

Université de Montréal

**L'étude de la glycoprotéine gM du virus Herpès
simplex de type 1 (HSV-1)
Identification de ses partenaires viraux et cellulaires et leur rôle
dans la régulation de l'infection virale**

par

Imane El Kasmi

Département de Pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Pathologie et biologie cellulaire
option biologie cellulaire

Avril 2017

© Imane El Kasmi, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

L'étude de la glycoprotéine gM du virus Herpès
simplex de type 1 (HSV-1)
Identification de ses partenaires viraux et cellulaires et leur rôle dans la régulation de
l'infection virale

Présentée par :
Imane El Kasmi

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy LEMAY, président-rapporteur
Dr. Roger LIPPÉ, directeur de recherche
Dr. Gregory EMERY, membre du jury
Dre. Angela PEARSON, examinateur externe
Dr. Jean-François GAUCHAT représentant du doyen

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1 Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1).....	1
1-1 Aperçu historique	1
1-2 Les virus herpétiques : Classification.....	3
1-3 Les aspects médicaux du virus herpès simplex de type 1.....	6
1-4 Traitement et préventions	10
1-5 Vaccins	12
2 Le virus herpès simplex de type 1, génome et structure	13
2-1 Constituants du virus HSV-1	13
2-2 Le génome viral	13
2-3 La capsid virale.....	16
2-4 Le tégument	17
2-5 L'enveloppe	19
3 Le cycle de réplication du virus HSV-1.....	20
3-1 La fixation et l'entrée	21
3-2 Transport du virus au noyau	24
3-3 Régulation de l'expression génique.....	26
3-4 Réplication de l'ADN viral.....	29
3-5 Assemblage et encapsidation.....	32
4 Transport du noyau au cytoplasme	34
4-1 Sortie nucléaire.....	34
4-2 Tégumentation	38

4-3 Enveloppement secondaire	39
4-4 Transport à la membrane plasmique et sortie	42
4-5 Propagation du virus	43
5 Établissement de la latence, maintien et réactivation	44
6 La glycoprotéine gM (UL10).....	47
6-1 Gène, protéine et structure.....	47
6-2 Les fonctions de la glycoprotéine gM	49
6-3 Rôle de gM dans l'enveloppement secondaire	50
6-4 Rôle de gM dans la fusion membranaire et la propagation cellule à cellule	51
6-5 Le complexe gMgN.....	52
6-6 Autres partenaires de gM.....	54
7 Hypothèses et objectifs de recherche.....	54
CHAPITRE II RÉSULTATS - PRÉSENTATION PAR ARTICLES	58
Article 1: HSV-1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery	58
Abstract.....	60
Introduction.....	61
Materials and Methods.....	64
Results.....	68
Discussion.....	82
Acknowledgments.....	86
References.....	86
Article 2: Extended synaptotagmin 1 interacts with the Herpes simplex virus type 1 glycoprotein M and negatively modulates virus-induced membrane fusion	94
Abstract.....	96
Introduction.....	97
Materials and Methods.....	100
Results.....	108
Discussion.....	113
Acknowledgments.....	135
References.....	136

CHAPITRE III	Discussion générale.....	144
1	Caractérisation du complexe gM/gN du virus HSV-1.....	145
2	Identification d'un rôle fonctionnel de la glycoprotéine gN.....	147
3	Rôle d'E-Syt1 et 3 dans la propagation du virus.....	148
4	Conclusions et perspectives.....	151
	Bibliographie.....	153
	Annexe.....	190

Résumé

Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1) est l'agent pathogène qui cause l'herpès labial souvent appelé feu sauvage. Le virus se compose d'un génome viral d'ADN protégé dans une capsidie icosaédrique entourée d'une couche protéique appelé le tégment. La structure du virion est enfermée dans une enveloppe lipidique riche en glycoprotéines virales. La glycoprotéine M (gM/UL10) du virus HSV-1 est considérée comme étant non essentielle pour le virus, mais est qui est toutefois conservée dans la famille *Herpesviridae*. Durant le cycle de réplication du virus HSV-1, gM est exprimée très tôt, mais également lors des événements tardifs du cycle viral. Elle a la particularité de se localiser dans différents compartiments membranaires, et semble jouer un rôle important dans la modulation de la fusion induite par le virus. Cette régulation impliquerait des interactions de gM avec d'autres protéines virales et cellulaires, ce qui nous amène à l'objectif de ce projet, soit l'identification et la caractérisation des partenaires viraux et cellulaires de gM et leur rôle dans la régulation de l'infection virale. Le premier article présenté dans cette thèse et qui a été publié dans *Journal of Virology* s'attarde sur le complexe gM/gN du virus HSV-1, complexe qui a été documenté pour d'autres virus herpétiques mais pas HSV-1. Lors de cette étude, nous avons examiné l'interaction putative de gM/gN. Nous avons confirmé que les deux protéines forment un complexe et que gM redirige gN du réticulum endoplasmique (RE) au TGN. Nous avons observé que la surexpression de la glycoprotéine gN stimule la formation de syncytiums dans le contexte d'une infection par une souche non syncytiale, indiquant que gM et gN interagissent non seulement physiquement, mais aussi fonctionnellement à la modulation de la fusion membranaire. Ces résultats nous ont aidés à mieux comprendre le rôle que joue le complexe gM/gN dans le mécanisme de fusion virale.

Dans la deuxième partie du travail présenté ici, nous avons cherché à identifier des partenaires cellulaires potentiels de gM. En utilisant une approche d'immunoprécipitation (IP) couplée à la spectrométrie de masse (MS / MS), nous avons identifié la protéine cellulaire E-Syt1 (Extended synaptotagmin-1) comme partenaire de gM. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation dans des cellules transfectées et également dans un contexte d'infection. De plus, l'utilisation d'ARN d'interférences ciblant spécifiquement E-Syt1 et/ou E-Syt3, nous a permis de démontrer que ces protéines régulent négativement l'entrée du virus, sa sortie ainsi que sa propagation cellule à cellule. Il devient alors clair que gM interagit avec différentes protéines à la fois virales et cellulaires durant le cycle viral. Le changement dans les niveaux d'expression de ces protéines perturbe l'infection par le virus HSV-1 et met en évidence l'interaction entre la machinerie de fusion cellulaire et virale.

Mots-clés : gM, gN, fusion, E-Syt1 / E-Syt3 / HSV-1 / syncytiums

Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is an important human pathogen that causes a variety of diseases ranging from mild skin disorders to fatal encephalitis. HSV-1 virions are constituted of an icosahedral DNA-containing capsid that is surrounded by a lipid envelope. The surface of the viral envelope is decorated with an array of glycoprotein spikes. Glycoprotein M, (gM) encoded by UL10, is considered as a non-essential glycoprotein, however is highly conserved throughout the herpesvirus family. In the course of infection, gM is expressed at both early late stages of the viral life cycle. This protein can localize in different membranous compartments, and is able to modulate virus-induced membrane fusion. This property, most certainly implies the interaction of gM with other viral and cellular proteins. Therefore, it prompted us to identify and characterize gM viral and cellular interacting partners and its regulatory functions during viral infection.

The first article presented in this thesis has been published in *Journal of Virology* and focuses on HSV-1 gM/gN complex, which has been documented in several herpesviruses but this has not yet been demonstrated for HSV-1. As a part of this study, we examined the putative interaction of gM/ gN. We confirmed that gM and gN complex and their interaction is sufficient for gN to transport from the ER to the TGN. Furthermore, we showed that the overexpression of gN during the infection stimulates the formation of syncytia indicating that gM and gN not only interact physically but also functionally. This suggests a role of gN in membrane fusion. These results contributed to a better understanding of the role of gM/gN complex as a new fusion modulator in viral fusion.

In the second article presented in this thesis, we set out to identify potential cellular partners of gM, using an immunoprecipitation (IP) assay combined with mass spectrometry (MS/MS). We identified the Extended synaptotagmin-1 (E-Syt1) as a gM interacting partner. Next, this interaction was confirmed by co-immunoprecipitation in transfected cells and also in the context of infection. Moreover, by using small interfering RNAs (siRNA) specifically targeting E-Syt1 and/or E-Syt3, we were able to show that these proteins negatively regulate the entry, egress and the cell-to-cell spread of the virus. Manipulating the expression of E-Syt 1 and /or E-Syt3 disrupts HSV-1 replication and demonstrates the interaction between cellular and viral fusion machinery.

Keywords: gM, gN, fusion, E-Syt1 / E-Syt3 / HSV-1 / syncytia

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des virus de la famille des Herpesviridae humains	5
Tableau 2 : Les protéines composantes de la capsid mature du virus HSV-1.	18
Tableau 3 : Les glycoprotéines impliquées lors de l'entrée du virus HSV-1 et leurs récepteurs cellulaires	22

Article 2

Table 1: Proteins identified by proteomics.	134
--	-----

Liste des figures

Figure 1 : Structure et composition d'HSV-1.....	15
Figure 2 : Représentation schématique du génome du virus HSV-1 sous sa forme linéaire	15
Figure 3 : Cycle de réplication viral du virus HSV-1.....	21
Figure 4 : Fusion du virus HSV-1 avec une cellule cible à la membrane plasmique.	23
Figure 5 : Cascade d'expression des gènes viraux.....	28
Figure 6 : Schéma de la réplication de l'ADN du HSV-1	31
Figure 7 : Les étapes d'assemblage de la capside du virus HSV-1.	33
Figure 8 : Modèles de sortie cellulaire.....	36
Figure 9 : Schéma des interactions moléculaires lors de la formation du virion HSV-1.....	41
Figure 10 : Sortie du virion de la cellule hôte.....	44
Figure 11 : Établissement de la latence et réactivation du virus HSV-1.	46
Figure 12 : Schéma illustrant la topologie membranaire prédite de gM.....	49

Article 1

Figure 1: Schematic view of plasmids and viruses used in this study	73
Figure 2: gM drives gN to the TGN in transfected cells.....	74
Figure 3: Physical interaction between gM and gN in transfected cells.....	75
Figure 4: Co-immunoprecipitation of the gM/gN complex in infected cells.....	76
Figure 5: Expression of gM in wild type and mutant HSV-1 strains.....	78
Figure 6: gM/gN interacts less efficiently with the amino truncated Δ gM2 protein.	79
Figure 7: The HSV-1 gN viral protein induces syncytial formation in infected cells.	81

Article 2

Figure 1: Silver staining of samples analyzed by mass spectrometry	115
Figure 2: HSV-1 gM and E-Syt1 are reciprocally co-IP in transfected cells.....	116
Figure 3: E-Syt1 interacts with HSV-1gM in infected cells.....	117
Figure 4: Inhibition of E-Syt1 enhances the HSV-1 infection.....	119

Figure 5: Impact of the virus on E-Syt1 expression 120

Figure 6: E-Syt2 and E-Syt3 are also expressed and interacts with HSV-1gM in infected cells
..... 122

Figure 7: HSV-1 gM only minimally co-localizes with overexpressed E-Syt proteins 125

Figure 8: Efficient knockdown of E-Syt proteins and impact on viral release..... 126

Figure 9: E-Syt1 and E-Syt3 down regulation increases cell-to-cell spread 128

Figure 10: Cellular distribution of viral particles 129

Figure 11: Overexpression of E-Syt1 or E-Syt-3 reduces viral yields..... 130

Figure 12: E-Syt1 and E-Syt3 also impair HSV-1 entry..... 131

Figure 13: E-Syt1 and E-Syt3 knockdown increase cell-to-cell fusion in infected cells..... 133

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CO-IP	CO-immunoprecipitation
EM	Electron microscopy
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
E-Syt	Extended Synaptotagmin
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FBS	Fetal bovine serum
gB	Glycoprotéine B
gC	Glycoprotéine C
gD	Glycoprotéine D
gH/gL	Glycoprotéine H et L
gM	Glycoprotéine M
gN	Glycoprotéine N
Hpi	Hours post-infection
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
HSV-2	Herpes simplex virus type 2
ICP	Infected cell protein
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IRL	Internal repeat long
IRS	Internal repeat short
LAT	Latency associated transcript
MA	Maladie d'Alzheimer
MNE	Membrane nucléaire externe
MNI	Membrane nucléaire interne
MOI	Multiplicity of infection
MP	Membrane plasmique
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
Nt	N-terminale
Nc	C-terminale
ORF	Open reading frame
pb / kpb	Paires de bases / kilopaires de base
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PILR α	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor- α
RE	Réticulum endoplasmique
SD	Standard Deviation
TGN	trans-Golgi network
TK	Thymidine kinase
TNF	Tumor necrosis factor alpha

TRL	Terminal repeat long
TR _S	Terminal repeat short
U _L	Unique long region
U _S	Unique short region
V _{hs}	Virion host shutoff
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VP	Viral protein

À mes Chers parents

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Remerciements

Cette thèse est le résultat d'innombrables heures de travail, de réflexion, de lecture, de discussions, de réalisations, d'analyses, d'écriture, de révisions, de relecture, de séminaires et de conférences...d'acharnement, de stress, d'incertitude et de plaisir. Mais avant tout, cette thèse est le fruit d'une aventure humaine exceptionnelle qui n'aurait pu être menée à bien sans l'aide de nombreuses personnes, que je souhaite aujourd'hui remercier du fond du cœur pour m'avoir permis de vivre de tels moments tout au long de cette aventure.

*Tout d'abord, je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche **Dr. Roger Lippé** qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire, m'a encadré, et offert la chance d'évoluer au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour la formation scientifique de qualité qu'il m'a donnée. Sa grande rigueur intellectuelle, son efficacité et sa passion pour la science m'ont beaucoup appris. Je voudrais aussi le remercier pour le temps qu'il m'a accordé tout au long de ces années ainsi que d'avoir cru en mes capacités. Je salue en lui ses qualités humaines, son écoute, sa patience et sa sensibilité aux contextes personnels. Merci pour les discussions et les échanges passionnants et merci de m'avoir permis de réaliser ce projet dans les meilleures conditions... Merci pour tout. Je n'en garde que de bons souvenirs et des acquis qui m'accompagneront tant dans mon parcours professionnel que personnel.*

*Mes remerciements vont également au **Dr. Karl fernandes**, à la **Dre. Nicole Leclerc** et à la **Dre. Angela Pearson** pour m'avoir fait l'honneur de participer en tant que membres de mon comité de parrainage. Le temps que vous m'avez accordé et les bons conseils que vous m'avez donnés ont grandement contribué à améliorer la qualité de ce projet*

*J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres du laboratoire, passés et présents pour les commentaires, les suggestions, les encouragements et les discussions intéressantes. Merci à **Johanne** pour son aide précieuse, son professionnalisme et son dévouement pour le laboratoire. Merci à **Diane gingras** pour sa précieuse collaboration en microscopie*

électronique et sa bonne humeur. Merci à **Sandra, Yordanka, Daniel et Kerstin** pour leur sympathie, aide et précieux conseils.

Merci également au **Département de pathologie et biologie cellulaire et la Faculté de médecine** pour le support financier, ainsi qu'au personnel du Département qui à un moment ou un autre durant mon doctorat se sont dévoués pour le bon déroulement de mes études.

...une thèse c'est aussi plusieurs années passées en compagnie de personnes avec qui on partage le quotidien... les bons moments comme les mauvais ; alors pour votre présence, pour la précieuse amitié que l'on partage ou simplement en mémoire des moments passés ensemble, les soirées et les week-ends passés au labo, les litres de café préparés, les repas partagés et pour autant de fous rires, je pense particulièrement à **Bitá et Nabil**. Je vous dis à vous deux, merci pour la bonne ambiance au labo, merci pour vos conseils et votre aide, pour les discussions scientifiques, pour vos conseils et vos encouragements...J'en garde de beaux souvenirs et je vous souhaite du succès pour la suite de vos études.

Une pensée particulière envers une amie de cœur **Ghita**, ma Ghitou, tu es une amie en or sur laquelle je peux toujours compter malgré la distance qui nous sépare. Merci pour tes encouragements, merci d'avoir fait de longs voyages pour me rendre visite, pour notre amitié et pour tous les moments inoubliables passés ensemble.

Je ne pourrais pas terminer ces quelques lignes sans remercier ceux, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci à **ma maman et mon papa**, vous êtes la lumière qui éclaire ma vie, et je ne pourrais vous remercier suffisamment pour tout ce que vous avez fait pour moi...merci pour votre soutien inconditionnel, pour votre confiance illimitée en moi, merci pour vos encouragements et vos prières. Merci aussi pour votre amour immense et démesuré. Un grand merci à mes adorables sœurs **Myriam et Samia** pour leur affection, leur soutien. Merci pour vos messages d'encouragements et pour tout le bonheur qu'on a partagé ensemble.

Je tiens enfin à réserver une mention spéciale à ma chère tante Zoubida. Tati tu es plus qu'une tante pour moi, tu es ma deuxième maman. Merci pour ton grand soutien, ton affection

et ton amour... Mille mercis pour tout. C'est juste énorme tout ce que tu as fait et tu fais toujours pour moi.

Encore une fois, Merci à vous tous

CHAPITRE I INTRODUCTION

1 Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1)

1-1 Aperçu historique

Le virus herpès existe depuis plusieurs millions d'années, toutefois son origine dans l'histoire humaine reste inconnue. Les premiers rapports relatant les infections par ce virus remontent à l'ancienne civilisation grecque. L'histoire rapporte que le médecin Hippocrate a été le premier à avoir décrit des lésions qui apparaissaient à la surface de la peau. Il les a défini par le mot grec « herpès » pour signifier « glisser ou ramper » en référence à la nature de propagation des lésions cutanées herpétiques (1-3). Plus tard durant l'époque romaine, l'empereur Tibère aurait tenté d'empêcher l'épidémie par ce qui semblait être le virus d'herpès, en interdisant les baisers lors des cérémonies et d'événements publics (4). Au cours du 18^e siècle, il a été rapporté que l'écrivain William Shakespeare connaissait la présence de l'herpès labial. Dans sa pièce de Roméo et Juliette, il décrit des lésions caractéristiques causées par le virus d'herpès (5). Par la suite, de nombreux chercheurs de l'époque se sont intéressés à étudier ces mystérieux agents infectieux. Puis la première distinction entre l'herpès buccal et l'herpès génital est arrivée en 1813, lorsque Robert Willan et son collègue Thomas Bateman publient leurs travaux sur la compréhension de l'herpès génital qu'il désigne sous le nom (herpes praeputialis) (6).

Une des étapes les plus importantes dans la détermination de la cause des lésions herpétiques a eu lieu en 1884, lorsque le médecin américain Louis Duhring les différencie cliniquement de l'eczéma et du pemphigus qui ne sont pas contagieux (7). Toutefois, ce n'est qu'en 1893 que le

dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal a démontré expérimentalement pour la première fois que l'herpès simplex est une infection contagieuse (8). Il a fallu attendre l'arrivée du 20^e siècle pour que les grandes découvertes émergent concernant l'infection causée par le virus de l'herpès simplex. En 1912, Wilhelm Grüter isole le virus HSV-1 et révèle sa nature infectieuse. En effet, il démontre que le virus d'herpès humain peut se transmettre à un lapin puis de nouveau à un humain (9). Une autre percée importante dans la compréhension du virus d'herpès fait son apparition en 1925, quand le virologue américain Ernest Goodpasture montre que le virus d'herpès migre par voie axonale jusqu'au ganglion trigéminal, où il réside pendant sa latence (10). Puis en 1939, Burnet et Williams établissent le principe de la latence. Ils suggèrent que le virus d'herpès persiste à vie dans l'organisme et réside principalement dans les neurones pendant la période de latence. Cependant, lorsqu'il est stimulé le virus s'active et provoque des lésions herpétiques (11). Finalement en 1962, le Dr Karl Schneweis révèle l'existence de deux virus différents, le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui affectant principalement la région labiale et le virus herpès simplex de type 2 (HSV-2) qui lui est associé aux lésions génitales (12).

Les connaissances sur le virus d'herpès ont énormément évolué au cours des 50 dernières années. Le développement rapide de la biologie moléculaire, le séquençage et l'analyse structurale des macromolécules du vivant ont conduit les chercheurs à découvrir l'ADN viral, et par conséquent identifier les protéines codées par le virus HSV-1, et c'est aussi la découverte et la compréhension des gènes codant pour ces protéines. Le progrès technologique associé aux techniques de génie génétique a permis de démontrer le potentiel très important du virus d'herpès dans les approches de thérapie génique. Toutefois, l'étude des interactions virus-virus et virus-hôte, revêt d'une importance considérable non seulement parce qu'elle permet d'affiner

nos connaissances sur le fonctionnement du virus, mais surtout parce qu'elle est prometteuse pour l'avancement de la recherche médicale.

1-2 Les virus herpétiques : Classification

Le virus d'HSV-1 fait partie de la grande famille des *Herpesviridae*. Cette famille comprend plus de 200 virus différents qui ont été découverts jusqu'à maintenant. Neuf virus parmi eux sont actuellement connus pour causer des maladies chez les humains (13, 14). Ces virus partagent des propriétés biologiques spécifiques telles qu'un ADN viral linéaire double-brin, un génome dont la taille varie entre 120 à 230 kilopaires de bases (kpb) et codant pour 70 à 200 gènes (15, 16). Ils ont une structure composée d'une capsidie icosaédrale (125-130 nm) contenant 162 capsomères entourées d'une matrice protéique appelée le tégument, qui à son tour est entouré par une enveloppe de bicouches lipidiques dont laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales (14). Ces virus ont la particularité de détruire les cellules qu'ils ont infectées, et se caractérisent par leur capacité à établir et maintenir la latence, puis se réactiver en réponse à des facteurs déclenchants (17).

La famille des *Herpesviridae* est divisée en trois sous-familles selon leurs particularités et propriétés biologiques. Les *Alphaherpesvirinae*, dont fait partie le virus HSV-1 et auquel on s'intéresse dans ce projet de doctorat, possèdent un cycle répliatif relativement court. Ils ont la particularité d'infecter plusieurs types cellulaires *in vitro* et sont capables d'induire la mort des cellules qu'ils infectent. De plus, ce groupe de virus a la capacité d'établir une infection dans les ganglions sensoriels (18). Cette sous-famille inclut les virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2) ainsi que le virus le virus varicella-zoster (VZV) qui cause la

varicelle et le zona. La sous-famille des *Betaherpesvirinae* inclut le cytomegalovirus humain (CMV) et les roséolovirus (HHV-6A, HHV-6B et HHV-7), sont caractérisés principalement par le nombre restreint de cellules qu'ils peuvent infecter. Le cycle réplcatif et l'infection sont plus lents que ceux des *Alphaherpesvirinae*. Ces virus entraînent un élargissement dans la taille des cellules infectées (cytomégalie), et peuvent également établir des infections latentes dans différents sites ; les glandes sécrétoires, les cellules lymphoréticulaires et les cellules rénales (19). Finalement, la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, regroupe seulement deux genres, le virus Epstein-Bar (EBV) et le virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV). Ces virus se distinguent par leur potentiel oncogène, et sont associés à des tumeurs malignes telles que le lymphome de Burkitt et le Sarcome de Kaposi (20). Ils infectent spécifiquement les lymphocytes T et B et induisent des infections latentes dans les tissus lymphoïdes (19).

Récemment, la phylogénie et le séquençage des génomes ont connu un grand progrès, ceci a permis aux experts du groupe d'étude sur les *Herpesviridae* (ICTV) de mettre à jour la classification des virus. Ils ont intégré la famille des *Herpesviridae* (infectant les mammifères, oiseaux et reptiles), à l'ordre des *Herpesvirales* puis deux autres familles ont été créées : les *Alloherpesviridae* (infectant les poissons et les amphibiens), et les *Malacoherpesviridae* qui sont des herpèsvirus de bivalves (21).

Sous famille	Désignation	Noms communs	Genre	Taille du génome (Kpb)	Cellules infectées <u>Lytique</u> <u>Latence</u>	Manifestations cliniques
Alpha (α)	HHV-1	Virus herpès simplex 1 (HSV-1)	Simplexvirus	152	Cutanéo-muqueuses Neurones	Kératites encéphalites Infections oro-labiales
Alpha (α)	HHV-2	Virus herpès simplex 1 (HSV-2)	Simplexvirus	154	Cutanéo-muqueuses Neurones	Infections génitales Infections néonatales
Alpha (α)	HHV-3	Virus Varicella-Zoster (VZV)	Varicellovirus	125	Cutanéo-muqueuses Neurones Lymphocytes T4, CD4+	Varicelle et zona
Bêta (β)	HHV-5	Cytomégalovirus Humain(HCMV)	Cytomégalovirus	229	Leucocytes Cellules endothéliales	mononucléose infectieuse infections congénitales pneumonie rejet de greffe
Bêta (β)	HHV-6 A/B	Roséolovirus	Roséolovirus	159	Lymphocytes T4 Monocytes Epithélium	roséole hépatite et pneumonie mononucléose infectieuse
Bêta (β)	HHV-7	Roséolovirus	Roséolovirus	145	Lymphocytes T4, CD4+ Epithélium	Roséole hépatite et pneumonie mononucléose infectieuse
Gamma (γ)	HHV-8	Herpès virus associé au Sarcome de Kaposi (KSHV)	Rhadinovirus	165	Lymphocytes B Epithélium	sarcome de Kaposi maladie de Castleman lymphome des cavités corporelles
Gamma (γ)	HHV-4	Virus Epstein-Barr (EBV)	Lymphocryptovirus	172	Lymphocytes B Epithélium	mononucléose infectieuse lymphome de Burkitt carcinome nasopharyngé

Tableau 1 : Caractéristiques des virus de la famille des Herpesviridae humains

1-3 Les aspects médicaux du virus herpès simplex de type 1

1-3-1 Épidémiologie et transmission

Les pathologies qui sont liées à l'infection par les virus herpétiques humains sont nombreuses. Un éventail des principales maladies causées par ces infections sont citées dans le tableau 1. Les infections par le virus d'HSV constituent un véritable problème de santé mondiale. Actuellement plus de 3,7 milliards de personnes de moins de 50 ans (67% de la population) sont infectées par HSV-1, et 417 millions de personnes entre 17 et 49 ans souffrent de l'infection par HSV-2 (l'Organisation Mondiale de la Santé 2015) (22, 23).

L'infection par le virus HSV est encore plus élevée dans les pays en voie de développement, où certaines études estiment que la séroprévalence atteint près de 100% pour les virus herpès simplex (24). La situation est encore plus préoccupante en zone de forte endémie pour le virus de l'immunodéficience humaine, puisque l'infection par HSV-2 multiplie le risque de transmission sexuelle du VIH par un facteur allant de 2 à 4 (25).

L'infection primaire par HSV-1 est souvent asymptomatique et la plupart des individus infectés ne le savent pas au début. Le virus se transmet principalement par le contact direct avec les surfaces muqueuses d'un individu excréteur du virus lors d'une primo-infection, d'une récurrence clinique ou d'une excrétion virale asymptomatique (salive, sécrétions vaginales, liquide amniotique (23)). Une fois que le sujet est infecté, le virus se dirige du site de l'infection aux ganglions du système nerveux périphérique en se déplaçant le long de l'axone jusqu'au ganglion trigéminal. Ici le virus entre dans une phase d'infection latente qui persiste pendant toute la durée de la vie de l'hôte. Pendant la latence, le virus est relativement dormant et ne produit pas d'infection. Cependant, sous l'action de certains stimulus comme le stress physique

ou émotionnel (26), la fièvre (27) ou le déséquilibre hormonal, le processus de la réactivation de la latence est déclenché produisant ainsi des particules virales infectieuses. Ces particules vont subir un transport antérograde pour retourner au site d'infection primaire et provoquer des lésions vésiculaires récurrentes (28).

1-3-2 Pathologies et symptômes

Généralement HSV-1 est associé à des lésions orofaciales, connues sous le nom de l'herpès labial et communément appelé bouton de fièvre ou feu sauvage. Toutefois, il peut provoquer d'autres pathologies comme la trachéite, l'oesophagite l'eczéma herpétique, le panaris herpétique (infection des mains), et les lésions génitales. Des symptômes plus graves peuvent être associés à l'infection par ce virus telle que la cécité due à l'infection cornéenne récurrente et à la kératoconjonctivite. Notons aussi que le virus peut entraîner des complications pouvant être fatales tel que la méningite ou l'encéphalite.

1-3-3 Infections chez les individus immunosupprimés

L'immunité cellulaire conditionne en grande partie l'évolution de l'infection herpétique. En effet, l'infection par le virus HSV-1 est encore plus sévère chez les sujets immunodéprimés (patients infectés par le virus VIH, transplantés de moelle osseuse ou d'organes solides). De plus, la persistance permanente de l'infection par le virus HSV-1 chez l'hôte augmente le risque d'infection simultanée par le VIH (29, 30). *In vitro*, des interactions bidirectionnelles et synergiques ont été décrites entre l'HSV-1 et le VIH. De nombreuses protéines d'expression

herpétique produites par des gènes précoces sont capables *in vitro* de transactiver la réplication du VIH en interagissant avec la région régulatrice *Long Terminal Repeat* (31, 32).

1-3-4 Les troubles neurologiques causés par HSV-1

❖ L'encéphalite herpétique

L'encéphalite d'HSV-1 est la plus dévastatrice des infections à HSV-1. Les manifestations cliniques associées à ce type d'infection sont nombreuses et incluent, la fièvre, une altération de la conscience, un comportement anormal de même que des désordres neurologiques localisés. L'encéphalite causée par HSV est également caractérisée par des événements d'inflammation, un œdème et des hémorragies cérébrales importantes. Le pourcentage de mortalité chez les patients non traités est de plus de 70% et seulement 2,5% des survivants vont retrouver leurs fonctions neurologiques normales (33, 34).

❖ La Paralyse de Bell

La paralysie de Bell est un type de paralysie faciale d'apparition soudaine qui, en général, frappe partiellement ou totalement un côté du visage. Différentes hypothèses étiologiques ont été émises afin de tenter d'expliquer cette paralysie et plusieurs éléments donnent à penser que la paralysie de Bell est effectivement d'origine virale. Les recherches réalisées dans ce sens ont démontré qu'elle serait due à la réactivation du virus HSV-1 qui s'accompagne d'une inflammation et d'un œdème comprimant le nerf crânien facial ce qui empêche ainsi le contrôle adéquat des muscles faciaux concernés (35, 36).

❖ **Maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui touche 20 millions de personnes dans le monde. Elle est caractérisée par des troubles cognitifs notamment la perte de la mémoire. Dans le cerveau des malades s'observent des dépôts de peptides bêta-amyloïdes qui forment des plaques, ainsi que des agrégats de la protéine Tau (37). La (MA) est la première cause de démence chez la personne âgée, mais son étiologie reste encore inconnue. Il y a plusieurs décennies, l'infection par le HSV-1 a été proposée comme un facteur important dans la susceptibilité à la maladie d'Alzheimer (38), et différentes études ont considéré qu'il existe une relation entre cet agent pathogène et le développement de la maladie d'Alzheimer (39, 40). Par la suite, d'autres groupes de recherche ont détecté l'ADN viral du virus HSV-1 dans le cerveau des individus atteints de la maladie d'Alzheimer (39, 41-43). En effet, dans les cerveaux des malades, 90% des plaques amyloïdes contiennent l'ADN du virus HSV-1 et 72% de l'ADN d'HSV-1 dans le cerveau a été associé aux plaques. L'ADN du virus HSV-1 associé aux plaques étaient beaucoup plus faibles chez les cerveaux normaux que ceux atteints de la maladie d'Alzheimer. La co-localisation de l'ADN d'HSV-1 avec les plaques amyloïdes dans le cerveau atteint d'alzheimer, place le virus d'HSV-1 en juxtaposition directe avec le biomarqueur de la (MA) suggérant ainsi un rôle important du virus HSV-1 dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (37, 44). Une autre étude démontre que l'ADN de HSV-1 est retrouvé dans les plaques amyloïdes qui caractérisent la maladie d'Alzheimer (45). Plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires ont démontré que la présence du virus HSV-1 cause la modification du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde APP (46), une augmentation de la production de protéines tau phosphorylées (47), et également l'apparition d'anomalies neuronales conduisant

ainsi à la mort cellulaire (46). Il a été rapporté également que la présence d'anticorps IgM anti-HSV-1 dans le plasma des patients malades associée à une infection primaire ou une réactivation récente du virus induit une augmentation du risque de développer la MA (48, 49). Une autre hypothèse tentant d'exposer le lien entre le virus HSV-1 et la maladie d'Alzheimer lors du transport des capsides virales à la surface cellulaire. En effet une interaction dynamique et fréquente a été observée entre la protéine APP et la capside virale néosynthétisée, d'une manière qui facilite le transport viral de la capside et interfère avec la distribution de la protéine APP normale. De telles interactions suggèrent une base mécanistique pour la relation clinique observée entre l'infection par HSV-1 et le risque de maladie d'Alzheimer (50). Des études plus approfondies seront nécessaires afin de mieux comprendre la causalité entre une infection par le virus HSV-1 et la maladie d'Alzheimer.

1-4 Traitement et préventions

Le traitement de l'infection par le virus HSV-1 a fait l'objet de nombreuses études thérapeutiques au cours des 40 dernières années, et plusieurs agents antiviraux ont été développés dans le but de contrer l'infection par le virus. Cependant, aucun traitement antiviral n'est à présent en mesure d'éradiquer le virus. Tous les médicaments antiviraux qui ont fait l'objet d'une mise sur le marché ciblent seulement le virus en réplication active en bloquant l'enzyme clef pour cette étape, à savoir l'ADN polymérase, mais ne permettent en aucun cas d'éliminer l'infection latente. On distingue deux générations d'antiviraux, ceux qui sont directement actifs et ceux qui requièrent la présence d'une enzyme codée par le virus HSV-1 pour devenir active, comme la thymidine kinase. Les premiers médicaments antiviraux nucléosidiques topiques, l'idoxuridine (IDU), la vidarabine, et la trifluridine étaient peu efficaces à cause de leur très haute toxicité lors de l'administration systémique (51, 52). La

percée majeure dans la thérapie de l'infection par HSV-1 était le développement d'une seconde génération de traitements sous forme d'analogues nucléosidiques dotés d'un mécanisme d'action sélectif (moindre toxicité sur les cellules épithéliales saines). L'acyclovir (ACV) et le penciclovir (PCV) et leur prodrogue respective, le valacyclovir et le famciclovir, constituent les traitements de premier choix contre les infections au HSV-1 (53, 54). Les analogues de nucléosides phosphonates (ANP) qui incluent le cidofovir (CDV) et l'adéfovir (ADV) peuvent également être inclus dans cette classe. Ces molécules sont des prodrogues dépendantes de l'activation par une thymidine kinase virale (TK), et leur mode d'action a bien été étudié. Elles ont la particularité d'inhiber l'ADN polymérase virale, en d'autres termes, seules les cellules infectées sont traitées. Le mécanisme repose sur une première phosphorylation sélective via la thymidine kinase virale. La forme active triphosphate est ensuite formée par des étapes de phosphorylation successives qui sont catalysées par des kinases intracellulaires, ce qui va empêcher la réplication virale. Pour les analogues nucléotiques, le Cidofovir (CDV) appartient à la famille des dérivés phosphonylméthoxyalkyl des purines et des pyrimidines dont l'action ne dépend d'aucune enzyme virale. Étant donné qu'ils sont déjà monophosphatés, les kinases cellulaires vont le convertir en sa forme diphosphate active inhibant ainsi l'ADN polymérase virale. Sa sélectivité est assurée par la grande affinité qu'a le Cidofovir diphosphate pour la polymérase à ADN virale (55, 56). L'inhibition de la polymérase à ADN du virus se fait par l'incorporation de la forme triphosphate dans les chaînes de l'ADN naissant, bloquant ainsi la réplication. L'ADN viral est incapable de poursuivre l'élongation. En effet, il manque à cet analogue le résidu carboné à partir duquel s'effectuent les liens phosphodiester entre les nucléosides (57). Il existe d'autres mécanismes d'action qui ont été explorés afin de bloquer le

virus, tel que les inhibiteurs ciblant la fusion membranaire induite par le virus (58), l'inhibition des protéases virales (59) ou du complexe hélicase-primase (60, 61).

Un traitement antiviral idéal a pour but d'inhiber le plus spécifiquement possible un événement de la réplication virale, sans pour autant perturber le cycle cellulaire. La fixation, l'entrée, la synthèse protéique, la réplication de l'ADN, l'assemblage, et le bourgeonnement constituent les étapes critiques de la réplication du virus HSV-1 et sont donc des cibles potentielles pour les antiviraux. Cependant, les médicaments qui existent actuellement peuvent réduire la production virale et restreindre la transmission, ce qui permet d'atténuer la sévérité des symptômes, mais le risque de réactivation est toujours présent puisque le virus persiste encore. À la longue, l'utilisation de ces drogues peut entraîner l'émergence d'éventuelles souches résistantes afin d'échapper à la pression antivirale (62). Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les interactions du virus HSV-1 avec son hôte à différentes étapes du cycle viral, ce qui pourrait alors permettre de cibler les protéines virales, mais aussi cellulaires qui sont nécessaires au déroulement des différentes étapes de l'infection par HSV-1, et par conséquent identifier de nouvelles molécules thérapeutiques susceptibles d'éradiquer le virus.

1-5 Vaccins

Le meilleur moyen pour contrôler le virus d'HSV-1 est le développement d'un vaccin efficace. Depuis 1920, des efforts considérables ont été déployés et plusieurs essais cliniques ont été réalisés, mais aucun vaccin n'a démontré une protection réelle et suffisante pour justifier un développement commercial. La recherche à ce sujet continue à contribuer de manière décisive à l'apparition de nouvelles stratégies de vaccination contre le virus HSV-1 incluant le virus vivant génétiquement atténué (63), la préparation de virus entier inactivé (64), la réplication de vecteurs non pathogènes qui expriment un ou plusieurs antigènes du virus (65), l'immunisation

génétique basée sur l'expression d'une ou plusieurs protéines du virus HSV-1 dans un plasmide (2), ainsi que le vaccin sous-unité glycoprotéique recombinant (66). Les glycoprotéines d'enveloppe du virus HSV-1 (gB et gD) ont été le plus souvent choisies en raison de leur capacité à stimuler l'immunité humorale (production d'anticorps neutralisants *in situ* et dans le sérum) et à stimuler l'immunité cellulaire restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II (67).

2 Le virus herpès simplex de type 1, génome et structure

2-1 Constituants du virus HSV-1

Le virus HSV-1 a été le premier virus herpétique identifié et est l'un des virus les plus étudiés à travers le monde du fait de ses caractéristiques biologiques et des pathologies humaines qu'il peut causer. HSV-1 partage une morphologie commune avec tous les autres membres de la famille des *Herpesviridae*. Il se caractérise par une capsidie icosaédrique qui protège l'ADN ainsi qu'une enveloppe bilipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales. Entre la capsidie et la membrane se trouve une couche de protéines appelée tégument (62). Un schéma de la structure du virion est représenté dans la **figure 1**.

2-2 Le génome viral

Le génome du virus HSV-1 est composé d'un ADN double-brin linéaire qui se circularise immédiatement après l'infection, et persiste sous une forme circulaire épisomale non répliquative durant la latence (68, 69). Sa taille est de 152 kb et a un contenu de G+C d'environ 68,3% (70, 71). Il contient environ 90 gènes et code pour au moins 84 protéines différentes (18, 62). Sur le plan structurel, le génome est constitué de deux segments liés de façon covalente et qui sont

désignés par « unique long » (U_L ; *unique long*) (108 kb) et « unique court » (U_S ; *unique short*) (13 kb). Les gènes viraux codés dans ces régions sont nommés selon leur localisation dans chacun des segments suivis d'un numéro correspondant à leur rang respectif (p. ex., UL1 or Us2). Les produits de ces gènes sont nommés par l'ajout du préfixe 'p' au nom du gène (p. ex. : pUL21). Plusieurs protéines virales sont parallèlement désignées selon leur propriété générale : protéine de cellule infectée (ex : ICP4), protéine virale (ex : VP16), ou selon leur fonction respective (ex : gène U_L23=Thymidine kinase) (69). Ces deux segments uniques sont flanqués par de larges séquences répétées inversées *a*, *b*, *c* appelées *terminal* (TR) ou *inverted repeats* (IR) (72). Le génome du virus HSV-1 contient trois origines de réplication de l'ADN : Ori_L, situé dans le segment U_L, et deux Ori_S qui se trouvent dans les régions répétées des extrémités du segment U_S (**Figure 2**). L'ADN viral est répliqué de manière continue sous forme de « cercle roulant », et forme de longs concatémères qui sont clivés en monomères. Il existe deux éléments de séquence d'ADN *pac1* et *pac2* (DNA cleavage/packaging signals) dans les régions répétées inversées qui ont le rôle d'assurer le clivage approprié pendant le processus d'encapsidation (73, 74).

Une énumération complète des gènes et des protéines virales codées par HSV-1 est présentée en annexe afin de servir de référence tout au long de cette thèse (**Annexe 1**).

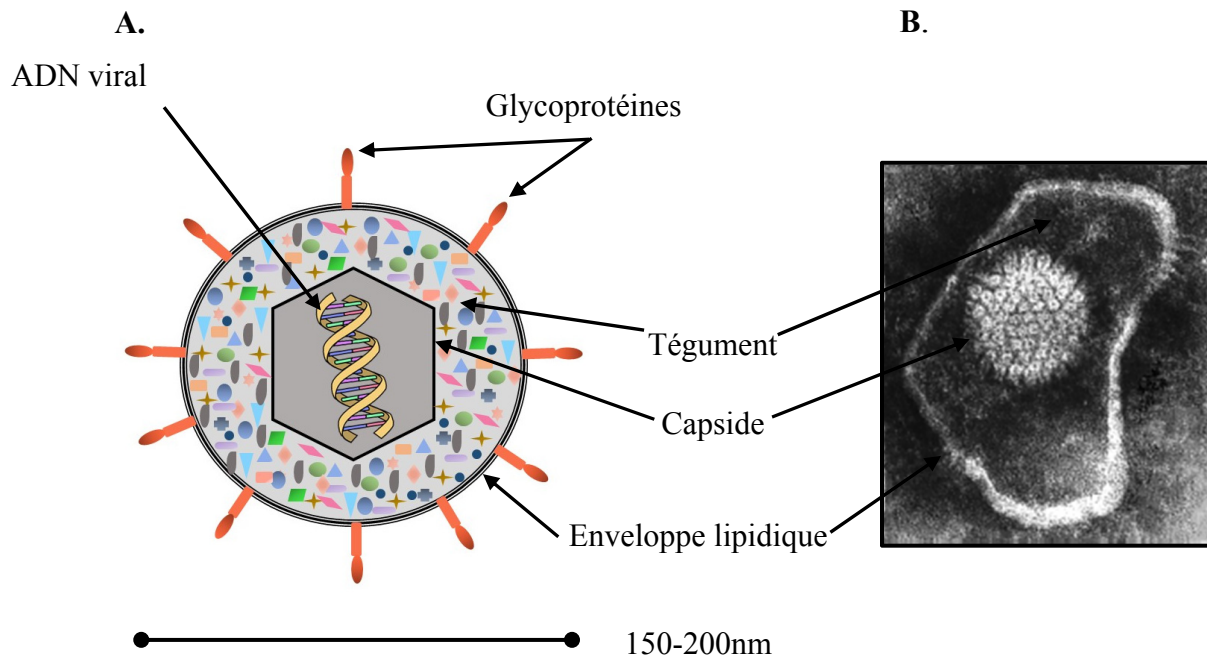


Figure 1 : Structure et composition d'HSV-1.

