai. L'approche ciblée que nous avons privilégiée, en ne nous concentrant que sur des protéines préalablement retrouvées dans les virions matures [58], combinée à l'essai mis au point pour détecter l'implication de ces protéines dans le cycle de réplication d'HSV-1 semblent donc efficaces puisqu'ils nous permettent d'obtenir un taux de protéines positives bien plus élevé que dans le cas des études pan-génomiques (**Figure 3** de l'article et [109-111]).

2. Importance des protéines cellulaires retrouvées dans le virus mature pour son cycle de réplication

Compte tenu du nombre important de protéines cellulaires retrouvées dans les virions matures, nous avons émis l'hypothèse que certaines de ces protéines devaient être impliquées dans la régulation du cycle de réplication d'HSV-1. L'objectif principal de ce projet était donc d'identifier les protéines de l'hôte jouant un rôle dans la biologie du virus. En confirmant les résultats obtenus à l'aide de notre système de criblage fonctionnel par des essais de plaques ainsi que par des immunobuvardages de type Western afin de démontrer l'efficacité des pARNi utilisés, nous avons démontré que 17 de ces protéines influençaient de façon significative la quantité de virus produits et présents dans le milieu extracellulaire (Figures 3 et 4 de l'article). L'inhibition de ces protéines n'entraînant qu'une faible cytotoxicité, nous pouvons affirmer que les fluctuations observées sont réellement causées par l'implication de ces protéines dans le cycle de réplication virale. Il est intéressant de noter que parmi les protéines positives lors du criblage, l'inhibition d'une seule, l'ubiquitine C, s'est avérée toxique. Bien que cela ne signifie aucunement que cette protéine ne puisse pas avoir un impact sur la biologie de l'herpès, nous l'avons exclue de notre liste des protéines positives puisque notre méthode ne nous permet pas de distinguer

une diminution des virus produits résultant de l'inhibition de la protéine ciblée de celle résultant d'une diminution du nombre de cellules viables pouvant être infectées.

Il est important de souligner que les résultats obtenus n'infirmen en aucun cas une quelconque implication des autres protéines cellulaires testées dans le cycle viral d'HSV-1. En effet, de par sa nature, notre essai ne nous permet d'identifier que des protéines cellulaires à courte demi-vie jouant un rôle important dans le cycle de réplication virale en culture cellulaire. Ainsi, il est probable que notre essai ne nous permette pas d'identifier, par exemple, des protéines cellulaires qui pourraient être impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte puisque ces protéines ne seront pas essentielles en culture cellulaire. Il n'est donc pas surprenant que la cyclophiline a, une protéine pourtant retrouvée chez au moins deux autres membres de la famille des herpèsvirus et connue pour être impliquée dans la régulation du cycle infectieux du VIH [131-133], ne fasse pas partie des cibles positives de cette étude puisque sa fonction est essentiellement liée à régulation de la réponse immunitaire. Dans le même ordre d'idée, l'impact de protéines cellulaires possédant une très longue demi-vie ne pourrait être vérifié par notre méthode puisqu'elles seraient encore présentes lors de l'infection. Une protéine dont l'inhibition induirait la relâche de nombreuses particules virales non infectieuses ne pourrait être détectée comme positive puisque l'essai détecte les particules virales totales. Malgré ces limitations suggérant que nous ayons peut-être laissé passer quelques faux négatifs, le nombre de protéines que notre essai nous a permis de valider demeure imposant.

Parmi les protéines dont nous avons pu valider l'influence sur le cycle de réplication d'HSV-1, il est intéressant de noter que l'inhibition d'une protéine, l'annexine A1 (ANXA1), induit une augmentation significative du titre viral. Il semblerait donc que cette protéine diminue la production virale, mais comme ANXA1 a des fonctions extrêmement variées [134], il serait difficile de déterminer les raisons de ce phénomène. Il est toutefois concevable qu'il pourrait être avantageux pour un virus de réguler négativement sa production virale afin, par exemple, de ne pas surcharger trop rapidement la machinerie cellulaire permettant ainsi une plus grande production virale à long terme ou alors pour