- A. Le virus HSV-1 est composé d'un ADN double brin protégé par une nucléocapside virale icosaédrale. Une couche de protéine tégmentaire entourant la capside, et une enveloppe lipidique où sont ancrées toutes les glycoprotéines virales. B : Ces composantes structurales sont visualisées en microscopie électronique (à droite) : (Image de microscopie électronique prise de <http://virology-online.com/viruses/HSV.htm>)

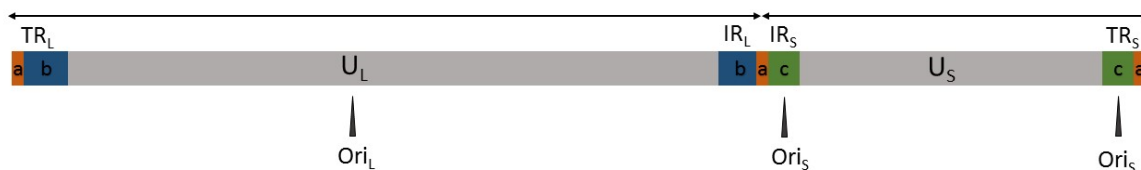


Figure 2 : Représentation schématique du génome du virus HSV-1 sous sa forme linéaire

Le génome HSV-1 est divisé en deux segments désignés U_L (long) et U_S (short : court) liés de façon covalente. Ces deux composants sont séparés par des séquences répétées inversées IR_L , IR_S , tandis que les extrémités sont flanquées par des répétitions terminales TR_L , TR_S . Le génome viral contient aussi trois origines de réplication Ori.

2-3 La capsid virale

Tous les virus herpétiques partagent des caractéristiques structurales similaires (75) : une capsid de forme icosaédrale ($T = 16$) d'environ 125 nm de diamètre et qui est composée de 162 capsomères répartis en 150 hexons et 12 pentons, un portal avec un canal axial permettant l'entrée et la relâche de l'ADN viral, et 320 triplexes connectent les capsomères en groupes de trois (76-80). La capsid virale est composée principalement de quatre protéines virales VP5(U_L19), VP26 (U_L35), VP23 (U_L18) et VP19C (U_L38). La protéine virale VP5 est la plus abondante, elle est présente en cinq copies dans chaque penton et en six copies par hexon qui forment les capsomères (81, 82). Les six copies de la protéine VP26 interagissent avec chaque hexon de VP5 (83). Des triplex formés de deux copies de VP23 et une seule copie de VP19C relient les capsomères adjacents entre eux (76, 77, 81, 84). Dans la capsid mature, on y trouve également la protéine U_L6 qui forme un portal sur le sommet d'un des 12 axes de la capsid à travers lequel le génome viral peut s'introduire et aussi être libéré dans le noyau (76, 85-88). En plus, la capsid incorpore une protéase nommée VP24 codée par U_L26 et qui s'autoclive pour générer VP21 et VP24 pendant l'encapsidation de l'ADN (77, 89). Deux autres protéines virales mineures, U_L25 et U_L17, sont présentes à la surface de la capsid et forment un hétérodimère appelé composant spécifique du vertex de la capsid (CVSC), elles sont impliquées dans l'encapsidation de l'ADN et la maturation de la capsid (76, 85, 90-93) (Tableau 2).

Les capsides observées dans les noyaux des cellules infectées par le virus HSV-1 sont classés en groupes : La capsid de type A est dépourvue de protéines d'échafaudage et ne contient pas d'ADN. La capsid de type B contient des protéines d'échafaudage, mais pas l'ADN viral et représente l'état de la capsid avant l'encapsidation de l'ADN du virus HSV-1. La capsid de

type C est la nucléocapside mature contenant de l'ADN viral et pas de protéines d'échafaudage (76, 94-96).

2-4 Le tégment

Le tégment est la composante majeure du virion, et il représente 40% ou plus de la masse totale (97). Il a été défini comme étant une couche amorphe de protéines située entre la nucléocapside et l'enveloppe lipidique du virus. Il était convenu depuis longtemps que le tégment se compose d'environ 20 protéines virales (2, 98) et le rôle exact de plusieurs de ces protéines reste encore mal connu. Une étude protéomique récente réalisée dans notre laboratoire a consisté à analyser par spectrométrie de masse les particules virales purifiées. Les résultats obtenus ont permis d'identifier un ensemble de 23 protéines tégmentaires, 8 protéines de capsidie, 13 protéines d'enveloppe et plus de 49 protéines cellulaires incluant des protéines régulatrices du transport intracellulaire, de l'expression génique et d'autres protéines impliquées dans la réponse immunitaire (99, 100).

Les protéines du tégment jouent différents rôles durant le cycle viral, et plusieurs d'entre elles sont cruciales durant les étapes de l'infection. En effet, elles sont impliquées dans le transport des capsides via le recrutement des moteurs cellulaires (99, 102, 103), la régulation de l'expression des gènes viraux ou cellulaires (104, 105), l'assemblage des composants viraux durant l'infection (99), l'enveloppement des virions et la sortie. Ces protéines modulent aussi l'environnement de la cellule hôte en bloquant la synthèse des protéines cellulaires (2), et aussi en inhibant les réponses contre les mécanismes de défense antiviraux intrinsèques (62).

Protéine	Gène	Fonction	Localisation dans la capsid	Copies/capsid
VP5	UL19	Protéine majeure de la capsid	Les capsomères	995
VP23	UL18	Forme le triplex avec la protéine VP19C	Les triplexes	640
VP19C	UL38	Membre du triplex qui stabilise la capsid	Les triplexes	320
VP26	UL35	Interagit avec VP5, et impliqué dans l'assemblage de la capsid	La pointe du hexon	952
UL17	UL17	Forme un hétérodimère avec UL25 appelé CCSC	À l'extérieur sur plusieurs facettes	60
UL25	UL25	Forme un hétérodimère avec UL17 appelé CCSC	À l'extérieur sur plusieurs facettes	60
VP24	UL26	Assure l'activité protéolytique, clive le produit du gène UL26, (libère VP24 et VP21)	Intérieur (protéase clivée)	87-147
pUL6	UL6	Forme l'anneau du portal	Portal	12

Tableau 2 : Les protéines composantes de la capsid mature du virus HSV-1.

Le tableau est adapté de Baines, J. D. et al, 2006 (101).

Plusieurs études suggèrent que l'incorporation des protéines du tégument dans le virion est un processus ordonné et séquentiel qui se produit par de nombreuses interactions tout au long du processus d'assemblage du virus : interactions capsid-tégument, tégument-tégument, et tégument-enveloppe (106-110). Ainsi, les protéines tégumentaires sont classées selon leur association ou dissociation de la capsid tel que défini en différentes concentration de sels : les protéines du « tégument externe » se détachent aisément de la capsid, alors que les autres protéines qui restent rattachées et participent à son transport au noyau et appartiennent au

«tégument interne» (103, 111, 112). Les protéines tégumentaires pUL36/VP1-2, VP11/12, VP13/14, VP16, et VP22 sont abondantes et jouent un rôle dans la composition du virion. Pour ICP0 et ICP4, leur abondance est relativement faible, elles interagissent entre elles et régulent la cascade de l'expression des gènes viraux (113, 114). La composante structurale du tégument est la protéine transactivatrice VP16, elle joue un rôle clef dans l'inhibition de la répression hétérochromatinienne du génome viral et également dans la régulation transcriptionnelle des gènes IE (immédiats-précoces) déclenchant ainsi le cycle infectieux (115, 116). Elle joue un rôle essentiel dans la maturation et la sortie virale (117-119), et interagit avec plusieurs protéines du tégument incluant pUL36/VP1/2, pUL41/Vhs, UL46/VP11/12, UL47/VP13/14, et UL49/VP22 (109, 120-123), et avec le domaine cytoplasmique des glycoprotéines gB, gD, et gH (124-126). La protéine Vhs (UL41) est connue pour empêcher l'expression de certaines protéines de l'hôte en dégradant les ARN messagers (13). Les protéines Us3, pUL36 et pUL37 sont les seuls composants du tégument à rester associés à la capsidie après fusion à la membrane plasmique (127), et sont responsables du transport de la capsidie au noyau via le réseau des microtubules impliquant les moteurs dynéines, ces trois protéines sont appelées « protéines du tégument interne» (102, 103, 128).

2-5 L'enveloppe

L'enveloppe du virus HSV-1 se présente en une bicouche lipidique qui recouvre l'extérieur du virus mature, et qui semble dériver des compartiments cellulaires (129, 130). L'enveloppe virale est enrichie en sphingomyéline et en phosphatidylsérine, deux lipides caractéristiques des membranes du TGN (trans-Golgi network) (131). D'ailleurs, la plupart des études supporte l'hypothèse selon laquelle le TGN serait le site d'enveloppement final du virus HSV-1 (132-136). L'enveloppe du virus contient principalement les glycoprotéines virales (gB; gC; gD; gE;

gG; gH; gI; gJ; gK; gL; gM; gN), ainsi que quelques protéines virales associées comme (pUL20 et pUS9, pUL43, pUL45, pUL56) (3, 99, 107, 137-140). Certaines de ces glycoprotéines existent sous forme d'hétérodimères comme les deux complexes gH/gL, et gE/gI (141, 142). Ce dernier complexe est particulier car il lie les immunoglobulines G (IgG) en se liant à leur domaine Fc, ce qui a pour conséquence d'inhiber les fonctions de défense immunitaire (143-145). Toutes les glycoprotéines virales ne sont pas essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire, toutefois elles participent néanmoins à différentes étapes du cycle viral. Elles sont impliquées dans la fixation du virus et son entrée dans les cellules cibles (146-151). En effet, elles interagissent directement ou indirectement avec les récepteurs cellulaires, déclenchant ainsi la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte (152). Elles ont aussi des rôles importants dans l'enveloppement final du virus, la propagation du virus de cellule à cellule (149, 151), ainsi que dans l'évasion immunitaire durant l'infection (147, 153, 154).

3 Le cycle de réplication du virus HSV-1

HSV-1 est un virus enveloppé pantropique, qui a la capacité d'infecter les cellules épithéliales, immunitaires et neuronales (62). L'initiation de l'infection se fait par la fixation du virus aux récepteurs de la surface cellulaire, suivie par l'entrée du virus mature dans la cellule hôte. La capsid est alors transportée aux pores nucléaires, et ADN viral est libéré dans le noyau. Il y a par la suite la succession de plusieurs étapes clés incluant la transcription du génome viral, la synthèse de l'ADN viral et l'assemblage des capsides. Lorsque l'ADN viral est empaqueté dans la capsid, celle-ci sort du noyau via des étapes d'enveloppement et de dé-enveloppement, puis va être transporté au site final d'enveloppement pour acquérir sa membrane finale. Le virus mature est transporté par la suite à la surface cellulaire, il va alors fusionner avec la membrane

plasmique puis être libéré hors de la cellule (107, 108). Le processus complet du cycle de réplication virale dure environ 18 à 20 heures selon le type cellulaire (62) (**Figure 3**).

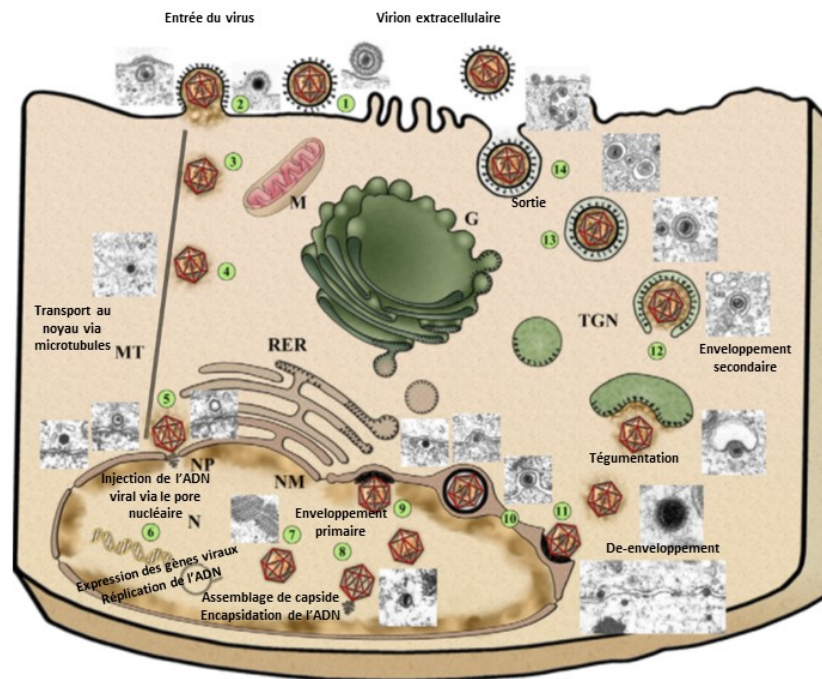


Figure 3 : Cycle de réplication viral du virus HSV-1.

Les structures cellulaires sont désignées comme suit : N : noyau, MT : microtubules, NP : pore nucléaire, NM : membrane nucléaire, TGN : trans-Golgi network (TGN), RER : reticulum endoplasmic rugueux, M : mitochondrie, G : appareil de Golgi. Cette image est une adaptation d'une figure originale de Mettenleiter, T. C. et al. (2009) (108).

3-1 La fixation et l'entrée

HSV-1 peut utiliser deux voies distinctes pour son entrée dans la cellule selon le type cellulaire qu'il infecte. L'entrée classique est basée sur la fusion directe entre l'enveloppe du virion et la membrane plasmique activée par la liaison aux récepteurs cellulaires, indépendamment du pH. Ce type de fusion a été observé dans les cellules Vero et Hep-2 (155, 156). HSV-1 utilise aussi

la voie de l'endocytose pour entrer dans les cellules, ce processus nécessite un environnement à faible pH dans les cellules épithéliales (Hela, CHO-K1 et les kératinocytes) (157-159) ou bien via un modèle d'endocytose indépendant du pH (mélanome de souris B78H1) (160). Dans la plupart des virus enveloppés, l'entrée dans la cellule nécessite la présence d'une ou deux glycoprotéines d'enveloppe. Toutefois le virus HSV-1 fait intervenir cinq glycoprotéines virales gB, gC, gD et gH/gL qui sont nécessaires et suffisantes pour la fixation et la pénétration du virus dans les cellules (**Tableau. 3**)(148, 161).

Glycoprotéine	Sa fonction	Ses récepteurs cellulaires
gC	Impliquée dans la fixation initiale du virus à la surface de la cellule via sa liaison au récepteur cellulaire. Stabilise l'interaction entre gD et son récepteur cellulaire.	Le sulfate d'héparane
gD	Joue un rôle important dans l'initiation de la fusion : 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.	HVEM La nectine 1 et 2 les héparanes 3-O-sulfatés
gH-gL	Régule l'activité fusogénique en formant un complexe avec gB.	Les intégrines
gB	Catalyse la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique entraînant la libération de la capsid virale dans le cytoplasme.	Le sulfate d'héparane DC-SIGN PILR α MAG NMMHCIIA

Tableau 3 : Les glycoprotéines impliquées lors de l'entrée du virus HSV-1 et leurs récepteurs cellulaires

L'initiation de la fixation aux cellules se fait par l'interaction des glycoprotéines gC et gB avec les glycosaminoglycanes (héparane sulfates) (HSPG) de la surface cellulaire (162, 163). Bien que la fixation de virus par la glycoprotéine gC semble améliorer considérablement la capacité

du virus à infecter, elle n'est toutefois pas essentielle pour l'entrée du virus et la réplication (164). La fixation du virion à la membrane cellulaire est stabilisée par l'interaction de la glycoprotéine gD avec un de ses récepteurs cellulaires ; la Nectine-1, la Nectine-2, les héparine-sulfates modifiées (3-OS-HS), et l'herpès virus entry mediator (HVEM) (3, 165-167). De telles interactions semblent favoriser la fusion, mais gD n'est pas considérée comme une protéine fusogénique. Son rôle est plutôt de réguler l'activité fusogénique de la glycoprotéine gB possédant de nombreuses caractéristiques des protéines de fusion virale (152, 168, 169). La résolution de la structure de la glycoprotéine gD de HSV-1 a montré qu'elle possède deux conformations : en absence du récepteur, sa conformation est fermée, tandis que lorsqu'elle interagit avec son récepteur, elle semble avoir une conformation ouverte et active. gD va alors subir un changement de conformation permettant l'activation de gB et du complexe gH/gL déclenchant ainsi la machinerie nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte (**Figure 4**) (147, 161). Le mécanisme exact reste encore mal compris, mais on sait que la région N-terminale de gD interagit avec les récepteurs cellulaires provoquant la libération de son domaine C-terminal, qui va activer le complexe gB et gH / gL, provoquant ainsi la fusion membranaire (14).

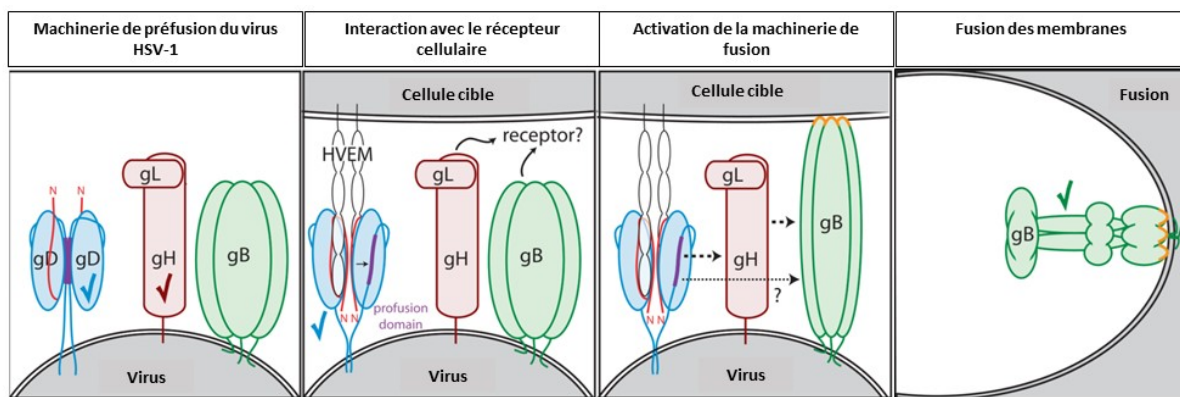


Figure 4 : Fusion du virus HSV-1 avec une cellule cible à la membrane plasmique.

La glycoprotéine gD forme un dimère, et les régions proches de l'extrémité amino-terminale (rouge) bloquent le site de liaison au récepteur. Après, que gD soit lié à HVEM, l'extrémité N-terminale de gD forme une boucle et déplace l'extrémité carboxy-terminale qui contient le domaine de pro-fusion. La nectine 1 (non représentée ici) peut également se lier à un site chevauchant sur gD et déplacer l'extrémité C-terminale d'une manière similaire. Le trimère gB, et l'hétérodimère gH/gL se lient également à des récepteurs cellulaires. Les différents sites du domaine de la pro-fusion de gD interagissent avec gH/gL et gB, qui peuvent interagir entre eux en réponse à la liaison de gD à son récepteur. Cette interaction provoque un changement de conformation de gD déclenchant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la MP via l'activation de gB et du complexe gH/gL. Image adaptée de Connolly, S. et al. (2011) (152).

3-2 Transport du virus au noyau

Après que la capsid et son tégument soient relâchés dans le cytoplasme, ce complexe doit se déplacer au noyau afin de libérer le génome viral. Plusieurs protéines du tégument tel que (VP12/13 et VP16) (114, 170) se dissocient immédiatement de la capsid après phosphorylation par les kinases virales (UL13 et Us3) et/ou cellulaires (114, 171), tandis que d'autres restent plus étroitement attachées tel que VP1/2 (UL36), UL37 et VP11/12 (172, 173). Les protéines qui se sont dissociées vont commencer à altérer les fonctions cellulaires afin de favoriser la propagation du virus (132, 146). Parmi elles on trouve la protéine virale pUs3 qui bloque l'apoptose par l'inactivation d'un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, et la protéine virale vhs qui régule négativement les récepteurs cellulaires du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et dégrade les ARNm cellulaires, ce qui permet d'échapper à la réponse immunitaire amorçant ainsi la synthèse des protéines virales (174-176).

Le cytoplasme se caractérise par une densité élevée (protéines, organelles, cytosquelette) ce qui rend la diffusion passive de la nucléocapsid au noyau pratiquement inenvisageable. Le virus met alors à son profit la machinerie cellulaire en utilisant les moteurs moléculaires associés aux microtubules pour transporter sa capsid vers le complexe des pores nucléaires (NCP) (177-

179). La présence du tégument interne augmente l'efficacité du transport de la capsidie vers le noyau (111). En effet, il a été démontré que le transport de la capsidie au noyau est dirigé vers l'extrémité négative des microtubules via l'interaction des protéines VP1/2 (UL36) et UL37 avec la dynéine et/ou la dynactine (103, 180-182). Cela requiert également la présence de d'autres protéines cellulaires telle que heat shock protein 90 (Hsp90), ainsi que certaines protéines du tégument (183).

Lorsque les capsides arrivent au noyau, elles s'accumulent au niveau de l'enveloppe nucléaire puis s'associent au complexe des pores nucléaires qui sert de passage pour l'injection du matériel génétique viral dans le noyau. Cette association nécessite l'intervention d'un mécanisme dépendant de l'importine β et de la Ran-GTP (179). Les études réalisées ont démontré que la présence de la protéine VP1/2 (UL36) est importante pour la libération de l'ADN viral aux pores nucléaires (184). En effet, la protéine VP1/2 (UL36) contient à son extrémité Nt un signal de localisation nucléaire qui semble être important pour les événements précoces et tardifs de réplication virale (185). De plus, l'association de la capsidie avec les pores nucléaires nécessite l'interaction de pUL36, pUL37 et pUL25 (bouchon du portal) (117, 186-188) avec l'importine- β (179), CAN/Nup214, hCG1, et Nup358 (172, 189). L'association entre le portal de la capsidie et le pore nucléaire se ferait par l'interaction d'UL25 avec VP1/2 (UL36) et UL6 (portal) ce qui va entraîner la libération de l'ADN viral à l'intérieur du noyau (112, 190, 191). En outre, il a été démontré que le clivage protéolytique de la protéine VP1/2 (UL36) est important pour la libération de l'ADN (191). Les protéines du tégument telles que VP16, VP13/14 (UL47), et la protéine VHS (UL41) sont transloquées au noyau (192).

3-3 Régulation de l'expression génique

3-3-1 Transcription des gènes immédiats-précoces

HSV-1 joue un rôle majeur dans notre compréhension actuelle de la régulation des gènes eucaryotes. Comme d'autres virus à ADN, le noyau est précisément l'endroit où a lieu la transcription de l'ADN viral du virus HSV-1. Ceci entraîne une réorganisation du noyau provoquant l'augmentation de sa taille, la condensation de la chromatine, la disruption du nucléole et des structures nucléaires (ND-10), ainsi que la destruction de lamina nucléaire lors des étapes tardives de l'infection (14).

Le virus HSV-1 exprime deux types de protéines, les protéines non structurales impliquées dans la réplication de l'ADN viral et les protéines de structure qui forment le virion et une partie de l'enveloppe virale (74). Il a la particularité d'utiliser l'ARN polymérase II (pol II) de la cellule hôte pour la transcription de tous ses gènes viraux et les ARNm transcrits sont par la suite transférés au cytoplasme pour la synthèse des protéines virales (193, 194). Au cours du cycle infectieux, l'expression de plus de 80 gènes individuels du virus HSV-1 se déroule de manière séquentielle et rigoureusement régulée (18, 195). L'expression des gènes viraux est décrite comme une cascade temporelle de transcription et de traduction de trois groupes de gènes classés selon leur apparition dans le temps. Les premiers sont les gènes immédiats-précoces (IE ou α), les seconds sont les gènes précoces (E ou β), et en dernier les gènes tardifs (L ou γ) (196, 197) (**Figure 5**). Pour la transcription de gènes α immédiats précoces (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, et ICP47), elle se produit en absence de toute synthèse *de novo* de protéines virales. Toutefois, la présence de la protéine transactivatrice VP16 (UL48) est importante (198). Cette protéine présente dans le tégument migre également jusqu'au noyau, mais indépendamment de la capsid. Plus précisément, la protéine VP16 interagit avec le facteur cellulaire (HCF-1) au cytoplasme

permettant ainsi sa translocation au noyau. Par la suite, VP16 s'associe au facteur de transcription (OCT1) conjointement avec la protéine (HCFC-1) formant ainsi un complexe qui reconnaît et se lie spécifiquement à une séquence consensus dans les promoteurs des gènes (IE), ce qui va induire l'activation de la transcription par l'ARN polymérase II (199, 200). La synthèse des protéines (IE) atteint son niveau maximal entre 2 et 4 heures après l'infection, ces protéines vont alors stimuler la transcription des gènes précoces et tardifs. Les protéines ICP0, ICP4 et ICP27 sont des transactivateurs puissants pour la transcription des gènes précoces (E) et tardives (L), tandis que la protéine virale ICP22 stimule seulement la transcription des gènes tardifs (L)(201). La protéine ICP47 inhibe la présentation des peptides associés aux molécules du CMH de classe I, bloquant ainsi la réponse immunitaire adaptative de l'hôte (202, 203). En effet, la plupart des protéines codées par les gènes (IE) sont multifonctionnelles et jouent plusieurs autres rôles durant le cycle viral, entre autres, la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, la transcription cellulaire, les réponses antivirales, l'inhibition de l'épissage alternatif des ARNm cellulaires, le transport des ARNm viraux hors du noyau, la régulation de l'expression des gènes viraux (IE et E) (203-208).

3-3-2 Transcription des gènes précoces

La synthèse des protéines immédiates-précoces (IE ou α) active la transcription des gènes précoces (E ou β), qui sont essentiels et suffisants pour induire la réplication virale à partir des sites de réplication (209-212). L'expression maximale de ces gènes est entre 4 et 8 heures après l'infection. Les protéines β sont en nombre de sept ; (pUL9, pUL29, pUL30, pUL42, pUL5, pUL8 et pUL52) et sont majoritairement des enzymes qui sont impliquées dans la synthèse et la réplication du génome viral ainsi que le métabolisme des nucléotides (196): On trouve le

complexe hélicase-primase composé d’pUL5, pUL8 et pUL52, la protéine liant l’ADN linéaire simple brin (ICP8/pUL29), l’ADN polymérase virale formée de pUL30 et pUL42, et la protéine de liaison au site d’origine de la réplication (pUL9). Il existe aussi des gènes (E ou β) qui nécessite un temps plus long pour s’exprimer et dont l’activation dépend de l’expression des protéines (IE ou α), comme le gène UL23 codant pour la thymidine kinase (TK) virale (18, 213, 214).

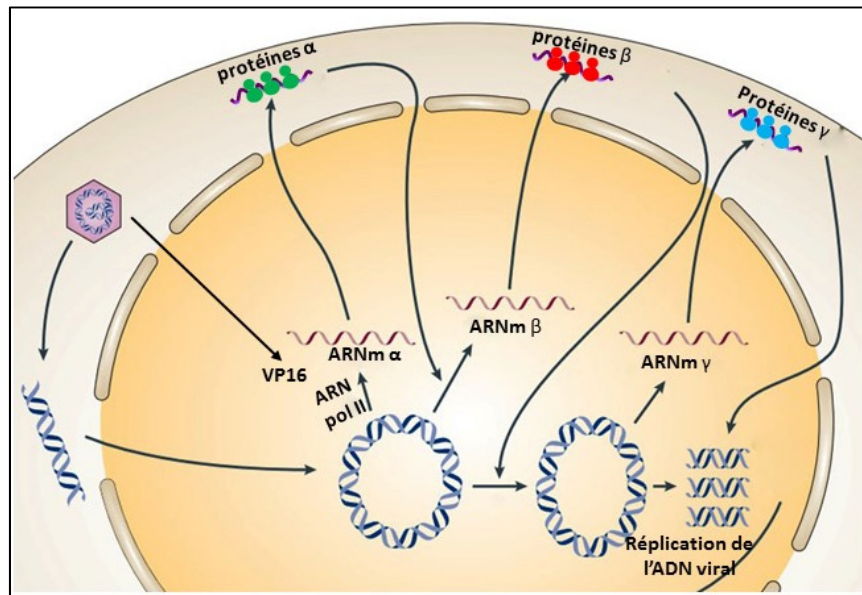


Figure 5 : Cascade d’expression des gènes viraux

Le génome viral est injecté dans le nucléoplasme via les pores nucléaires puis circularisé. Il y a par la suite expression des gènes α induite par l’ARN polymérase 1 et la liaison de VP16 aux promoteurs de gènes. Ceci va mener à l’expression des gènes β qui vont induire la réplication du génome et par la suite l’expression des gènes γ , comprenant les protéines structurales. Image adaptée de Knipe et al. (28).

3-3-3 Transcription des gènes tardives

Les gènes dits tardifs (L ou γ) sont les derniers gènes à s’exprimer dans la cascade de l’expression génique du virus HSV-1. L’initiation de la transcription de ces gènes dépend de

l'expression des protéines virales ICP4 ICP22 (US1.5) et ICP27, toutefois les mécanismes n'ont pas été complètement élucidés (215). Les gènes (L ou γ) sont exprimés à un niveau élevé après l'initiation de la réplication de l'ADN viral, et codent principalement pour des protéines structurales du virion, des composants du tégument et des glycoprotéines (195, 216, 217). Ils sont impliqués dans différentes étapes du cycle viral incluant l'assemblage du virus, la maturation, et la sortie. Ces gènes sont divisés en deux groupes ; les gènes dits « leaky late » ou γ_1 comme (ICP5, ICP34.5 gB, et gD) sont exprimées relativement tôt avant même la réplication de l'ADN, mais en très faible quantité, toutefois leur niveau d'expression augmente substantiellement lors la réplication virale. Pour leur part, les gènes γ_2 ou « true late », (UL11, UL36, UL20, gK, UL41, gC, UL38) sont exprimés tardivement et leur l'expression dépend complètement de la réplication de l'ADN viral (201, 218, 219).

3-4 Réplication de l'ADN viral

L'infection par le virus HSV-1 conduit à un remodelage du noyau de la cellule hôte. En effet, lorsque les protéines précoces (E ou β) sont exprimées, celles-ci donnent le signal du début de la réplication. À ce stade l'ADN viral parental s'accumule dans des sites spécialisés (sites pré-réplicatifs) localisés près des sites nucléaires ND10 du noyau (220, 221), alors que la chromatine cellulaire se condense à la périphérie du noyau et se dégrade (73, 222). La synthèse de l'ADN viral commence dès 3 heures après l'infection (3 hpi) et continue pendant au moins 12 heures (223). Le génome viral se circularise et la réplication précoce de l'ADN viral est initiée aux sites d'origine de réplication (OriS et OriL) par un mécanisme de réplication appelé θ (**Figure 6**). Mais plus tard, le mode de réplication circulaire (rolling circle) domine (73, 224) formant ainsi plusieurs copies de l'ADN viral assemblées en concatémères, lesquels seront ensuite clivés en

monomères durant le processus d'empaquetage de l'ADN viral (14, 74, 225). Le génome HSV-1 code pour sept protéines essentielles pour la réplication de l'ADN viral. La protéine de liaison d'origine U_L9, la protéine de liaison à l'ADN monocaténaire ICP8 (U_L29) (226, 227), les deux sous-unités de l'ADN polymérase : une sous-unité catalytique (pol) (U_L30) de 136 kDa (223), une sous-unité plus petite (U_L42) de 65 kDa (209), et le complexe hélicase primase composé de (U_L5/U_L52/U_L8) (226-228). Les enzymes et les facteurs cellulaires de l'hôte peuvent également être impliqués dans la synthèse de l'ADN viral, et comprennent la primase, l'ADN ligase et la topoisomérase II (229-231), ainsi que plusieurs composants des systèmes de réparation de l'ADN et de recombinaison homologue (214). De plus, la protéine cellulaire chaperonne Hsp90 s'est avérée essentielle pour la réplication virale, car son inhibition entraîne la localisation de l'ADN polymérase virale au cytoplasme et par conséquent l'altération de la réplication de l'ADN viral (232). D'autres protéines virales, quoique non essentielles, permettent une réplication efficace du virus, et participent au métabolisme nucléotidique, tel que la thymidine kinase (U_L23), la ribonucléotide réductase (U_L39, U_L40), la désoxyuridine triphosphate (U_L50), l'uracile-glycosylase (U_L2) et la nucléase alcaline (U_L12). Ces molécules sont importantes pour la réparation de l'ADN viral, car l'expression des enzymes cellulaires hôtes correspondantes est inhibée pendant l'infection (14).

Le mécanisme de réplication de l'ADN viral du virus HSV-1 se déroule selon le modèle suivant : Tout d'abord, la protéine U_L9 sous forme de dimère se lie à des séquences spécifiques présentes dans (OriS et OriL). En effet, grâce à son activité hélicase, elle initie le déroulement et la séparation des brins d'ADN, ce qui permet le recrutement de la protéine ICP8 qui se lie à l'ADN simple brin. Ensemble, ces deux protéines ont la capacité de recruter les cinq autres protéines impliquées dans la réplication de l'ADN au niveau des sites de réplication (U_L5/U_L52, U_L8,

UL30, UL42). Le complexe hélicase-primase composé de UL5, UL8, et UL52 (233) s'assemble au complexe d'ADN polymérase viral (UL30 et UL42) (234) au niveau de la fourche de réplication (225), permettant ainsi l'initiation des cycles de réplication en mode θ . Plus tard, et par un mécanisme encore inconnu, un deuxième type de réplication se produit et est appelé (cercle roulant) pour lequel la protéine UL9 n'est pas requise, ce qui indique que les événements d'initiation *de novo* ne sont plus nécessaires pour une réplication continue (235). La réplication en cercle roulant forme des concatémères qui sont clivés et emballés dans les capsides préassemblées (18, 223, 236).

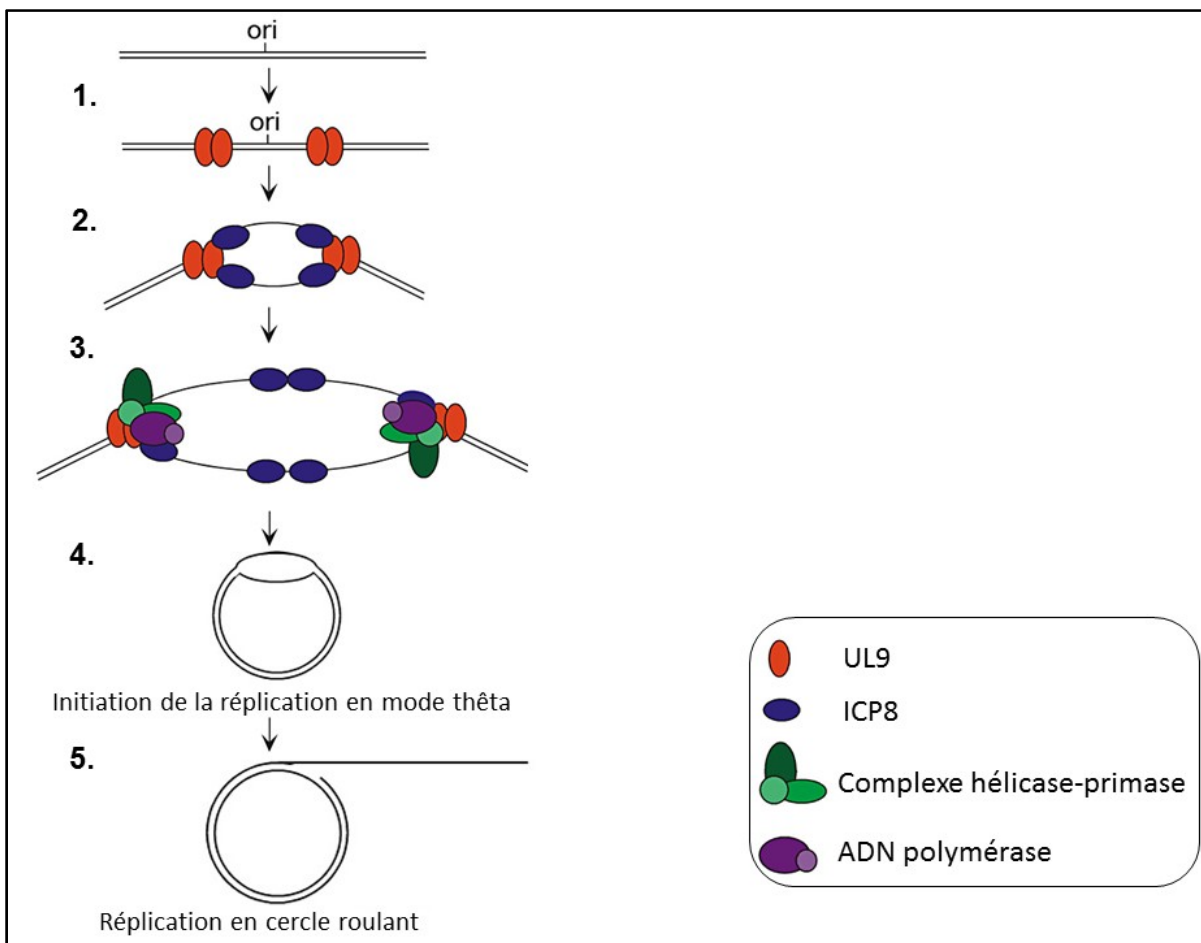


Figure 6 : Schéma de la réplication de l'ADN du HSV-1

1. Le cycle réplcatif débute par la liaison d'U_L9 à des sites spécifiques sur l'ADN viral (ori_L ou ori_S) et initie le déroulement de l'ADN. 2. La seconde protéine de liaison ICP8 est alors recrutée et se lie à l'ADN simple brin. 3. ICP8 et U_L9 recrutent ensuite le complexe hélicase-primase (U_L5, U_L8 et U_L52) et l'ADN polymérase (U_L30 et U_L42). 4. La synthèse de l'ADN débute et se poursuit via un mécanisme de réplication en cercle roulant 5. Figure modifiée de Taylor et al, 2002 (74).

3-5 Assemblage et encapsidation

L'assemblage des capsides virales de HSV-1 se déroule dans le noyau. En effet, lors de la réplication du génome, les gènes tardifs (E , γ) sont transcrits incluant ceux qui codent les protéines de la capsidie du virus. Ces protéines qui composent la capsidie sont synthétisées dans le cytoplasme puis relocalisées au noyau des cellules infectées où la capsidie est assemblée (3). La capsidie est formée principalement de quatre protéines virales : VP5 (U_L19), VP19C (U_L38), VP23 (U_L18) et VP26 (U_L35). Certaines de ces protéines, telles que VP5, VP26 et VP23, ne possèdent pas de signaux de localisation nucléaires et doivent former des complexes dans le cytoplasme. Elles interagissent avec la protéine de la capsidie VP19C ou avec la protéine d'échafaudage pré-VP22a pour être transportées au noyau (237-239).

La protéine VP26 est localisée au noyau uniquement lorsqu'elle est exprimée avec VP5 et VP19C ou avec pré-VP22a. La protéine VP23 devient nucléaire en présence de VP19C (240, 241). La protéine portal U_L6 s'incorpore au complexe en interagissant avec préVP22a (91, 242). Le triplex formé des protéines VP23 et VP19C s'ajoute à la capsidie pendant la formation des pentons et des hexons (243, 244), menant ainsi à la formation de procapsides sphériques immatures (89). Celles-ci diffèrent de la capsidie mature par sa forme plus relâchée et donc plutôt sphérique qu'icosaédrale et s'angularisent suite à l'entrée de l'ADN viral. Une fois que l'assemblage de la procapsidie est terminé, la protéase VP24 est activée et déclenche la

maturation de la capside. VP24 se détache d'abord de la protéine d'échafaudage pré-VP22a et la clive en protéine VP22a. Le clivage protéolytique des protéines d'échafaudage permet un contact direct entre les capsomères et provoque un changement conformationnel de la capside. Ainsi, la forme sphérique de la capside se transforme en structure icosaédrique stable prête à empaqueter l'ADN viral (**Figure 7**) (77, 245, 246).

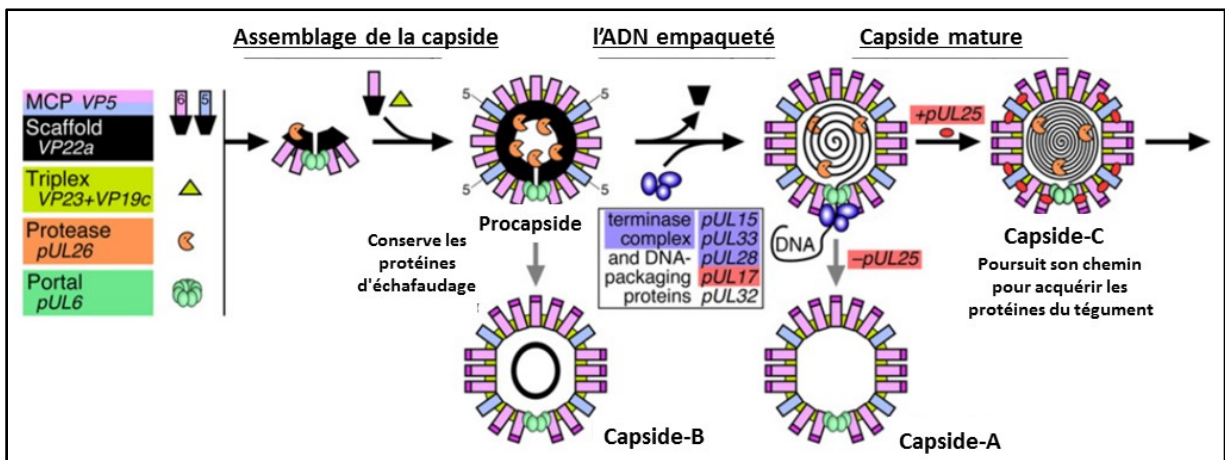


Figure 7 : Les étapes d'assemblage de la capside du virus HSV-1.