éviter d'être rapidement reconnu par le système immunitaire de l'hôte, ce qui réduirait les chances de prolifération. Par ailleurs, les autres protéines positives, dont l'inhibition résulte en une baisse de la production virale, sont notamment impliquées dans le transport intracellulaire, la signalisation cellulaire, la régulation de l'expression génique, la régulation de l'apoptose et le métabolisme des lipides (Figure 11 de l'article), soit autant de fonctions cellulaires pouvant influencer la production virale qu'il serait avantageux pour le virus de contrôler. De plus, plusieurs des protéines validées au cours de la présente étude ont déjà été retrouvées incorporées dans les virions d'autres herpèsvirus. Cela tend à suggérer que ces protéines pourraient avoir des fonctions similaires à l'intérieur de la grande famille des *Herpesviridae*. Puisque plusieurs herpèsvirus empruntent des voies communes et que de nombreuses protéines virales sont conservées chez plusieurs membres de cette famille, il est en effet probable que ceux-ci ont aussi besoin des mêmes facteurs cellulaires pour parvenir à leurs fins.

3. La protéine DDX3X : un nouvel acteur dans le cycle de réplication d'HSV-1

La protéine DDX3X est reconnue pour ses nombreux rôles à l'intérieur de la cellule; tout comme son homologue chez la levure, elle serait, entre autres, impliquée dans l'épissage des ARNm et leur export nucléaire en plus de jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire [120-122, 135]. Récemment, il a aussi été démontré que cette protéine jouait un rôle dans l'export nucléaire d'ARN viral suite à l'infection au HIV [124] ainsi que dans la réplication du HCV [128] en plus de se lier à la protéine K7 des poxvirus [127] et d'inhiber la transcription inverse du génome du HBV [129]. Compte tenu du fait que DDX3X semble impliquée dans les cycles de réplication de nombreux virus très différents les uns des autres et que la protéine ait aussi été retrouvée incorporée dans les virions d'HCMV [96], un proche cousin de l'herpès, nous avons cherché à mieux comprendre son rôle dans le cycle de prolifération d'HSV-1.

Les résultats obtenus en infectant une lignée cellulaire DDX3X thermosensibles à la température non permissive confirment ceux obtenus en inhibant la protéine par pARNi dans deux lignées cellulaires différentes, 143B et HeLa. Nous pouvons donc affirmer que DDX3X est bel et bien un acteur du cycle de réplication d'HSV-1 (Figure 5 et 6 de l'article). Par ailleurs, notre étude nous a permis de démontrer que la fraction incorporée dans les virions matures participait activement à l'infection virale (Figure 7 de l'article). Cette découverte, qui souligne une fois de plus les liens intimes unissant le virus à son hôte, est des plus intéressantes puisqu'elle démontre que l'incorporation de protéines cellulaires par HSV-1 n'est pas fortuite. Bien que l'incorporation de protéines de l'hôte dans les virions est un phénomène observé chez de nombreux virus [88, 94-96, 101], le rôle des protéines incorporées et leurs fonctions n'ont été que très peu étudiés; nos résultats démontrent toutefois qu'il s'agit d'un domaine d'étude qui mériterait plus d'attention afin de mieux comprendre les interactions hôte-pathogène.

Ayant démontré l'importance de DDX3X pour une production virale efficace, nous avons cherché à caractériser plus avant son rôle dans l'infection. Nos résultats tendent à démontrer que DDX3X agirait avant ou durant l'assemblage des capsides nucléaires puisque l'inhibition de DDX3X induit une baisse tant des titres extra qu'intracellulaires. De plus, le fait que peu de compartiments d'assemblage soient visibles par microscopie à fluorescence suite à l'inhibition de DDX3X et que très peu de capsides cytoplasmiques soient observées en absence de la protéine tendent à confirmer un rôle de DDX3X dans les étapes précoces du cycle de réplication. Ces conclusions sont aussi en accord avec notre observation d'une participation active au cycle infectieux de la fraction incorporée au virus de DDX3X. Les protéines du tégment agissent souvent dès l'entrée du virus dans la cellule afin d'accélérer la mise en route du cycle infectieux. Si une protéine cellulaire est nécessaire durant les premières étapes du cycle, il serait très avantageux pour le virus de l'incorporer au cours des étapes d'assemblage finales du virion afin de la relâcher rapidement lors d'une nouvelle ronde d'infection. Le rôle de DDX3X semble par ailleurs être lié à l'expression des gènes viraux puisqu'en son absence tant l'abondance que le nombre de protéines virales semblent être diminués (Figure 10 de l'article). Un tel rôle