Figure adaptée de Homa et al. 2013 (247).

Trois types de capsides nucléaires ont été identifiés par ultracentrifugation dans des gradients de sucrose (248). Les capsides C sont les capsides matures qui ont incorporés l'ADN viral formant ainsi des virions infectieux et ceci à travers le bourgeonnement au niveau de la membrane nucléaire. Elles sont dépourvues des protéines VP22a, VP21, et VP24 (248-250). Les capsides de type B ont acquis la forme icosaédrique, mais ne possèdent pas d'ADN. L'échec de l'empaquetage de l'ADN est dû au fait que ces capsides B conservent encore les protéines d'échafaudage clivées (VP21 et VP22a, et VP24) (251, 252). Quant à la capside A, elle ne possède pas d'ADN et est dépourvue d'une quantité significative de protéines d'échafaudage

VP21, VP22a et VP24 (101, 253, 254). Les capsides A et B sont considérées comme des capsides abortives et ne sont pas infectieuses. D'autres protéines virales, telles qu'UL6, UL15, UL17, UL25, UL26, UL26.5, UL28 et UL33, interviennent dans le processus d'encapsidation de l'ADN viral. Ces protéines peuvent cliver spécifiquement le concatémère d'ADN viral en monomères, et ont la capacité de stabiliser le génome viral à l'intérieur de la capsid afin d'empêcher une sortie non contrôlée. Les capsides matures C vont par la suite sortir du noyau afin de poursuivre l'infection (255-259).

4 Transport du noyau au cytoplasme

4-1 Sortie nucléaire

Après l'assemblage des nouvelles capsides et l'empaquetage du génome viral, les capsides formées continuent leur processus de maturation pour acquérir les protéines tégumentaires et l'enveloppe requise afin de devenir des particules virales matures pour être ensuite relâchées hors de la cellule. Pendant la sortie nucléaire des capsides, ces dernières doivent franchir plusieurs barrières physiques au sein de la cellule hôte. Plus explicitement, le virus doit traverser les deux membranes nucléaires avant d'acquérir l'enveloppe finale, par un processus qui n'est toujours pas totalement défini et qui reste encore controversé. En effet, il existe trois modèles qui tentent d'expliquer la sortie des capsides du noyau ainsi que leur transport à la membrane plasmique (**Figure 8**).

La première voie ou le modèle luminal suggère que les nucléocapsides bourgeonnent avec la MNI. Ces virions enveloppés se forment à l'intérieur de l'espace périnucléaire, puis vont se déplacer - tout en gardant l'enveloppe acquise à la membrane nucléaire interne - vers la lumière

du réticulum endoplasmique qui est continu avec l'enveloppe nucléaire, suivi d'un transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi et le TGN par la voie classique de biosynthèse. Ces vésicules voyageront par la suite jusqu'à la membrane plasmique puis le virus sera relâché par les voies de sécrétions normales de la cellule (2, 74, 260, 261). Les études qui critiquent ce modèle avancent que les virions matures ne possèdent pas les protéines UL31 et UL34 qu'on retrouve dans les téguments des virions nucléaires (262-264). En plus, ce modèle n'explique pas la présence des capsides nues au cytoplasme (62, 265). De plus, il a été rapporté que la composition protéique et lipidique de l'enveloppe des virions matures est différente de celle des virions périnucléaires enveloppés.

Le second modèle a été proposé afin d'expliquer le transport des capsides assemblées dans le noyau. Il s'agit du « modèle des pores élargis ». Ce modèle propose que les pores nucléaires se dilatent par un processus actif durant l'infection, pour atteindre une taille qui permet le passage direct des capsides. Une fois dans le cytoplasme ces capsides nues vont ensuite bourgeonner avec l'un des compartiments cellulaires telles que l'espace périnucléaire, le RE, l'appareil de Golgi ou le TGN. L'hypothèse de ce modèle se base exclusivement sur l'observation en microscopie électronique (EM) d'espaces dans l'enveloppe nucléaire qui sont 10 fois plus larges dans les cellules infectées (266-268). Les auteurs les interprétèrent alors comme des pores nucléaires dilatés. Toutefois, il a été démontré que les pores nucléaires gardent leur intégrité même à un stade tardif de l'infection (269).

Finalement le troisième modèle correspond au modèle d'enveloppement / dé-enveloppement / ré-enveloppement est le plus couramment accepté par la communauté scientifique car il supporte les différentes évidences morphologiques et biochimiques rapportées dans la littérature (131, 262, 263, 265, 270). Il stipule que les nucléocapsides bourgeonnent avec la membrane

nucléaire interne (MNI) et se retrouvent enveloppées dans l'espace périnucléaire. Ensuite, ces nouveaux virus enveloppés fusionnent avec la membrane nucléaire externe (MNE), permettant la translocation des nucléocapsides nues dans le cytoplasme des cellules infectées. Finalement, ces capsides acquièrent leur enveloppe finale au TGN par une voie non classique de transport au sein de la cellule.

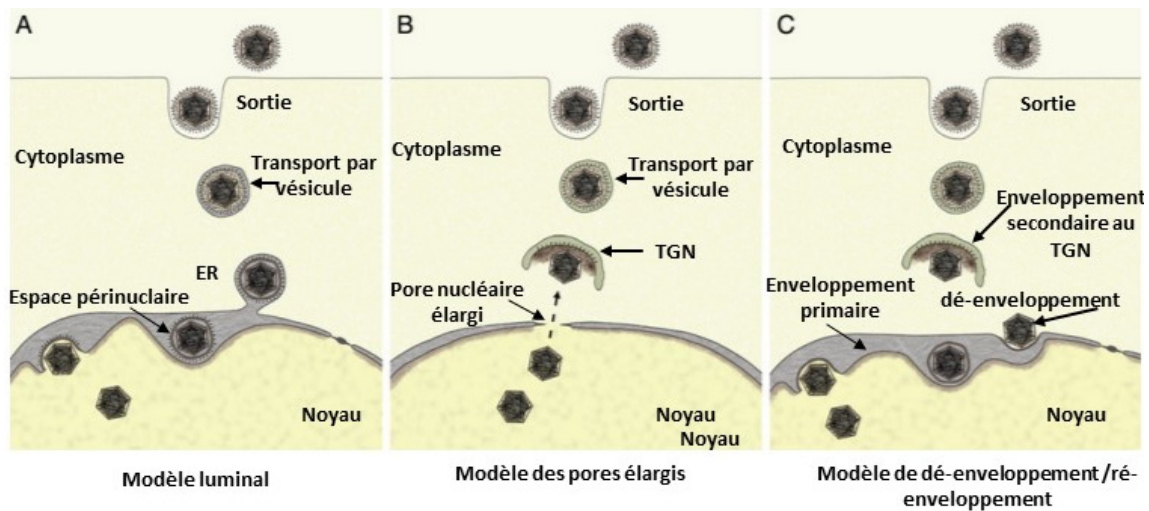


Figure 8 : Modèles de sortie cellulaire

Lors de l'enveloppement primaire, les capsides s'approchent de la MNI via les filaments d'actine, et doivent dépolymériser le réseau de lamina nucléaire qui forme une première barrière et empêche les capsides d'accéder à la membrane nucléaire interne. Pour ce faire, le complexe de sortie nucléaire (NEC) composé des protéines virales pUL31 et pUL34 recrute des protéines kinases cellulaires (PKC) pour phosphoryler la lamine B et ainsi causer le désassemblage de la lamina (271-274). Il y a aussi l'intervention des kinases virales pUL13 et pUs3, qui catalysent la phosphorylation de la lamine A et C menant ainsi à la dissolution de la lamina nucléaire (271, 272). La protéine tégmentaire VP16 est recrutée par les nucléocapsides qui vont bourgeonner à la MNI, entraînant ainsi des virions enveloppés primaires dans l'espace périnucléaire (270). La protéine UL11 a également été proposée pour avoir un rôle dans l'enveloppement primaire et

augmenter l'efficacité de l'enveloppement à cette étape (275). Il a été constaté aussi que gD, gB, gM, Us3 et VP22 peuvent également être détectés dans les virions primaires suggérant un rôle potentiel de ces protéines lors de cette étape (276, 277). Lors de l'étape de dé-enveloppement, les virions fusionnent avec la MNE et sont libérés dans le cytoplasme. Cependant, les mécanismes moléculaires de ce processus de fusion au noyau ne sont pas encore bien élucidés. Certaines recherches démontrent que les glycoprotéines virales gB, gD et gH/gL impliquées dans la fusion lors de l'entrée du virus ne jouent pas un rôle significatif dans le dé-enveloppement. En effet, il a été rapporté que la suppression de seulement gB ou gD n'affecte pas le processus de dé-enveloppement, toutefois, la double délétion des deux glycoprotéines entraîne l'accumulation des nucléocapsides dans l'espace périnucléaire et bloque leur sortie nucléaire (262, 278). La protéine du tégument pUs3 semble s'associer aux virions périnucléaire (276), sa délétion cause également une accumulation des nucléocapsides de l'enveloppement primaire au site périnucléaire suggérant ainsi un rôle lors du dé-enveloppement (279). Ces résultats indiquent que le mécanisme de fusion du virus lors de l'entrée est différent de celui qui se passe durant le processus de dé-enveloppement, ce dernier nécessitant probablement l'implication d'autres molécules. D'autres études ont rapporté l'association des glycoprotéines gM et gC avec les virions périnucléaires, toutefois leur rôle fonctionnel dans la sortie nucléaire n'a pas encore été démontré (277, 280-282). La plupart des résultats expérimentaux sur la sortie virale supportent le modèle d'enveloppement et de dé-enveloppement, suggérant qu'après la traversée de la double membrane nucléaire, les capsides se retrouvent au cytoplasme, vont poursuivre leurs processus de maturation et acquièrent les dernières composantes du virion, le tégument et l'enveloppe virale (131, 283-286)

4-2 Tégumentation

Les mécanismes moléculaires qui sont responsables de l'incorporation des protéines tégumentaires à la nucléocapside ne sont pas encore bien compris (287). La tégumentation semble se produire à différentes étapes durant le processus de sortie (noyau, membrane nucléaire, cytoplasme) (188). De plus, plusieurs études ont démontré que les protéines du tégument contiennent toutes les fonctions nécessaires pour le bourgeonnement au site d'enveloppement final, d'où la nécessité de mieux comprendre ce processus (288-290).

Le tégument est considéré comme étant une structure amorphe (286), cependant la tégumentation, par l'ajout des couches de protéines à la capsidite durant l'assemblage du virus, semble être un processus hautement ordonné (291). La couche interne de tégument est une structure filamenteuse composée de pUL36/VP1/2 et pUL37. Il a été démontré que ces deux protéines interagissent entre elles et forment un complexe (109, 292) et sont essentielles à la maturation du virus (293-295). Les protéines du tégument interagissent avec la capsidite d'un côté et avec les queues cytoplasmiques des glycoprotéines de l'autre côté, ce qui permet de lier ces composants structurels pour le processus final d'enveloppement et afin de maintenir l'intégrité de la particule virale (188). La protéine VP1-2/UL36 s'attache également aux pentons de la capsidite (296) et interagit avec la protéine majeure de la capsidite VP5 (81) et également avec la protéine UL25 en collaboration avec UL37, ce qui permettra l'assemblage des couches suivantes du tégument (297).

La suite des étapes de l'assemblage de tégument n'est pas encore bien définie. Les protéines abondantes du tégument telles qu'UL46, UL47, UL48 et UL49, représentent des candidats structurels (217, 298). Une étude récente dans notre laboratoire montre que pUL36/VP1/2, UL37, ICP0 et ICP4 sont des composants du tégument primaire (287). La protéine VP16 (UL48)

interagit avec les autres composants du tégument UL41 (VHS) et UL49 (109, 120, 121). Une autre étude démontre que VP16 interagit aussi avec les glycoprotéines gB, gD et gH (299). Ces données suggèrent que VP16 joue un rôle essentiel dans la formation du tégument externe en connectant plusieurs protéines virales entre-elles (119). Finalement, le tégument du virion mature extracellulaire devient encore plus compliqué puisqu'une étude récente au laboratoire a montré qu'il contient au moins 23 protéines virales différentes, et jusqu'à 49 protéines cellulaires (99).

4-3 Enveloppement secondaire

Lors de l'enveloppement secondaire, les capsides voyagent jusqu'au TGN, où elles vont acquérir leur enveloppe finale ainsi que plusieurs glycoprotéines virales qui vont s'incorporer de façon à ce que leur queue cytoplasmique soit en contact avec les protéines du tégument (182, 300-302). Le processus qui explique clairement le transport des capsides cytoplasmiques vers le site d'enveloppement n'est pas encore bien connu. Certains suggèrent un rôle important des protéines UL36 et UL37 lors de cette étape (303). Ce transport au TGN semble se faire via le réseau des microtubules impliquant les moteurs kinésines. En effet, des études rapportent qu'UL36 et UL37 recrutent ces protéines motrices en restant associées aux capsides durant la sortie (182, 300, 301, 304). Par ailleurs, plusieurs glycoprotéines identifiées dans les particules virales matures contiennent dans leurs domaines cytoplasmiques des séquences de ciblage qui sont responsables de leur localisation au site d'enveloppement, le TGN. Par exemple, les motifs à base de tyrosine semblent avoir un rôle important dans l'endocytose de ces protéines ainsi que leur localisation au site final d'enveloppement, et ceci via des interactions avec des adaptateurs de clathrine (305). En effet, ce motif fonctionnel a été identifié dans le domaine cytoplasmique des glycoprotéines gM, gK et UL20 qui sont toutes localisées au TGN (306, 307). D'autres ont

montré que ce motif est également présent dans les protéines d'enveloppe gB et gE (308-310). Cependant, les protéines virales d'enveloppe gD, et gH/L ne contiennent aucune séquence de ciblage connue, et sont localisées à la membrane plasmique lorsqu'elles sont exprimées en absence de toutes autres protéines virales (146). Toutefois, elles sont transportées au site final d'assemblage via l'interaction avec des protéines virales contenant les motifs de ciblage (311). Bien que le mécanisme d'enveloppement final ne soit pas bien défini, la plupart des études qui ont été faites à ce sujet ont révélé l'implication des glycoprotéines dans l'enveloppement final du virus. Ces études sont basées sur le phénotype induit lors de l'infection avec des virus mutants contenant des délétions de certaines glycoprotéines. En effet, la délétion de plusieurs glycoprotéines pourrait affecter l'enveloppement secondaire du virus, mais cela dépendait d'une combinaison spécifique de glycoprotéines et dans des virus différents de la famille des *Herpesviridae*. Ainsi la mutation de gM ou du complexe gE/gI n'a pas d'effet sur l'enveloppement d'HSV-1 (312, 313), alors que la délétion simultanée de gM et gE/gI du virus PRV entraîne des défauts dans l'enveloppement final (314, 315). L'effet le plus sévère sur l'enveloppement final du virus HSV-1 a été observé lors de l'infection des cellules avec des virus délétés de gK, ou de UL20. Il en résulte une accumulation importante de capsides non enveloppées dans le cytoplasme de ces cellules infectées, ainsi qu'une absence marquée de virus extracellulaire (316, 317). Plus précisément, le domaine C terminal de la protéine UL20 semble être impliqué dans l'enveloppement des capsides (151). D'autre part, la délétion du gène UL11 cause des défauts mineurs dans la sortie des capsides tandis que la délétion simultanée d'UL11 et gM provoque une inhibition drastique de leur enveloppement (313). Finalement, il a été montré récemment que la protéine VP22 forme un complexe avec les glycoprotéines gD, gM et gE en interagissant avec leur domaine cytoplasmique (318, 319), le complexe d'hétérodimère

gK/UL20 interagit avec gM et gB (320-322), et la glycoprotéine gE forme un complexe protéique avec les protéines virales UL11, UL16 et UL21 (323, 324) (**Figure 9**). Globalement, durant l'enveloppement final du virus, se produit un réseau complexe d'interactions entre les glycoprotéines ancrées à la membrane plasmique et les protéines du tégument liées à la capside, Ces interactions semble favoriser le processus d'enveloppement des capsides.

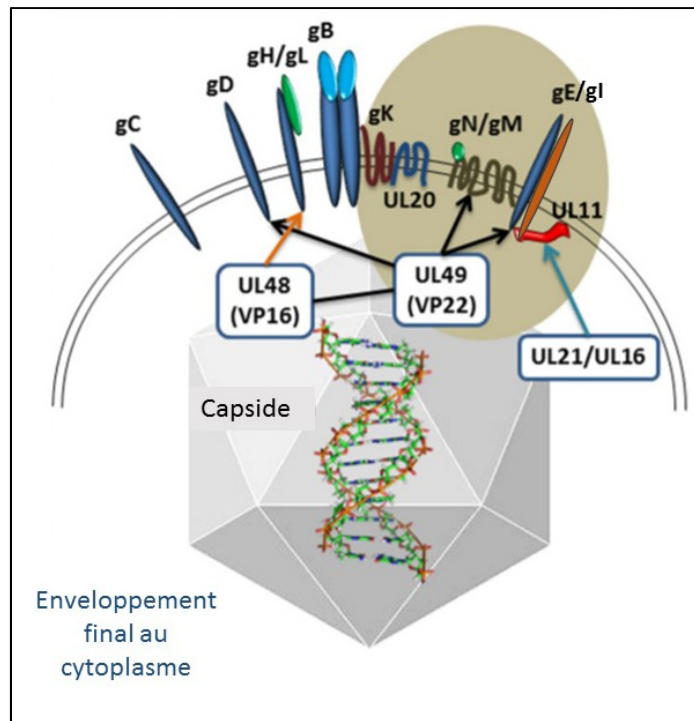


Figure 9 : Schéma des interactions moléculaires lors de la formation du virion HSV-1

Interactions entre les protéines tégumentaires liées à la capside avec le domaine C terminal des glycoprotéines lors de la formation du virion HSV-1. Figure adaptée de Chouljenko et al. 2012 (325)

L'enveloppement secondaire du virus implique la participation de certaines protéines cellulaires de l'hôte, comme les protéines Rab GTPases. Les protéines Rab1a/b, Rab43, Rab5 et Rab11 semblent jouer un rôle important afin de faciliter l'enveloppement au cytoplasme (326-328). De

plus, une étude récente a rapporté que le virus HSV-1 recrute des protéines membres de la machinerie ESCRT, et les protéines tégumentaires semblent être les candidats les plus susceptibles d'interagir directement avec celles-ci. En effet, la protéine pUL36 interagit avec TSG101, un composant du complexe ESCRT-I. Toutefois l'importance de cette interaction ainsi que le mécanisme de recrutement et de régulation de la machinerie ESCRT durant l'assemblage n'ont pas encore été étudié (329-331).

4-4 Transport à la membrane plasmique et sortie

L'enveloppement final au TGN est suivi par l'incorporation des virions dans des vésicules de sécrétion qui sont transportés à la membrane plasmique où elles fusionnent, ce qui permet par la suite la relâche des particules virales par exocytose dans les espaces extracellulaires. Il existe très peu de données concernant le rôle que peuvent jouer les protéines virales dans le transport et la sortie du virus. On pense que le processus d'exocytose des virions est régulé par la machinerie de fusion cellulaire plutôt que par les glycoprotéines virales. En particulier, les protéines SNAP-25, kinesine-1, GAP-43 ainsi que Rab3A, Rab6A, Rab8a, Rab11a, qui sont transportées avec les protéines du tégument et les glycoprotéines lors de la sortie du virus HSV-1 et PRV. L'utilisation de ces protéines par le virus facilite sa sortie à la membrane plasmique (332, 333). Une étude récente dans notre laboratoire a révélé l'implication de la protéine kinase D, cette protéine qui régule la sortie du cargo de sécrétion du TGN jusqu'à la MP (334), semble jouer un rôle important lors de la sortie du virus du site d'enveloppement le TGN pour atteindre la membrane plasmique (335). Une autre équipe rapporte que la myosine Va qui transporte les vésicules à travers le réseau d'actine cortical est impliquée dans la sortie du virus HSV-1 (336).

4-5 Propagation du virus

Plusieurs virus enveloppés, incluant HSV-1, peuvent se propager de cellule à cellule par passage direct à la cellule voisine et sans que la particule virale soit exposée à l'environnement extracellulaire (**Figure 10**). La propagation de cellule à cellule garantit au virus une transmission virale rapide, et lui permet d'échapper aux anticorps neutralisants contribuant ainsi à l'évasion immunitaire. Durant ce processus de transmission intercellulaire dans les cellules polarisées; épithéliales et neuronales, les souches virales de HSV-1 peuvent être divisées en deux groupes. D'une part, les souches de type sauvage se propagent à travers les jonctions entre les membranes des cellules adjacentes ce qui leur permet de se transmettre rapidement et ainsi infecter les cellules avoisinantes. D'autre part, les souches mutantes syncytiales se propagent par fusion des cellules infectées avec les cellules adjacentes non infectées, causant ainsi la formation de cellules géantes plurinucléées appelées syncytiums. Ces deux types de souches virales utilisent les glycoprotéines virales gD, gB et gH/gL pour pénétrer dans les cellules (337-340). Finalement, le complexe hétérodimère des glycoprotéines gE/gI semble jouer un rôle important dans la sortie du virus et dans la propagation intercellulaire. En effet, les mutations dans gE et gI ou dans le domaine cytoplasmique de gE, diminuent le nombre de particules virales aux jonctions cellulaires et provoquent l'accumulation de ces particules à la surface cellulaire (341-343).

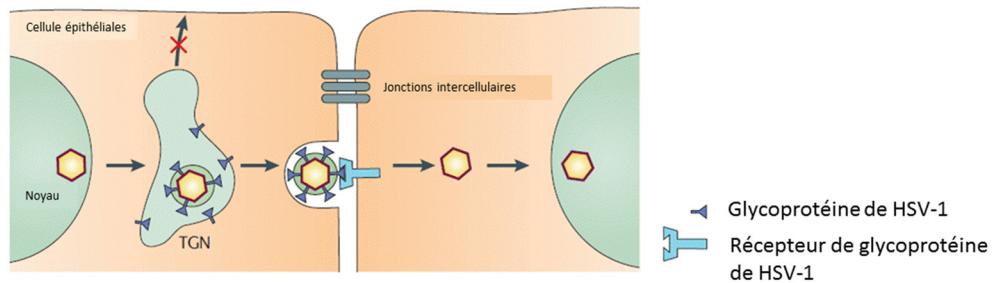


Figure 10 : Sortie du virion de la cellule hôte

Le virus HSV-1 dirige ses protéines structurales virales vers les sous-domaines du TGN, les virions vont s'accumuler aux surfaces cellulaires latérales (jonctions intercellulaires) et vont ainsi infecter les cellules voisines par passage à travers une jonction étroite. Ce type de propagation peut entraîner la formation de syncytium. Figure adaptée de Johnson, DC et al. 2011 (106).

5 Établissement de la latence, maintien et réactivation

Comme tous les virus de la famille *Herpesviridae*, le virus HSV-1 a la particularité de persister chez l'individu infecté tout au long de sa vie. Cette persistance est due au fait que le virus a la capacité d'établir deux types d'infection dans les cellules hôtes : Une infection lytique a généralement lieu dans les cellules épithéliales de la muqueuse orale lors de la primo-infection, et une infection latente a lieu dans les neurones sensitifs (344).

Pendant cette phase de latence, le virus infecte les neurones sensitifs innervant la région de la primo-infection, en fusionnant aux terminaisons nerveuses des axones, il va alors migrer via les microtubules par un transport rétrograde jusqu'aux noyaux des cellules nerveuses où il peut établir une latence (**Figure 11**). Les infections oculaires, nasales ou orales entraînent l'établissement de la latence au niveau du ganglion trigéminal (TG) (62, 345). Le génome du virus latent est maintenu dans le noyau des cellules nerveuses sous forme épisomale (28, 346). De plus étant associé à des histones cellulaires, le génome très condensé devient incapable de se répliquer, et l'expression des gènes en protéines est réprimée (347-350). Lors de la latence,

la transcription des gènes associés à la phase productive de l'infection est inhibée, à l'exception des microARN et des ARN longs non codants, en particulier ceux largement étudiés appelées «transcrits associées à la latence» (LATs) et qui restent fortement transcrits durant la latence (351). Le gène LAT produit un transcrit primaire de 8,3 kb qui, par un seul événement d'épissage, produit un transcrit très stable de 2,0 kb, dénommé LAT majeur qui s'accumule abondamment dans les noyaux des neurones sensitifs. L'exon de 6,3 kb résultant de l'excision de l'intron est, en revanche, très instable car il est rapidement clivé entraînant ainsi la formation de plusieurs microARNs (344, 352, 353).

Plusieurs recherches ont été effectuées afin d'identifier le rôle exact de LAT dans l'établissement, la maintenance ou la réactivation d'une infection latente. En effet, l'expression de LAT a été associée à la protection de la survie des cellules neuronales (354), et ceci en inhibant l'apoptose (355, 356). Il semble également que LAT joue un rôle sur le contrôle de l'extinction lymphocytaire CD8+ dirigé contre HSV-1. Une étude *in vivo* a ainsi montré que le nombre de lymphocytes activés ainsi que la sécrétion de TNF α et d'INF- γ étaient moins importantes après infection par une souche virale LAT- par rapport à la souche sauvage (357). De plus, il a été observé que pendant la latence, l'expression de LAT favorise l'assemblage répressif de l'hétérochromatine sur les promoteurs de gènes lytiques viraux, ce qui démontre son rôle dans l'inhibition de la transcription virale (350, 358). Le virus HSV-1 exprime au moins 16 miARN dont 8 (dénommés H1-H8) sont localisés dans la région LAT et sont exprimés pendant la latence (344, 353). Il a été démontré que les miARN H2, H4 et H6 régulent négativement l'expression d'ICP0 et ICP4 qui sont des activateurs transcriptionnels nécessaires lors de l'initiation d'une infection lytique, ainsi que l'expression d'ICP34.5 qui joue un rôle critique dans l'inhibition des réponses cellulaires antivirales (344, 353, 359). Bien que les gènes LATs ne soient pas essentiels

pour l'établissement, le maintien et la réactivation de la latence, ils permettent néanmoins d'augmenter l'efficacité de latence (360).

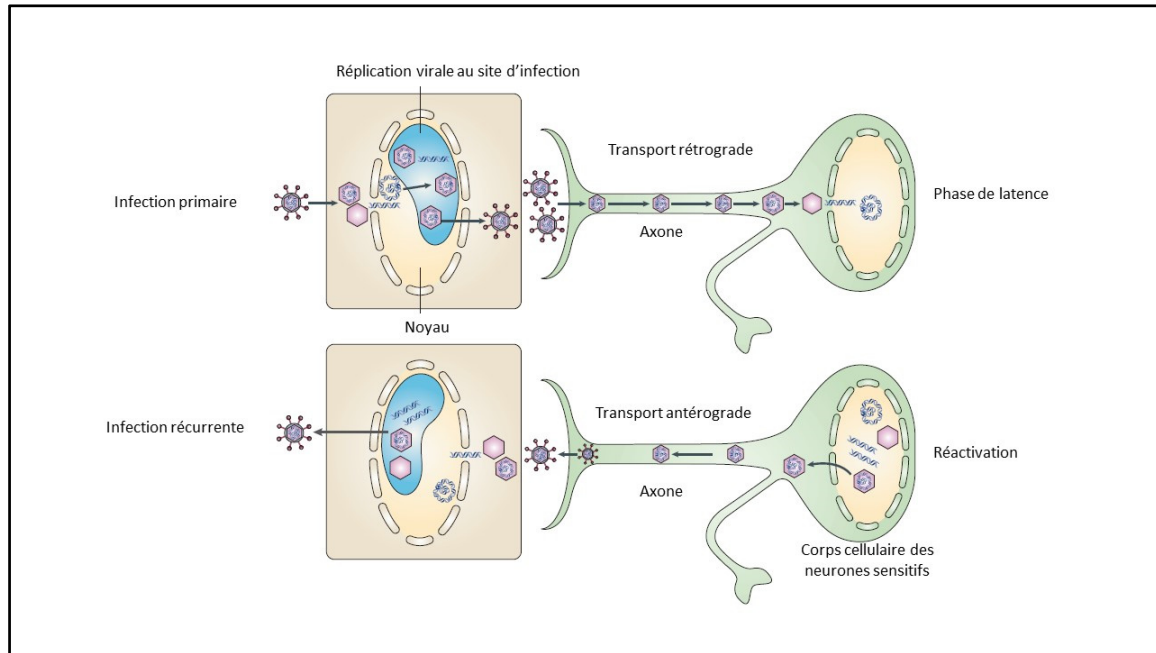


Figure 11 : Établissement de la latence et réactivation du virus HSV-1.

L'infection primaire des cellules épithéliales se traduit par une production du virus HSV-1. Les nouveaux virions produits vont migrer via un transport rétrograde afin d'infecter les neurones sensitifs. Le virus entre alors dans la phase de latence au niveau du noyau des neurones, le génome se circularise et seuls des transcrits spécifiques sont exprimés. Sous l'effet d'un stimulus, le virus se réactive, des nouveaux virions sont produits et par un transport antérograde vont réinfecter les cellules épithéliales situées dans la région proche du site de l'infection primaire. Figure adaptée de Knipe et al. 2008 (28).

À ce jour, les mécanismes précis menant au processus de réactivation du virus latent restent encore largement inconnus. Il semblerait que chez l'homme, la réactivation du virus de son état de latence vers un mode de réplication lytique peut être observée de façon spontanée sans cause évidente, ou provoquée par divers stimuli, tels que le stress, la fièvre, la fatigue, l'exposition aux radiations ultraviolettes, des lésions tissulaires, un état d'immunosuppression, un changement

hormonal, etc (62, 361). Lors de la réactivation, les nouveaux virions sont transportés de façon antérograde le long des axones des nerfs infectés jusqu'au site périphérique de l'infection primaire. À cet endroit, les virus se répliquent et entraînent une infection récurrente (362, 363). Afin d'induire la réactivation dans les cellules neuronales cultivées, de nouveaux inducteurs ont été mis en évidence tels que la privation en facteur de croissance des cellules nerveuses (NGF) (364), l'ajout de tricostatine A (TSA) (344), de capsaïcine (365) ou de dexaméthasone (366). La réactivation est liée au remodelage du gène viral par les histones. En effet il a été rapporté que l'inhibition des histones désacétylases menant à l'augmentation de la transcription favorise la réactivation du virus HSV-1 de la latence (367). En plus, le complexe de modifications formé de HCF-1 semble jouer un rôle central dans le processus de réactivation, d'une manière similaire à son rôle dans l'initiation de l'infection lytique (368, 369). De plus, il a été démontré récemment que la synthèse de nouvelles molécules de la protéine VP16 dans les neurones active l'expression des gènes (IE, α) ce qui a pour conséquence de réactiver le virus de sa phase latente (370).

6 La glycoprotéine gM (U_L10)

6-1 Gène, protéine et structure

La glycoprotéine M (gM) est une protéine membranaire intégrale hydrophobique de type III qui contient huit domaines transmembranaires hautement conservée dans toute la famille des *Herpesviridae* (306, 371). gM a été identifiée pour la première fois dans le cytomégalovirus humain (CMV) comme composante structurelle de l'enveloppe du virus (372), et tous les virus herpétiques qui ont été étudiés jusqu'à date ont démontré la présence d'homologues de gM

(373). La glycoprotéine (gM) de HSV-1 est codée par le gène UL10 dont la longueur en nucléotides de sa partie codante est 1422 pb et le nombre des acides aminés est 473 (374). Les analyses structurales qui ont été réalisées auparavant ont prédit que gM contient deux sites de N-glycosylation dans le domaine extracellulaire et de quatre motifs tyrosine de trafic membranaire de type YXXØ localisés dans l'extrémité cytoplasmique C-terminale (306, 371) **(Figure 12)**. La forme glycosylée immature d'HSV-1 gM migre à 50 kDa, alors que plusieurs formes matures sont détectées de 53 à 63 kDa. Le traitement de ces diverses formes avec la tunicamycine (un inhibiteur de N-glycosylation) entraîne la formation d'une seule bande à 47 kDa, révélant ainsi une forme précurseur non glycosylée de la protéine gM (371). Elle est classée comme étant une protéine tardive, toutefois, son produit de transcription et de traduction peut être détecté à 2hpi (375-377). gM est ciblée spécifiquement à la membrane nucléaire, et présente sur les virions périnucléaires (277). Plus tard, la glycoprotéine gM est localisée au TGN, à la membrane plasmique et incorporée dans les virions extracellulaires (282, 306).

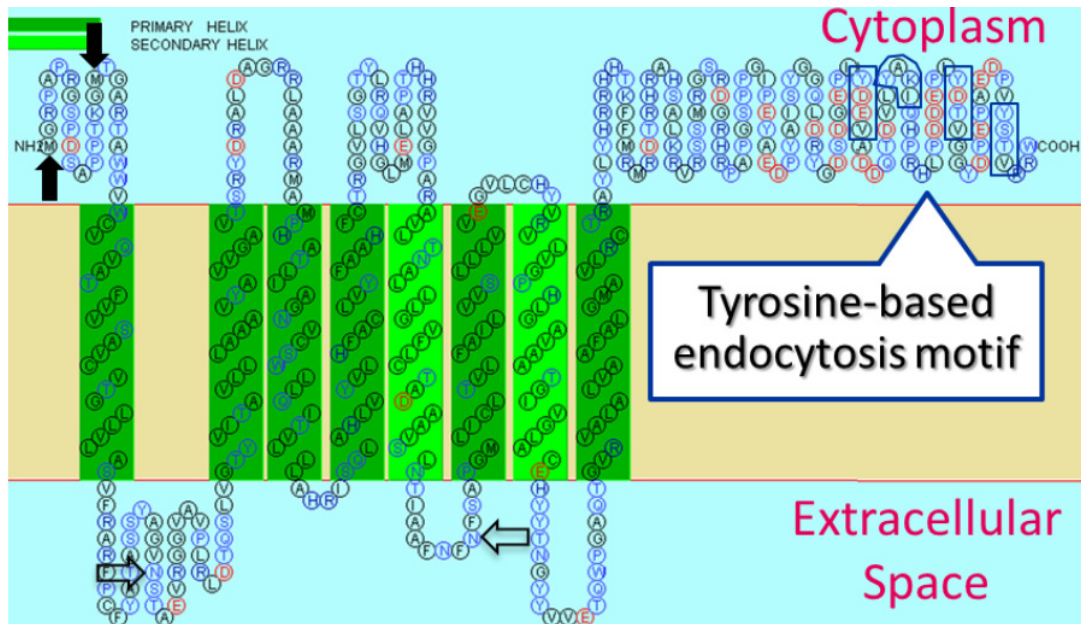


Figure 12 : Schéma illustrant la topologie membranaire prédite de gM.

Les flèches noires vides indiquent les sites potentiels de N-glycosylation, et les flèches noires pleines montrent les deux méthionines d'initiation. Les motifs d'endocytose sont indiqués par des boîtes bleues. Structure construite avec (SOSUI prediction) Hirokawa et al., 1998) (378).

6-2 Les fonctions de la glycoprotéine gM

La glycoprotéine gM est l'une des rares protéines d'enveloppe qui est bien conservée dans la famille *Herpesviridae*, ce qui suggère qu'elle joue un rôle important durant le cycle viral. Dans plusieurs alphaherpèsvirus, gM est associé à des fonctions différentes durant le cycle viral (325, 373, 379). Sa délétion dans la plupart des alphaherpèsvirus incluant HSV-1 (375), VZV (380), PRV(373), EHV-1 (379), EHV-4 (381), BoHV-1 (382) entraîne une diminution du titre viral de 10 à 100 fois mais produit néanmoins des virions infectieux, ce qui démontre qu'elle est non essentielle à la réplication virale dans les cellules en culture. En contrepartie, les autres homologues de gM dans MDV (383), HCMV (384), EBV (385) HHV-6 (386), et MHV-68 (387) semblent tous jouer un rôle essentiel dans la réplication virale. L'étude réalisée sur un

modèle de souris a démontré que le virus HSV-1 délété de gM est capable d'établir une infection latente, toutefois la réplication du virus à la périphérie et sa propagation ainsi que sa croissance dans le système nerveux a été affectée (388). Par conséquent, la glycoprotéine gM est nécessaire pour une infection efficace *in vitro* et aussi *in vivo*.

6-3 Rôle de gM dans l'enveloppement secondaire

La fonction exacte de gM reste encore mal connue. Elle est ciblée à plusieurs compartiments membranaires durant le cycle viral (282, 389, 390), et sa présence au TGN et au niveau des virions extracellulaires suggère un rôle potentiel de gM lors de l'enveloppement secondaire du virus (318, 380, 391). De plus, les chercheurs ont démontré qu'en présence de gM, les protéines membranaires gD et gH/gL sont relocalisées au TGN où se produit l'enveloppement final du virus, ils suggèrent que la localisation correcte de ces glycoprotéines virales au niveau du site d'enveloppement semble importante pour une incorporation efficace dans le virion (306). Plusieurs d'autres constatations ont permis de supporter le rôle de gM lors de l'enveloppement final; la délétion de la glycoprotéine gM dans les virus PRV ou EHV1, cause un léger défaut dans la production virale, toutefois la mutation du complexe gE/gI combinée avec la délétion du gène codant pour gM montre que la morphogenèse des virions néoformés est sévèrement affectée, un grand nombre des nucléocapsides non enveloppés s'accumulent dans le cytoplasme et pratiquement aucune particule virale enveloppée n'est relâchée dans le milieu extracellulaire supportant ainsi le rôle de gM lors de l'étape d'enveloppement (314, 392). La double délétion de gM et de la protéine du tégument associée à la membrane pUL11 du virus HSV-1 et PRV entraîne aussi une inhibition drastique dans l'enveloppement des virions cytoplasmiques ainsi qu'une réduction dans la production virale (313, 393). D'autres études ont

montré que PRV gM interagit avec la protéine tégumentaire U_L49 via son domaine cytoplasmique et favorise ainsi son incorporation dans les virions, ce qui semble être important pour l'enveloppement secondaire du virus durant sa maturation. Un triple mutant de délétion gM⁻/gE⁻/gI⁻ de PrV empêche l'incorporation d'UL49 dans les particules virales ce qui entraîne l'accumulation des nucléocapsides non enveloppées dans le cytoplasme (319). La glycoprotéine gM pourrait interagir avec U_L49 afin de cibler les nucléocapsides tégumentées vers le site l'enveloppement final, cette fonction semble être redondante et a été caractérisé après la délétion d'autres protéines virales. Une autre recherche réalisée récemment rapporte l'identification d'une région fonctionnelle importante dans la glycoprotéine gM. Cette région (gM 19–343aa) comporte les huit domaines transmembranaires nécessaires pour l'enveloppement secondaire des capsides (394).

6-4 Rôle de gM dans la fusion membranaire et la propagation cellule à cellule

Des études antérieures ont démontré que l'expression des glycoprotéines d'enveloppe gB, gD, gH et gL du virus HSV-1 est nécessaire et suffisante pour induire le processus de fusion dans un système de culture cellulaire (395). L'expression de la glycoprotéine gM du virus PRV ainsi que gM et gN du virus HHV-8 inhibe la fusion membranaire médiée par gB/D/H/L dans un contexte de transfection (391, 396). Ce phénomène a été étudié plus en détail par Crump et al. 2004 et leurs observations montrent que la co-expression de gM, gD, et gH/gL affecte le trafic membranaire causant ainsi l'internalisation et le ciblage intracellulaire des protéines membranaires gD et gH/gL au TGN (306). Ces résultats suggèrent que gM interagit avec ces glycoprotéines virales et qu'elle serait impliquée dans leur localisation au niveau du site

d'enveloppement secondaire (306). De plus, il a été reporté que l'absence de l'expression de gM dans un contexte de souches syncytiales les réduit drastiquement la fusion cellulaire induite par le virus. Ces virus mutés pour gM présentent également un ralentissement de la cinétique d'entrée dans les cellules Vero par rapport au virus de type sauvage (322). Il faut noter que la caractéristique d'inhibition de fusion de gM en contexte de transfection seulement, n'est pas strictement spécifique à l'herpèsvirus, la glycoprotéine gM du virus PRV inhibe aussi la fusion membranaire induite par la protéine F du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) (391).

6-5 Le complexe gMgN

Dans plusieurs virus herpétiques, il a été démontré que la glycoprotéine gM forme un complexe protéique avec la protéine transmembranaire gN (396-404). Pour le virus HSV-1, cette association reste encore à démontrer. Le complexe gMgN est caractérisé par une interaction stabilisée par un pont disulfure ainsi que des interactions hydrophobes des domaines transmembranaires (401, 403, 405). Les homologues de gM et gN sont exprimées dans tous les Herpèsvirus, et le complexe gMgN semble être hautement conservé ce qui indique un rôle important durant le cycle viral (405). Cependant, la fonction exacte de ce complexe durant le cycle infectieux reste encore à explorer.

La glycoprotéine gN du virus HSV-1 est une protéine membranaire de l'enveloppe du virion. Elle est caractérisée comme étant une protéine structurelle O-glycosylée, qui comprend un seul domaine transmembranaire et qui est exprimée tard durant la réplication du cycle viral (282, 406, 407). La glycoprotéine gN est codée par le gène UL49.5 et comporte 91 acides aminés. Selon le modèle prédit, le domaine N-terminal est exposé à la lumière du réticulum endoplasmique (ER)/ *trans* Golgi network (TGN), tandis que l'extrémité C-terminale est

orientée vers le cytosol (394). Bien que ce soit à des degrés différents, une mutation consistant en une rupture dans le gène codant pour gN de PRV, EHV-1, VZV et EBV entraîne la diminution du titre viral et de la taille des plages de lyses (385, 400, 403, 408). Une autre étude a démontré que la glycoprotéine gN est essentielle pour le virus HCMV, et semble jouer un rôle important dans l'enveloppement secondaire du virion (409). Plusieurs études dans la littérature ont suggéré que l'expression de gMgN est essentielle pour une production virale efficace. Ce complexe semble être impliqué dans différents processus tel que la maturation des virions ainsi que le contrôle de la fusion membranaire (379, 381, 410). De plus, la formation de gMgN est aussi requise pour l'export de ces glycoprotéines du réticulum endoplasmique au TGN et au compartiment endosomal durant le trafic intracellulaire (399, 409). Toutefois, la délétion de l'ORF codant pour gM ou gN des virus PRV, VZV, EHV-1 entraîne seulement une diminution dans la production du virus infectieux (384, 400). Une autre étude mettant en évidence l'interaction entre gM et gN du virus HHV-6, souligne que cette interaction est critique pour le processus de maturation de gM (386). Ainsi, lors de l'absence d'un partenaire du complexe, l'autre protéine subit des modifications post traductionnelles différentes et/ou présente des changements dans son transport intracellulaire (399, 409). Dans un contexte de transfection, l'expression de gMgN des virus PRV, HCMV et HHV-8 a entraîné l'inhibition de la fusion membranaire, ce qui suggère que ce complexe joue un rôle important dans la régulation de la fusion induite par le virus (391, 396). De plus, cette fonction semble être bien conservée dans la famille des *Herpesviridae*. Considérant ces résultats d'inhibition de fusion, il serait possible de penser que le complexe gMgN jouerait un rôle dans l'entrée et la sortie du virus, et ceci à travers la modulation de la fusion membranaire et du trafic des glycoprotéines. Des études

supplémentaires pour identifier des protéines cellulaires qui interagissent avec gMgN pourraient clarifier leur mécanisme de fonction (396).

6-6 Autres partenaires de gM

Il a été démontré que la queue cytoplasmique de la glycoprotéine gM du virus HCMV interagit avec la protéine cellulaire FIP4, une protéine effectrice de Rab11, et que cette interaction est essentielle pour la production du virus infectieux (405). Une analyse récente par LC-MS/MS a révélé que la protéine SNARE VAMP3 interagit avec le complexe gM/gN du virus HHV-6 (411). Un autre partenaire d'interaction de gM est la protéine tégumentaire majeure UL49, qui elle-même interagit avec la glycoprotéine gE via sa queue cytoplasmique (319). Plus récemment, il a été suggéré que la localisation nucléaire de gM à la phase tardive de l'infection dépend en partie d'UL31 et UL34 (412). Dernièrement, des études de double hybride dans la levure en utilisant la pleine longueur de gM comme appât ont révélé plusieurs autres protéines virales (113, 413, 414). Ces diverses interactions contribuent très probablement à réguler les fonctions de la gM durant le cycle viral.

7 Hypothèses et objectifs de recherche

L'infection induite par HSV-1 est parmi les pathologies les plus fréquentes chez les humains. Une meilleure compréhension de la biologie du virus HSV-1 exige d'approfondir les connaissances sur son fonctionnement afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, ce qui permettra d'éradiquer le virus. Comme plusieurs autres virus, HSV-1 constitue un excellent modèle pour étudier les mécanismes de la régulation cellulaire, et

caractériser les interactions hôte-virus. En effet, plusieurs propriétés du virus HSV-1 ont permis d'élargir la compréhension d'autres virus herpétiques ainsi que de nombreux autres virus. Les caractéristiques qui font de lui un bon modèle d'étude inclut sa cinétique de réplication rapide, la capacité d'infecter une grande variété de lignées cellulaires, la disponibilité des anticorps et des souches virales sauvages et mutantes, et une manipulation relativement sans danger.

Les glycoprotéines exprimées sur la surface du virion de HSV-1 jouent un rôle majeur pendant le cycle de vie du virus, à la fois pendant l'entrée virale et lors de la sortie du virus de la cellule. La glycoprotéine gM, sur laquelle porte cette étude est hautement conservée dans toute la famille d'*Herpesviridae*, ce qui laisse suggérer un rôle essentiel lors du cycle viral. Toutefois sa fonction exacte durant l'infection par HSV-1 reste encore mal comprise. Des études basées sur la microscopie électronique ont montré l'implication de gM lors l'enveloppement final des virus HSV-1, PRV, et EHV-1 (313, 314, 392, 393, 415). L'expression de gM des virus HSV-1 et PRV dans des essais de transfection entraine l'altération du trafic membranaire intracellulaire, causant ainsi la relocalisation d'autres protéines virales et particulièrement gD, et gH/L de la surface cellulaire au TGN (306, 313). Ces résultats suggèrent que gM joue un rôle important dans l'assemblage des virus infectieux au niveau du site d'enveloppement secondaire. De plus, semble gM a la capacité d'empêcher la fusion membranaire induite par les glycoprotéines virales gB, gD et gH/gL ce qui suggère un rôle important de gM durant l'entrée du virus (322, 373, 389, 391, 395, 396). Toutefois, gM stimule l'entrée du virus par fusion dans un contexte de souches virales syncytiales (322). Ces données suggèrent que gM jouerait un rôle de modulateur de la fusion membranaire induite par le virus à travers un mécanisme qui n'est pas encore connu.

De plus, il a été rapporté que très tôt durant l'infection, HSV-1 gM est spécifiquement ciblée aux enveloppes nucléaires et sur les virions périnucléaires, alors qu'elle localisée au TGN et sur les virions extracellulaires plus tard durant le cycle viral (277, 282, 306, 371, 412). La présence de gM à différents sites spécifiques durant l'infection semble être important pour la régulation de sa fonction. Toutefois le processus qui gouverne le ciblage de gM reste encore mal compris. L'objectif principal de ce projet de doctorat est d'investiguer et comprendre le mécanisme de fonctionnement de gM durant le cycle viral. La glycoprotéine gM interagit fonctionnellement avec différentes protéines virales mais aucune d'elle ne semble réguler sa fonction. Il serait alors important d'identifier au cours de cette étude les partenaires moléculaires virales et cellulaires qui interagissent avec gM et qui sont susceptibles de moduler sa fonction. Il a été rapporté dans plusieurs études que la glycoprotéine gN interagit avec gM et forme un complexe qui semble être stable et bien conservé dans la famille d'*Herpesviridae* (396, 399, 401-403, 416). Par ailleurs, la pertinence du rôle fonctionnel de gM/gN semble varier d'un virus à l'autre (391, 396, 404). Toutefois ce complexe gM/gN n'a pas encore été démontré expérimentalement pour le virus HSV-1. Nous avons donc émis l'hypothèse que gN serait un partenaire de gM et pourrait jouer un rôle important dans sa relocalisation durant le cycle viral, étant donné que gN est connue pour moduler la localisation de gM dans certains virus herpétiques. Le premier objectif était de mettre en évidence la formation du complexe gM/gN du virus HSV-1, ainsi que de caractériser son rôle fonctionnel lors de l'infection par HSV-1, et ultimement définir la fonction de gN dans le processus de ciblage de gM.

Le deuxième objectif a pour but d'une part, de comprendre et clarifier comment la glycoprotéine gM module la fusion virale, sachant qu'elle a la capacité de réguler à la fois positivement et négativement ce processus de fusion durant l'infection virale. Et d'autre part, nous voulons

déterminer si d'autres protéines cellulaires à part les récepteurs cellulaires connus d'HSV-1 pourraient interagir avec gM et participer ainsi à la régulation de la fusion virale. Pour atteindre cet objectif, nous avons cherché à identifier des nouveaux partenaires d'interaction inconnus de gM. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche basée sur des analyses protéomiques combinées aux expériences d'immunoprécipitations dans un contexte de transfection de gM. Les résultats obtenus par LC-MS-MS ont été validés afin de vérifier si l'interaction est directe et spécifique et confirmer ainsi la pertinence du partenaire d'interaction. Dans le but d'explorer l'importance fonctionnelle de ce partenaire, nous avons réalisé différentes stratégies notamment en surexprimant ou en bloquant l'expression de la protéine candidate, puis nous avons évalué la production et la propagation virale par essais de plaques, immunofluorescence et microscopie électronique. La caractérisation des nouveaux partenaires de gM, nous aidera à mieux comprendre le rôle de gM durant le cycle viral, mais aussi d'avoir des nouvelles connaissances sur la propagation du virus HSV-1 et son mécanisme de fusion virale. A long terme, l'élucidation du fonctionnement de ces molécules permettrait éventuellement d'identifier des cibles potentielles de nouvelles drogues antivirales.

CHAPITRE II RÉSULTATS - PRÉSENTATION PAR ARTICLES

Article 1: HSV-1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery

Auteurs : Imane EL Kasmi et Roger Lippé

Publié dans : Journal of Virology. Février 2015 ; volume 89, n°4 : pages 2313-2323

Contribution des auteurs :

Imane EL Kasmi* : Conception, planification et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

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

* Premier auteur

Note sur le texte :

Cette section reproduit le texte intégral de l'article mentionné ci-dessus. Certaines modifications ont toutefois été apportées à la mise en page du manuscrit afin de mieux l'intégrer à la présente thèse.

HSV-1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery

Imane El Kasmi and Roger Lippe[#]

Department of Pathology and Cell biology, University of Montreal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Running title: gN complexes with gM and modulates fusion

Abstract word count: 247

Manuscript word count: 5048

Corresponding author

roger.lippe@umontreal.ca

Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) capsids are assembled in the nucleus, where they incorporate the viral genome. They then transit through the two nuclear membranes and are wrapped by a host-derived envelope. In the process, several HSV-1 proteins are targeted to the nuclear membranes but their roles in viral nuclear egress are unclear. Among them, glycoprotein M (gM), a known modulator of virus-induced membrane fusion, is distributed on both the inner and outer nuclear membranes at the early stages of the infection, when no other viral glycoproteins are yet present there. Later on, it is found on perinuclear virions and ultimately redirected to the TGN, where it cycles with the cell surface. In contrast, transfected gM is only found at the TGN and cell surface, hinting at an interaction with other viral proteins. Interestingly, many herpesvirus gM analogs interact with their gN counterparts, which typically alters their intracellular localization. To better understand how HSV-1 gM localization is regulated, we evaluated its ability to bind gN and discovered it does so in both transfected and infected cells, an interaction strongly weakened by the deletion of the gM amino terminus. Functionally, while gN had no impact on gM localization, gM redirected gN from the ER to the TGN. Most excitingly, gN overexpression stimulated the formation of syncytia in the context of an infection by a non-syncytial strain, hinting that gM and gN not only physically but also functionally interact and that gN modulates gM's activity on membrane fusion.

Importance

HSV-1 gM is an important modulator of virally-induced cell-cell fusion and viral entry, a process that is likely finely modulated in time and space. Up to now, little was known of the proteins that regulate gM's activity. In parallel, gM is found in various intracellular locations at different moments ranging from nuclear membranes, perinuclear virions, the TGN, cell surface

and on mature extracellular virions. In transfected cells, it is however only found on the TGN and cell surface, hinting that its localization is modulated by other viral proteins. The present study identifies HSV-1 gN as a binding partner for gM, in agreement with their analogs in other herpesviruses, but most excitingly shows that gN modulates gM's impact on HSV-1 induced membrane fusion. These findings open up new research avenues on the viral fusion machinery.

Introduction

Herpesviridae are among the most complex human viruses from the point of view of their large genomes and viral particle composition. Among them, herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the prototype of human alphaherpesviruses, incorporates its 152 kB genome into an icosahedral capsid surrounded by a multi-protein tegument layer and a cell-derived lipid layer containing over a dozen viral proteins (1, 2). Of the latter, those mediating viral entry, namely gB, gD and the gH/gL complex, are essential for the propagation of the virus (3). In contrast, the viral glycoprotein M (gM) is conserved throughout the family and typically critical for beta- and gammaherpesviruses but is not essential for most alphaherpesviruses including HSV-1 (4-16). Consequently, when gM is depleted from the HSV-1 or the related alphaherpes pseudorabies virus, viral yields are minimally reduced by 3 to 50 fold. However, its impact is substantially increased when UL11 or gE/gI are co-depleted in combination with gM likely due to overlapping functions between these viral proteins (5, 17-19).

Despite its non-essential status in tissue culture, gM of several alphaherpesviruses has been associated with a number of functions throughout the viral life cycle (7, 10, 19-22). The glycoprotein is thus known to down regulate the surface expression of gD and the gH/gL

complex, two key players in virus induced membrane fusion, and facilitates the upstream incorporation of the gH/gL complex into mature virions (23, 24). Furthermore, gM has been shown to stimulate viral entry in the context of syncytial strains (22). However, despite its presence on nuclear membranes (see below), gM is seemingly not involved in the release of herpesviruses from the nucleus, where newly made viral capsids are initially assembled (17). In contrast, with the conserved gN viral protein, gM alters immunity against the virus by down regulating the transport and peptide loading of major histocompatibility complex class I in the ER (25-30). Finally, and perhaps most interestingly, gM has been reported to modulate virulence in animal models (31, 32). Thus, gM appears to exert important and diverse regulatory activities at potentially different intracellular localizations. In this context, targeting of gM to these distinct sites is likely one important means to regulate its function. It is therefore critical to understand this process and define its molecular players.

In several herpesviruses, gM, gN and related homologues physically interact (16, 21, 33-36). In many cases, this association impacts their release from the ER and maturation at the Golgi apparatus. For Epstein Barr and infectious laryngotracheitis viruses, gM is required for the processing of the related gN (36, 37), while for bovine herpesvirus 1 and human herpesviruses 6 and 8, gN is a dominant determinant of gM transport and maturation (15, 21, 30). In contrast, the sole transfection of HSV-1 gM is sufficient to drive it to the TGN irrespective of the presence of gN or other viral genes (23, 38). However, a more complex and dynamic scenario takes place in infected cells with the early recruitment of HSV-1 gM to nuclear membranes at 4 hours post-infection (hpi) and ultimately on perinuclear virions once they are produced (38, 39). Much later on, gM is redirected to the TGN, where it cycles back and forth with the plasma membrane, and

may ultimately be retargeted again to the ER at a time when the TGN is eventually disrupted by the infection (39). The glycoprotein is also incorporated on mature extracellular virions (6). HSV-1 gN localization is more problematic to access as antibodies are currently unavailable to characterize it. It is thus unclear if it is complexed to gM, as for its counterparts in other herpesviruses, and how the two molecules depend on each other for their intracellular transport and maturation. Moreover, no function has yet been assigned to gN.

Given that gM expression is detectable as early as 2 hpi and that gN mRNAs are only discernible from 10 hpi onwards, coincident with the release of gM from the ER (38), it was tempting to postulate that gN may be the molecular switch that releases gM from the nuclear membranes in infected cells. The present study examines this possibility using an YFP tagged version of gN to monitor it and depicts an intricate situation where gM and gN do indeed form a complex in the absence of additional viral proteins as the two proteins readily interacted in transfected cells as they did in infected cells. While gM was targeted to the TGN independently of gN, the latter was exclusively at the ER when transfected alone. However, gN was significantly redirected to the TGN in the presence of gM. Importantly, the mutual co-immunoprecipitation of YFP tagged gN with either endogenous or exogenous gM confirmed their physical interaction both in transfected and infected cells. Taking advantage of a previously reported mutant deleting the first two methionines at amino acids 1 and 19 (19), but still expressing lower levels of an amino terminal truncated gene product starting from the third methionine residue at amino acid 133, we further showed that the formation of the gM/gN complex still occurs but is strongly disrupted by the deletion. Most excitingly, this physical interaction transcends into a functionally relevant one as overexpression of gN in wild type infected cells leads to a significant increase of syncytia

formation, a normally rare event unless syncytial mutants are used. Altogether, these results hint at a fine multi-protein modulation of cell-cell fusion that is deregulated by altering gN expression. Given the importance of cell to cell transmission to avoid immune detection by neutralizing antibodies, these findings likely have a significant impact for viral spread.

Materials and Methods

Cells and viruses. 143B and Hela (ATCC) 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 15 µg/ml 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU; Sigma) except prior to transfection or infection. The non-syncytial wild-type HSV-1 strain 17+ (obtained from Beate Sodeik) and HSV-1ΔgM2 mutant virus (provided by Konstantin Kousoulas (19)) were propagated on BHK cells and their titers determined by plaque assay on Vero cells. For clarity, the viruses and constructs used in the paper are shown in figure 1.

Transfections and infections. For co-transfection studies, 143B cells grown in 24-well plates were transfected with 0.8 µg/well of pHA-UL10 (expressing HA tagged HSV-1 gM; Mutagenex) and pEYFPN1-HSV UL49A (coding for HSV-1 gN; generously provided by Colin Crump) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours later, the cells were fixed and permeabilized for immunofluorescence microscopy. To monitor their subcellular localization in the context of an HSV-1 infection, the cells were first transfected with 0.8 µg/ml of pEYFPN1-HSV UL49A for 24 hours than absorbed with wild-type HSV-1 strain 17+ at a MOI of 2 for 1 h at 37°C and subsequently grown in

standard medium at 37°C. At various times following post-infection, the cells were fixed and permeabilized for immunolabeling as detailed below.

Immunofluorescence microscopy. For confocal microscopy, cells were fixed at 4°C for 30 minutes in 3% paraformaldehyde made in phosphate-buffered saline (PBS), washed with PBS, and any remaining fixative inactivated with 50 mM NH₄Cl in PBS. The cells were permeabilized using 0.1% Triton X-100 for 4 min and non-specific protein binding sites were blocked with 10% FCS. The specimens were labeled for 1 h at room temperature with primary antibodies diluted in 10% FCS, washed, and incubated with secondary antibodies for 30 min. The samples were mounted on glass slides in Dako containing 0.1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. The following primary antibodies were used: α-gM rabbit polyclonal 4c10 (courtesy of Joel Baines) to detect endogenous gM (infection) or a mouse monoclonal α-HA antibody (Santa Cruz) to detect HA-tagged exogenous gM (transfection). We also used sheep α-TGN46 (Serotec), rabbit α-Calnexin (Stressgen) and a mouse α-GFP (Roche). All secondary antibodies (Alexa 488, 568, and 674) were from Molecular Probes. Fluorescence microscopy was performed on a LSM510 confocal microscope and software (Carl Zeiss). The confocal sections were all acquired using a 100x objective and contrast adjustments of immunofluorescence images were performed equally with Adobe Photoshop CS5 for all images within each experiment. Quantification of the subcellular localization of gM and gN was done by manually counting cells that were positive for both proteins. In all cases, at least 200 positive cells were compiled for each condition and independent experiment.

Syncytium formation. 143B cells grown in 24-well plates were transfected with 0.8 µg/well of pEYFPN1-HSV UL49A using Lipofectamine 2000 as above. Twelve hours later, the cells were infected with the non-syncytial wild-type HSV-1 strain 17+ or HSV-1ΔgM2 at a MOI of 2 for 1 h at 37°C and then grown in standard medium at 37°C. At various times post-infection, the cells were fixed and stained with 0.1 µg/ml Hoechst 33342 to identify the nuclei. The plasma membrane was additionally labeled with 5 µg/mL wheat germ agglutinin (WGA) conjugated to Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) to delineate the cell boundaries. Syncytia, defined as fluorescent membranes containing two or more nuclei, were scored from randomly selected fields of view (200 cells per condition per independent experiment).

Immunoprecipitation. For immunoprecipitation studies, HeLa cells were chosen because of their higher rate of transfection. They were grown on 10 cm dishes and transfected at 80% confluence with either 24 µg/dish of pHA-UL10 or pEYFPN1-HSV UL49A or alternatively with 12 µg/dish of each plasmid. Twenty four hours post-transfection, the cells were lysed for 30 min at 4°C with gentle agitation with RIPA buffer (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7.4, 1% deoxycholic acid, 1% NP-40, 0.1% SDS, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche)). For immunoprecipitation studies in the context of infections, cells were transfected 24 hours with 24 µg/dish of pEYFPN1-HSV UL49A and subsequently infected with HSV-1 WT or HSV-1 ΔgM2 at a MOI of 5 for an additional 16 hours. They were then lysed as above. In both cases, cell debris was removed by centrifugation (14 000 g, 15 min, 4°C) and the supernatants incubated with pre-immune serum for 1 hour. These lysates were subsequently incubated with protein A agarose (Roche) for 1 h hour at 4°C with gentle agitation. After centrifugation at 10 000 g for 5 min to remove the beads, these pre-cleared lysates were

incubated overnight at 4°C with mouse anti-HA (to detect exogenous gM), the rabbit 4c10 polyclonal (to bring down endogenous gM; in our hands, the PAS980 polyclonal did not work well for this purpose) or mouse anti-GFP (which very efficiently binds EYFP, data not shown). Fresh protein A agarose beads were added for 60 min and the immune complexes washed three times with RIPA buffer and once with Tris-HCl pH 7.4 to remove unbound proteins. The bead bound material and total lysates were finally analyzed by Western blotting as detailed below. To evaluate the impact of the gM truncation on gN co-immunoprecipitation, the quantification of the Western blot data were normalized to the level of gM and gN that could be immunoprecipitated by their respective antibodies. The ratio between the co-ip in the context of wild type infection and the amount of co-ip with HSV-1 Δ gM2 was then calculated.

SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting. gM tends to aggregate near boiling temperatures (personal unpublished observation). Consequently, immunoprecipitated proteins and whole cell lysates were heated prior to loading on denaturing 10% polyacrylamide gels with sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, and 2% β -mercaptoethanol) at 37°C for 1 hour to analyze gN, 56°C for 2 min for gM, and 1 hour at 37°C plus 2 min at 56°C when analyzing both proteins. After electrophoresis, the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were immersed for 1 h in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, and 0.1% Tween 20) and subsequently incubated for 2 h with a rabbit polyclonal against HSV-1 gM (PAS980) or rabbit anti-GFP antibodies diluted in blocking buffer to detect gM and gN respectively. The blots were then washed and probed with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (anti-Rabbit (Cedarlane)). When rabbit gM antibodies

were used for both immunoprecipitations and Western blotting (for instance to detect gM/gN complexes in infected cells), Light Chain Specific antibodies (ImmunoResearch Johnson) were used as secondary antibodies at this stage to avoid the detection the primary antibody. Final revealing was done with the Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) on Kodak BioMax Light film or using a ChemiDoc MP system (Bio-Rad). Where indicated, the latter was used to quantify the expression of gM in wild type and mutant strains using the onboard quantification tools (Image Lab version 5.0).

Results

gM binds to and drives gN to the TGN in transfected cells. To directly probe the putative formation of a HSV-1 gM/gN complex, the two proteins were first examined by fluorescence microscopy in transfected cells. As anticipated, cells that were transfected with gM alone lead to the accumulation of that protein at the TGN (Fig. 2), in agreement with previous reports (23, 38). In contrast, gN alone accumulated in the ER, as evidenced by its reticular staining and outer nuclear envelope pattern and overlapping with the calnexin marker (Fig. 2). When co-expressed with gM, both proteins strongly co-localized and were exclusively found at the TGN in doubly transfected cells (Fig. 2). Quantification of over 600 cells taken from multiple images and three independent experiments confirmed these findings with 100% of transfected gM alone at the TGN, 100% of gN alone in the ER and 100% of co-transfected gM and gN at the TGN respectively. Importantly, co-transfection of gN with an empty HA vector did not relocalize any gN to the TGN (data not shown). While gM targeting was independent of gN, the intracellular localization of gN was thus strongly influenced by gM. Altogether, these data strongly hinted at a functional interaction between gM and gN.

To assess whether the functional interaction seen in the co-transfected cells translated into direct physical interactions, cells were transfected with plasmids coding for either protein or co-transfected with both and analyzed by pull downs. Unfortunately, the initial gM polyclonal used (PAS980) was not suitable for immunoprecipitations in our hands and an gN antisera is as of yet unavailable, the two molecules were thus individually immunoprecipitated using an antibody against the HA tag present on gM or an anti-GFP antibody, which efficiently reacted with the related EYFP tag present on gN (data not shown). These samples were then analyzed by Western blotting to probe the association of the two proteins. As revealed in figure 3 (panels A, B), either antibody readily and specifically detected its intended target. Furthermore, the gM glycoprotein was, as expected, expressed in multiple forms ranging from 55 to over 70 kDa consistent with its previously documented post-translational processing (6, 38). Meanwhile, gN appeared as a single band near the 37 kDa marker, a mass consistent with the predicted 9.2 kDa gN when coupled to the 27 kDa YFP moieties (Fig. 3a). Most interestingly, the immunoprecipitation of gM brought down gN and vice versa, indicating the two molecules did indeed interact and did so in the absence of any additional viral protein (Fig. 3c). Interestingly, the GFP immunoprecipitation appeared enriched in the higher molecular weight forms of gM and contained much less of the 55 kDa gM band seen in the total cell lysate or gM immunoprecipitation, suggesting the complex may preferentially be enriched for specific gM post-translational forms (Fig. 3c).

The gM/gN complex exists in infected cells. Given the differential behavior of gM in infected and transfected cells, it was crucial to evaluate if the above gM/gN complex could also be detected in the context of an infection. For this purpose cells were transfected with pEYFPN1-

HSV UL49A to circumvent the lack of gN antibody then infected with wild type virus as a source of endogenous gM. The potential complex was probed by pull downs assays. The data confirms the specificity of the respective antibodies and their ability to bring down their intended targets (Fig. 4b). It also shows that a complex could indeed be readily detected in infected cells supplemented with exogenous YFP tagged gN (Fig. 4c), in agreement with the aforementioned co-transfection results. As before, gN was detected as a single band, indicating that gN expression in the context of an infection was no different than in transfection experiments. Similarly, the complex appeared enriched in the higher molecular weight forms of gM (compare total or immunoprecipitated gM with that following an immunoprecipitation against the YFP/gN protein). We thus concluded that gM does indeed form a complex with gN in both transfected and infected scenarios.

Implication of the gM amino terminus in the gM/gN complex. Knocking out the HSV-1 gM protein has proven an unusually difficult matter as deleting its start site results in the expression of gM from internal methionines. To address this issue, Kousoulas and colleagues had previously reported the use of a double HSV-1 mutant strain in which the first two methionines were mutated to substantially reduce gM expression (19). To first confirm these findings, we probed this viral mutant with the carboxyl terminal 4C10 gM antibody by both immunofluorescence and Western blotting. The data indicated that while the mutations were very effective at reducing gM expression, small residual amounts of the protein were nonetheless still detectable by immunofluorescence (Fig. 5a) and Western blotting (Fig. 5b). Quantification of the Western blot data indicated that the truncated mutant was expressed at approximately 15% of the level of wild type gM (Fig. 5c). Far from being an impediment, this

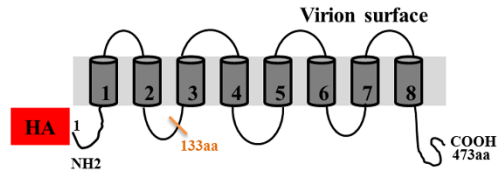
provided us with an opportunity to ask if the amino terminus of gM is important for its interaction with gN. Thus, cells transfected with exogenous pEYFP HSV1 UL49A and infected with the double gM mutant (HSV-1 Δ gM2) were analyzed by co-immunoprecipitation as above. The data showed that the gN still bound to the truncated gM (Fig. 6c). However quantification of 3 independent experiments indicated that the detection of the gM/gN complex was reduced by 33 folds when compared to full length gM, taking into account the relative expression level of the two proteins and the ability of the antibodies to immunoprecipitate them. As noted before, the complex preferentially contained the higher molecular weight form of gM.

Functional relevance of the complex. Various gM/gN complexes have been documented in distinct herpesviruses hinting at a conserved role. Although, the association of gM with gN typically causes a change of localization of one or both of the proteins, no function has been assigned to either gN or the gM/gN complex. However, gM is a negative modulator of cell-cell fusion when co-transfected with the HSV-1 fusion machinery constituted of the viral glycoproteins gB, gD and gH/gL (23). In contrast, gM stimulates the entry by fusion of the virus in the context of strong syncytial strains (22), indicating viral induced fusion is normally very tightly controlled. Given this highly modulated fusion activity, we asked whether gN might also participate in this process. One clue came during the above studies when syncytia were noted upon gN overexpression in infected cells, something that is uncommon when using the 17⁺ wild type HSV-1 strain. To address this more systematically, we quantified syncytia formation under various conditions using Hoechst to stain the nuclei and Alexa Fluor 647 labelled WGA to delineate the cell boundaries (see insets of Fig. 7). Not surprisingly, syncytia were never seen in gN, gM or gM/gN transfected cells in the absence of virus since the HSV-1 fusion apparatus

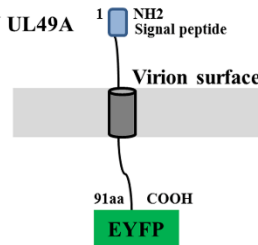
is lacking in these scenarios (data not shown). Similarly, the sole presence of wild type virus predominantly yielded a non-syncytial phenotype, with over 80% of cells containing a unique nucleus or very few of them (Fig. 7a). In contrast, only 45% of cells contained a single nucleus when gN was overexpressed in wild type infected cells (Fig. 7b). This substantial increase in cell-cell fusion was statistically highly significant ($p=0.0039$ when comparing the increase of cells with more than one nucleus; $p=0.0007$ if one compares the decrease of cells with a single nucleus) and reached up to 13 nuclei per cell (Fig. 7b). Very interestingly, this syncytial phenotype depended on the presence of both gM and gN as a viral strain depleted for gM (HSV-1 Δ gM2) was statistically indistinguishable ($p>0.05$) from wild type virus in terms of syncytia, even upon the overexpression of gN (Fig. 7c,d). Moreover, the lack of any significant syncytia in the case of truncated gM plus YFP gN shows that the gN, and consequently the vector alone, does not induce cell-cell fusion per se. This was nonetheless confirmed by transfecting the empty vector then infecting the cells with wild type virus. In these experiments, 94% of cells had a single nuclei ($n=295$ cells). This suggested that the gN overexpression deregulated the normally tightly gM controlled virus-induced fusion.

A. PLASMIDS

pHA-UL10



pEYFPN1-HSV UL49A



B. VIRUSES

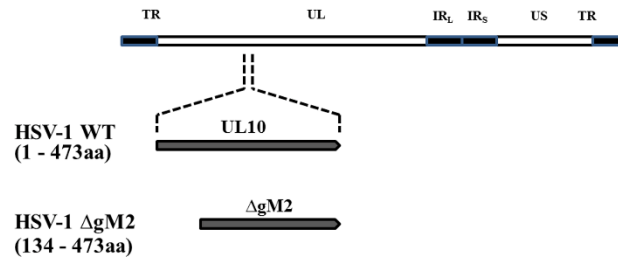


Figure 1: Schematic view of plasmids and viruses used in this study

A) Plasmid vectors either expressed the amino-terminal HA tagged gM (pHA-UL10) or the carboxyl-terminal YFP tagged gN (pEYFPN1-HSV UL49A) fusion proteins. The gray areas indicate the predicted transmembrane domains. **B)** The genomic map of the HSV-1 genome showing the unique long (UL) and unique short (US) regions flanked by terminal (TR) and internal inverted (IR_L and IR_S) repeat sequences is shown. In most experiments, wild type virus coding for the full length gM was used (473 amino acids; HSV-1 WT). Where indicated,

a mutant virus coding for a truncated gM was used where the first 133 amino acids of gM were deleted (HSV-1 Δ gM2).

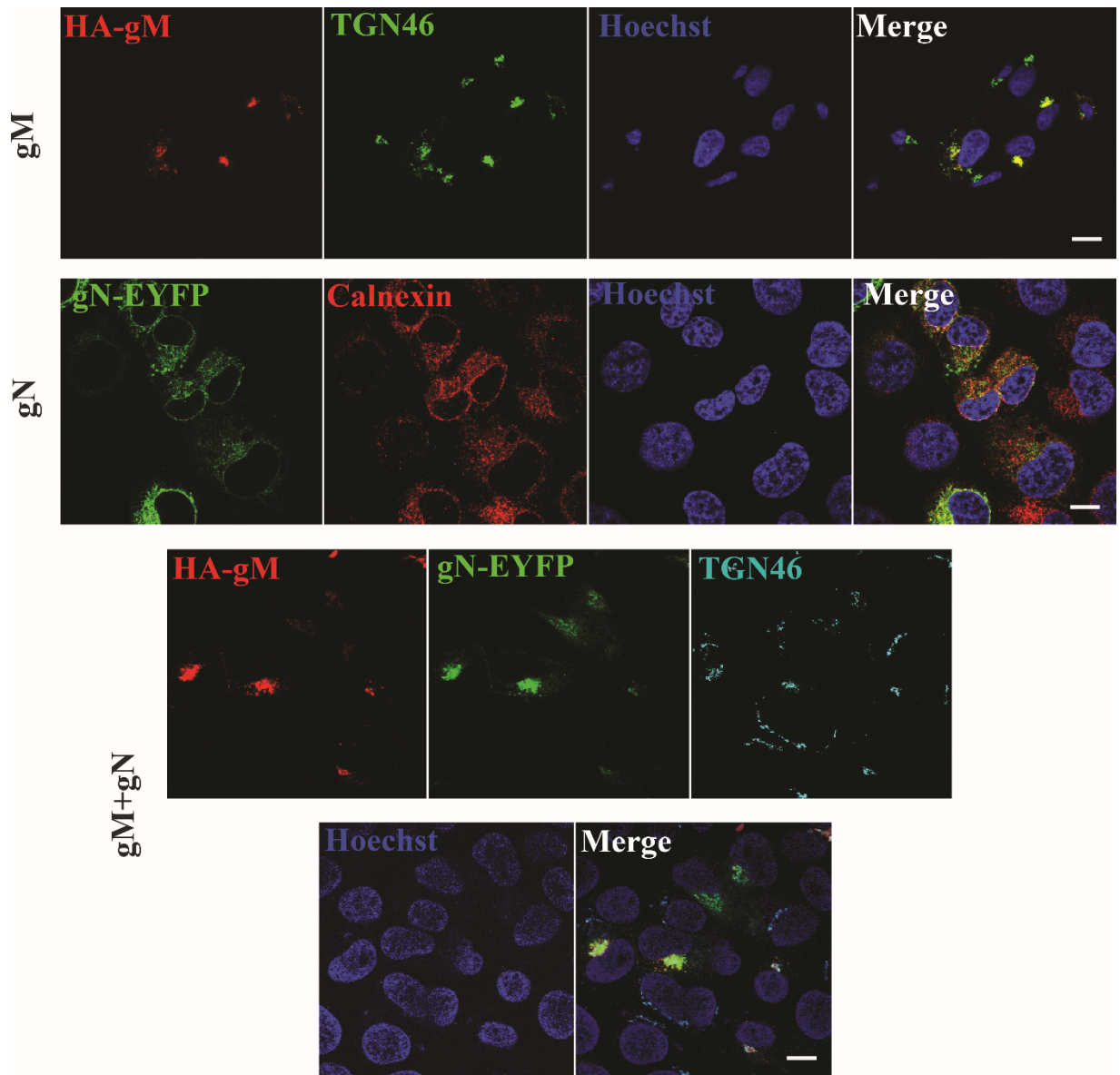


Figure 2: gM drives gN to the TGN in transfected cells

143B cells grown on coverslips were transfected with plasmids coding for HA tagged gM and YFP labelled gN or cotransfected with the two plasmids and processed as described in Materials

and Methods. The coverslips were fixed and then reacted with antibodies against HA (to detect gM), TGN46 (to label the TGN), or calnexin (to identify the endoplasmic reticulum), while nuclei were labelled with Hoechst. Samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy. Scale bar: 10 μ m

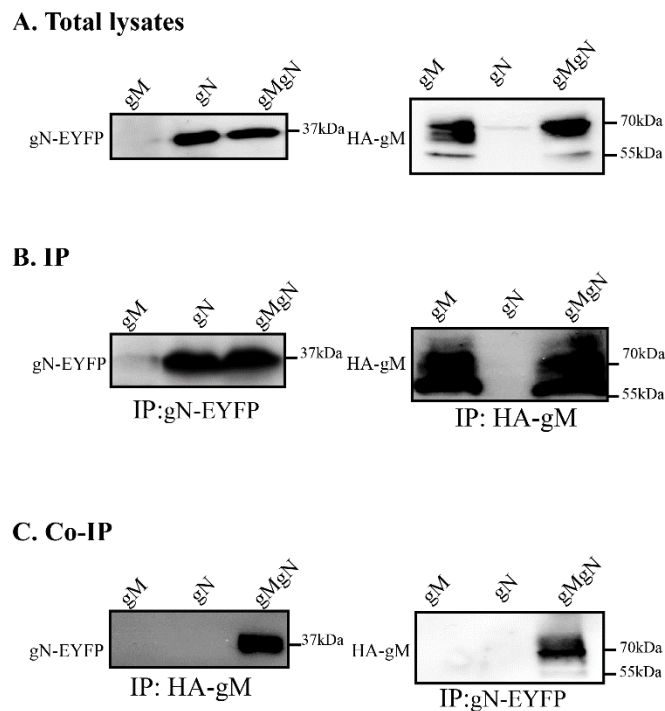


Figure 3: Physical interaction between gM and gN in transfected cells

Hela cells were transfected with plasmids expressing HA tagged gM (gM), YFP tagged gN (gN) or cotransfected with both constructs (gM/gN). The cells were harvested at 24h post-transfection and lysed with RIPA buffer. As positive controls, 1/50th of the total lysate of each transfection were also loaded onto the gels and analyzed (panel A). The rest of the lysates were immunoprecipitated (IP) with mouse anti-HA antibodies for gM or mouse anti-GFP antibodies for gN (panels B, C) and subjected to SDS-PAGE in 10% gel followed by Western blotting. The

blots were reacted with the PAS980 anti-gM antibody or an anti-GFP antibody to detect gM and gN respectively as indicated to the left of each blot (panels A, B, C). The molecular masses of the molecular weight marker are indicated to the right of the panels.

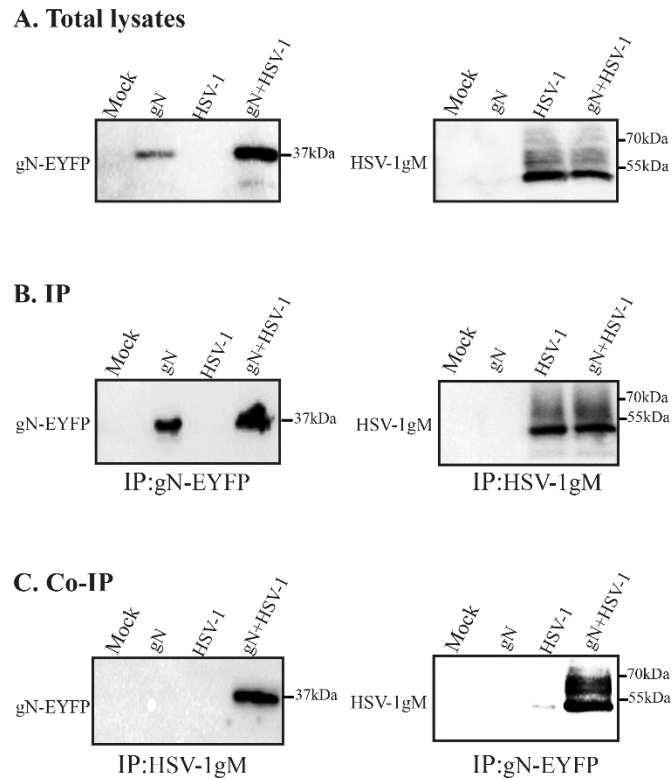


Figure 4: Co-immunoprecipitation of the gM/gN complex in infected cells

Hela cells were transfected with YFP tagged gN for 24h. They were then infected with wild-type virus at an MOI of 5 and the cells harvested at 16 hpi and lysed. Two percent and a half (1/40th) of the lysates was directly loaded onto the gels (panel A) and the rest immunoprecipitated (IP) with the 4C10 anti-gM or anti-GFP antibody as indicated (panels B, C). All samples were analyzed by Western blotting. The blots were reacted with the PAS980 anti-gM (panels A-C, right side) or anti-GFP antibodies (panels A-C, left side). Uninfected

cells were used as negative control. The molecular masses of the molecular weight marker are indicated to the right of the panels.