serait en accord avec l'une des fonctions les plus étudiées de DDX3X, soit son implication dans le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme. En effet, des études sur des cellules infectées au VIH ont démontré que DDX3X se liait aux ARN viraux ainsi qu'au facteur d'export nucléaire Crm1 permettant ainsi leur transport hors du noyau. Puisque certains ARNm d'HSV-1 sont possiblement exportés en utilisant cette voie [136, 137], il est possible que dans le contexte d'une infection à HSV-1, DDX3X puisse avoir une fonction similaire à sa fonction pour VIH.

Perspectives et conclusion

Au cours des dernières décennies, les études de virologie ont non seulement permis de mieux comprendre comment les virus pouvaient exploiter la machinerie cellulaire pour leur propre profit, elles ont aussi grandement participé à une meilleure compréhension du fonctionnement de la cellule. Les résultats présentés dans le cadre de ce projet font état de contribution majeure des protéines cellulaires au cycle de réplication d'HSV-1. Non seulement le virus exploite-il la machinerie cellulaire afin de produire et assembler ses composantes mais il recrute aussi certaines protéines de l'hôte afin de les intégrer à ses virions matures augmentant en conséquence leur virulence. Ainsi, nous avons mis en lumière l'implication de 17 protéines cellulaires dans le cycle de réplication du virus de l'Herpès simplex de type 1. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes attardés sur l'une d'entre elles, DDX3X afin de démontrer la fiabilité de notre approche. Cependant, l'étude plus approfondie de la contribution des 16 autres protéines au cycle de réplication d'HSV-1 permettrait de comprendre encore un peu mieux la relation entre HSV-1 et son hôte. En outre, comme au moins sept des protéines ont été retrouvées chez d'autres herpèsvirus, une étude approfondie des mécanismes d'action de ces protéines cellulaires permettrait peut-être de révéler des fonctions conservées chez de nombreux membres de cette famille.

Le fait que nous ayons pu démontrer que la fraction de DDX3X incorporées aux virions joue un rôle actif dans l'infection virale est certainement l'une des conclusions les plus excitantes de notre étude. En effet, bien que l'incorporation de protéines cellulaires dans les virions matures est un phénomène reconnu, bien peu d'études ont porté sur le rôle de ces protéines dans le processus infectieux. Si les protéines que nous avons criblées avaient à l'origine été retrouvées incorporées dans les virions matures d'HSV-1, cette étude n'a pas cherché à vérifier le rôle des fractions incorporées au virus sauf dans le cas de DDX3X. Maintenant que nous avons confirmé l'implication de ces protéines dans le cycle de réplication du virus et que nous avons démontré qu'il était possible d'évaluer l'impact des protéines incorporées sur la production virale, il serait intéressant de s'attaquer au rôle de ces fractions incorporées. En effet, celles-ci pourraient non seulement être nécessaires

lors d'un nouveau cycle infectieux mais, à la lumière d'une étude récente qui suggérait que le tégment des virions matures d'HSV-1 subissait certaines transformations après sa sortie de la cellule [32], elles pourraient aussi être nécessaires à la réorganisation du tégment dans les virions extracellulaires.

DDX3X est une protéine multifonctionnelle connue pour son implication dans les cycles infectieux de nombreux virus. Dans nos mains et selon nos conditions expérimentales, tant DDX3X cellulaire que DDX3X incorporée dans les virions matures influencent la prolifération d'HSV-1. Bien que la protéine semble agir sur l'expression des gènes viraux, nous ne savons pas, pour le moment, de quelle façon DDX3X est impliquée dans ce processus. Il faut donc à présent nous concentrer sur la caractérisation du rôle de DDX3X au niveau moléculaire et sur l'identification de ses partenaires afin de mieux comprendre son implication dans la biologie de l'herpès. Ces connaissances pourraient non seulement mener au développement d'antiviraux contre un large spectre de virus humains, mais aussi contribuer à une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans la cellule saine, qui à ce jour demeure nébuleux.

Bibliographie

1. Hamilton, R., *The herpes book*. J. P. Tarcher ed. 1980, Los Angeles: St-Martin Press. 206 p.
2. Cartwright, F.F. and M.D. Biddiss, *Disease and History*, ed. Crowell. 1972. 247 p.
3. Shakespeare, W., *Romeo and Juliet*. Acte 1 scène IV. 1597-1599.
4. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields' virology*. 5th ed. 2007, Philadelphia: Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 1 texte électronique.
5. Roizman, B. and R.J. Whitley, *The nine ages of herpes simplex virus*. Herpes, 2001. **8**(1): p. 23-7.
6. Wildy, P., *Antigens of Herpes Simplex Virus of Oral and Genital Origin*. Cancer Research, 1973. **33**(6): p. 1465-1468.
7. Gibson, W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1044-52.
8. Spear, P.G. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion*. J Virol, 1972. **9**(1): p. 143-59.
9. Spear, P.G., M. Sarmiento, and R. Manservigi, *The structural proteins and glycoproteins of herpesviruses: a review*. IARC Sci Publ, 1978(24 Pt 1): p. 157-67.
10. Kieff, E.D., S.L. Bachenheimer, and B. Roizman, *Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2*. J Virol, 1971. **8**(2): p. 125-32.
11. Ejercito, P.M., E.D. Kieff, and B. Roizman, *Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells*. J Gen Virol, 1968. **2**(3): p. 357-64.
12. Friedman, G.K., et al., *Herpes Simplex Virus Oncolytic Therapy for Pediatric Malignancies*. Mol Ther, 2009. **17**(7): p. 1125-1135.
13. Parker, J.N., et al., *Genetically engineered herpes simplex viruses that express IL-12 or GM-CSF as vaccine candidates*. Vaccine, 2006. **24**(10): p. 1644-1652.
14. Markert, J.M., et al., *Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre-and Post-tumor Resection for Recurrent GBM*. Mol Ther, 2008. **17**(1): p. 199-207.
15. Davison, A., et al., *The order Herpesvirales*. Archives of Virology, 2009. **154**(1): p. 171-177.
16. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. Virus Research, 2006. **117**(1): p. 90-104.
17. Fatahzadeh, M. and R.A. Schwartz, *Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **57**(5): p. 737-763.
18. Carter, C.J., *Interactions between the products of the Herpes simplex genome and Alzheimer's disease susceptibility genes: Relevance to pathological-signalling cascades*. Neurochemistry International, 2008. **52**(6): p. 920-934.

19. Federoff, H.J., *An infectious conspiracy: the case for HSV-1 and APOE[epsilon]4 in Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging*. **20**(4): p. 467-468.
20. Howard, M., et al., *Regional Distribution of Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) and HSV-2 in Men and Women in Ontario, Canada*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003. **41**(1): p. 84-89.
21. Michael, B.D., et al., *Acute central nervous system infections in adults, A retrospective cohort study in the NHS North West region*. *QJM*, 2010. **103**(10): p. 749-758.
22. Roberts, C.M., J.R. Pfister, and S.J. Spear, *Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students*. *Sex Transm Dis*, 2003. **30**(10): p. 797-800.
23. Davison, A.J., *Herpesvirus Genes*. *Reviews in Medical Virology*, 1993. **3**(4): p. 237-244.
24. McGeoch, D.J., et al., *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1*. *J Gen Virol*, 1988. **69** (Pt 7): p. 1531-74.
25. Lehman, I.R. and P.E. Boehmer, *Replication of Herpes Simplex Virus DNA*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(40): p. 28059-28062.
26. Rajčáni, J., V. Andrea, and R. Ingeborg, *Peculiarities of Herpes Simplex Virus (HSV) Transcription: An overview*. *Virus Genes*, 2004. **28**(3): p. 293-310.
27. Trus, B.L., et al., *Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12668-71.
28. Davison, M.D., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1*. *J Gen Virol*, 1992. **73**(Pt 10): p. 2709-13.
29. Trus, B.L., et al., *The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly*. *J Mol Biol*, 1996. **263**(3): p. 447-62.
30. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid: Characterization of Intermediates Observed During Cell-free Capsid Formation*. *Journal of Molecular Biology*, 1996. **263**(3): p. 432-446.
31. Subak-Sharpe, J.H. and D.J. Dargan, *HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology*. *Virus Genes*, 1998. **16**(3): p. 239-51.
32. Newcomb, W.W. and J.C. Brown, *Time-Dependent Transformation of the Herpesvirus Tegument*. *J. Virol.*, 2009. **83**(16): p. 8082-8089.
33. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
34. Luxton, G.W., et al., *Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(16): p. 5832-7.
35. Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius, *Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(5): p. 1007-21.