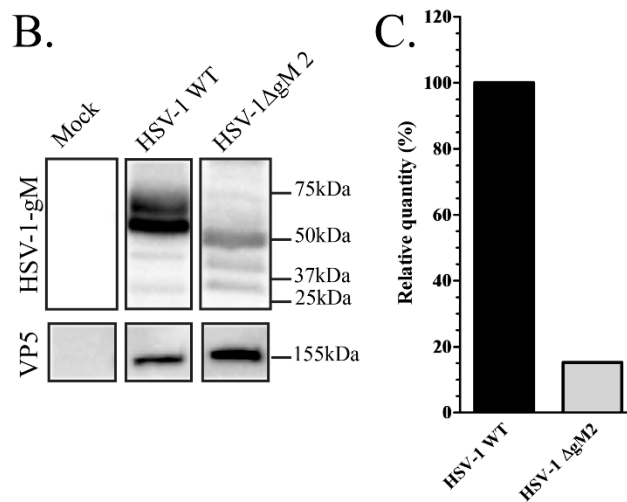
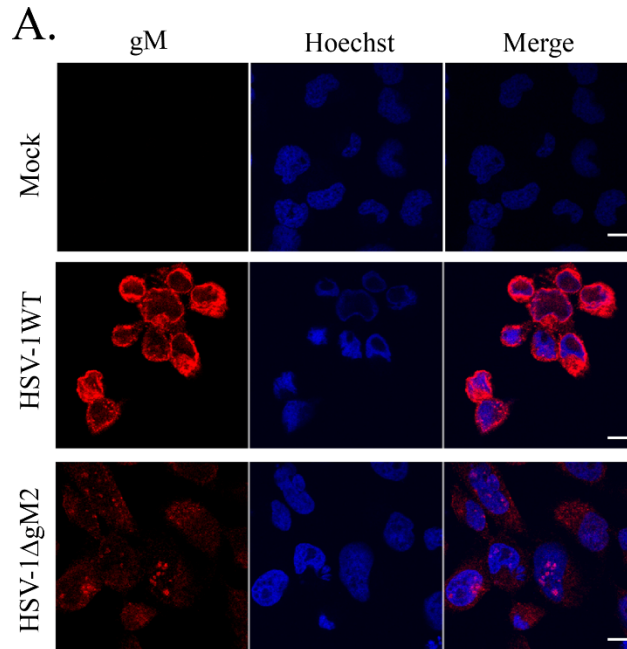


Figure 5: Expression of gM in wild type and mutant HSV-1 strains

A) 143B cells grown on coverslips were infected with HSV-1ΔgM2 and, as positive control, wild type HSV-1. The cells were fixed at 16 hpi and stained with anti-gM (4C10) antibody (red) and Hoechst (blue). **B)** HSV-1, HSV-1ΔgM2 infected or mock treated 143B cells were also harvested at 16 hpi and cell lysates analyzed by Western blotting. The blots were reacted with anti-gM (PAS980) antibodies or, as loading control antibodies against the major capsid protein

VP5. Mock infected cells were used as negative control. Note that the predicted molecular weight for gM is 52 kDa, while that of the truncated HSV-1ΔgM2 (lacking the first 132 amino acids) is 37.5 kDa. These predictions do not take into consideration the reported post-translational processing of the gM protein, clearly evident in the blots. C) Quantification of the Western blot expression levels of gM in HSV-1 WT and HSV-1ΔgM2. These estimates were normalized against VP5 (ratios of gM : VP5). For easier comparison, the data for wild type virus was arbitrarily defined as 100%. Scale bar: 10 μm

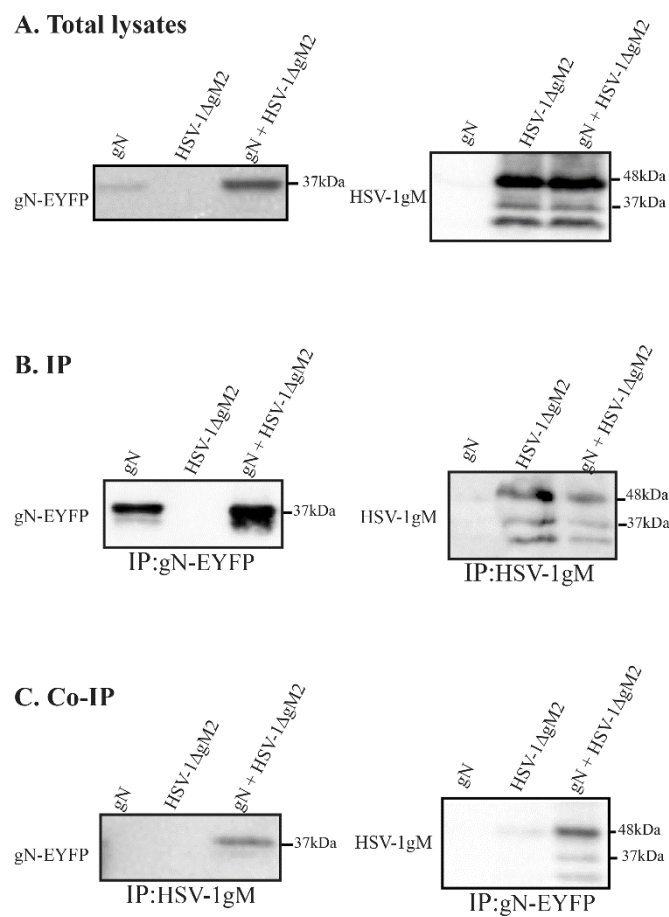
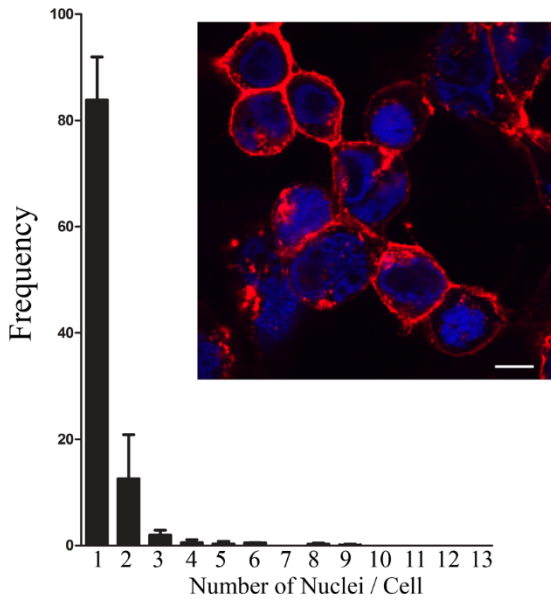


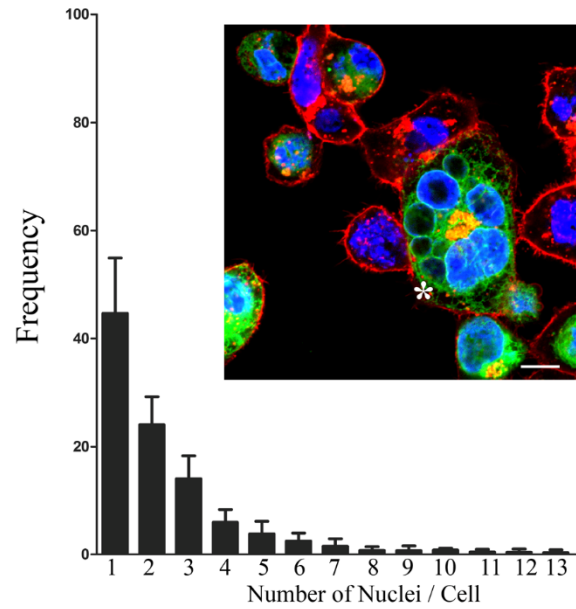
Figure 6: gM/gN interacts less efficiently with the amino truncated ΔgM2 protein.

Hela cells were transfected with YFP tagged gN for 24h. They were then infected with HSV-1 Δ gM2virus at an MOI of 5 and the cells harvested at 16 hpi and lysed. Two percent and a half (1/40th) of the lysates were directly loaded onto the gels and the rest immunoprecipitated (IP) with the 4C10 anti-gM or anti-GFP antibody (panels B,C) and analyzed by Western blotting. The blots were reacted with the PAS980 anti-gM (panels A-C, right side) or anti-GFP antibodies (panels A-C, left side). As before, the molecular masses of the molecular weight marker are indicated to the right of the panels.

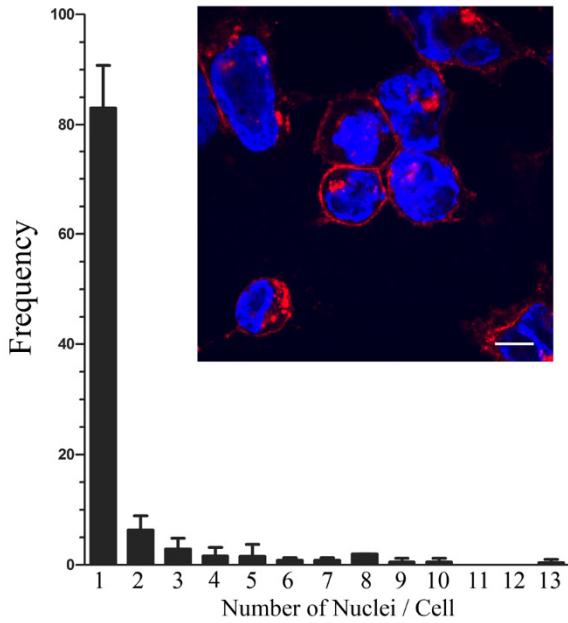
A. HSV-1 WT



B. HSV-1 WT + gN



C. HSV-1 Δ gM2



D. HSV-1 Δ gM2 + gN

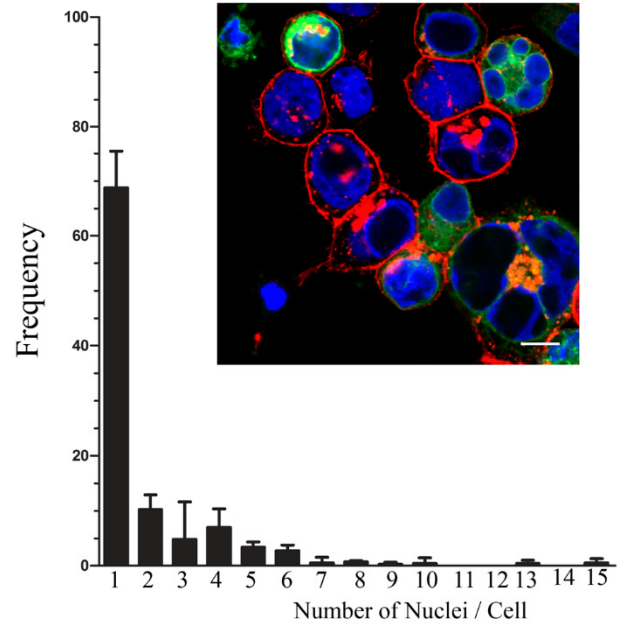


Figure 7: The HSV-1 gN viral protein induces syncytial formation in infected cells.

143B cells were transfected with (panels B, D) or without (panels A, C) YFP tagged gN for 24h and subsequently infected at an MOI of 2 with wild type virus (panels A, B) or HSV-1ΔgM2 (panels C, D). At 12 hpi, the cells were fixed and stained without permeabilization for plasma membrane with Alexa647-labeled wheat germ agglutinin to delineate the cell boundaries. Cells were then washed and examined by confocal laser scanning microscopy for the presence of syncytia, defined as single cells containing two or more nuclei. Quantification was measured by counting 200 cells for each experiment. The reported values represent averages of three independent experiments. The error bars indicate standard deviations. Fluorescence microscopy insets show typical examples for each condition. The * in panel B denotes an example of a syncytia. Scale bar: 10 μm

Discussion

From alphaherpesviruses to gammaherpesviruses, gM interacts with gN and the complex typically leads to changes in intracellular targeting of either or both proteins (15, 21, 30, 36, 37, 40). The present study indicates this extends to HSV-1 and further reveals that the amino terminal 132 amino acids of HSV-1 gM are important for an efficient interaction between the two proteins. At this point though, it is premature to conclude if the deletion of the amino gM terminus removes a binding domain or perhaps alternatively impacts the overall conformation of the protein. It may also be that the lower expression level of the truncated mutant lessens the probability of contact between the two proteins. In all cases, the complex was composed of a single gN molecular weight band preferentially bound to, but not exclusively, with higher molecular weight forms of gM, which are presumably the heavily glycosylated forms of the protein. This may mean the two proteins interact once gM is modified in the Golgi or more

likely, since gN is never TGN bound in the absence of gM, that the two proteins interact in the ER and the complex is then transported to the Golgi where immature sugars on gM can be modified.

It is unfortunately not possible to address the intracellular localization of endogenously expressed and untagged gN as no antibody is available and our efforts to produce such an antibody have failed (El Kasmi & Lippé). We thus cannot rule out that the ER localization of the overexpressed gN does not reflect that of gN expressed by the virus. However, as the YFP tagged gN clearly physically and functionally interacted with both endogenous and exogenously expressed gM, we feel confident that the gM/gN complex reported here is biologically relevant. Moreover, the co-localization of the two proteins in intact cells indicated the immunoprecipitated complex is not an artifact based on a post-lysate event taking place in the test tube.

Interestingly, while gN is dominant and alters the localization and/or maturation of gM in BHV-1, EHV-1 and HHV8 (21, 30, 40), the opposite seems true for HSV-1, EBV and ILTV where gM is required for the transport and /or processing of gN (this study and (36, 37)). While the reasons for this distinction among herpesviruses are not clear, that the complex formation has targeting consequences for gM or gN in all herpesviruses studied so far appears well conserved. We previously reported the late targeting of gM from the nuclear membranes to the TGN in infected cells (38) but the mechanisms targeting gM to either compartment are not known. Our initial expectation was that gN might constitute the molecular switch that triggers HSV-1 gM relocalization since gN expression coincides with this change of targeting and is known to redirect gM in some herpesviruses. Unexpectedly, this was not the case for HSV-1. Given that gM is never nuclear when transfected alone but transits in different intracellular compartments

during an infection, this indicates that one or more additional viral proteins controls gM intracellular targeting or that alternatively, a host protein does so under the influence of the virus. How gM is targeted to the nucleus and escapes this compartment thus remains a mystery. The impact of the gM/gN complex on virus-induced membrane fusion, a phenomenon normally under tight control, is of significant interest. Past studies have attributed both a negative and positive role for gM. Hence, gM co-transfection reduced cell-cell fusion mediated by the HSV-1 fusion machinery composed of gB, gD and the gH/gL complex (23). In apparent contrast, gM was recently reported to stimulate viral entry, i.e. the fusion of the viral envelope with the cell surface in the context of strong syncytial strains (22). Interestingly, both cases involve “forced situations” where the fine controls of virally-induced fusion were deregulated as has been the case with the various syncytial strains studied in the past, all of which involve mutations (41-49). Despite this possible caveat, these experimental models are clearly very useful to unravel new fusion modulators that may otherwise be difficult to detect. It is in a similar context that gN’s role on syncytial formation was detected in the present study, in this case by overexpressing gN early during an infection with a non-syncytial strain.

The apparent discrepancy between the transfection and infection scenarios must be reconciled somehow. It is worth noting that gM inhibition of fusion in the transfected model can occur in the absence of gN but is stimulated by it (23), while the stimulatory activity of gM on fusion during entry by syncytial strains happens in the presence of gN (22). In contrast, the sole co-expression of gM and gN in the absence of the gB, gD and gH/gL is insufficient to drive cell-cell fusion. Our own present findings indicate that the sole overexpression of gN in transfection experiments or in the context of a virus expressing significantly reduced amounts of gM (HSV-1 Δ gM2 viral mutant), does not induce syncytial formation. Altogether, these results suggest that

gN's activity first depends on the presence of gM and secondly that additional viral proteins temporarily and spatially modulate gM positive or negative regulation of fusion. While only speculative, it may be critical to identify additional modulators of fusion and finely manipulate this viral apparatus. This will surely be a significant challenge.

While the precise interplay between gM and gN remains elusive, it is tempting to speculate that gM may play a role early during the infection, when it is located on nuclear membranes and when gN is not yet expressed. At that stage, gM could regulate membrane fusion, perhaps preventing the unrestricted fusion of the inner and outer nuclear membrane at a time when new viral particles have yet to be assembled. The targeting of gM to nuclear membranes prior to the presence of the gB, gD and gH fusogenic machinery would be consistent with such a concept (38, 50-53). As gM is subsequently detected on perinuclear virions at 14 hpi (39), it could then promote the fusion of the enveloped viral particles with the outer nuclear membrane, although data by Mettenleiter and colleagues would argue otherwise as the deletion of gM from the related pseudorabies virus does not lead to an accumulation of perinuclear virions (17). Further downstream, the partial release of gM from the nucleus (observed from 10-13 hpi) coincides with the expression of gN (mRNA detectable at 10 hpi) and targeting of gN to the TGN. While the exact mechanism of action of gN is unknown, it clearly modulates gM by potentially sequestering it and/or preventing it from interacting with other proteins. This interaction of gN with gM in infected cells could thus prevent gM's negative modulation on membrane fusion and thus promote cell-cell fusion under perhaps yet to be defined suitable conditions. This would enable the virus to evade neutralizing antibodies awaiting outside the cell and thus favor viral spreading.

Acknowledgments

We would like to thank the generosity of Drs Konstantin Gus Kousoulas, Colin Crump, Joel Baines, Lynn Enquist and Beate Sodeik for providing invaluable reagents. We particularly wish to thank Kerstin Radtke for her help in the early stages of this work. This work was financed by a NSERC grant to RL (RGPIN/342203-2010).

References

1. **Loret S, Guay G, Lippé R.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-8618.
2. **Henaff D, Radtke K, Lippé R.** 2012. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. *Traffic* **13**:1443-1449.
3. **Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH.** 2012. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* **4**:800-832.
4. **Lehner R, Meyer H, Mach M.** 1989. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol* **63**:3792-3800.
5. **Baines JD, Roizman B.** 1991. The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J Virol* **65**:938-944.
6. **Baines JD, Roizman B.** 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J Virol* **67**:1441-1452.

7. **Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Braun B, Kaaden OR, Baines JD.** 1996. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J Virol* **70**:4110-4115.
8. **Fuchs W, Mettenleiter TC.** 1999. DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein. *J Gen Virol* **80**:2173-2182.
9. **Cai JS, Jang HK, Izumiya Y, Tsushima Y, Kato K, Damiani AM, Miyazawa T, Kai C, Takahashi E, Mikami T.** 1999. Identification and structure of the Marek's disease virus serotype 2 glycoprotein M gene: comparison with glycoprotein M genes of Herpesviridae family. *J Vet Med Sci* **61**:503-511.
10. **Dijkstra JM, Visser N, Mettenleiter TC, Klupp BG.** 1996. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J Virol* **70**:5684-5688.
11. **Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M, Osterrieder N.** 2002. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Gen Virol* **83**:997-1003.
12. **Konig P, Giesow K, Keil GM.** 2002. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Vet Microbiol* **86**:37-49.

13. **Ziegler C, Just FT, Lischewski A, Elbers K, Neubauer A.** 2005. A glycoprotein M-deleted equid herpesvirus 4 is severely impaired in virus egress and cell-to-cell spread. *J Gen Virol* **86**:11-21.
14. **Yamagishi Y, Sadaoka T, Yoshii H, Somboonthum P, Imazawa T, Nagaike K, Ozono K, Yamanishi K, Mori Y.** 2008. Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread. *J Virol* **82**:795-804.
15. **Kawabata A, Jasirwan C, Yamanishi K, Mori Y.** 2012. Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation. *Virology* **429**:21-28.
16. **Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W.** 2000. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* **74**:11881-11892.
17. **Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG, Mettenleiter TC.** 2009. Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **83**:896-907.
18. **Brack AR, Dijkstra JM, Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC.** 1999. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol* **73**:5364-5372.
19. **Chouljenko DV, Kim IJ, Chouljenko VN, Subramanian R, Walker JD, Kousoulas KG.** 2012. Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol* **86**:4262-4270.

20. **Klupp BG, Nixdorf R, Mettenleiter TC.** 2000. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J Virol* **74**:6760-6768.
21. **Koyano S, Mar EC, Stamey FR, Inoue N.** 2003. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J Gen Virol* **84**:1485-1491.
22. **Kim IJ, Chouljenko VN, Walker JD, Kousoulas KG.** 2013. Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry. *J Virol* **87**:8029-8037.
23. **Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T, Browne HM.** 2004. Alpha herpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol* **85**:3517-3527.
24. **Ren Y, Bell S, Zenner HL, Lau SY, Crump CM.** 2012. Glycoprotein M is important for the efficient incorporation of glycoprotein H-L into herpes simplex virus type 1 particles. *J Gen Virol* **93**:319-329.
25. **Barker DE, Roizman B.** 1992. The unique sequence of the herpes simplex virus 1 L component contains an additional translated open reading frame designated UL49.5. *J Virol* **66**:562-566.
26. **Barnett BC, Dolan A, Telford EA, Davison AJ, McGeoch DJ.** 1992. A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. *J Gen Virol* **73**:2167-2171.
27. **Liang X, Tang M, Manns B, Babiuk LA, Zamb TJ.** 1993. Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* **195**:42-50.

28. **Said A, Azab W, Damiani A, Osterrieder N.** 2012. Equine herpesvirus type 4 UL56 and UL49.5 proteins downregulate cell surface major histocompatibility complex class I expression independently of each other. *J Virol* **86**:8059-8071.
29. **Deruelle MJ, Van den Broeke C, Nauwynck HJ, Mettenleiter TC, Favoreel HW.** 2009. Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology* **395**:172-181.
30. **Lipinska AD, Koppers-Lalic D, Rychlowski M, Admiraal P, Rijsewijk FA, Bienkowska-Szewczyk K, Wiertz EJ.** 2006. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol* **80**:5822-5832.
31. **Dijkstra JM, Gerdtts V, Klupp BG, Mettenleiter TC.** 1997. Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host. *J Gen Virol* **78**:2147-2151.
32. **MacLean CA, Robertson LM, Jamieson FE.** 1993. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J Gen Virol* **74 (Pt 6)**:975-983.
33. **Jons A, Dijkstra JM, Mettenleiter TC.** 1998. Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol* **72**:550-557.
34. **Liang X, Chow B, Raggio C, Babiuk LA.** 1996. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol* **70**:1448-1454.

35. **Wu SX, Zhu XP, Letchworth GJ.** 1998. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J Virol* **72**:3029-3036.
36. **Fuchs W, Mettenleiter TC.** 2005. The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res* **112**:108-114.
37. **Lake CM, Molesworth SJ, Hutt-Fletcher LM.** 1998. The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J Virol* **72**:5559-5564.
38. **Zhang J, Nagel CH, Sodeik B, Lippé R.** 2009. Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes. *J Virol* **83**:12984-12997.
39. **Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J, Roizman B.** 2007. Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J Virol* **81**:800-812.
40. **Rudolph J, Seyboldt C, Granzow H, Osterrieder N.** 2002. The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J Virol* **76**:2952-2963.
41. **Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G, Roizman B.** 1991. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**:6414-6424.
42. **Melancon JM, Foster TP, Kousoulas KG.** 2004. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *J Virol* **78**:7329-7343.

43. **Sanders PG, Wilkie NM, Davison AJ.** 1982. Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **63**:277-295.
44. **Bzik DJ, Fox BA, DeLuca NA, Person S.** 1984. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* **137**:185-190.
45. **Bond VC, Person S.** 1984. Fine-Structure Physical Map Locations of Alterations That Affect Cell-Fusion in Herpes-Simplex Virus Type-1. *Virology* **132**:368-376.
46. **Debroy C, Pederson N, Person S.** 1985. Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. *Virology* **145**:36-48.
47. **Hutchinson L, Goldsmith K, Snoddy D, Ghosh H, Graham FL, Johnson DC.** 1992. Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *J Virol* **66**:5603-5609.
48. **Pogue-Geile KL, Lee GT, Shapira SK, Spear PG.** 1984. Fine mapping of mutations in the fusion-inducing MP strain of herpes simplex virus type 1. *Virology* **136**:100-109.
49. **Ruyechan WT, Morse LS, Knipe DM, Roizman B.** 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* **29**:677-697.
50. **Torrise MR, Di Lazzaro C, Pavan A, Pereira L, Campadelli-Fiume G.** 1992. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J Virol* **66**:554-561.
51. **Stannard LM, Himmelhoch S, Wynchank S.** 1996. Intra-nuclear localization of two envelope proteins, gB and gD, of herpes simplex virus. *Arch Virol* **141**:505-524.
52. **Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, Johnson DC.** 2007. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between

the virion envelope and the outer nuclear membrane. Proc Natl Acad Sci U S A
104:10187-10192.

53. **Johnson DC, Wisner TW, Wright CC.** 2011. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. J Virol **85**:4910-4926.

Article 2: Extended synaptotagmin 1 interacts with the Herpes simplex virus type 1 glycoprotein M and negatively modulates virus-induced membrane fusion

Auteurs : Imane El Kasmi¹, Bita Khadivjam¹, Miki Lackman¹, Johanne Duron¹, Eric Bonneil², Pierre Thibault² and Roger Lippé¹

Publié dans : Journal of Virology. Octobre 2017. Diffusion en ligne avant impression

Contribution des auteurs :

Imane EL Kasmi* : conception, planification et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Bit a Khadivjam: Réalisation des expériences d'inhibition d'E-Syts (1 / 2 / 3)

Miki Lackman : Réalisation des expériences d'inhibition d'E-Syt1

Johanne Duron : Réalisation des expériences d'essais de plaques

Eric Bonneil : Analyse des échantillons par MS-MS

Pierre Thibault : Analyse des échantillons par MS-MS

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

* Premier auteur

Note sur le texte :

Cette section reproduit le texte intégral de l'article mentionné ci-dessus. Certaines modifications ont toutefois été apportées à la mise en page du manuscrit afin de mieux l'intégrer à la présente thèse.

**Extended synaptotagmin 1 interacts with the Herpes simplex virus type 1 glycoprotein M
and negatively modulates virus-induced membrane fusion**

By

Imane El Kasmi¹, Bitu Khadiyjam¹, Miki Lackman¹, Johanne Duron¹, Eric Bonneil², Pierre
Thibault² and Roger Lippé¹

¹ Department of Pathology and Cell biology, University of Montreal, C.P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada H3C 3J7

² Institute for Research in Immunology and Cancer, ‡Department of Chemistry, University of
Montreal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada H3C 3J7

Running title: E-Syt1 binds HSV-1 gM and limits viral fusion

Keywords: E-Syt1 / E-Syt2 / E-Syt3 / gM / UL10 / HSV / syncytia / fusion

Corresponding author:
Roger Lippé
Email: roger.lippe@umontreal.ca
Tel.: +1 514 343-5616

Abstract

Enveloped viruses typically encode their own fusion machinery to enter cells. Herpesviruses are particular as they fuse with a number of cellular compartments throughout their life cycle. As the uncontrolled mixing of the host membranes should be avoided in these events, the tight regulation of the viral fusion machinery is critical. While studying the herpes simplex virus type 1 glycoprotein gM, we identified the cellular protein E-Syt1 (**Extended synaptotagmin-1**) as an interaction partner. This took place in both infected and transfected cells, suggesting other viral proteins were not required for this interaction. Most interestingly, E-Syt1 is a member of the synaptotagmin family of membrane fusion regulators. However, this protein is rather known to promote the tethering of the endoplasmic reticulum (ER) with the plasma membrane. We now show that E-Syt1, along with the related E-Syt3, negatively modulates viral release into the extracellular milieu, cell-to-cell viral spread and viral entry, all processes that implicate membrane fusion events. Similarly, these E-Syt proteins impacted the formation of viral-induced syncytia. Altogether, these findings hint at the modulation of the viral fusion machinery by the E-Syt family of proteins.

Importance

Viruses typically encode their own fusion apparatus to enable them to enter cells. For many viruses, this means a single fusogenic protein. However, herpesviruses are large entities that express several accessory viral proteins to regulate their fusogenic activity. The present study hints at the additional participation of cellular proteins in this process, suggesting the host can also modulate, to some extent, viral fusion. Hence the E-Syt proteins 1 and 3 seem to

negatively modulate the different viral fusion events that take place during the HSV-1 viral life cycle. This could represent yet another innate immunity response to the virus.

Introduction

Synaptotagmins are members of a membrane-trafficking protein family that were originally defined as containing an N-terminal transmembrane region, a variable linker, and two so-called C-terminal C2 domains that bind phospholipids and calcium (1). There are 17 known mammalian synaptotagmins found in the brain and located in distinct subcellular compartments (2, 3). They participate in the maturation of secretory vesicles, exocytosis and endocytosis, including protein and membrane recycling at nerve terminals (4-6). Most of these proteins engage and regulate SNARE proteins, the core cellular fusion machinery (7), and many act as Ca^{2+} sensors and form homo- or heterodimers (1, 8-11). Moreover, they finely control membrane blending by acting on fusion pore opening and expansion (12). However, the functions of several synaptotagmins remain to be determined.

The extended synaptotagmins (E-Syt) belong to a family of transmembrane proteins recently discovered that are ubiquitously expressed. The three mammalian homologs (E-Syt1, E-Syt2, E-Syt3) of the yeast tricalbins (tricalbins-1, 2 and 3) have a similar domain structure as the classical synaptotagmins. They additionally contain an SMP (Synaptotagmin-like, Mitochondrial-lipid-binding Protein) domain and multiple C2 domains (five in E-Syt1 and three in E-Syt2 and E-Syt3) (13). Despite this structural homology, they do not seem to interact with SNARE proteins to modulate fusion events as synaptotagmins do. Rather, they mediate the tethering of the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane (PM) (14), specific lipid transfer between the two membranes (15) and receptor signaling (16). At the intracellular level,

E-Syt1 broadly associates with the ER, while E-Syt2 and E-Syt3 are rather at ER-PM contact sites (14, 17, 18). These surface contacts are mediated by C2 domain-dependent binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂ in the PM, and in the case of E-Syt1, by elevated levels of cytosolic Ca²⁺ (19). As for synaptotagmins, E-Syt proteins can form homo- or heterodimers with each other, which promotes the above ER-PM interactions (14). However, E-Syts are not essential and cells that lack all three isoforms do not exhibit major obvious defects aside from growing more slowly (15). Despite these findings, the precise role played by E-Syts is mainly unknown and any functional link with the SNARE cellular fusion machinery, if any, remains to be found.

Enveloped viruses enter cells by fusion with either the plasma membrane or an internal compartment such as endosomes. The process is driven by virally encoded proteins that are activated downstream of their initial interactions with specific host receptors. Albeit fusion is often mediated by a unique viral protein, herpesviruses exhibit a complex fusion apparatus composed of a core of four distinct viral proteins. For herpes simplex virus type 1 (HSV-1), these are the glycoprotein B (gB), gD and the gH/gL complex, with the former exhibiting the fusogenic activity (20). While all four proteins are present on the surface of virions, they are also detected on various cellular compartments during the infection, including the nuclear envelopes, TGN, endosomes and plasma membrane (21-27). This implies that gB is tightly regulated to avoid the unforeseen and uncontrolled fusion of various cellular compartments. This is particularly critical as the virus undergoes 3 to 4 distinct fusion events during its replication cycle (28). As discussed above, the virus initially enters cells by fusion (1st fusion event) and subsequently releases its genome into the nucleus. There, it assembles new viral particles that are too large to escape via the nuclear pores and rather bud through the inner

nuclear envelope, producing transient enveloped viruses that also contain the aforementioned core fusion machinery (29-31). This is followed by the rapid fusion of these primary enveloped virions with the outer nuclear envelope, thereby releasing naked viral capsids into the cytoplasm (2nd fusion event). Following their re-envelopment within the cell and subsequent budding from that compartment to yield double enveloped viruses (32), the viruses fuse with the plasma membrane to release singly enveloped mature virions (3rd fusion event). Finally, HSV-1 can use an alternative exit pathway and infect neighboring cells via direct cell-cell fusion induced by the virus, representing a fourth potential fusion event (33).

A large body of literature shows that HSV-1 gB is regulated by the viral proteins gD and gH/gL and cellular receptors (nectin 1 or 2, HVEM, and 3-*O*-sulphated heparin sulphate (20)). There is evidence that other molecules also participate in this process, including the viral proteins U_L20, gK, U_S3, TK, gM and gN (34-43). Many of these activities were detected in the context of mutants that promote syncytia, cell-cell fusion events that can arise when cells expressing the core HSV-1 fusion machinery at their cell surface contact adjacent cells. The viral gM protein is an interesting case as it is present on most of the cellular compartments where viral fusion takes place, as well as on the aforementioned primary enveloped virions and onto mature extracellular virions (27, 44, 45). It also reduces the surface expression of gB and the gH/gL complex and negatively impacts syncytium formation in transfected cells (46-48). In contrast, gM instead promotes viral entry at the cell surface and stimulates gH/gL incorporation in mature virions (41, 49, 50). Interestingly, it is among the first viral glycoproteins found at the inner nuclear membrane, well before the core fusion machinery is targeted there (45). This raises the question as to whether and how gM may modulate viral fusion and is itself regulated, both positively and negatively. So far, the HSV-1 proteins U_L46 and gN have been identified as gM

partners (43, 51-53) with gN directly binding to gM and stimulating virally induced syncytium formation (43). Another open question is whether cellular proteins, aside from the known HSV-1 receptors, could participate in this process. Thus little is known about the role and modulation of gM during the infection.

To better understand how gM might regulate viral fusion, a search for novel binding partners was performed, with an emphasis on host-derived proteins using HSV-1 gM transfected cells. We found by proteomics and confirmed in co-immunoprecipitation studies that HSV-1 gM binds to the cellular E-Syt1 protein. Knocking E-Syt1 down stimulated the release of the virus into the extracellular media at the expense of cell-associated infectious particles. Conversely, overexpressing E-Syt1 led to reduced levels of mature virions in the media, hinting at a negative regulation. E-Syt1 did not act alone but in combination with the related E-Syt3, which exhibited a similar phenotype. Most interestingly, these E-Syt proteins impacted viral entry as well as cell-cell fusion (syncytia) and viral plaque size (cell-to-cell spread), suggesting they somehow acted on the viral fusion machinery. These findings highlight functional links between the viral and cellular fusion machinery and the membrane tethering E-Syt family.

Materials and Methods

Cells and viruses. Vero (African green monkey kidney), HeLa (human cervical cancer) cells were purchased from (ATCC) and all cell lines were tested yearly for absence of mycoplasma contaminants. They were grown at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% bovine growth serum (BGS, HyClone) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen). Wild type HSV-1 strain 17⁺ and the HSV-1(17⁺)Lox-Luc viral strain (both obtained from Dr. Beate Sodeik) were propagated on BHK cells and their titers

determined by plaque assay on Vero cells. The latter virus is derived from strain 17⁺ and encodes a Gaussian luciferase gene under the constitutively expressed immediate early CMV promoter positioned between the UL55 and UL56 HSV-1 genes (57).

Antibodies. Primary antibodies and dilution used in this study were as follows: anti-Myc rabbit polyclonal (1:1000; 2272, Cell Signaling Technology), anti-Myc mouse polyclonal (9B11) (1:100; 2276, Cell Signaling Technology) anti-HA mouse monoclonal (1:1000; SC-7392, Santa Cruz), anti E-Syt1 rabbit polyclonal (1:1000; A303-362A, Bethyl Laboratories), anti E-Syt2 rabbit polyclonal (1:1000; NBP1-59988, Novus Biologicals), anti E-Syt3 rabbit polyclonal (1:1000; NBP1-91354, Novus Biologicals), anti β -actin mouse monoclonal (1:2500; ab6276, Abcam), anti γ -Tubulin mouse monoclonal (1:5000; T6557, Sigma-Aldrich), anti-HSV VP5 mouse monoclonal (1:2000; Virusys), anti-HSV gM rabbit polyclonal PAS980 (1:1000; courtesy of Dr. Lynn Enquist), anti-HSV gM rabbit polyclonal 4c10 (1:000; courtesy of Dr. Joel Baines) and anti-human DDX3 rabbit R648 polyclonal (1:4000; courtesy of Dr. A. Patel). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (goat anti-mouse or rabbit) and light-chain-specific antibody (mouse anti-rabbit) were all used at 1:10 000 and were purchased from Jackson ImmunoResearch.

Plasmids. Plasmids encoding myc E-Syt1, myc E-Syt2 and myc E-Syt3 were a gift from Dr. Pietro de Camilli (14). The empty vector pcDNA3.1 myc was from Invitrogen. The plasmid encoding pHA-UL10 (expressing hemagglutinin HA-tagged HSV-1 gM) was generated by Mutagenex (Suwanee, GA, USA).

Mass spectrometry. HeLa cells were transiently transfected with plasmid expressing HA-gM or mock transfected (no DNA). Twenty-four hours post-transfection, the cells were harvested and lysed in RIPA buffers. The lysates were then immunoprecipitated (IP) using a preimmune serum or an anti-HA monoclonal antibody and the bead-bound proteins analyzed on precast 4-12% SDS-PAGE gradient gels and silver staining. For each lane, four similarly sized parts were excised, taking care to exclude the heavy chain of the precipitating antibodies, and destained with 15 mM of potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich) and 50 mM of sodium thiosulfate (sigma-Aldrich). Each part was shrunk in 50% CAN, reconstituted in 50 mM ammonium bicarbonate with 10 mM TCEP (Thermofisher Scientific) and vortexed for 1 h at 37 °C. Chloroacetamide (Sigma-Aldrich) was added for alkylation to a final concentration of 55 mM. Samples were vortexed for another hour at 37 °C. One microgram of trypsin was added, and the digestion was performed for 8 h at 37 °C. Peptide extraction was conducted with 90% CAN. Extracted peptide samples were dried down and solubilized in CAN 5% formic acid (FA) 0.2%. Samples were loaded on a homemade C18 precolumn (0.3 mm i.d. x 5 mm) connected directly to the switching valve. They were separated on a homemade reversed-phase column (150 µm i.d. x 150 mm) with a 56 min gradient from 10–30% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on a Nano-LC-Ultra-2D (Eksigent, Dublin, CA) connected to an LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired with a 60,000 resolution was followed by 12 MS/MS spectra on the most abundant multiply charged precursor ions. Tandem MS experiments were performed using CID at a collision energy of 25%. The data were processed using Mascot 2.1 (Matrix Science, London, UK) and a concatenated UniProt human and herpesvirus database. Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10 ppm and 0.01 Da, respectively. Variable selected post-translational

modifications were carbamidomethyl (C), oxidation (M), deamidation (NQ) and phosphorylation (STY). Data were visualized with Scaffold 4.3.0 (Protein threshold 99% with at least 2 peptides identified and a false discovery rate of 0.1% for peptides).

Co-immunoprecipitation. For immunoprecipitation studies, HeLa cells were grown on 10 cm dishes and transfected at 80% confluence with the indicated plasmids (24 µg/well) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, the cells were harvested, washed with PBS, and lysed for 30 min at 4 °C with gentle agitation in 1 ml of RIPA buffer (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% deoxycholic acid, 1% NP-40, 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). For immunoprecipitation studies in the context of infections, cells were instead infected with wild type HSV-1 at multiplicity of infection (MOI) of 5 for 18 hours. They were then lysed as above. In both cases, the supernatants obtained after centrifugation were precleared by incubation with pre-immune serum for 1 hour. Protein A agarose beads were then added and allowed to react with rotation for an additional 1 h at 4 °C. After centrifugation at 10,000 g for 5 min to remove the beads, these pre-cleared lysates were incubated with appropriate antibodies overnight at 4 °C (anti-HA for proteomics, anti-gM or E-Syt1 for co-IP). Fresh protein A agarose beads were added for 1h and the immune complexes washed three times with RIPA buffer and once with Tris-HCl pH 7.4 to remove unbound proteins. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting as detailed below.

SDS-PAGE and Western immunoblotting assay. Immunoblotting was carried out essentially as described earlier (43). Briefly, protein concentrations in each sample were

measured using a Bradford protein assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) and 25 µg of proteins were loaded onto 10% acrylamide SDS-PAGE gels. Afterwards, the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes then blocked for 1 hour at room temperature with blocking buffer (10% nonfat dry milk in 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 0.1% Tween 20). The membranes were ultimately reacted overnight with the primary antibodies as indicated in each figure legend followed by an appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. The detection was done using the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) and a ChemiDoc MP System (Bio-Rad) that, unlike films, enables the reliable and linear quantification of proteins over a wide range (57). The images were acquired and analyzed with the Image Lab Software Version 5.0 (Bio-Rad).

RNA isolation and RT-PCR amplification. The relative levels of the mRNA transcripts for E-Syt1, E-Syt2 and E-Syt3 were detected by RT-PCR as follows. First, total RNA was extracted from HeLa cells using the SV Total RNA isolation system according to the manufacturer's instruction (Promega Corporation, WI, USA). cDNAs were next synthesized using 2 µg of RNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit following the manufacture's protocol (Applied Biosystems Foster City CA, USA). The resulting cDNAs were subjected to PCR assay using a Taq DNA Polymerase and ThermoPol Buffer (New England BioLabs M0267, Ipswich, Massachusetts, USA) in a total volume of 50 µl. The following primers were used: E-Syt1 forward primer: 5'ggggctgtgtcaatgttctt3', E-Syt1 reverse primer: 5'tccttcacttgacacatcgag3', E-Syt2 forward primer: 5'gaacctgtgtggaggaaaa3', E-Syt2 reverse primer: 5'gcctttggcaagttcttcag3', E-Syt3 forward primer: 5'agacctgtccccacaacaag3' and E-Syt3

reverse primer: 5'taggatcagctccactgct3'. PCR products were subsequently separated on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized and photographed by using the above ChemiDoc MP system (Bio-Rad). The expected size of the PCR E-Syt1, E-Syt2 and E-Syt3 fragments are 869 bp, 869 bp and 874 bp respectively.

siRNA transfection. HeLa cells grown in a 6-well plates were transfected with siRNA pools targeting specific each E-Syt (see below) using PepMute (SignaGen Laboratories Rockville, MD, USA). The siRNA transfection mix was composed of 100 μ l of PepMute transfection buffer, 50 nM of the pooled siRNA, and 1.5 μ l of PepMute reagent. After 48 hours of transfection, the cells were directly harvested or, when indicated, infected as above. The siRNAs used were E-Syt1: On-TARGETplus SMART pools L-010652-00-0005 from Dharmacon, Mississauga, ON, Canada; E-Syt2: human ESYT2 HSC.RNAI.N020728.12.5 and 12.1 from IDT and E-Syt3: human ESYT3 HSC.RNAI.N031913.12.6 from IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa USA). The non-targeting control (NC1) was from IDT.

Purification of extracellular virus. HeLa cells were grown on 500 cm² dishes until 80% confluent. Cells were mock treated or infected with wild type HSV-1 at MOI of five. Eighteen hours later, the extracellular medium was harvested then clarified by centrifugation at 300 x g for 5 min at 4 °C. The samples were filtered through a 0.45 μ m filter to eliminate any remaining intact cells and large cellular debris. Extracellular virions were subsequently pelleted by centrifugation at 20,000 x g for 1 hour at 4 °C in a Beckman SW32-Ti rotor. The viral pellets were finally resuspended in MNT buffer (30 mM MES, 100 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7.4) prior to analysis by Western blotting (see above).

Viral titers. Virus titers were measured by plaque assay using Vero cells as before, using serial dilutions of the viral preparations (26). Once plaques appeared, cells were fixed with cold methanol and stained with 0.1% crystal violet.

Entry assay. The assay was performed essentially as before (57). For instance, 6×10^5 cells/well HeLa cells were plated in 6-well plates and transfected 16 hours later with E-Syt specific siRNAs using PepMute. As negative control, cells were transfected with the non-targeting NC1 siRNA. Forty-eight hours post-transfection, cells were inoculated at an MOI of 30, 4 °C and for 1 hour with HSV-1(17+) Lox-Luc or wild type HSV-1 as negative control. To allow virus penetration, the cells were then incubated at 37 °C for another hour, cells were washed with PBS and lysed for 30 minutes at room temperature with 100 μ l/well of lysis buffer from a luciferase assay kit Biotium Burlington, Ontario, Canada. The viral strain used encodes a luciferase gene under the constitutively expressed immediate early CMV promoter positioned between the UL55 and UL56 HSV-1 genes. Samples were then transferred to 96-well plates and analyzed with a LUMIstar Galaxy luminometer and software version 4.30-0 (BMG Labtech). In each experiment, a control sample was left at 4 °C to prevent viral entry into the cells.

Electron microscopy. HeLa cells were transfected with E-Syt specific siRNAs then infected 2 days later with wild type HSV-1 at an MOI of 5 for 18 hours. They were next fixed for an hour with 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH7.2). Cells were washed and scrapped off the plates in cacodylate buffer and pelleted by low speed centrifugation. The pellets were post-fixed with 1% OsO₄ in cacodylate buffer for an hour

at 4 °C and then dehydrated in graded series of ethanol and embedded in Epon (64). Ultrathin sections were obtained using a Reichert Ultracut ultramicrotome and mounted on naked nickel grids. These sections were stained with 3% aqueous uranyl acetate and examined with a Philips CM100 transmission electron microscope. Electron micrographs were captured using an AMT XR80 digital camera. Quantification of the capsids found in the samples was done from randomly selected fields from two independent experiments.

Syncytial assays. HeLa cells were grown on glass coverslips in 24-well plates prior to transfection with siRNA oligos as described above. Forty-eight hours post-transfection, the cells were infected with the wild-type HSV-1 at an MOI of 2 for 1 h at 37 °C and then grown for 14 hours at 37 °C. The cells were fixed at 4 °C for 30 min with 4% paraformaldehyde made in phosphate buffered saline (PBS) and washed with PBS. To visualize syncytium formation, the plasma membrane was labeled with 5 µg/ml of wheat germ agglutinin (WGA) conjugated to Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) and stained with 0.1 g/ml Hoechst 33,342 to identify the nuclei. Fluorescence images were captured with a ZEISS Axio-Imager Z2 (epifluorescence microscope) and mounted with Adobe Photoshop CS6. Cells with more than one nucleus were defined as a syncytium and were scored from representative microscopic fields of view (100 cells per condition per independent experiment).