36. Cai, W. and P.A. Schaffer, *Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2904-15.
37. Sarma, N., et al., *Small interfering RNAs that deplete the cellular translation factor eIF4H impede mRNA degradation by the virion host shutoff protein of herpes simplex virus*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6600-9.
38. Zhang, Y.Q., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA*. Clin Exp Dermatol, 2008. **33**(1): p. 56-61.
39. Ellison, K.S., et al., *Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4120-31.
40. Kwun, H.J. and K.L. Jang, *Transcriptional regulation of herpes simplex virus type 1 ICP0 promoter by virion protein 16*. Mol Cell Biol Res Commun, 2000. **3**(1): p. 15-9.
41. Lam, Q., et al., *Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2575-81.
42. O'Regan, K.J., et al., *Incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 into the virus particle is independent of interaction with VP16*. Virology, 2007. **369**(2): p. 263-80.
43. Lee, J.H., et al., *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1*. Virology, 2008. **378**(2): p. 347-54.
44. Vittone, V., et al., *Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9566-71.
45. Stylianou, J., et al., *Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5204-18.
46. Desai, P., et al., *Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11354-61.
47. Naldinho-Souto, R., H. Browne, and T. Minson, *Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2582-4.
48. Zhang, J., et al., *Early, active and specific localization of HSV-1 gM to nuclear membranes*. J Virol, 2009.
49. van Genderen, I.L., et al., *The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei*. Virology, 1994. **200**(2): p. 831-6.
50. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
51. Schmidt, J., et al., *Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus results in an alteration of in vivo host range and correlates with mutations in glycoproteins B and H*. J Virol, 2001. **75**(21): p. 10054-64.
52. Schmidt, J., et al., *Adaptability in herpesviruses: glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 17-24.

53. Molesworth, S.J., et al., *Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6324-32.
54. Avitabile, E., G. Lombardi, and G. Campadelli-Fiume, *Herpes simplex virus glycoprotein K, but not its syncytial allele, inhibits cell-cell fusion mediated by the four fusogenic glycoproteins, gD, gB, gH, and gL*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6836-44.
55. Farnsworth, A., et al., *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, 2007. **104**(24): p. 10187-92.
56. Farnsworth, A., K. Goldsmith, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8481-94.
57. Saksena, M.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3592-606.
58. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
59. Garner, J.A., *Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(11): p. 1497-1513.
60. Martinez, W.M. and P.G. Spear, *Structural Features of Nectin-2 (HveB) Required for Herpes Simplex Virus Entry*. J. Virol., 2001. **75**(22): p. 11185-11195.
61. Montgomery, R.I., et al., *Herpes Simplex Virus-1 Entry into Cells Mediated by a Novel Member of the TNF/NGF Receptor Family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-436.
62. Maurer, U.E., B. Sodeik, and K. Grunewald, *Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(30): p. 10559-10564.
63. Radtke, K., et al., *Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1000991.
64. Granzow, H., B.G. Klupp, and T.C. Mettenleiter, *Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 3200-5.
65. Wolfstein, A., et al., *The Inner Tegument Promotes Herpes Simplex Virus Capsid Motility Along Microtubules in vitro*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-237.
66. Garner, J.A., *Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(11): p. 1497-513.
67. Heldwein, E. and C. Krummenacher, *Entry of herpesviruses into mammalian cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(11): p. 1653-1668.
68. Nicola, A.V., A.M. McEvoy, and S.E. Straus, *Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5324-32.

69. Nicola, A.V., et al., *Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7609-16.
70. McNabb, D.S. and R.J. Courtney, *Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 virion protein encoded by the UL35 open reading frame*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2653-63.
71. Lagunoff, M. and B. Roizman, *The regulation of synthesis and properties of the protein product of open reading frame P of the herpes simplex virus 1 genome*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3615-23.
72. Spector, D., F. Purves, and B. Roizman, *Role of alpha-transinducing factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3504-13.
73. Markovitz, N.S. and B. Roizman, *Small dense nuclear bodies are the site of localization of herpes simplex virus 1 U(L)3 and U(L)4 proteins and of ICP22 only when the latter protein is present*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 523-8.
74. Lium, E.K. and S. Silverstein, *Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 ICP0 C3HC4 zinc ring finger reveals a requirement for ICP0 in the expression of the essential alpha27 gene*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8602-14.
75. Ishov, A.M. and G.G. Maul, *The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 815-26.
76. Ward, P.L., W.O. Ogle, and B. Roizman, *Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4623-31.
77. Adelman, K., B. Salmon, and J.D. Baines, *Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3086-91.
78. Sheaffer, A.K., et al., *Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 687-98.
79. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
80. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
81. Mettenleiter, T.C., T. Minson, and P. Wild, *Egress of alphaherpesviruses*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1610-2.
82. Remillard-Labrosse, G., et al., *Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1074-83.
83. Brown, S.M., et al., *ICP34.5 influences herpes simplex virus type 1 maturation and egress from infected cells in vitro*. J Gen Virol, 1994. **75**(Pt 12): p. 3679-86.
84. Knipe, D.M. and A. Cliffe, *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 211-21.
85. Thompson, R.L. and N.M. Sawtell, *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6660-75.

86. Braunagel, S.C., et al., *Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9307-12.
87. Gurer, C., A. Cimarelli, and J. Luban, *Specific Incorporation of Heat Shock Protein 70 Family Members into Primate Lentiviral Virions*. J. Virol., 2002. **76**(9): p. 4666-4670.
88. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses*. J. Virol., 2005. **79**(11): p. 6577-6587.
89. Segura, M.M., et al., *Identification of Host Proteins Associated with Retroviral Vector Particles by Proteomic Analysis of Highly Purified Vector Preparations*. J. Virol., 2008. **82**(3): p. 1107-1117.
90. Zhang, C., et al., *Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomics analysis*. Virology Journal, 2010. **7**(1): p. 242.
91. Ott, D.E., *Cellular proteins detected in HIV-1*. Reviews in Medical Virology, 2008. **18**(3): p. 159-175.
92. Krauss, O., et al., *An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles*. J Gen Virol, 2002. **83**(10): p. 2347-2359.
93. Shaw, M.L., et al., *Cellular Proteins in Influenza Virus Particles*. PLoS Pathog, 2008. **4**(6): p. e1000085.
94. Moerdyk-Schauwecker, M., S.I. Hwang, and V.Z. Grdzlishvili, *Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach*. Virol J, 2009. **6**: p. 166.
95. Lodish, H.F. and M. Porter, *Specific incorporation of host cell surface proteins into budding vesicular stomatitis virus particles*. Cell, 1980. **19**(1): p. 161-169.
96. Varnum, S.M., et al., *Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome*. J. Virol., 2004. **78**(20): p. 10960-10966.
97. Spear, G., et al., *Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV)*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(9): p. 4376-4381.
98. Kattenhorn, L.M., et al., *Identification of Proteins Associated with Murine Cytomegalovirus Virions*. J. Virol., 2004. **78**(20): p. 11187-11197.
99. Michael, K., et al., *Composition of Pseudorabies Virus Particles Lacking Tegument Protein US3, UL47, or UL49 or Envelope Glycoprotein E*. J. Virol., 2006. **80**(3): p. 1332-1339.
100. Johannsen, E., et al., *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(46): p. 16286-16291.
101. Bechtel, J.T., R.C. Winant, and D. Ganem, *Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Journal of virology, 2005. **79**(8): p. 4952-64.
102. Dry, I., et al., *Proteomic Analysis of Pathogenic and Attenuated Alcelaphine Herpesvirus 1*. J. Virol., 2008. **82**(11): p. 5390-5397.