Statistical analysis. Virus titers, protein abundance and syncytium formation were normalized to the values obtained for the controls as mentioned in each figure legend and analyzed with bilateral Student's T tests using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software).

Results

E-Syt1 interacts with HSV-1 gM. The reported ability of the HSV-1 gM viral protein to modulate fusion both negatively and positively points to the likely regulation of gM itself. To identify new gM partners, particularly cellular ones, they were probed in HA-gM transfected cells. Whole cell lysates were used to immunoprecipitate (IP) gM using a HA monoclonal antibody for greater specificity (available gM antibodies are polyclonal). As controls, preimmune sera or cells only treated with the transfection reagent were tested in parallel. Analysis of the entire band tracks by silver staining (fig. 1) and mass spectrometry (Table 1) lead to the identification of only a few proteins present in two independent experiments, aside from gM. These were specific to the IP and absent from the Lipofectamine or preimmune controls. Of particular interest was E-Syt1, an 1104 amino acid protein with a predicted molecular weight of 122.9 kDa that is a tethering factor related to synaptotagmins. To confirm this interaction, reciprocal immunoprecipitations with either gM or E-Syt1 antibodies were performed, using mock treated or gM transfected cells. As expected, the data corroborated the above findings, with gM antibodies bringing down E-Syt1 (fig. 2B) and vice versa (fig. 2C). Given their interaction in transfected cells, it appeared that these two proteins formed a complex in the absence of other viral proteins. To probe if such complex is relevant in the context of infection, the experiments were repeated in cells infected for 18 hours, a time when structural proteins such as viral glycoproteins are typically expressed in large amounts. Once again, co-IP experiments confirmed the two proteins did bind one another (fig. 3). As expected, this was dependent on the use of gM or E-Syt1 antibodies and the presence of the virus.

E-Syt1 modulates viral egress. E-Syt1 is a tethering molecule that enables contacts between the ER and the cell surface. It is also a member of the synaptotagmin family that typically interacts with the SNARE machinery, the core cellular element that drives membrane fusion. To determine if E-Syt1 has any functional relevance for the infection, extracellular viral yields were measured in the presence or absence of E-Syt1 using commercially available siRNA pools. The data revealed that knocking down E-Syt1 (80% efficacy of the siRNA) (fig. 4A, B) led to a highly significant increase of infectious virions in the supernatant (fig. 4C). To evaluate if E-Syt1 modulates viral particle production, intracellular yields were next monitored. Figure 4D shows that E-Syt1 depletion reduced the number of cell-associated viral particles, suggesting that E-Syt1 may hinder their release across the plasma membrane. In contrast, the virus did not impact the level of E-Syt1 expression, since they were similar in mock treated and infected cells (fig. 5).

E-Syt3 isoform also partakes in HSV-1 egress. E-Syt1 is one of three related human isoforms. To define whether other E-Syt proteins also influence the HSV-1 life cycle, we first evaluated their expression in HeLa cells by RT-PCR. The results indicated that all three isoforms were indeed present in these cells (fig. 6A). This was further confirmed by Western blot using E-Syt1, 2 or 3 specific antibodies (data not shown). To see if E-Syt2 and 3 also physically interact with gM, co-IP experiments were done in infected cells using gM antibodies. Most interestingly, both of them were also co-immunoprecipitated with gM while absent from the control uninfected cell lysates (fig. 6B). Although undetected by mass spectrometry, this was not so surprising given the ability of E-Syts to form heterodimers (14). We finally probed whether the E-Syt proteins colocalized with gM in infected cells. Unfortunately, we could not

find antibodies that detect endogenous E-Syt proteins by immunofluorescence and consequently resorted to E-Syt overexpression. Oddly, only minimal colocalization was noted between gM and the E-Syt proteins (fig. 7) hinting at the presence of large pools of gM and E-Syts not binding one another in this context.

We next examined if knocking down the E-Syt isoforms individually affected viral output. As they can dimerize, we also depleted them in pairs. The efficacy of the commercial siRNA pools was monitored by Western blot and digitally quantified. All interference reagents proved efficient with reductions reaching 78% (E-Syt1), 86% (E-Syt2) and 91% (E-Syt3) (fig. 8A). Given their efficacy, we next proceeded to test the impact of the E-Syt proteins on extracellular viral yields by plaque assays. These results indicated that E-Syt2 depletion had a slight but not statistically significant effect on HSV-1 production, while depletion of E-Syt1 alone or in combination with E-Syt3 led to significant and larger increases in mature infectious particles in the extracellular milieu (fig. 8B). To examine if the E-Syt proteins only impaired HSV-1 release into the extracellular media or if they also impacted cell-to-cell spread, plaque sizes were additionally measured. The data were in agreement with the above findings in that depletion of E-Syt1, E-Syt3 or both increased the propagation of the virus to neighboring cells, while siRNAs against E-Syt2 seem to hamper the depletion of E-Syt1 or 3 (fig. 9).

To better define how E-Syts modulated the virus, infected cells were monitored by transmission electron microscopy under E-Syt depletion conditions. Figure 10 shows representative images and quantitation of these observations from two independent experiments. With wild-type levels of E-Syts, the virus was readily detected within the nucleus (nuclear capsids) or occasionally between the two nuclear envelopes (primary enveloped virions). The virus was also prevalent in the cytoplasm (with or without an envelope) and at the cell surface

(extracellular virions). Under these conditions, the viral particles were roughly distributed equally among the nucleus (38%), cytoplasm (32%) and cell surface (30%). Upon the depletion of E-Syt1, E-Syt3 or both, no obvious impact was noted on the nuclear pool of the virus. A modest and statistically significant decrease of nuclear particles was noted in si E-Syt1 treated cells, but such impact was not confirmed in the double knock-downs. In contrast, the proportion of virions at the cell surface strongly and significantly jumped to 53%, 48% and 55% (si E-Syt1, si E-Syt3 and both respectively) at the expense of reduced levels of viral particles in the cytoplasm (15%, 16% and 13% respectively). The E-Syt proteins thus seemed to favor the exit of the virus out of the cytoplasm into the extracellular milieu without affecting much the nuclear levels of the virus. Most importantly, these data showed that there were no gross virion morphogenesis defects.

Given that reduced levels of E-Syt1 and E-Syt3 promoted the release of virions from the cells, we sought to determine if overexpressing them would conversely reduce viral yields. In full agreement with the above findings, overexpression of E-Syt proteins caused a significant reduction by roughly 40% for E-Syt1 and E-Syt 3, while the reduction for E-Syt2 was not statistically significant (fig. 11). Thus, E-Syt1 and E-Syt3 in both reduced or overexpressed conditions influenced viral production, while E-Syt2 did not seem to play a significant role.

E-Syt1 and E-Syt3 also modulate viral entry. While exiting cells, HSV-1 must fuse with the plasma membrane to be released in the extracellular environment. Our data so far supported the involvement of E-Syt1 and E-Syt3 in this step. As mentioned earlier, this is not the only fusion event the virus undertakes at the plasma membrane, as it also fuses with the PM upon entry at the beginning of the replication cycle. This is particularly relevant as HSV-1 transiently

induces the release of Ca^{++} from ER stores (54-56) and that E-Syt1 promotes membrane contacts in a Ca^{++} dependent fashion (17, 18). Consequently, a viral entry assay was used to directly test this hypothesis. This assay relies on an HSV recombinant virus coding for a luciferase (57) and a short 1hour infection time to monitor viral entry before viral genome replication kicks in. In this assay, no luminescence was detectable upon infection with wild-type virus or at 4 °C, a temperature that prohibits viral entry (fig. 12). In contrast, infections with the HSV-1 Lox-Luc gave a strong signal, which we normalized to 100%. Most interestingly, knocking down E-Syt1, E-Syt3 or both promoted viral entry into the cells, with the strongest effect seen with the double knock downs (fig. 12). Thus, as for viral egress, E-Syt1 and E-Syt3 modulated the passage of the virus during viral entry.

E-Syt1 and E-Syt3 limit syncytial formation. As previously mentioned, a number of viral mutants deregulate the viral fusion machinery and lead to a cell-cell fusion phenotype (syncytia). We recently demonstrated that this deregulation can also occur by overexpressing regulators of this machinery (43). The present findings somehow position E-Syt proteins as negative regulators of fusion in the context of an HSV-1 infection, since deleting them stimulate viral entry and egress through the plasma membrane and vice versa if overexpressed. To test if E-Syt1 and E-Syt3 also modulate virally induced syncytial formation, they were overexpressed and cell-cell fusion monitored. As expected, no syncytia were recorded in the absence of infection (data not shown). Similarly, only rare and small syncytia were found in the presence of the wild-type virus (fig. 13A). Knocking down E-Syt1, E-Syt3 or both all resulted in the increased detection of syncytia, including large ones that reached up to 14 nuclei per cell (fig. 13B-D). Once again, the combined effect of E-Syt1 and E-Syt3 gave the strongest phenotype,

with half the cells being multinuclear. This indicated that the E-Syts do indeed regulate virally induced membrane fusion.

Discussion

Enveloped viruses are typically fully autonomous and encode their own fusion machinery, whether a single protein such as the vesicular stomatitis virus G glycoprotein or multiple viral proteins as for herpesviruses (20, 58). It is most interesting that HSV-1 depends on the E-Syt1 and E-Syt3 host proteins, in addition to its cellular receptors, to regulate its fusion activities across cellular membranes. These findings were corroborated in multiple ways, including the interaction of E-Syt1, 2 and 3 with the HSV-1 glycoprotein M, itself a regulator of viral fusion. In addition, E-Syt1 and related E-Syt3 curbed viral egress, viral entry, cell-to-cell viral spread as well as HSV-1 induced cell-cell fusion. E-Syts thus appear to impact many of the possible fusion steps occurring during the HSV-1 life cycle. It now remains to be seen if E-Syts also affect the fusion of the primary enveloped virions with the outer nuclear membrane. This is a distinct possibility given the presence of E-Syt1 in the ER and its continuity with the outer nuclear envelope. Another important aspect is how E-Syt proteins and gN relate with respect to gM, as they seemingly have opposite effects (43). Further work is required to elucidate the fine-tuning of the viral fusion machinery but the lack of gN antibodies complicates this endeavor (43).

E-Syt proteins promote the close apposition of ER and the plasma membrane and the transfer of lipids between these two compartments and can form both homo- and heterodimers (14, 15). While only E-Syt1 was initially identified by mass spectrometry as an HSV-1 gM binding partner, E-Syt3 was also found to modulate viral-dependent fusion steps, supporting the

view they act cooperatively. The minimal co-localization of gM with exogenously expressed E-Syt1 suggests that most of these molecules are not associated with one another and E-Syt3 may consequently have eluded detection in our original co-IP/MS assays. It may also be that E-Syt3 is bound to E-Syt1 instead of gM, though we cannot also exclude an indirect binding of E-Syt1 with gM. In this latter scenario, the molecule bridging gM to E-Syt1 would be cellular in nature since E-Syt1 does bind to gM in transfected cells in the absence of other viral proteins. That E-Syt2 did not exhibit similar phenotypes in these events suggests that the three E-Syts are not merely redundant cellular isoforms. In this respect, it is worth noting that while E-Syt2 did not statistically impact viral spread or plaque size, it did seem to have the opposite effect of E-Syt1 and 3 in siRNA depleted cells. Moreover, depleting cells of E-Syt2 in conjunction with E-Syt1 or 3 nullified their phenotypes, an aspect that remains to be clarified and may be linked to the ability of E-Syt2 form heterodimers with other E-Syt isoforms and perhaps shield the virus from E-Syt 1 or 3.

In all above experiments, E-Syt1 or E-Syt3 down regulation stimulated the production of infectious viral particles, while E-Syt1 and/or E-Syt3 overexpression had the opposite effect. While the present data do not exclude that E-Syt overexpression inhibited viral yields by triggering the unfolded protein response, this is perhaps not a major issue as HSV-1 is known to efficiently dampen such response via ICP0 (59). Thus our results seem consistent with a negative role for E-Syts on virally induced fusion events. This is somewhat in contrast with the contribution of the related synaptotagmins, which promote exocytosis in neurons (60) and the current lack of evidence that E-Syt proteins modulate cellular fusion events. However, not all members of the synaptotagmin family act the same way. For instance, in contrast to other synaptotagmins, synaptotagmin VII limits pore expansion during lysosomal exocytosis (61),

while synaptotagmin 11 minimizes vesicle formation along the clathrin-coated vesicle pathway (62). It is therefore plausible that synaptotagmins modulate fusion by various means, both positively and negatively. One big question is, if at all, the E-Syts somehow cooperate with or antagonize the SNARE fusion machinery as do synaptotagmins in neurons (63). While the existing literature points for a tethering function for E-Syts, the membrane proximity they promote is nonetheless an essential step and prerequisite toward membrane fusion. Whatever the case might be, the present findings suggest a previously unforeseen link between the HSV-1 fusion apparatus and the cellular E-Syt protein family.

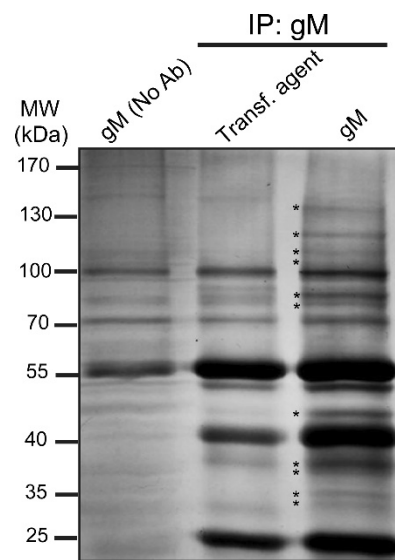


Figure 1: Silver staining of samples analyzed by mass spectrometry

Cells were transiently transfected with a plasmid expressing HA-gM or mock transfected (no DNA). After 24 hours post-transfection, the cells were harvested and lysed in RIPA buffer. The lysates were immunoprecipitated (IP) using a preimmune serum or an anti-HA monoclonal antibody and the bead-bound proteins analyzed on precast 4-12% SDS-PAGE gradient gels. Proteins were subsequently silver stained and entire lane tracks processed for mass spectrometry

as detailed in the materials and methods section. Bands specifically detected by silver staining in the gM immunoprecipitation are highlighted by stars. The molecular masses of the molecular weight markers are indicated to the left of the panels.

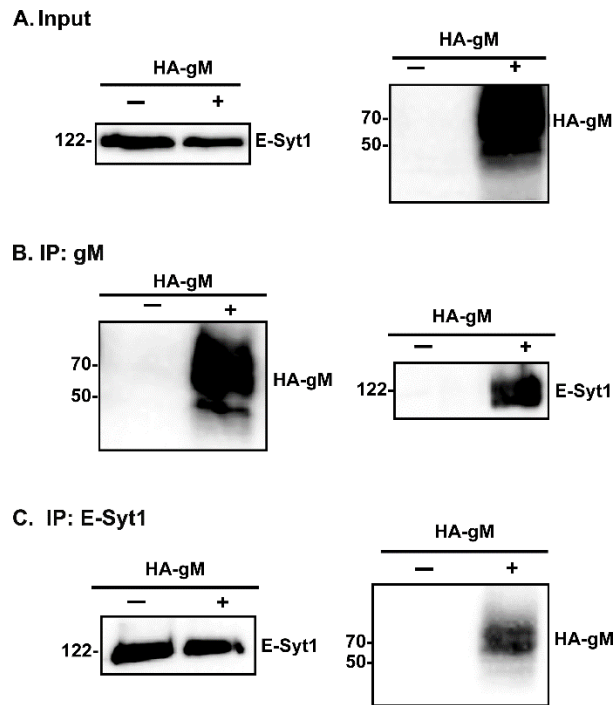


Figure 2: HSV-1 gM and E-Syt1 are reciprocally co-IP in transfected cells

HeLa cells were transfected with plasmids expressing HA-tagged gM. After 24h of transfection, the cells were lysed as described in Materials and Methods. The lysates were IP using a monoclonal anti E-Syt1 antibody or with a monoclonal anti-HA antibody and loaded onto a 10% SDS-PAGE gel. **A)** The Western blot of the total lysates (2% loaded) served as a positive antibody controls. In parallel, the immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with **(B)** anti-gM (4C10) or **(C)** anti E-Syt1 antibodies. The molecular masses of the molecular

weight markers are indicated to the right of the panels. (-) means transfection control and (+) means cells transfected with a HA-gM plasmid.

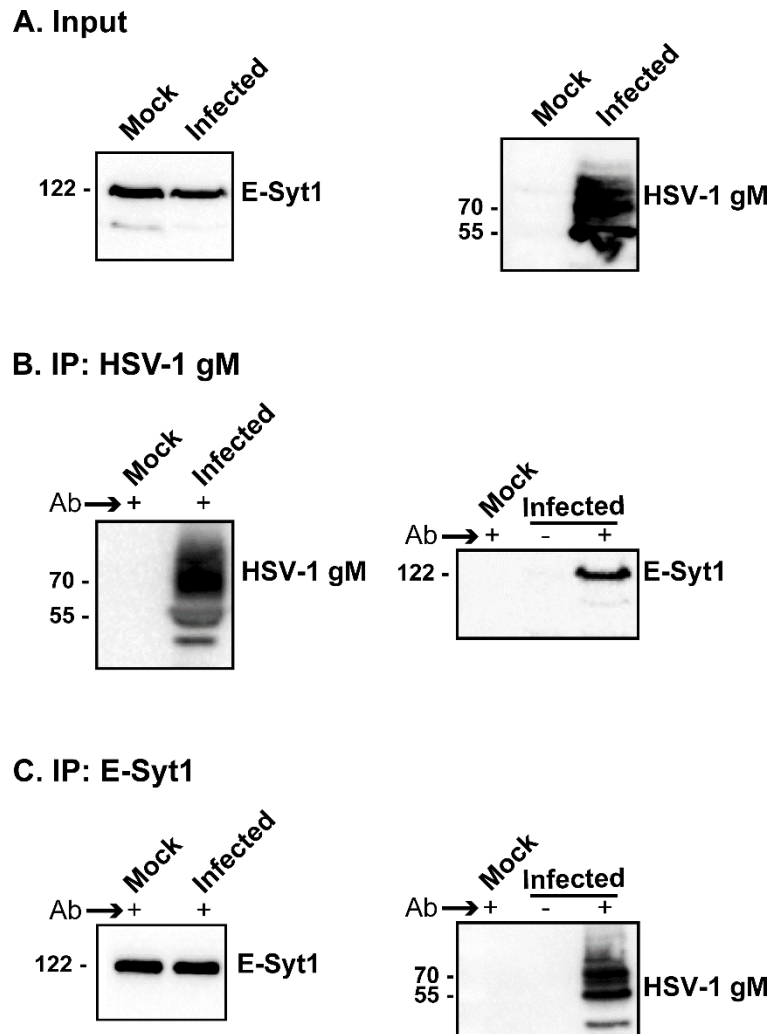


Figure 3: E-Syt1 interacts with HSV-1gM in infected cells

HeLa cells were infected with wild-type virus at an MOI of 5 and the cells harvested at 18-hour post-infection (hpi) then lysed. **A)** Total cell lysates were loaded on gels or immunoprecipitated

with **B**) the polyclonal (4C10) anti-gM or **C**) anti E-Syt1 antibody. Uninfected cells and immunoprecipitations performed using the preimmune serum served as negative control. The bead-bound proteins were resolved in a 10% gel and immunoblotted with either E-Syt1 or the PAS980 gM antibodies as indicated. The molecular masses of the molecular weight markers are indicated to the right of the panels. (-) means preimmune as negative control and (+) for immunoprecipitation with the antibody of interest.

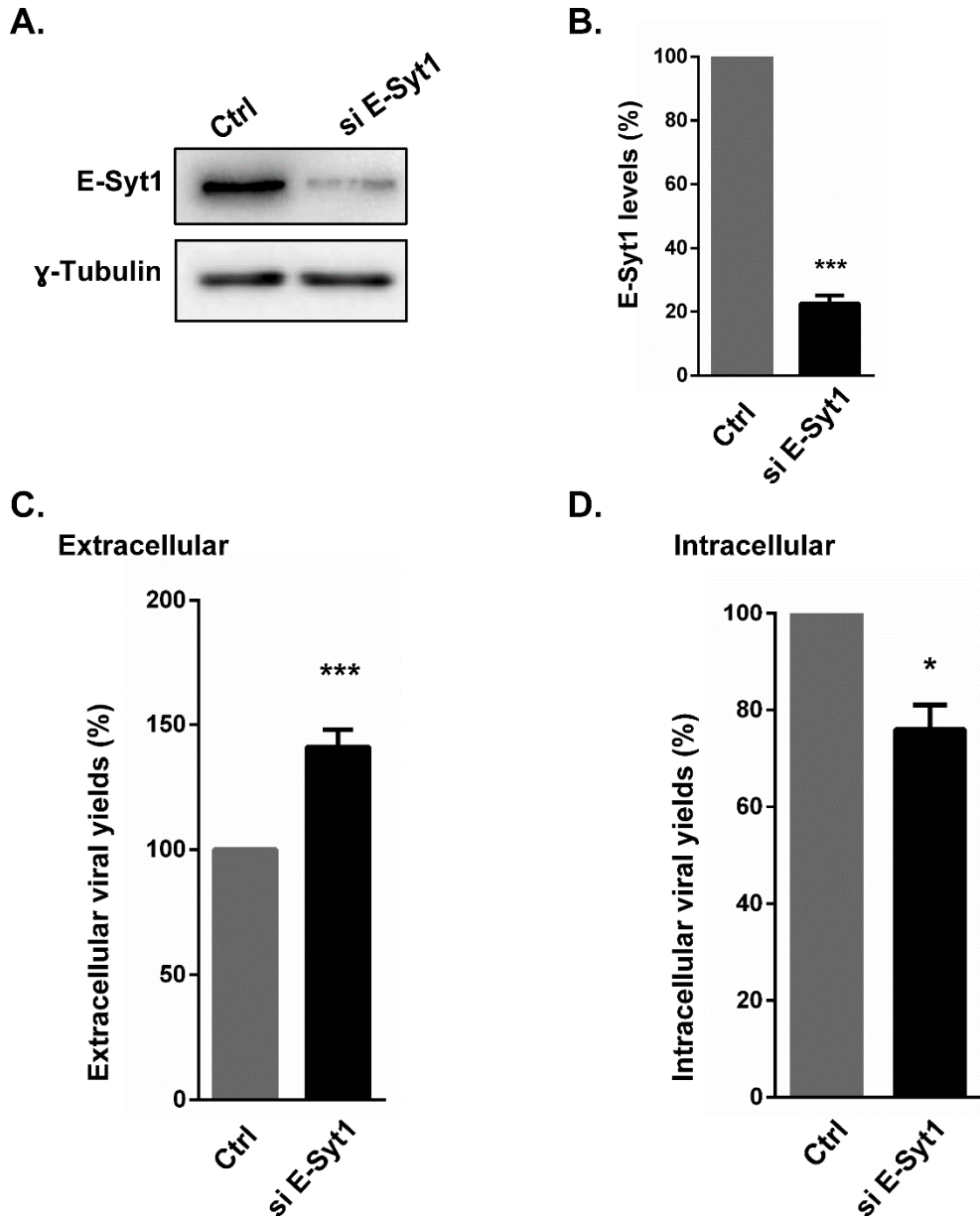


Figure 4: Inhibition of E-Syt1 enhances the HSV-1 infection

HeLa cells were seeded in 6-well plates and transfected with siRNAs targeting E-Syt1. Forty-eight hours later, the cells were infected with wild type HSV-1 at an MOI of 5 for 20 hours. **A)** Cell lysates were analyzed by Western blot against E-Syt1 and **B)** the efficacy of the siRNA measured on a ChemiDoc and Image Lab software, which give a linear response over several

logs (right panel). **C**) The extracellular medium and **D**) cell lysates were then collected and titrated on Vero cells. Viral plaques were then quantified and normalized to 100%, using the no siRNA control (transfection reagent only). The error bars show the standard errors of the means (SEM) of four independent experiments, each done in duplicates. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the control (ctrl). The exact p values were B: 0.0003; C: 0.0004; D: 0.020.

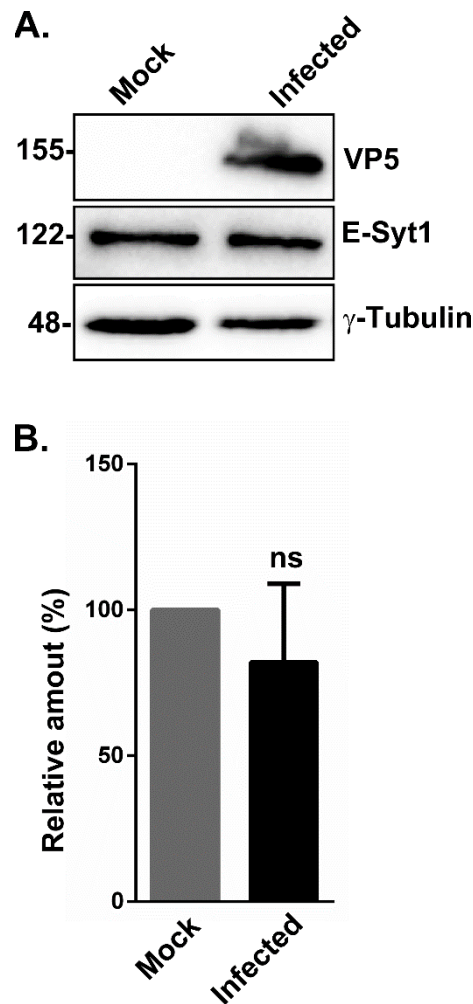


Figure 5: Impact of the virus on E-Syt1 expression

HeLa cells were mock treated or infected with wild type HSV-1 at an MOI of 5 for 20 hours. **A)** Cell lysates were prepared as above and VP5, E-Syt1 and γ -tubulin expression determined by Western blot. **B)** Quantification was performed with a ChemiDoc instrument and Image Lab software. These values, means and SEM were derived from six independent experiments. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the mock (p=0.541).

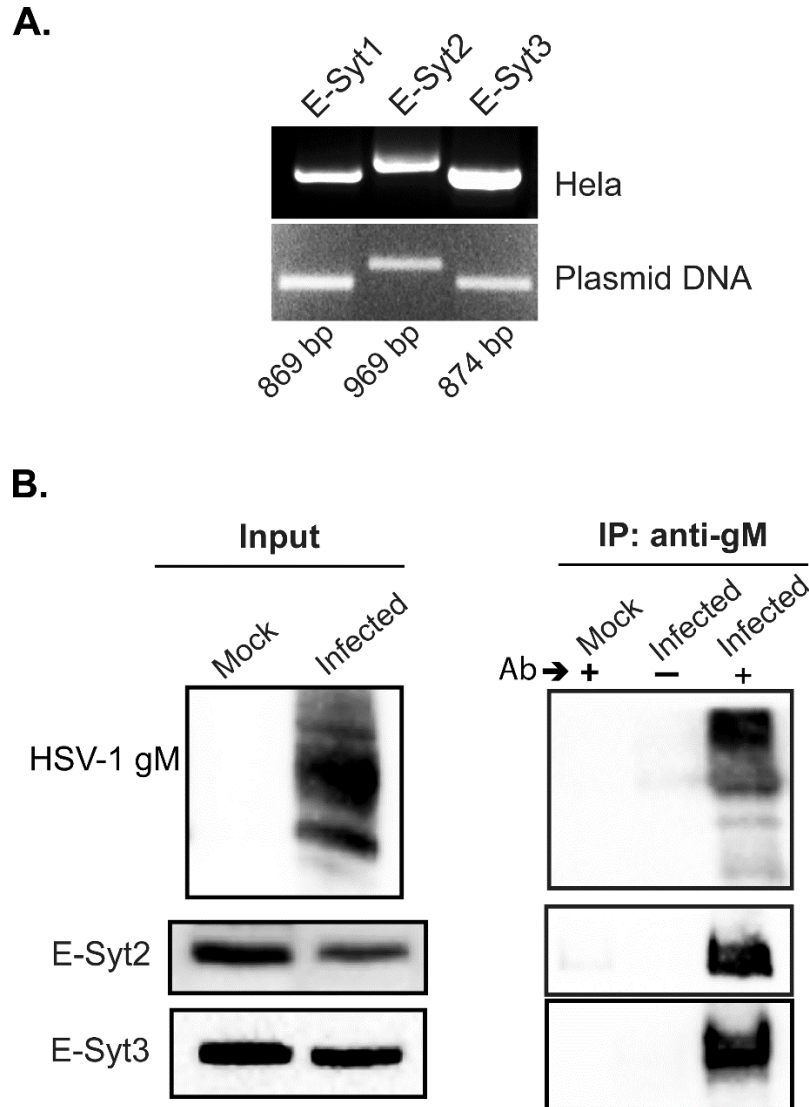


Figure 6: E-Syt2 and E-Syt3 are also expressed and interacts with HSV-1gM in infected cells

A) The expression of E-Syt1, E-Syt2 and E-Syt3 was monitored in HeLa cells by RT-PCR. Total RNA was isolated from the cells, reversed transcribed and amplified with E-Syt1, 2 or 3 specific primers by PCR. Plasmids coding for each isoform served as PCR and specificity controls. A representative experiment is shown among the three performed. **B)** HeLa cells were mock infected or infected with wild-type virus at an MOI of five. At 18 hpi the cells were

harvested and then lysed with RIPA buffer. The immunoprecipitation was performed using the polyclonal (4C10) anti-gM for infected cells and uninfected cells as negative control. The (+/-) indicates the presence or not of the antibody used for IP. Recovered proteins (IP) and aliquots of the lysates (input) were separated by SDS-PAGE and detected by western blot with either E-Syt2, E-Syt3 or the PAS980 gM antibodies as indicated. One representative experiment out of four independent experiments is shown.

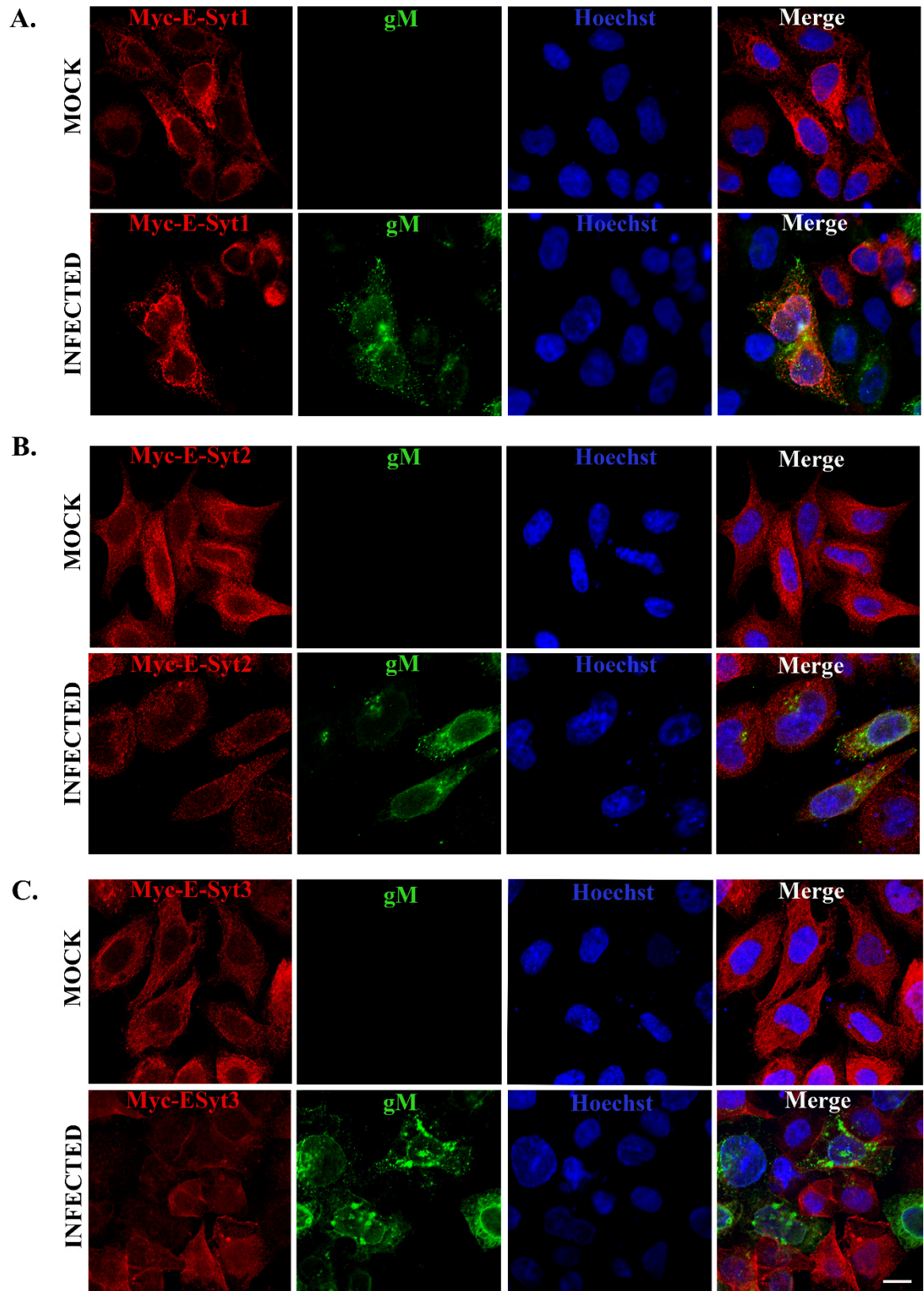
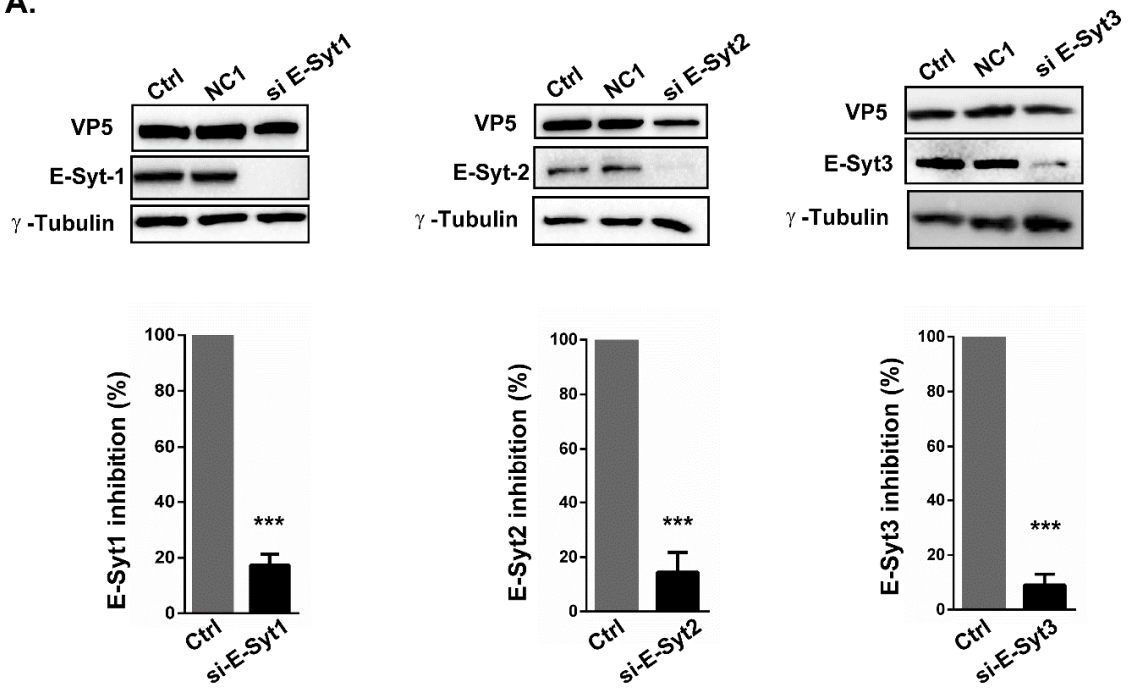


Figure 7: HSV-1 gM only minimally co-localizes with overexpressed E-Syt proteins

Hela cells grown on coverslips were transfected for 12 hours with plasmids coding for **A)** myc E-Syt1, **B)** myc E-Syt2 or **C)** myc E-Syt3. They were then infected with wild-type HSV-1 for 12 hours. Cells were then fixed, permeabilized, and immunostained with an antibody against Myc to detect E-Syt1, E-Syt2, or E-Syt3 (red signals) and with an anti-gM (4C10) antibody to detect infected cells (green signals), while nuclei were stained with Hoechst (blue signals). Scale bar: 10 μm

A.



B.

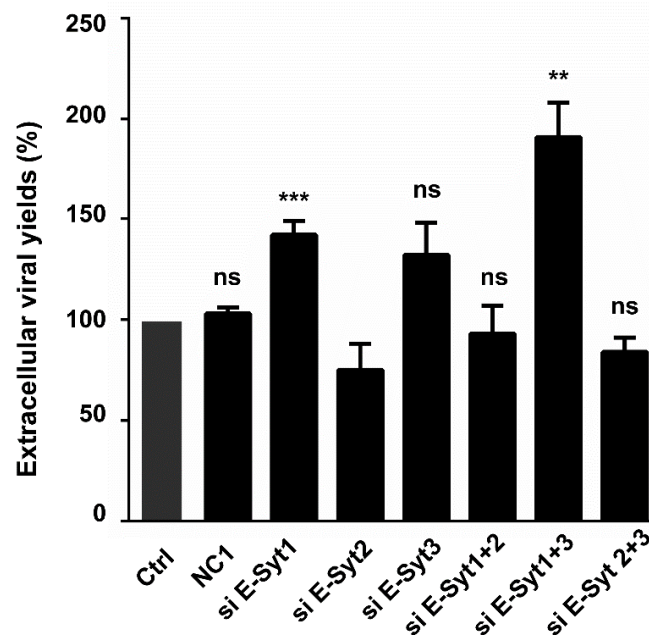


Figure 8: Efficient knockdown of E-Syt proteins and impact on viral release

(A-C) Efficacy of the siRNAs. **A)** HeLa cells were transfected for 48 hours with the transfection reagent only (Ctrl), or siRNAs against E-Syt1, E-Syt2 or E-Syt3 as indicated. The cells were

then harvested, lysed and protein levels of E-Syt proteins detected by Western blot as shown. Immunoblots of cell lysates were also probed with β -calnexin or γ -tubulin as internal loading control. The results were then quantified with a ChemiDoc station and Image Lab. The histograms under each gel indicate the mean values from three experiments and the standard errors of the means. Stars indicate the results of bilateral Student's T-tests, which were si E-Syt1: 0.00035; si E-Syt2: 0.0002 and si E-Syt3: 0.0002. **B)** Viral production in E-Syt depleted cells. The supernatant from above infections were collected, and their viral content titrated on Vero cells by plaque assays to monitor viral output. The titers were normalized to the mean value obtained with samples treated with transfection reagent only. The error bars show the standard errors of the means (SEM) of three independent experiments, each done in duplicates. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the control (exact p values were NC1: 0.63; si E-Syt1: 0.0004; si E-Syt2: 0.286; si E-Syt3: 0.341; si E-Syt1+2: 0.659; si E-Syt1+3: 0.006; si E-Syt2+3: 0.038).

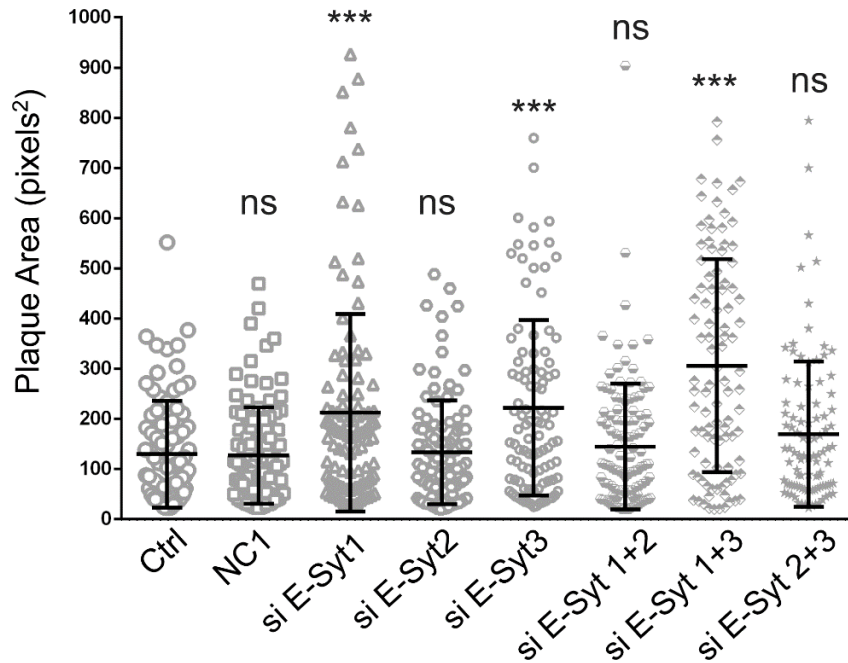
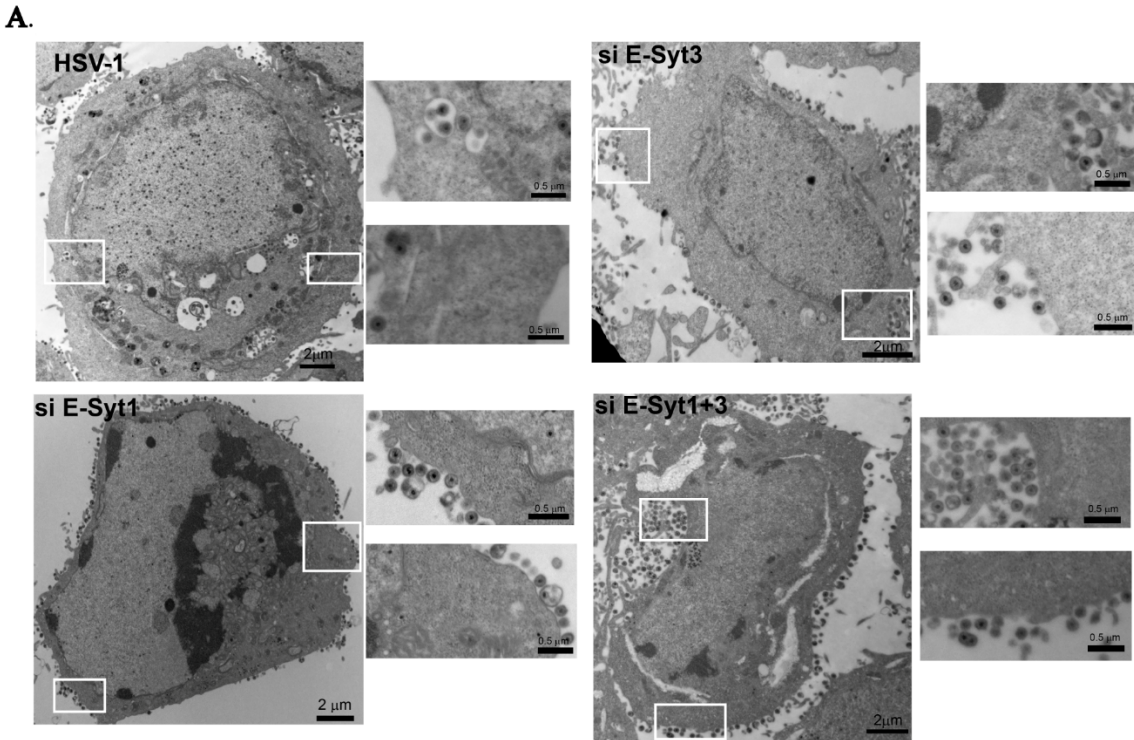


Figure 9: E-Syt1 and E-Syt3 down regulation increases cell-to-cell spread

The experiment was essentially performed as in figure 7, and plaque size determined in square pixels using ImageJ. The graph shows the mean size \pm SEM of 100 plaques from each condition from a representative experiment. They were also statistically analyzed with bilateral Student T tests (n=3 independent experiments) and gave p values of NC1: 0.955; si E-Syt1: 0.0006; si E-Syt2: 0.80; si E-Syt3: 0.00004; si E-Syt1+2: 0.368; si E-Syt1+3: 7.3×10^{-11} ; si E-Syt2+3: 0.038.