103. Mouland, A.J., et al., *The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufen Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation*. J. Virol., 2000. **74**(12): p. 5441-5451.
104. Zhu, F.X., et al., *Virion Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus*. J. Virol., 2005. **79**(2): p. 800-811.
105. Rana, T.M., *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 23-36.
106. Hirsch, A.J., *The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication*. Future Microbiology, 2010. **5**(2): p. 303-311.
107. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
108. Caplen, N.J., et al., *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(17): p. 9742-9747.
109. Brass, A.L., et al., *Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen*. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
110. Zhou, H., et al., *Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(5): p. 495-504.
111. König, R., et al., *Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication*. Cell, 2008. **135**(1): p. 49-60.
112. Krishnan, M.N., et al., *RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 242-5.
113. Karlas, A., et al., *Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 818-822.
114. Tai, A.W., et al., *A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication*. Cell host & microbe, 2009. **5**(3): p. 298-307.
115. Bushman, F.D., et al., *Host Cell Factors in HIV Replication: Meta-Analysis of Genome-Wide Studies*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000437.
116. Huppi, K., S.E. Martin, and N.J. Caplen, *Defining and assaying RNAi in mammalian cells*. Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 1-10.
117. Pei, Y. and T. Tuschl, *On the art of identifying effective and specific siRNAs*. Nat Methods, 2006. **3**(9): p. 670-6.
118. Durand, L.O. and B. Roizman, *Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10591-9.
119. Escudero-Paunetto, L., et al., *SR proteins SRp20 and 9G8 contribute to efficient export of herpes simplex virus 1 mRNAs*. Virology, 2010. **401**(2): p. 155-164.
120. Schroder, M., *Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(3): p. 297-306.
121. Cullen, B.R., *Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 26-7.
122. Tarn, W.Y. and T.H. Chang, *The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human*. RNA Biol, 2009. **6**(1): p. 17-20.

123. Kwong, A.D., B.G. Rao, and K.T. Jeang, *Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 845-53.
124. Yedavalli, V.S.R.K., et al., *Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function*. Cell, 2004. **119**(3): p. 381-392.
125. Sharma, D. and J. Bhattacharya, *Evolutionary constraints acting on DDX3X protein potentially interferes with Rev-mediated nuclear export of HIV-1 RNA*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9613.
126. Schroder, M., M. Baran, and A.G. Bowie, *Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2147-57.
127. Kalverda, A.P., et al., *Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3*. J Mol Biol, 2009. **385**(3): p. 843-53.
128. Angus, A.G., et al., *Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 1): p. 122-32.
129. Wang, H., S. Kim, and W.S. Ryu, *DDX3 DEAD-Box RNA helicase inhibits hepatitis B virus reverse transcription by incorporation into nucleocapsids*. J Virol, 2009. **83**(11): p. 5815-24.
130. Cherry, S., *What have RNAi screens taught us about viral-host interactions?* Current Opinion in Microbiology, 2009. **12**(4): p. 446-452.
131. Franke, E., H. Yuan, and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**: p. 359 - 362.
132. Colgan, J., et al., *Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk*. Immunity, 2004. **21**: p. 189 - 201.
133. Towers, G., et al., *Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors*. Nat Med, 2003. **9**: p. 1138 - 1143.
134. Rescher, U. and V. Gerke, *Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions*. J Cell Sci, 2004. **117**(13): p. 2631-2639.
135. Sekiguchi, T., et al., *Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation*. Exp Cell Res, 2004. **300**(1): p. 213-22.
136. Soliman, T.M. and S.J. Silverstein, *Herpesvirus mRNAs Are Sorted for Export via Crm1-Dependent and -Independent Pathways*. J. Virol., 2000. **74**(6): p. 2814-2825.
137. Williams, P., J. Verhagen, and G. Elliott, *Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10946-52.