B.

Cell type	Nuclear Capsids	Perinuclear Virions	Cytoplasmic Capsids	Extracellular Virions	Total of counted particules
HSV-1	560 (32%)	102 (6%)	557 (32%)	516 (30%)	1735 (100%)
si E-Syt1	411 (25%) *	119 (7%)	252 (15%) *	860 (53%) *	1617 (100%)
si E-Syt3	725 (31%)	124 (4%)	412 (16%) *	1157 (48%) *	2418 (100%)
si E-Syt1+3	341 (28%)	50 (4%)	166 (13%) *	663 (55%) *	1210 (100%)

Figure 10: Cellular distribution of viral particles

HeLa cells were mock transfected or treated with E-Syt1, E-Syt3 siRNA pools, then infected with wild type HSV-1 at an MOI of 5 for 18h. The cells were then fixed and processed for thin-section electron microscopy as described in Materials and Methods. **A)** Representative cells for each condition. **B)** Values represent the average number and the percentage of viral particles counted from two independent experiments, each using six randomly selected cells per condition (up to 2418 particles per conditions). These results were compared to the HSV-1 samples using bilateral Student T tests using the HSV-1 (* E-Syt 1: nuclear capsids $p=0,0311$; cytoplasmic

capsids $p=0,0276$; extracellular virions $p=0,0194$; E-Syt 3: cytoplasmic capsids $p=0,042$; extracellular virions $p=0,0227$; E-Syt 1+ 3: cytoplasmic capsids $p=0,0194$; extracellular virions $p=0,0262$).

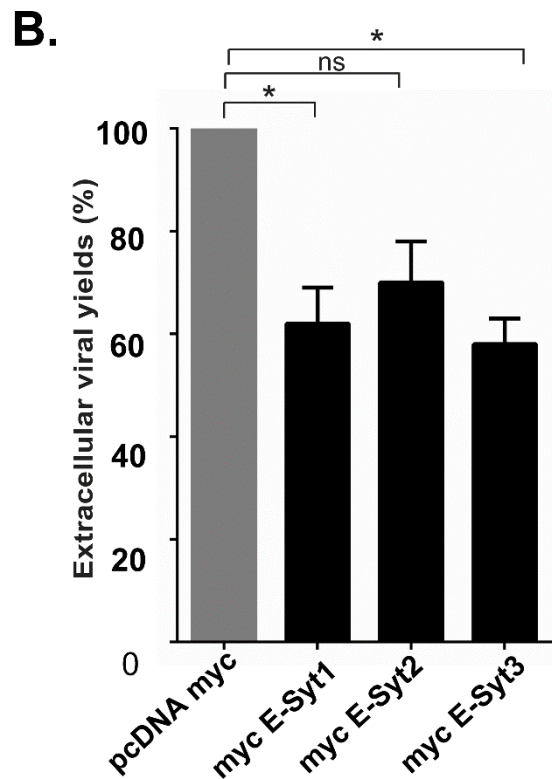
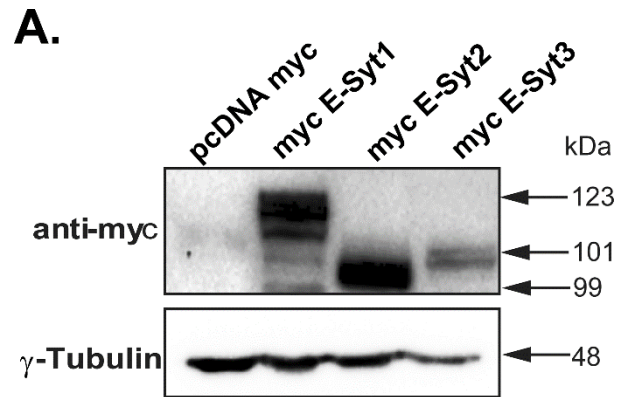


Figure 11: Overexpression of E-Syt1 or E-Syt-3 reduces viral yields

HeLa cells were transfected with plasmids expressing myc E-Syt1, myc E-Syt2, or myc E-Syt3. Twenty-four hours later, the cells were infected with wild type HSV-1 at an MOI of 5 for 18 hours. **A)** Cell lysates were prepared and exogenous protein expression tested by Western blot using anti-myc antibodies. **B)** Viral production in the above conditions was evaluated by plaque assays. The bars represent the means of three independent experiments, along with their SEM. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the control (p values of myc E-Syt1: 0.030; myc E-Syt2: 0.061; myc E-Syt3: 0.016).

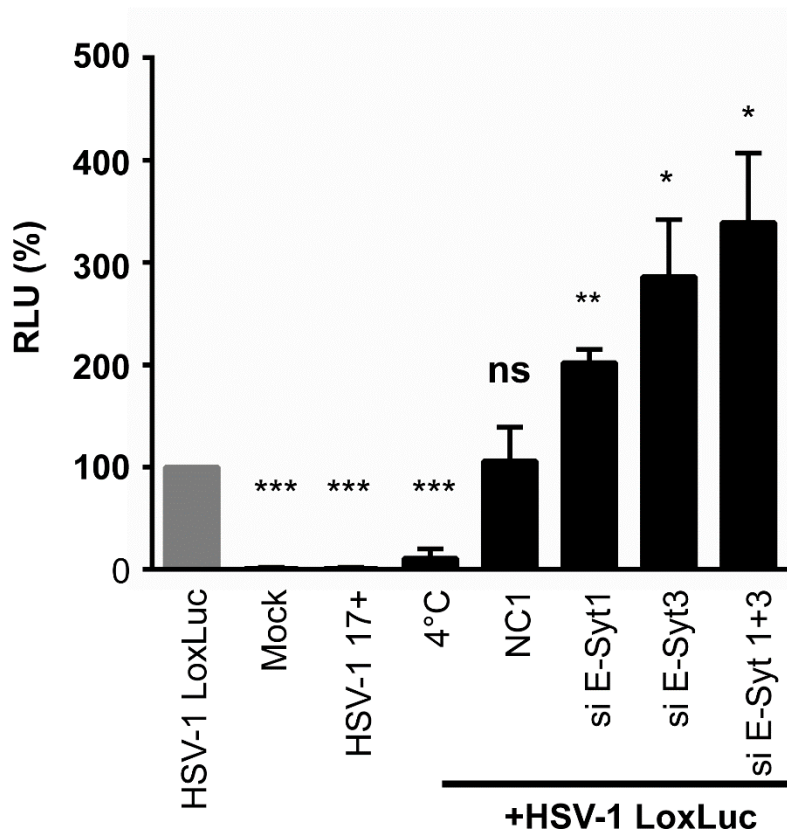


Figure 12: E-Syt1 and E-Syt3 also impair HSV-1 entry

Hela cells seeded in 6-well plates were transfected with siRNA targeting E-Syt1, E-Syt3 or both for 48 hours. Control non-targeting siRNAs (NC1) were also used. Cells were subsequently mock-infected or infected at a MOI of 30 for 1 hour at 4°C (viral adsorption step) with wild type HSV-1 (luciferase-negative) or HSV-1 LoxLuc (luciferase positive). The cells were then incubated at 37°C for another hour to enable viral entry and subsequently lysed at room temperature for 30 minutes in the presence of luciferin and energy (ATP). As an additional control, one sample was left at 4 °C throughout the experiment to prevent viral entry. All samples were next transferred to 96-well plates and analyzed with a luminometer. Values represent the mean RLU (relative light units) from three independent experiments and error bars depict the standard errors of the means. Stars indicate the results of bilateral Student T-tests upon comparison to the positive HSV-1 LoxLuc control. The following p values were obtained: mock: 8×10^{-9} ; HSV-1 17⁺: 1×10^{-9} ; 4 °C: 0.0004; NC1: 0.86; si E-Syt1: 0.001; si E-Syt3: 0.028; si E-Syt1+3: 0.024.

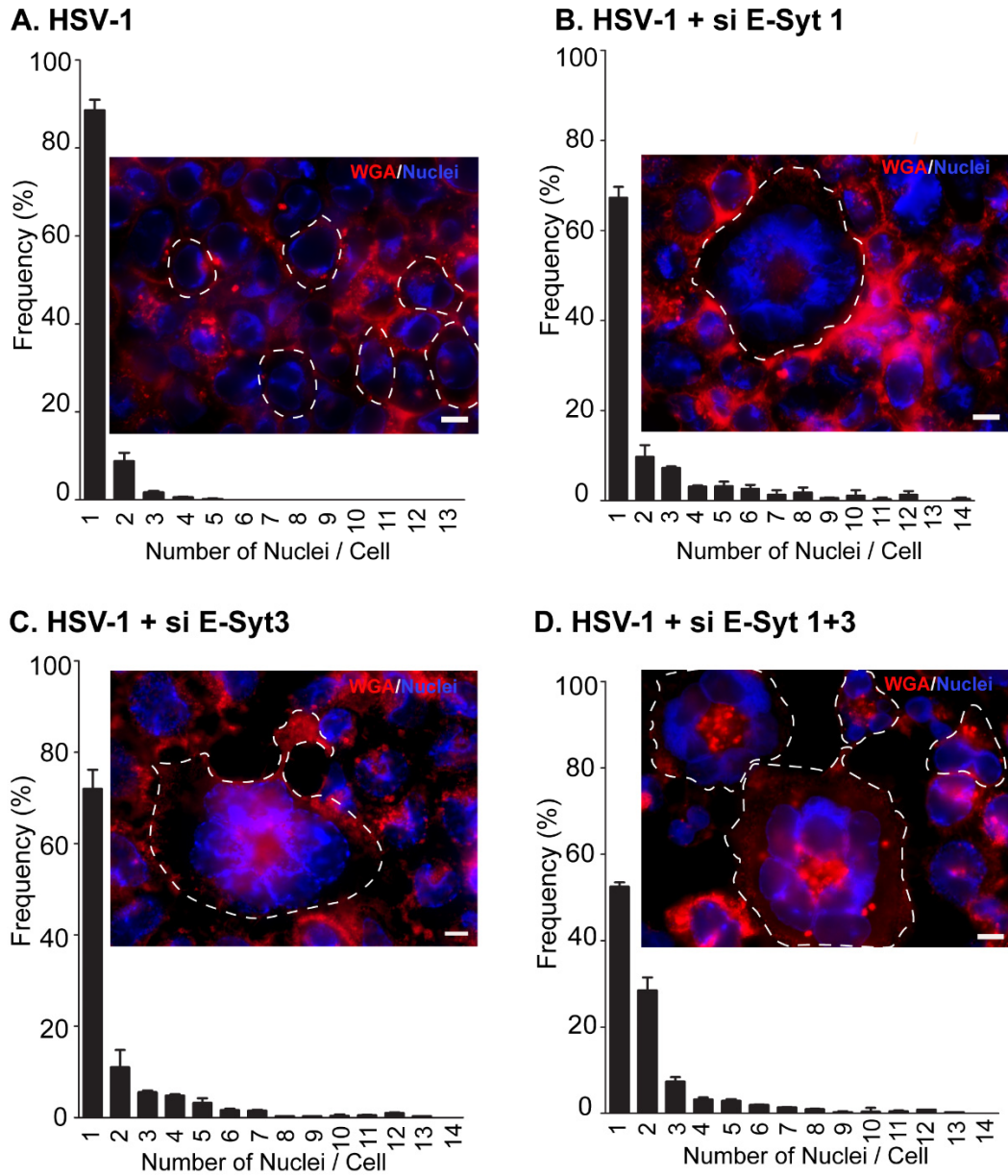


Figure 13: E-Syt1 and E-Syt3 knockdown increase cell-to-cell fusion in infected cells

Hela cells grown on coverslips were **A)** mock transfected or **B-D)** treated for 48 hours with each of different siRNA pools targeting **B)** E-Syt1, **C)** E-Syt3 or **D)** E-Syt1 and E-Syt3. They were subsequently infected at a MOI of two with wild type HSV-1 for 14 hpi. To visualize cell-

to-cell fusion, the cells were fixed and incubated with the membrane marker Alexa 647-labeled wheat germ agglutinin (WGA), a lectin that binds to N-acetyl D-glucosamine and sialic acid present on cell surface and internal glycoproteins. The stained cells were processed for fluorescence microscopy and randomly (blindly) photographed in order to examine the presence of syncytia, defined as single cells containing two or more nuclei. For clarity, the outlines of some of the cells are indicated by broken lines. Quantification was done by counting 200 cells per condition in each of 2 independent experiments. The reported values represent averages from these independent experiments and error bars depict the standard errors of the means. Fluorescence images (see insets) show typical examples for each condition. Scale bars: 10 μ m.

Accession	Uniprot ID	Gene ID	Description	MW	1 st experiment Total (coverage)	2 nd experiment Total (coverage)
A8K8U1_HUMAN	Q86VP6	CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1	136.3 kDa	8 spectra (9%)	12 spectra (11%)
B3KMV5_HUMAN	Q9BSJ8	ESYT1	Extended synaptotagmin-1	122.9 kDa	3 spectra (3%)	3 spectra (3%)
B4DDH8_HUMAN	Q96N66	MBOAT7	Lysophospholipid acyltransferase 7	50.6 kDa	2 spectra (6%)	3 spectra (10%)
GM_HHV11	P04288.1	2703379	HSV-1 gM	51.4 kDa	26 spectra (27%)	23 spectra (25%)

Table 1: Proteins identified by proteomics.

HeLa cells transfected with HA-gM were immunoprecipitated samples with a HA antibody, resolved onto gradient gels and processed for mass spectrometry. Peptides were analyzed with the Mascot and Scaffold using a combined HSV-1 and human in-house trypsin database. The table indicates the Accession, Uniprot ID, Gene ID, a brief description of the proteins and their predicted molecular weights found in both independent experiments as well as the number of

total spectrum counts and coverage of each protein. The thresholds for detection were 99% for the proteins and 0.1% false discovery rate (FDR) for the peptides with at least 2 peptides.

Acknowledgments

We are indebted to Drs. Pietro de Camilli, A Patel, Joel Baines and Lynn Enquist for antibodies and plasmids. This study was funded by the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP258030), the *Natural Sciences and Engineering Research Council* of Canada (grant # RGPIN-2016-04277) and Canadian Foundation for Innovation to RL. The Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) receives funds from IRICoR, the Canadian Foundation for Innovation, and the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS). The IRIC proteomics facility is a Node of the Canadian Genomic Innovation Network and is supported by the Canadian Government through Genome Canada. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author Contributions

All authors actively participated in the present study. IEK performed the bulk of the experiments, analyzed the data and contributed to the writing of the manuscript. ML did many of the preliminary data driving this project and BK performed some of the late experiments. JD performed all plaque assays. EB and PT did the mass spectrometry of the samples. RL designed the experiments and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Sudhof TC. 2002. Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277:7629-32.
2. Dean C, Dunning FM, Liu H, Bomba-Warczak E, Martens H, Bharat V, Ahmed S, Chapman ER. 2012. Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Mol Biol Cell* 23:1715-27.
3. Adolfsen B, Saraswati S, Yoshihara M, Littleton JT. 2004. Synaptotagmins are trafficked to distinct subcellular domains including the postsynaptic compartment. *J Cell Biol* 166:249-60.
4. Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC. 1995. Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375:594-9.
5. Ahras M, Otto GP, Tooze SA. 2006. Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* 173:241-51.
6. Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW. 2003. Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature* 426:559-63.
7. Hong W, Lev S. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol* 24:35-43.
8. Nagy G, Milosevic I, Mohrmann R, Wiederhold K, Walter AM, Sorensen JB. 2008. The SNAP-25 linker as an adaptation toward fast exocytosis. *Mol Biol Cell* 19:3769-81.

9. Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas RR, Chapman ER. 2005. Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5210-4.
10. Sugita S, Shin OH, Han W, Lao Y, Sudhof TC. 2002. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities. *EMBO J* 21:270-80.
11. Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R. 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-5.
12. Wang CT, Bai J, Chang PY, Chapman ER, Jackson MB. 2006. Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J Physiol* 570:295-307.
13. Creutz CE, Snyder SL, Schulz TA. 2004. Characterization of the yeast tricalbins: membrane-bound multi-C2-domain proteins that form complexes involved in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci* 61:1208-20.
14. Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P. 2013. PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* 153:1494-509.
15. Saheki Y, Bian X, Schauder CM, Sawaki Y, Surma MA, Klose C, Pincet F, Reinisch KM, De Camilli P. 2016. Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nat Cell Biol* 18:504-15.
16. Herdman C, Moss T. 2016. Extended-Synaptotagmins (E-Syts); the extended story. *Pharmacol Res* 107:48-56.

17. Min SW, Chang WP, Sudhof TC. 2007. E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3823-8.
18. Fernandez-Busnadiego R, Saheki Y, De Camilli P. 2015. Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2004-13.
19. Idevall-Hagren O, Lu A, Xie B, De Camilli P, Fernandez-Busnadiego R, Saheki Y, De Camilli P. 2015. Triggered Ca²⁺ influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering. *EMBO J* 34:2291-305.
20. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. 2011. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* 9:369-81.
21. Norrild B, Virtanen I, Pedersen B, Pereira L. 1983. Requirements for transport of HSV-1 glycoproteins to the cell surface membrane of human fibroblasts and Vero cells. *Arch Virol* 77:155-66.
22. Compton T, Courtney RJ. 1984. Virus-specific glycoproteins associated with the nuclear fraction of herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* 49:594-7.
23. Gilbert R, Ghosh HP. 1993. Immunoelectron microscopic localization of herpes simplex virus glycoprotein gB in the nuclear envelope of infected cells. *Virus Res* 28:217-31.
24. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P, Cunningham AL. 2002. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol* 76:9934-51.

25. Beitia Ortiz de Zarate I, Kaelin K, Rozenberg F. 2004. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J Virol* 78:1540-51.
26. Turcotte S, Letellier J, Lippé R. 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79:8847-60.
27. Loret S, Guay G, Lippé R. 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 82:8605-18.
28. Johnson DC, Baines JD. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* 9:382-94.
29. Wright CC, Wisner TW, Hannah BP, Eisenberg RJ, Cohen GH, Johnson DC. 2009. Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB. *J Virol* 83:11847-56.
30. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, Johnson DC. 2007. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10187-92.
31. Padula ME, Sydnor ML, Wilson DW. 2009. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol* 83:4757-65.
32. Henaff D, Radtke K, Lippé R. 2012. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. *Traffic* 13:1443-9.

33. Johnson DC, Webb M, Wisner TW, Brunetti C. 2001. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol* 75:821-33.
34. Melancon JM, Foster TP, Kousoulas KG. 2004. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *J Virol* 78:7329-43.
35. Sanders PG, Wilkie NM, Davison AJ. 1982. Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 63:277-95.
36. Bond VC, Person S. 1984. Fine-Structure Physical Map Locations of Alterations That Affect Cell-Fusion in Herpes-Simplex Virus Type-1. *Virology* 132:368-376.
37. Debroy C, Pederson N, Person S. 1985. Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. *Virology* 145:36-48.
38. Hutchinson L, Goldsmith K, Snoddy D, Ghosh H, Graham FL, Johnson DC. 1992. Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *J Virol* 66:5603-9.
39. Pogue-Geile KL, Lee GT, Shapira SK, Spear PG. 1984. Fine mapping of mutations in the fusion-inducing MP strain of herpes simplex virus type 1. *Virology* 136:100-9.
40. Ruyechan WT, Morse LS, Knipe DM, Roizman B. 1979. Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol* 29:677-97.
41. Kim IJ, Chouljenko VN, Walker JD, Kousoulas KG. 2013. Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry. *J Virol* 87:8029-37.

42. Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ, Johnson DC. 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* 83:3115-26.
43. El Kasmi I, Lippé R. 2015. Herpes Simplex Virus 1 gN Partners with gM To Modulate the Viral Fusion Machinery. *J Virol* 89:2313-23.
44. Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J, Roizman B. 2007. Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J Virol* 81:800-12.
45. Zhang J, Nagel CH, Sodeik B, Lippé R. 2009. Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes. *J Virol* 83:12984-97.
46. Klupp BG, Nixdorf R, Mettenleiter TC. 2000. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J Virol* 74:6760-8.
47. Koyano S, Mar EC, Stamey FR, Inoue N. 2003. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J Gen Virol* 84:1485-91.
48. Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T, Browne HM. 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol* 85:3517-27.
49. Ren Y, Bell S, Zenner HL, Lau SY, Crump CM. 2012. Glycoprotein M is important for the efficient incorporation of glycoprotein H-L into herpes simplex virus type 1 particles. *J Gen Virol* 93:319-29.
50. Lau SY, Crump CM. 2015. HSV-1 gM and the gK/pUL20 complex are important for the localization of gD and gH/L to viral assembly sites. *Viruses* 7:915-38.

51. Lee JH, Vittone V, Diefenbach E, Cunningham AL, Diefenbach RJ. 2008. Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology* 378:347-54.
52. Fossum E, Friedel CC, Rajagopala SV, Titz B, Baiker A, Schmidt T, Kraus T, Stellberger T, Rutenberg C, Suthram S, Bandyopadhyay S, Rose D, von Brunn A, Uhlmann M, Zeretzke C, Dong YA, Boulet H, Koegl M, Bailer SM, Koszinowski U, Ideker T, Uetz P, Zimmer R, Haas J. 2009. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog* 5:e1000570.
53. Striebinger H, Funk C, Raschbichler V, Bailer SM. 2016. Subcellular Trafficking and Functional Relationship of the HSV-1 Glycoproteins N and M. *Viruses* 8:83.
54. Cheshenko N, Del Rosario B, Woda C, Marcellino D, Satlin LM, Herold BC. 2003. Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *J Cell Biol* 163:283-93.
55. Cheshenko N, Liu W, Satlin LM, Herold BC. 2007. Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. *Mol Biol Cell* 18:3119-30.
56. Cheshenko N, Trepanier JB, Stefanidou M, Buckley N, Gonzalez P, Jacobs W, Herold BC. 2013. HSV activates Akt to trigger calcium release and promote viral entry: novel candidate target for treatment and suppression. *FASEB J* 27:2584-99.
57. Khadivjam B, Stegen C, Hogue-Racine MA, El Bilali N, Dohner K, Sodeik B, Lippe R. 2017. The ATP-dependent RNA Helicase DDX3X modulates Herpes Simplex Virus Type 1 Gene Expression. *J Virol* 91:e02411-16.

58. Kim IS, Jenni S, Stanifer ML, Roth E, Whelan SP, van Oijen AM, Harrison SC. 2017. Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E28-E36.
59. Burnett HF, Audas TE, Liang G, Lu RR. 2012. Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection. *Cell Stress Chaperones* doi:10.1007/s12192-012-0324-8.
60. Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC. 1994. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-27.
61. Jaiswal JK, Chakrabarti S, Andrews NW, Simon SM. 2004. Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol* 2:E233.
62. Wang C, Wang Y, Hu M, Chai Z, Wu Q, Huang R, Han W, Zhang CX, Zhou Z. 2016. Synaptotagmin-11 inhibits clathrin-mediated and bulk endocytosis. *EMBO Rep* 17:47-63.
63. Wang S, Li Y, Ma C. 2016. Synaptotagmin-1 C2B domain interacts simultaneously with SNAREs and membranes to promote membrane fusion. *Elife* 5.
64. Luft JH. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9:409-14.

CHAPITRE III Discussion générale

Les glycoprotéines de l'enveloppe des virus herpétiques jouent des rôles importants et variés à différentes étapes du cycle viral. Elles sont requises durant l'entrée, l'assemblage et la sortie du virus (403). La glycoprotéine gM du virus HSV-1 est parmi les protéines virales les plus conservées dans la famille des virus herpétiques. Elle est connue pour moduler l'entrée virale et la fusion cellule à cellule induite par le virus (322, 396, 417). Ce processus semble être bien régulé durant l'infection. Toutefois, le mécanisme par lequel gM module la fusion n'est pas encore connu. Des études antérieures ont rapporté la présence de gM dans le noyau des cellules infectées, alors que gM exprimée seule est localisée au TGN (277, 282, 306) . Ce résultat suggère que gM interagit avec d'autres protéines virales durant le cycle viral qui sont probablement responsables de son ciblage nucléaire. Toutefois, plusieurs molécules ont été testées auparavant et aucune ne semble expliquer ces phénomènes (282).

Dans l'article I, il a été question d'examiner un partenaire potentiel de gM basé sur nos connaissances des autres virus herpétiques. La glycoprotéine gN constitue un partenaire de gM très conservée dans toute la famille d'*Herpesviridae* (396, 399, 403), cependant cette interaction n'a jamais été démontrée pour le virus HSV-1. De plus, la pertinence fonctionnelle de ce complexe ou de gN toute seule n'est pas claire et varie considérablement d'un virus à l'autre.

1 Caractérisation du complexe gM/gN du virus HSV-1

La première stratégie s'appuyait sur la mise en évidence du complexe gM/gN. En effet, nos expériences de co-immunoprécipitations nous ont permis de valider l'interaction de ces deux protéines. Leur association en contexte de transfection confirme que ces deux glycoprotéines interagissent en absence de toute autre protéine virale. Plus intéressant encore, nos données de CO-IP dans les cellules infectées indiquent l'existence d'une interaction physique et directe entre gM et gN. Ce résultat a depuis été confirmé dans une nouvelle étude publiée en 2016 par l'équipe de Susanne M. Bailer (394). De plus, notre étude révèle que les 132 premiers acides aminés de la glycoprotéine gM sont importants mais pas absolument nécessaires pour l'interaction gM/gN. En effet gN reste liée au complexe même en absence de cette région localisée dans la partie N-terminale. Toutefois, cette interaction semble beaucoup moins forte par rapport à l'interaction avec HSV-1 gM WT. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la délétion de ce domaine diminue le niveau d'expression de gM et par conséquent l'interaction de gM/gN serait alors moins stable mais cela reste à être déterminé. D'autres sites d'interactions entre gM et gN peuvent également être envisageables, puisqu'une étude a montré que gN et gM sont reliés entre autres par seule liaison disulfure formée entre la cystéine C46 présente dans le domaine luminal de gN et la cystéine C59 présente dans la grande boucle de gM (394). Collectivement, ces données confirment que gM/gN interagissent physiquement et forment un complexe stable pour de nombreux virus de la même famille. Il est à noter que dans les expériences réalisées, c'est l'expression de la protéine gN exogène qui a été détectée et ceci à l'aide de son étiquette YFP. Ce choix est lié à l'absence d'un anticorps spécifique capable de détecter l'expression de gN endogène. Nous avons tout de même essayé de produire un anticorps anti-gN, mais malheureusement nous avons été confrontés à des problèmes de spécificité.

Toutefois, nous considérons que l'interaction gM/gN est biologiquement pertinente, puisque gN exogène est capable de lier la glycoprotéine gM dans un contexte de transfection et également lors de l'expression de gM endogène.

Nous avons montré par des expériences d'immunofluorescence que, contrairement à d'autres virus herpétiques comme BHV-1 et EHV-1, où gN est dominant sur gM (398, 400), la glycoprotéine gN du virus HSV-1 n'a pas d'impact sur la localisation de gM au TGN. En effet, gN réside dans le réticulum endoplasmique en absence de toute autre protéine virale. Toutefois, en présence de gM, gN est transférée vers le TGN. Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui suggère que la translocation de gN au TGN nécessite la région hydrophobique de gM, mais est indépendante du domaine C-terminal et cytoplasmique de gM (394). Ces résultats pourraient suggérer que gM conduit gN au TGN afin qu'elle soit incorporée au virion mature. Étonnement, nos efforts et ceux d'autres laboratoires indiquent que HSV-1-gN est indétectable dans les virions matures par spectrométrie de masse (99). Considérant nos résultats qui montrent que gM et gN forment un complexe, et la présence de gN dans les virions extracellulaires du virus PRV, il est probable que gN échappe à cette détection en raison de sa petite taille inadaptée pour générer des peptides tryptiques appropriés.

Au cours de l'infection, gM est localisée à l'enveloppe nucléaire, aux virions périnucléaires, au TGN ainsi que sur les virions matures. Malheureusement, à cause de l'absence d'anticorps nous étions incapables de détecter la localisation intracellulaire de gN. Néanmoins, nous pouvons penser que plusieurs populations peuvent coexister incluant gM/gN en complexe, ainsi que des protéines gN et gM qui voyagent indépendamment les unes des autres exerçant ainsi des fonctions spécifiques en fonction du compartiment où elles résident.

2 Identification d'un rôle fonctionnel de la glycoprotéine gN

Le rôle que joue la glycoprotéine gM dans la régulation de la fusion induite par le virus est controversé dans la littérature. D'une part, gM est un régulateur négatif de la fusion induite par l'expression des protéines gB, gD et gH/gL en contexte de transfection, essentiellement parce qu'elle réduit leur expression à la membrane plasmique (391, 396). D'autre part, gM stimule la fusion lors l'entrée du virus dans le contexte d'infection avec des souches syncytiales (322). Ces résultats ont été obtenus dans des situations dites "forcées" où la fusion induite par le virus a été dérégulée. Pour comprendre le rôle de gN, nous avons parallèlement utilisé un système basé sur la surexpression de la glycoprotéine gN suivi par une infection. Avec ce système, nous étions capables de mettre en évidence une coopération fonctionnelle entre gM et gN. Nous avons ainsi remarqué qu'en présence de gN exogène, la formation des syncytiums est stimulée et ceci lors de l'infection avec une souche virale d'HSV-1 WT non syncytiale. De plus, conformément à une interaction fonctionnelle de gN et gM, la formation des syncytiums induite par gN a été réduite avec le virus HSV-1 Δ gM2, qui exprime très peu de gM. Il a été rapporté que ce mutant, qui est tronqué d'un fragment en N-terminale de gM (132 premiers acides aminés), est incapable de sortir du RE (390). Étant donné que ce fragment est important pour l'interaction gM/gN, il est possible de penser que Δ gM2 et gN toutes les deux retournent au RE et sont par conséquent incapables d'atteindre les sites de fusion membranaire (394). Ce contexte spécifique dans lequel le rôle de gN dans la modulation de la fusion a été identifié pourrait être un système intéressant à utiliser afin d'identifier des domaines dans la glycoprotéine gM requis pour la fusion membranaire modulée par gM/gN.

3 Rôle d'E-Syt1 et 3 dans la propagation du virus

L'étude présentée dans l'article II s'inscrit également dans mon objectif d'identification de nouveaux partenaires d'interaction de la glycoprotéine gM. Durant le cycle viral, le virus HSV-1 interagit avec différents compartiments dans la cellule, exploite la machinerie cellulaire pour son propre avantage, et recrute différentes protéines de l'hôte dans le but de se répliquer et d'infecter d'autres cellules. La glycoprotéine gM est connue pour réguler la fusion induite par le virus. De plus, gM est localisée à différents endroits durant l'infection où le processus de fusion est requis. Très peu de choses sont connues quant aux molécules modulant cette localisation et son impact sur la fusion au cours de l'infection. Il s'avère donc pertinent d'étudier plus en profondeur ces mécanismes afin de mieux comprendre comment gM régule la machinerie de fusion.

L'objectif principal de cette seconde étude est d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de gM susceptibles de réguler la fusion modulée par gM. Nous avons donc procédé à l'analyse protéomique de la glycoprotéine gM. La stratégie qui a été établie consiste à immunoprécipiter gM dans un contexte de transfection suivie par une analyse en spectrométrie de masse avec comme objectif à long terme de comparer les résultats en contexte d'infection. Les résultats obtenus révèlent l'identification d'une protéine de 122.9 kDa et qui est nommée E-Syt1 pour Extended synaptotagmin1. Afin de valider ce résultat, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées, et ont démontré que les deux protéines sont liées dans les cellules transfectées et également dans un contexte d'infection, qui suggère que cette interaction ne nécessite pas la présence d'autres protéines virales.

Le rôle des protéines (E-Syt) n'est pas bien caractérisé dans la littérature. Certains suggèrent qu'elles fonctionnent comme des attaches du RE à la MP alors que leur nom reflète leur

similitude avec les synaptotagmines, une famille de protéines impliquées dans la régulation de la fusion et la sécrétion dépendante de Ca^{2+} . Afin de déterminer l'importance physiologique de la protéine E-Syt1 pour le virus HSV-1, nous avons inhibé son expression dans les cellules infectées en utilisant de l'ARN d'interférence. Nos résultats montrent que lorsqu'E-Syt1 est bloqué, la production virale est stimulée. En regardant plus en détail l'impact d'E-Syt1 sur des étapes clés du cycle viral, on a conclu qu'elle régule négativement le processus d'entrée du virus, sa sortie ainsi que sa propagation de cellule à cellule, toutes des étapes impliquant des événements de fusion qui se produisent lors de l'infection. De plus, E-Syt1 est connue pour former un hétérodimère avec E-Syt3 via leur domaine SMP commun (418). De ce fait, nous avons trouvé qu'E-Syt3 seule, ou avec E-Syt1 module aussi les étapes de fusion dépendantes de virus, mais qu'E-Syt2 ne semble pas participé à ces processus.

Il reste difficile avec les éléments dont nous disposons actuellement de comprendre le mécanisme d'action par lequel la protéine E-Syt1, liée ou pas à la glycoprotéine gM, affecte les événements de fusion induits par le virus. Nous savons que le virus HSV-1 utilise la voie de sécrétion cellulaire impliquant le RE afin de synthétiser plusieurs protéines virales, qui vont par la suite être transportées à la membrane plasmique et/ou au TGN. Le transfert rapide de l'information entre ces membranes fournit à la cellule un moyen de réguler les fonctions essentielles du RE. Pour ce faire, le RE et la MP recrutent alors les protéines E-Syts qui sont responsables de former des ponts entre la surface de la cellule et le RE, ces deux organelles deviennent alors étroitement juxtaposées, mais sans fusion membranaire. Il a été rapporté que la perte de l'expression de ces protéines d'attaches RE-MP entraîne une réduction massive des sites de contacts RE-MP. De plus, les cellules dépourvues de ces sites subissent un stress du RE (419). On pourrait penser alors que l'inhibition de E-Syt1 et E-Syt3 entraîne la perte des sites

de contacts, ceci va causer un ralentissement dans la communication et le transfert des signaux cellulaires entre les organelles et par conséquent favoriser l'infection virale et par un mécanisme encore inconnu stimuler la fusion virale. De plus, plusieurs synaptotagmines agissent avec les protéines SNARES pour favoriser la fusion. Toutefois, une étude rapporte que SYT4 inhibe la fusion membranaire catalysée par SNARE à la fois en présence et en absence du calcium (420). Ainsi, la surexpression de SYT4 réduit la fréquence des événements de fusion dans les cellules, et raccourcit le temps de l'ouverture des pores de fusion à la dilatation (421). Des études futures pourraient se focaliser à comprendre comment les protéines E-Syts collaborent avec la machinerie de fusion SNARE pour favoriser ou bloquer la fusion membranaire.

L'approche utilisée d'immunoprécipitation en contexte de transfection suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a des avantages mais présente aussi des limites. En effet, la présence de contaminants tels que des protéines liant de façon non spécifique les billes d'agarose lors de l'immunoprécipitation représente un problème majeur. Il est alors crucial dans ce genre d'expérience d'introduire plusieurs contrôles afin de limiter tout contaminant et d'augmenter ainsi la spécificité. D'autres part, malgré la validation de notre modèle et d'avoir démontré qu'E-Syt1 interagit avec gM, il nous a été impossible d'identifier tous les partenaires d'interaction de gM. En fait, l'approche utilisée ne nous permet pas de détecter les interactions faibles et/ou transitoires ni celles impliquant d'autres protéines virales. De plus, certaines protéines identifiées par spectrométrie de masse comme partenaire de gM ont été éliminées à cause de leur présence dans les contrôles négatifs. Il serait alors fort utile d'utiliser une autre approche afin d'augmenter le nombre de partenaires de gM.

4 Conclusions et perspectives

En résumé, les travaux présentés dans cette thèse de doctorat ont permis d'identifier deux partenaires de la glycoprotéine gM du virus HSV-1, soit gN, une protéine virale et la composante cellulaire E-Syt1. Nous avons également réussi à déterminer le rôle fonctionnel de chacune de ces protéines identifiées. D'une part, nous avons démontré que la surexpression de gN stimule la formation des syncytiums et module l'activité de gM dans la fusion membranaire induite par le virus. D'autre part, nous avons montré que la protéine E-Syt1 module négativement la sortie du virus dans le milieu extracellulaire, son entrée dans les cellules voisines et également la propagation du virus de cellule à cellule, tous ces processus impliquant la fusion membranaire. De plus, la glycoprotéine gM régule négativement la fusion en contexte de transfection en relocalisant les glycoprotéines de la machinerie de fusion virale de la membrane plasmique vers le TGN (391) mais positivement lors de l'entrée par fusion de souches syncytiales. Il serait alors intéressant de savoir si ces trois protéines coopèrent dans le même complexe ou bien interagissent dans des complexes distincts. Des études par Co-IP des trois protéines en même temps pourraient nous éclaircir sur ce point mais une approche spatio-temporelle pourrait être nécessaire pour voir si ces molécules agissent au même endroit au même moment. Il serait tout aussi pertinent de savoir si E-Syt1 et/ou gN interagit avec la machinerie de fusion virale, par exemple avec des approches de co-immunoprécipitation ou de double hybride. Finalement, l'inhibition de l'expression d'E-Syt1 et E-Syt3 a stimulé la production virale et la fusion membranaire dans un contexte d'infection avec le virus HSV-1 de type sauvage. Afin de mieux caractériser le rôle du complexe gM/E-Syt1, il serait intéressant de voir l'impact de l'inhibition de ces protéines E-Syt1 et E-Syt3 lorsque le virus est délété de gM, et ceci en infectant les cellules avec le virus HSV-1 Δ gM2.

Des études précédentes ont montré qu'en phase précoce d'infection, gM est localisée à la membrane nucléaire interne, et sur les virions périnucléaires (277). Malgré cela, le rôle de gM au noyau reste encore un mystère. Nous pensons qu'étant donné son rôle dans la régulation de la fusion, il est probable que gM module la fusion lors de la sortie des virions dans l'espace périnucléaire, particulièrement parce que les composantes de l'appareil de fusion du virus s'y retrouve intégralement (332).

Il est clair que gM interagit avec d'autres protéines, puisque ni gN ni E-Syt1 ne cible gM au noyau et toute seule, gM est retrouvée au TGN. L'identification des molécules se liant à gM dans le noyau nous aiderait donc à définir les mécanismes de ciblage au niveau moléculaire et à fournir des pistes concernant le rôle précis de gM au cours de l'infection en utilisant des membranes nucléaires de cellules infectées comme source de matériel. De plus, une approche protéomique en utilisant la méthode de BioID est parfaitement adaptée pour une telle question. Un des avantages de cette technique est qu'il est possible de capturer aussi bien des interactions stables que des interactions plus faibles ou transitoires. Finalement, durant le cycle viral, gM se localise à différents endroits, ce qui suppose qu'elle interagit avec différentes protéines en fonction du temps. Pour aborder cette question, différents lysats cellulaires pourraient être préparés à différents moments post-infection.

Bibliographie

1. Wildy P. Herpes: history and classification. In: Kaplan AS, ed. The herpes-viruses : New York: Academic Press; 1973.
2. Roizman B, Knipe, D.M., Whiteley, R.J. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D., Howley, P.M. . 5^e éd. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007.
3. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields' virology. 5th^e éd. Philadelphia: Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Garzetti A. From Tiberius to the Antonines. A history of the roman empire AD 14-192. LTD MaC, rédacteur. London: Taylor & Francis; 1974.
5. Shakespeare W. Romeo and Juliet 1597-1599.
6. Willan R. On cutaneous diseases. Vol. I [microform] / by Robert Willan. Philadelphia: Kimber and Conrad, Brown & Merritt); 1809.
7. Duhring LA. Dermatitis herpetiformis. JAMA. 1983;250(2):212-6.
8. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. Herpes. 2001;8(1):23-7. Epub 2002/02/28.
9. Gruter W. Das herpesvirus, seine etiologische und klinische bedeutung. Munch Med Wschr 1924;71:1058.
10. Goodpasture EW, Teague O. Transmission of the Virus of Herpes Febrilis along Nerves in experimentally infected Rabbits. J Med Res. 1923;44(2):139-84.7.
11. Burnet FM, Williams SW. Herpes simplex: new point of view. . Med J. Aust 1939;1:637-40.
12. Evans AS, Kaslow RA. Viral infections of humans: epidemiology and control, 4th edition. Springer, rédacteur 1997.
13. Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares RE, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. Folia Microbiol (Praha). 2017;62(2):151-6.

14. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79(13):1635-52. Epub 2015/03/10.
15. Roizman B, Longnecker R. *Fundamentals of molecular virology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2011.
16. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425-49. Epub 1992/01/01.
17. Seo JY, Britt WJ. Sequence requirements for localization of human cytomegalovirus tegument protein pp28 to the virus assembly compartment and for assembly of infectious virus. *J Virol*. 2006;80(11):5611-26. Epub 2006/05/16.
18. Roizman B, Sears A. Herpes simplex viruses and their replication. *Fields virology*. 2001;2:2399-459.
19. Roizman B, Pellett P. The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields virology*. 2001;4:2381-97.
20. Ambinder RF, Cesarman E. Clinical and pathological aspects of EBV and KSHV infection. Dans: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., rédacteurs. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press
Copyright (c) Cambridge University Press 2007.; 2007.
21. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order herpesvirales. *Arch Virol*. 2009;154(1):171-7.
22. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140765.
23. Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(1):e114989.
24. Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S3-28.

25. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*. 2006;20(1):73-83.
26. Stock C, Guillen-Grima F, de Mendoza JH, Marin-Fernandez B, Aguinaga-Ontoso I, Kramer A. Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(9):885-90. Epub 2002/06/26.
27. Spruance SL. Pathogenesis of herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light. *J Clin Microbiol*. 1985;22(3):366-8.
28. Knipe DM, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(3):211-21. Epub 2008/02/12.
29. Schacker T, Ryncarz AJ, Goddard J, Diem K, Shaughnessy M, Corey L. Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men. *JAMA*. 1998;280(1):61-6. Epub 1998/07/11.
30. Mertz KJ, Trees D, Levine WC, Lewis JS, Litchfield B, Pettus KS, et al. Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1795-8. Epub 1998/11/17.
31. Ghosh S, Selby MJ, Peterlin BM. Synergism between Tat and VP16 in trans-activation of HIV-1 LTR. *J Mol Biol*. 1993;234(3):610-9. Epub 1993/12/05.
32. Palu G, Benetti L, Calistri A. Molecular basis of the interactions between herpes simplex viruses and HIV-1. *Herpes*. 2001;8(2):50-5.
33. Whitley RJ, Soong SJ, Linneman C, Jr., Liu C, Pazin G, Alford CA. Herpes simplex encephalitis. Clinical Assessment. *JAMA*. 1982;247(3):317-20. Epub 1982/01/15.
34. Baringer JR. Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin*. 2008;26(3):657-74, viii. Epub 2008/07/29.
35. Murakami S, Mizobuchi M, Nakashiro Y, Doi T, Hato N, Yanagihara N. Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle. *Ann Intern Med*. 1996;124(1 Pt 1):27-30. Epub 1996/01/01.
36. Furuta Y, Fukuda S, Chida E, Takasu T, Ohtani F, Inuyama Y, et al. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. *J Med Virol*. 1998;54(3):162-6. Epub 1998/03/27.

37. Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;48(2):319-53.
38. Ball MJ. "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?". *Can J Neurol Sci.* 1982;9(3):303-6.
39. Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:202.
40. Mori I, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Yokochi T, et al. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol.* 2004;73(4):605-11. Epub 2004/06/29.
41. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol.* 1991;33(4):224-7.
42. Pogo BG, Casals J, Elizan TS. A study of viral genomes and antigens in brains of patients with Alzheimer's disease. *Brain.* 1987;110 (Pt 4):907-15.
43. Walker DG, O'Kusky JR, McGeer PL. In situ hybridization analysis for herpes simplex virus nucleic acids in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1989;3(3):123-31.
44. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol.* 2009;217(1):131-8.
45. Renvoize EB, Awad IO, Hambling MH. A sero-epidemiological study of conventional infectious agents in Alzheimer's disease. *Age Ageing.* 1987;16(5):311-4.
46. Zambrano A, Solis L, Salvadores N, Cortes M, Lerchundi R, Otth C. Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(3):259-69.
47. Alvarez G, Aldudo J, Alonso M, Santana S, Valdivieso F. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res.* 2012;90(5):1020-9.
48. Letenneur L, Peres K, Fleury H, Garrigue I, Barberger-Gateau P, Helmer C, et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One.* 2008;3(11):e3637.
49. Lovheim H, Gilthorpe J, Adolfsson R, Nilsson LG, Elgh F. Reactivated herpes simplex infection increases the risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2015;11(6):593-9.

50. Cheng SB, Ferland P, Webster P, Bearer EL. Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell. *PLoS One*. 2011;6(3):e17966. Epub 2011/04/13.
51. Wilhelmus KR. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(12):CD002898.
52. Labetoulle M, Offret H, Colin J. Traitement des kératites herpétiques (formes m taherp tiques exclues). Labetoulle M, L'herpès et le zona oculaire en pratique: clinique, th rapeutique et pr vention" Med'Com Editions, Paris, 2008; Sous presse. 2009.
53. Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7(5):559-68. Epub 2009/06/03.
54. Naesens L, De Clercq E. Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes*. 2001;8(1):12-6. Epub 2002/02/28.
55. Cihlar T, Chen MS. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50(6):1502-10.
56. Snoeck R, Andrei G, Gerard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, et al. Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis*. 1994;18(4):570-8. Epub 1994/04/01.
57. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Assous MV. *Microbiologie et pathologie infectieuse*. Paris: De Boeck Universit ; 1999.
58. Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, et al. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Res*. 1998;40(1-2):85-94.
59. Smibert CA, Johnson DC, Smiley JR. Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene UL41. *J Gen Virol*. 1992;73(Pt 2):467-70.
60. Kleymann G, Fischer R, Betz UA, Hendrix M, Bender W, Schneider U, et al. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med*. 2002;8(4):392-8. Epub 2002/04/03.

61. Crute JJ, Grygon CA, Hargrave KD, Simoneau B, Faucher AM, Bolger G, et al. Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nat Med*. 2002;8(4):386-91. Epub 2002/04/03.
62. Fields B, Knipe D, Howley P, Griffin D. *Fields virology*. 5th. : Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
63. Koelle D. Vaccines for herpes simplex virus infections. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000). 2006;7(2):136-41.
64. Smith TJ, Morrison LA, Leib DA. Pathogenesis of herpes simplex virus type 2 virion host shutoff (vhs) mutants. *J Virol*. 2002;76(5):2054-61. Epub 2002/02/12.
65. Bowers WJ, Mastrangelo MA, Stanley HA, Casey AE, Milo LJ, Federoff HJ. HSV amplicon-mediated A β vaccination in Tg2576 mice: differential antigen-specific immune responses. *Neurobiol Aging*. 2005;26(4):393-407.
66. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*. 2002;347(21):1652-61. Epub 2002/11/22.
67. Bosseray A, Bonadona A, Morand P. Où en sont les vaccins contre les infections à Herpès simplex? *Pathol Biol*. 2002;50(8):483-92.
68. Strang BL, Stow ND. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol*. 2005;79(19):12487-94. Epub 2005/09/15.
69. Pellett P. RB (2007). The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields virology*, HP Knipe DM ed(Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins). :2479-500.
70. Macdonald SJ, Mostafa HH, Morrison LA, Davido DJ. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain McKrae. *J Virol*. 2012;86(17):9540-1. Epub 2012/08/11.
71. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, 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):1531-74.
72. Wadsworth S, Jacob RJ, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol*. 1975;15(6):1487-97.
73. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:347-84. Epub 1997/01/01.

74. Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. Herpes simplex virus. *Front Biosci.* 2002;7:d752-64. Epub 2002/02/28.
75. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, et al. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol.* 2005;86(1):41-53.
76. Baines JD. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):606-13.
77. Homa FL, Brown JC. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol.* 1997;7(2):107-22.
78. Bera A, Perkins EM, Zhu J, Zhu H, Desai P. DNA binding and condensation properties of the herpes simplex virus type 1 triplex protein VP19C. *PLoS One.* 2014;9(8):e104640.
79. Anderson F, Savulescu AF, Rudolph K, Schipke J, Cohen I, Ibiricu I, et al. Targeting of viral capsids to nuclear pores in a cell-free reconstitution system. *Traffic.* 2014;15(11):1266-81.
80. Wu W, Newcomb WW, Cheng N, Aksyuk A, Winkler DC, Steven AC. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. *J Virol.* 2016;90(10):5176-86.
81. Newcomb WW, Trus BL, Booy FP, Steven AC, Wall JS, Brown JC. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol.* 1993;232(2):499-511. Epub 1993/07/20.
82. Zhou ZH, Prasad BV, Jakana J, Rixon FJ, Chiu W. Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. *J Mol Biol.* 1994;242(4):456-69.
83. Chen DH, Jakana J, McNab D, Mitchell J, Zhou ZH, Dougherty M, et al. The pattern of tegument-capsid interaction in the herpes simplex virus type 1 virion is not influenced by the small hexon-associated protein VP26. *J Virol.* 2001;75(23):11863-7.
84. Saad A, Zhou ZH, Jakana J, Chiu W, Rixon FJ. Roles of Triplex and Scaffolding Proteins in Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid Formation Suggested by Structures of Recombinant Particles. *J Virol.* 1999;73(8):6821-30.
85. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol.* 2011;1(2):142-9. Epub 2011/09/20.

86. Kobayashi R, Kato A, Oda S, Koyanagi N, Oyama M, Kozuka-Hata H, et al. Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 Is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site. *J Virol.* 2015;89(11):6141-7.
87. Trus BL, Cheng N, Newcomb WW, Homa FL, Brown JC, Steven AC. Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2004;78(22):12668-71.
88. Chang JT, Schmid MF, Rixon FJ, Chiu W. Electron cryotomography reveals the portal in the herpesvirus capsid. *J Virol.* 2007;81(4):2065-8.
89. Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Trus BL, Cheng N, Steven A, et al. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J Virol.* 1999;73(5):4239-50. Epub 1999/04/10.
90. Trus BL, Newcomb WW, Cheng N, Cardone G, Marekov L, Homa FL, et al. Allosteric Signalling and a Nuclear Exit Strategy: Binding of UL25/UL17 Heterodimers to DNA-filled HSV-1 Capsids. *Mol Cell.* 2007;26(4):479-89.
91. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, et al. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol.* 2001;75(22):10923-32. Epub 2001/10/17.
92. Cockrell SK, Huffman JB, Toropova K, Conway JF, Homa FL. Residues of the UL25 protein of herpes simplex virus that are required for its stable interaction with capsids. *J Virol.* 2011;85(10):4875-87.
93. Snijder J, Radtke K, Anderson F, Scholtes L, Corradini E, Baines J, et al. Vertex-Specific Proteins pUL17 and pUL25 Mechanically Reinforce Herpes Simplex Virus Capsids. *J Virol.* 2017;91(12).
94. Kobayashi R, Kato A, Sagara H, Watanabe M, Maruzuru Y, Koyanagi N, et al. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates Nucleocapsid Maturation. *J Virol.* 2017;91(18).
95. Cardone G, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Steven AC. Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv Exp Med Biol.* 2012;726:423-39.
96. Yang K, Wills E, Lim HY, Zhou ZH, Baines JD. Association of herpes simplex virus pUL31 with capsid vertices and components of the capsid vertex-specific complex. *J Virol.* 2014;88(7):3815-25.

97. Newcomb WW, Jones LM, Dee A, Chaudhry F, Brown JC. Role of a reducing environment in disassembly of the herpesvirus tegument. *Virology*. 2012;431(1-2):71-9. Epub 2012/06/15.
98. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res*. 2004;106(2):167-80.
99. Loret S, Guay G, Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*. 2008;82(17):8605-18. Epub 2008/07/04.
100. Stegen C, Yakova Y, Henaff D, Nadjar J, Duron J, Lippé R. Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen. *PLoS One*. 2013;8(1):e53276.
101. Baines J, Duffy C. Nucleocapsid Assembly and Envelopment of Herpes Simplex Virus. Dans: Sandri-Goldin RM, rédacteur. *Alpha Herpesviruses*. Norfolk: Caister Academic Press; 2006. p. 175-204.
102. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*. 2002;13(8):2795-809. Epub 2002/08/16.
103. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*. 1997;136(5):1007-21.
104. Barzilai A, Zivony-Elbom I, Sarid R, Noah E, Frenkel N. The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery. *J Virol*. 2006;80(1):505-13. Epub 2005/12/15.
105. Liu X, Fitzgerald K, Kurt-Jones E, Finberg R, Knipe DM. Herpesvirus tegument protein activates NF-kappaB signaling through the TRAF6 adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11335-9. Epub 2008/08/07.
106. Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(5):382-94. Epub 2011/04/16.
107. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res*. 2009;145(2):173-86.
108. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*. 2009;143(2):222-34. Epub 2009/08/05.

109. Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol.* 2005;79(15):9566-71.
110. Meckes DG, Jr., Wills JW. Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *J Virol.* 2007;81(23):13028-36. Epub 2007/09/15.
111. Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ, Sodeik B. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic.* 2006;7(2):227-37. Epub 2006/01/20.
112. Roberts AP, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon FJ, Padeloup D. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2009;83(1):105-16. Epub 2008/10/31.
113. Lee JH, Vittone V, Diefenbach E, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 2008;378(2):347-54. Epub 2008/07/08.
114. Morrison EE, Stevenson AJ, Wang YF, Meredith DM. Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J Gen Virol.* 1998;79(Pt 10):2517-28.
115. Mackem S, Roizman B. Structural features of the herpes simplex virus alpha gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer alpha regulation on chimeric thymidine kinase genes. *J Virol.* 1982;44(3):939-49.
116. N. B, Knipe DM, Howley PM. Herpes simplex viruses. In : Knipe DM, Howley PM, eds *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 2501-602.
117. Ko DH, Cunningham AL, Diefenbach RJ. The major determinant for addition of tegument protein pUL48 (VP16) to capsids in herpes simplex virus type 1 is the presence of the major tegument protein pUL36 (VP1/2). *J Virol.* 2010;84(3):1397-405. Epub 2009/11/20.
118. Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol.* 2002;76(13):6729-42.
119. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol.* 2000;74(14):6287-99.

120. Elliott G, Mouzakis G, O'Hare P. VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *J Virol.* 1995;69(12):7932-41.
121. Smibert CA, Popova B, Xiao P, Capone JP, Smiley JR. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol.* 1994;68(4):2339-46.
122. Zhang Y, Sirko DA, McKnight JL. Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *J Virol.* 1991;65(2):829-41. Epub 1991/02/01.
123. Laine RF, Albecka A, van de Linde S, Rees EJ, Crump CM, Kaminski CF. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nat Commun.* 2015;6:5980.
124. Gross ST, Harley CA, Wilson DW. The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology.* 2003;317(1):1-12.
125. Kamen DE, Gross ST, Girvin ME, Wilson DW. Structural basis for the physiological temperature dependence of the association of VP16 with the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H. *J Virol.* 2005;79(10):6134-41.
126. Svobodova S, Bell S, Crump CM. Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *J Virol.* 2012;86(1):473-83. Epub 2011/10/21.
127. Luxton GW, Haverlock S, Collier KE, Antinone SE, Pincetic A, Smith GA. 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):5832-7. Epub 2005/03/30.
128. Cardone G, Newcomb WW, Cheng N, Wingfield PT, Trus BL, Brown JC, et al. The UL36 tegument protein of herpes simplex virus 1 has a composite binding site at the capsid vertices. *J Virol.* 2012;86(8):4058-64. Epub 2012/02/22.
129. Epstein MA. Observations on the Mode of Release of Herpes Virus from Infected HeLa Cells. *The Journal of Cell Biology.* 1962;12(3):589-97.
130. Morgan C, Rose HM, Mednis B. Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. *J Virol.* 1968;2(5):507-16.

131. van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G, van Meer G. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology*. 1994;200(2):831-6.
132. Gershon AA, Sherman DL, Zhu Z, Gabel CA, Ambron RT, Gershon MD. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol*. 1994;68(10):6372-90.
133. Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y, et al. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol*. 2008;82(11):5198-211. Epub 2008/03/21.
134. Turcotte S, Letellier J, Lippé R. 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):8847-60.
135. Foster TP, Chouljenko VN, Kousoulas KG. Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *J Virol*. 2008;82(13):6310-23. Epub 2008/04/25.
136. Henaff D, Radtke K, Lippé R. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. *Traffic*. 2012;13(11):1443-9.
137. Adams R, Cunningham C, Davison MD, MacLean CA, Davison AJ. Characterization of the protein encoded by gene UL49A of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1998;79(Pt 4):813-23.
138. Foster TP, Rybachuk GV, Kousoulas KG. Glycoprotein K specified by herpes simplex virus type 1 is expressed on virions as a Golgi complex-dependent glycosylated species and functions in virion entry. *J Virol*. 2001;75(24):12431-8. Epub 2001/11/17.
139. Ghiasi H, Nesburn AB, Cai S, Wechsler SL. The US5 open reading frame of herpes simplex virus type 1 does encode a glycoprotein (gJ). *Intervirology*. 1998;41(2-3):91-7. Epub 1998/11/20.
140. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol*. 2008;18(1):35-51.
141. Hutchinson L, Browne H, Wargent V, Davis-Poynter N, Primorac S, Goldsmith K, et al. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J Virol*. 1992;66(4):2240-50. Epub 1992/04/01.

142. Johnson DC, Feenstra V. Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J Virol.* 1987;61(7):2208-16. Epub 1987/07/01.
143. Nagashunmugam T, Lubinski J, Wang L, Goldstein LT, Weeks BS, Sundaresan P, et al. In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol.* 1998;72(7):5351-9. Epub 1998/06/17.
144. Johnson DC, Hill AB. Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;232:149-77.
145. Frank I, Friedman HM. A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol.* 1989;63(11):4479-88. Epub 1989/11/01.
146. Heldwein EE, Krummenacher C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1653-68. Epub 2008/03/21.
147. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol.* 2007;17(3):205-15. Epub 2007/02/14.
148. Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* 2004;6(5):401-10.
149. Avitabile E, Lombardi G, Campadelli-Fiume G. 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):6836-44. Epub 2003/05/28.
150. Avitabile E, Lombardi G, Gianni T, Capri M, Campadelli-Fiume G. Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J Virol.* 2004;78(15):8015-25.
151. Melancon JM, Fulmer PA, Kousoulas KG. The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment. *Virol J.* 2007;4:120. Epub 2007/11/13.
152. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(5):369-81. Epub 2011/04/12.

153. Browne H, Baxter V, Minson T. Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt 12):2813-7.
154. Mikloska Z, Cunningham AL. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J Gen Virol.* 1998;79(Pt 2):353-61.
155. Koyama AH, Uchida T. The mode of entry of herpes simplex virus type 1 into Vero cells. *Microbiol Immunol.* 1987;31(2):123-30.
156. Wittels M, Spear PG. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 1991;18(2-3):271-90.
157. Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol.* 2003;77(9):5324-32.
158. Nicola AV, Hou J, Major EO, Straus SE. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol.* 2005;79(12):7609-16.
159. Komala Sari T, Pritchard SM, Cunha CW, Wudiri GA, Laws EI, Aguilar HC, et al. Contributions of herpes simplex virus 1 envelope proteins to entry by endocytosis. *J Virol.* 2013;87(24):13922-6.
160. Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2005;79(11):6655-63.
161. Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, et al. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol.* 2007;17(5):313-26. Epub 2007/06/19.
162. Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J Virol.* 1998;72(7):6119-30.
163. Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol.* 1992;116(5):1273-81.

164. Gruenheid S, Gatzke L, Meadows H, Tufaro F. Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans. *J Virol.* 1993;67(1):93-100.
165. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol.* 2000;10(5):305-19. Epub 2000/10/04.
166. Navaratnarajah CK, Miest TS, Carfi A, Cattaneo R. Targeted Entry of Enveloped Viruses: Measles and Herpes Simplex Virus I. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):43-9.
167. Walker EB, Pritchard SM, Cunha CW, Aguilar HC, Nicola AV. Polyethylene glycol-mediated fusion of herpes simplex type 1 virions with the plasma membrane of cells that support endocytic entry. *Virol J.* 2015;12:190.
168. Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science.* 2006;313(5784):217-20. Epub 2006/07/15.
169. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009;276(24):7228-36. Epub 2009/11/03.
170. Morrison EE, Wang Y-F, Meredith DM. Phosphorylation of Structural Components Promotes Dissociation of the Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument. *J Virol.* 1998;72(9):7108-14.
171. Maurer UE, Sodeik B, Grunewald K. Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10559-64. Epub 2008/07/26.
172. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol.* 2009;83(4):1660-8. Epub 2008/12/17.
173. Murphy MA, Bucks MA, O'Regan KJ, Courtney RJ. The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids. *Virology.* 2008;376(2):279-89. Epub 2008/05/03.
174. Benetti L, Munger J, Roizman B. The herpes simplex virus 1 US3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol.* 2003;77(11):6567-73.

175. Benetti L, Roizman B. In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3. *J Virol.* 2007;81(19):10242-8. Epub 2007/07/20.
176. Poon AP, Benetti L, Roizman B. U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *J Virol.* 2006;80(8):3752-64. Epub 2006/03/31.
177. Antinone S, Shubeita G, Coller K, Lee J, Haverlock-Moyns S, Gross S, et al. The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol.* 2006;80:5494 - 8.
178. Radtke K, Kieneke D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, Scholz T, 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):e1000991. Epub 2010/07/16.
179. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4922-31.
180. Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B. The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol.* 2000;74(3):1355-63.
181. Döhner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell.* 2002;13(8):2795-809.
182. Lyman MG, Enquist LW. Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *J Virol.* 2009;83(5):2058-66. Epub 2008/10/10.
183. Zhong M, Zheng K, Chen M, Xiang Y, Jin F, Ma K, et al. Heat-shock protein 90 promotes nuclear transport of herpes simplex virus 1 capsid protein by interacting with acetylated tubulin. *PLoS One.* 2014;9(6):e99425.
184. Batterson W, Furlong D, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol.* 1983;45(1):397-407.
185. Abaitua F, O'Hare P. Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. *J Virol.* 2008;82(11):5234-44. Epub 2008/04/04.

186. Collier KE, Lee JI, Ueda A, Smith GA. The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J Virol.* 2007;81(21):11790-7. Epub 2007/08/24.
187. Klupp BG, Fuchs W, Granzow H, Nixdorf R, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol.* 2002;76(6):3065-71.
188. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002;76(4):1537-47.
189. Padeloup D, Blondel D, Isidro AL, Rixon FJ. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol.* 2009;83(13):6610-23. Epub 2009/04/24.
190. Newcomb WW, Booy FP, Brown JC. Uncoating the herpes simplex virus genome. *J Mol Biol.* 2007;370(4):633-42. Epub 2007/06/02.
191. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol.* 2008;82(7):3311-9. Epub 2008/01/25.
192. Shu M, Taddeo B, Roizman B. The nuclear-cytoplasmic shuttling of virion host shutoff RNase is enabled by pUL47 and an embedded nuclear export signal and defines the sites of degradation of AU-rich and stable cellular mRNAs. *J Virol.* 2013;87(24):13569-78.
193. Whither RNAi? *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):489-90. Epub 2003/05/31.
194. Costanzo F, Campadelli-Fiume G, Foa-Tomasi L, Cassai E. Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol.* 1977;21(3):996-1001.
195. Weir JP. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene.* 2001;271(2):117-30. Epub 2001/06/22.
196. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.* 1974;14(1):8-19. Epub 1974/07/01.
197. Weinheimer SP, McKnight SL. Transcriptional and post-transcriptional controls establish the cascade of herpes simplex virus protein synthesis. *J Mol Biol.* 1987;195(4):819-33. Epub 1987/06/20.
198. Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. 2^e éd. Fields BN, Knipe DM, rédacteurs. New York: Raven Press; 1990.

199. Wysocka J, Herr W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(6):294-304. Epub 2003/06/27.
200. Gu H. Infected cell protein 0 functional domains and their coordination in herpes simplex virus replication. *World Journal of Virology.* 2016;5(1):1-13.
201. Wagner EK, Bloom DC. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):419-43.
202. York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell.* 1994;77(4):525-35. Epub 1994/05/20.
203. Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature.* 1995;375(6530):411-5.
204. Fruh K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R, et al. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature.* 1995;375(6530):415-8. Epub 1995/06/01.
205. Gu H, Liang Y, Mandel G, Roizman B. Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(21):7571-6. Epub 2005/05/18.
206. Hardy WR, Sandri-Goldin RM. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol.* 1994;68(12):7790-9.
207. Orlando JS, Balliet JW, Kushnir AS, Astor TL, Kosz-Vnenchak M, Rice SA, et al. ICP22 is required for wild-type composition and infectivity of herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol.* 2006;80(19):9381-90. Epub 2006/09/16.
208. Lilley CE, Chaurushiya MS, Boutell C, Everett RD, Weitzman MD. The Intrinsic Antiviral Defense to Incoming HSV-1 Genomes Includes Specific DNA Repair Proteins and Is Counteracted by the Viral Protein ICP0. *PLoS Path.* 2011;7(6):e1002084.
209. Conley AJ, Knipe DM, Jones PC, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J Virol.* 1981;37(1):191-206.

210. Weller SK, Spadaro A, Schaffer JE, Murray AW, Maxam AM, Schaffer PA. Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 1985;5(5):930-42. Epub 1985/05/01.
211. Parris DS, Cross A, Haarr L, Orr A, Frame MC, Murphy M, et al. Identification of the gene encoding the 65-kilodalton DNA-binding protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 1988;62(3):818-25.
212. Schaffer PA, Aron GM, Biswal N, Benyesh-Melnick M. Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus type 1: isolation, complementation and partial characterization. *Virology.* 1973;52(1):57-71. Epub 1973/03/01.
213. Garfinkle B, McAuslan BR. Regulation of herpes simplex virus-induced thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;58(3):822-9.
214. Weller SK, Coen DM. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a013011. Epub 2012/09/07.
215. Fields B, Knipe D, Howley P. *Fields virology* 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. 2013:1662-704.
216. Spear PG, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J Virol.* 1972;9(1):143-59.
217. Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J Virol.* 1974;14(3):640-51.
218. Costa RH, Devi BG, Anderson KP, Gaylord BH, Wagner EK. Characterization of a major late herpes simplex virus type 1 mRNA. *J Virol.* 1981;38(2):483-96.
219. Jones PC, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol.* 1979;31(2):299-314.
220. Ishov AM, Maul GG. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol.* 1996;134(4):815-26.
221. Uprichard SL, Knipe DM. Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. *J Virol.* 1996;70(3):1969-80. Epub 1996/03/01.

222. Quinlan MP, Chen LB, Knipe DM. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell*. 1984;36(4):857-68. Epub 1984/04/01.
223. Jacobs A, Breakefield XO, Fraefel C. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part I. HSV-1 structure, replication and pathogenesis. *Neoplasia*. 1999;1(5):387-401. Epub 2000/08/10.
224. Muylaert I, Tang KW, Elias P. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem*. 2011;286(18):15619-24. Epub 2011/03/03.
225. Jacob RJ, Morse LS, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J Virol*. 1979;29(2):448-57.
226. Challberg MD. A method for identifying the viral genes required for herpesvirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(23):9094-8.
227. Wu CA, Nelson NJ, McGeoch DJ, Challberg MD. Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *J Virol*. 1988;62(2):435-43.
228. Bermek O, Willcox S, Griffith JD. DNA replication catalyzed by herpes simplex virus type 1 proteins reveals trombone loops at the fork. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2539-45.
229. Ebert SN, Shtrom SS, Muller MT. Topoisomerase II cleavage of herpes simplex virus type 1 DNA in vivo is replication dependent. *J Virol*. 1990;64(9):4059-66.
230. Muylaert I, Elias P. Knockdown of DNA ligase IV/XRCC4 by RNA interference inhibits herpes simplex virus type I DNA replication. *J Biol Chem*. 2007;282(15):10865-72.
231. Wilkinson DE, Weller SK. Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *J Virol*. 2004;78(9):4783-96.
232. Burch AD, Weller SK. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase requires the mammalian chaperone hsp90 for proper localization to the nucleus. *J Virol*. 2005;79(16):10740-9.
233. Crute JJ, Tsurumi T, Zhu LA, Weller SK, Olivo PD, Challberg MD, et al. Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(7):2186-9.

234. Gottlieb J, Marcy AI, Coen DM, Challberg MD. The herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: a subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity. *J Virol.* 1990;64(12):5976-87. Epub 1990/12/01.
235. Skaliter R, Lehman IR. Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10665-9.
236. Lee K, Kolb AW, Sverchkov Y, Cuellar JA, Craven M, Brandt CR. Recombination Analysis of Herpes Simplex Virus 1 Reveals a Bias toward GC Content and the Inverted Repeat Regions. *J Virol.* 2015;89(14):7214-23.
237. Rixon FJ, Addison C, McGregor A, Macnab SJ, Nicholson P, Preston VG, et al. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 9):2251-60.
238. Nicholson P, Addison C, Cross AM, Kennard J, Preston VG, Rixon FJ. Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 5):1091-9.
239. Desai P, Person S. Molecular interactions between the HSV-1 capsid proteins as measured by the yeast two-hybrid system. *Virology.* 1996;220(2):516-21.
240. Nicholson P, Addison C, Cross AM, Kennard J, Preston VG, Rixon FJ. Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *J Gen Virol.* 1994;75(Pt 5):1091-9.
241. Rixon FJ, Addison C, McGregor A, Macnab SJ, Nicholson P, Preston VG, et al. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol.* 1996;77(Pt 9):2251-60.
242. Newcomb W, Trus B, Booy F, Steven A, Wall J, Brown J. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol.* 1993;232:499 - 511.
243. Conway JF, Homa F. Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of herpes simplex virus. Dans: Weller SK, rédacteur. *Alphaherpesviruses: Molecular virology.* Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2011. p. 175-93.
244. Jin F, Li S, Zheng K, Zhuo C, Ma K, Chen M, et al. Silencing herpes simplex virus type 1 capsid protein encoding genes by siRNA: a promising antiviral therapeutic approach. *PLoS One.* 2014;9(5):e96623.

245. Weller SK. Alphaherpesviruses: molecular virology: Horizon Scientific Press; 2011.
246. Roos WH, Radtke K, Kniesmeijer E, Geertsema H, Sodeik B, Wuite GJ. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9673-8. Epub 2009/06/03.
247. Homa FL, Huffman JB, Toropova K, Lopez HR, Makhov AM, Conway JF. Structure of the pseudorabies virus capsid: comparison with herpes simplex virus type 1 and differential binding of essential minor proteins. *J Mol Biol*. 2013;425(18):3415-28.
248. Gibson W, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol*. 1972;10(5):1044-52. Epub 1972/11/01.
249. Perdue ML, Cohen JC, Randall CC, O'Callaghan DJ. Biochemical studies of the maturation of herpesvirus nucleocapsid species. *Virology*. 1976;74(1):194-208. Epub 1976/10/01.
250. Davison MD, Rixon FJ, Davison AJ. Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1992;73(Pt 10):2709-13.
251. Rixon FJ, Cross AM, Addison C, Preston VG. The products of herpes simplex virus type 1 gene UL26 which are involved in DNA packaging are strongly associated with empty but not with full capsids. *J Gen Virol*. 1988;69(Pt 11):2879-91.
252. Newcomb WW, Brown JC. Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *J Virol*. 1991;65(2):613-20. Epub 1991/02/01.
253. Klupp BG, Granzow H, Keil GM, Mettenleiter TC. The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol*. 2006;80(13):6235-46. Epub 2006/06/16.
254. Trus BL, Booy FP, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL, Thomsen DR, 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):447-62. Epub 1996/11/01.
255. Yang K, Baines JD. Proline and tyrosine residues in scaffold proteins of herpes simplex virus 1 critical to the interaction with portal protein and its incorporation into capsids. *J Virol*. 2009;83(16):8076-81.

256. Yang K, Wills E, Baines JD. The putative leucine zipper of the UL6-encoded portal protein of herpes simplex virus 1 is necessary for interaction with pUL15 and pUL28 and their association with capsids. *J Virol.* 2009;83(9):4557-64.
257. Beard PM, Taus NS, Baines JD. DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells. *J Virol.* 2002;76(10):4785-91.
258. Yang K, Baines JD. The putative terminase subunit of herpes simplex virus 1 encoded by UL28 is necessary and sufficient to mediate interaction between pUL15 and pUL33. *J Virol.* 2006;80(12):5733-9.
259. Chang YE, Poon AP, Roizman B. Properties of the protein encoded by the UL32 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J Virol.* 1996;70(6):3938-46.
260. Johnson DC, Spear PG. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol.* 1982;43(3):1102-12.
261. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res.* 1998;51:237-347. Epub 1999/01/19.
262. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* 2001;75(8):3675-84.
263. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol.* 2002;76(17):8939-52.
264. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N, Mettenleiter TC. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol.* 2002;76(1):364-78.
265. Mettenleiter TC, Minson T. Egress of alphaherpesviruses. *J Virol.* 2006;80(3):1610-1; author reply 1-2. Epub 2006/01/18.
266. Leuzinger H, Ziegler U, Schraner E, Fraefel C, Glauser D, Heid I, et al. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol.* 2005;79:13047 - 59.
267. Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, et al. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol.* 2005;79(2):1071-83.

268. Wild P, Senn C, Manera CL, Sutter E, Schraner EM, Tobler K, et al. Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy. *J Virol.* 2009;83(1):408-19. Epub 2008/10/17.
269. Hofemeister H, O'Hare P. Nuclear pore composition and gating in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol.* 2008;82(17):8392-9. Epub 2008/06/20.
270. Naldinho-Souto R, Browne H, Minson T. Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions. *J Virol.* 2006;80(5):2582-4. Epub 2006/02/14.
271. Leach NR, Roller RJ. Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology.* 2010;406(1):127-37. Epub 2010/08/03.
272. Mou F, Forest T, Baines JD. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol.* 2007;81(12):6459-70.
273. Park R, Baines JD. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol.* 2006;80(1):494-504.
274. Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science.* 2002;297(5582):854-7.
275. Baines JD, Roizman B. The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *J Virol.* 1992;66(8):5168-74.
276. Padula ME, Sydnor ML, Wilson DW. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol.* 2009;83(10):4757-65. Epub 2009/03/13.
277. Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J, Roizman B. Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J Virol.* 2007;81(2):800-12.
278. Farnsworth A, Wisner TW, Johnson DC. Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J Virol.* 2007;81(1):319-31. Epub 2006/10/13.

279. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, 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):10187-92. Epub 2007/06/06.
280. Jensen HL, Norrild B. Herpes simplex virus type 1-infected human embryonic lung cells studied by optimized immunogold cryosection electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(4):487-96.
281. Torrisi MR, Di Lazzaro C, Pavan A, Pereira L, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J Virol*. 1992;66(1):554-61.
282. Zhang J, Nagel CH, Sodeik B, Lippé R. Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes. *J Virol*. 2009;83(24):12984-97. Epub 2009/10/09.
283. Skepper JN, Whiteley A, Browne H, Minson A. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol*. 2001;75(12):5697-702.
284. Mettenleiter TC, Muller F, Granzow H, Klupp BG. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cell Microbiol*. 2013;15(2):170-8. Epub 2012/10/13.
285. Granzow H, Klupp B, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter T. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol*. 2001;75:3675 - 84.
286. Mettenleiter T. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol*. 2002;76:1537 - 47.
287. Henaff D, Remillard-Labrosse G, Loret S, Lippé R. Analysis of the early steps of herpes simplex virus 1 capsid tegumentation. *J Virol*. 2013;87(9):4895-906.
288. McLauchlan J, Rixon FJ. Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol*. 1992;73(Pt 2):269-76.
289. Rixon FJ, Addison C, McLauchlan J. Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Gen Virol*. 1992;73(Pt 2):277-84.
290. Szilagyi JF, Cunningham C. Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J Gen Virol*. 1991;72(Pt 3):661-8.

291. Mettenleiter T. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004;106:167-80.
292. Mijatov B, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. *Virology.* 2007;368(1):26-31. Epub 2007/07/27.
293. Klupp BG, Granzow H, Mundt E, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus ul37 gene product is involved in secondary envelopment. *J Virol.* 2001;75(19):8927-36.
294. Desai PJ. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol.* 2000;74(24):11608-18.
295. Desai P, Sexton GL, McCaffery JM, Person S. A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *J Virol.* 2001;75(21):10259-71.
296. Zhou ZH, Chen DH, Jakana J, Rixon FJ, Chiu W. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol.* 1999;73(4):3210-8.
297. Leege T, Granzow H, Fuchs W, Klupp BG, Mettenleiter TC. Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 7):1560-8. Epub 2009/03/20.
298. Zhang Y, McKnight JL. Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J Virol.* 1993;67(3):1482-92. Epub 1993/03/01.
299. Zhu Q, Courtney RJ. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 1994;204(2):590-9.
300. Luxton GW, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Schober JM, Smith GA. The Pseudorabies Virus VP1/2 Tegument Protein Is Required for Intracellular Capsid Transport. *J Virol.* 2006;80(1):201-9.
301. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Diefenbach E, Holland DJ, Boadle RA, Armati PJ, et al. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol.* 2002;76(7):3282-91. Epub 2002/03/09.
302. Smith GA, Enquist LW. Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:135-61. Epub 2002/07/27.

303. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):423-9. Epub 2006/07/04.
304. Sandbaumhuter M, Dohner K, Schipke J, Binz A, Pohlmann A, Sodeik B, et al. Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. *Cell Microbiol.* 2013;15(2):248-69. Epub 2012/11/29.
305. Favoreel HW. The why's of Y-based motifs in alphaherpesvirus envelope proteins. *Virus Res.* 2006;117(2):202-8. Epub 2006/01/19.
306. Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T, Browne HM. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 12):3517-27.
307. Foster TP, Melancon JM, Olivier TL, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. *J Virol.* 2004;78(23):13262-77.
308. Alconada A, Bauer U, Sodeik B, Hoflack B. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol.* 1999;73(1):377-87.
309. Fan Z, Grantham ML, Smith MS, Anderson ES, Cardelli JA, Muggeridge MI. Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J Virol.* 2002;76(18):9271-83.
310. Beitia Ortiz de Zarate I, Cantero-Aguilar L, Longo M, Berlioz-Torrent C, Rozenberg F. Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *J Virol.* 2007;81(24):13889-903.
311. Wisner TW, Johnson DC. Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol.* 2004;78(21):11519-35. Epub 2004/10/14.
312. Lee HC, Chouljenko VN, Chouljenko DV, Boudreaux MJ, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD) cytoplasmic terminus and full-length gE are not essential and do not function in a redundant manner for cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol.* 2009;83(12):6115-24. Epub 2009/04/10.
313. Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG, Mettenleiter TC. Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2009;83(2):896-907. Epub 2008/11/14.

314. Brack AR, Dijkstra JM, Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol.* 1999;73(7):5364-72.
315. Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC. The Pseudorabies Virus US3 Protein Is a Component of Primary and of Mature Virions. *J Virol.* 2004;78(3):1314-23.
316. Baghian A, Jaynes J, Enright F, Kousoulas KG. An amphipathic alpha-helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits herpes simplex virus-1 (HSV-1)-induced cell fusion and virus spread. *Peptides.* 1997;18(2):177-83.
317. Foster TP, Melancon JM, Baines JD, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J Virol.* 2004;78(10):5347-57.
318. Maringer K, Stylianou J, Elliott G. A network of protein interactions around the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J Virol.* 2012;86(23):12971-82. Epub 2012/09/21.
319. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, et al. Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J Virol.* 2002;76(16):8208-17.
320. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Chouljenko DV, Kousoulas KG. The amino terminus of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK) modulates gB-mediated virus-induced cell fusion and virion egress. *J Virol.* 2009;83(23):12301-13. Epub 2009/10/02.
321. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Kim J, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. *J Virol.* 2010;84(17):8596-606. Epub 2010/06/25.
322. Kim IJ, Chouljenko VN, Walker JD, Kousoulas KG. Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry. *J Virol.* 2013;87(14):8029-37. Epub 2013/05/17.
323. Yeh PC, Han J, Chadha P, Meckes DG, Jr., Ward MD, Semmes OJ, et al. Direct and Specific Binding of the UL16 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus to the Cytoplasmic Tail of Glycoprotein E. *J Virol.* 2011;85(18):9425-36. Epub 2011/07/08.
324. Han J, Chadha P, Meckes DG, Jr., Baird NL, Wills JW. Interaction and Interdependent Packaging of Tegument Protein UL11 and Glycoprotein E of Herpes Simplex Virus. *J Virol.* 2011;85(18):9437-46. Epub 2011/07/08.

325. Chouljenko DV, Kim IJ, Chouljenko VN, Subramanian R, Walker JD, Kousoulas KG. Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol.* 2012;86(8):4262-70. Epub 2012/02/10.
326. Rémillard-Labrosse G, Lippé R. Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN. *Commun Integr Biol.* 2009;2(5):434-6. Epub 2009/11/13.
327. Zenner HL, Yoshimura S, Barr FA, Crump CM. Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. *J Virol.* 2011;85(16):8012-21. Epub 2011/06/18.
328. Hollinshead M, Johns HL, Sayers CL, Gonzalez-Lopez C, Smith GL, Elliott G. Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *EMBO J.* 2012;31(21):4204-20.
329. Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe.* 2013;14(3):232-41.
330. Calistri A, Munegato D, Toffoletto M, Celestino M, Franchin E, Comin A, et al. Functional Interaction Between the ESCRT-I Component TSG101 and the HSV-1 Tegument Ubiquitin Specific Protease. *J Cell Physiol.* 2015;230(8):1794-806.
331. Owen DJ, Crump CM, Graham SC. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses.* 2015;7(9):5084-114. Epub 2015/09/24.
332. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Aggarwal A, Tijono B, Rixon FJ, Diefenbach RJ, et al. Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons. *J Virol.* 2009;83(7):3187-99. Epub 2009/01/30.
333. Hogue IB, Bosse JB, Hu JR, Thiberge SY, Enquist LW. Cellular mechanisms of alpha herpesvirus egress: live cell fluorescence microscopy of pseudorabies virus exocytosis. *PLoS Pathog.* 2014;10(12):e1004535.
334. Johns HL, Gonzalez-Lopez C, Sayers CL, Hollinshead M, Elliott G. Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment. *Traffic.* 2014;15(2):157-78.
335. Rémillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G, Lippé R. Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic.* 2009;10(8):1074-83. Epub 2009/06/25.

336. Roberts KL, Baines JD. Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol.* 2010;84(19):9889-96.
337. Forrester A, Farrell H, Wilkinson G, Kaye J, Davis-Poynter N, Minson T. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol.* 1992;66(1):341-8.
338. Ligas MW, Johnson DC. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol.* 1988;62(5):1486-94. Epub 1988/05/01.
339. Roop C, Hutchinson L, Johnson DC. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J Virol.* 1993;67(4):2285-97. Epub 1993/04/01.
340. Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Lopez M, Campadelli-Fiume G. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HIgr) and nectin2 (PRR2/HveB). *J Virol.* 2000;74(8):3909-17.
341. Johnson DC, Webb M, Wisner TW, Brunetti C. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol.* 2001;75(2):821-33. Epub 2001/01/03.
342. Saldanha CE, Lubinski J, Martin C, Nagashunmugam T, Wang L, van Der Keyl H, et al. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E domains involved in virus spread and disease. *J Virol.* 2000;74(15):6712-9. Epub 2000/07/11.
343. Polcicova K, Goldsmith K, Rainish BL, Wisner TW, Johnson DC. The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors. *J Virol.* 2005;79(18):11990-2001. Epub 2005/09/06.
344. Aranda AM, Epstein AL. [Herpes simplex virus type 1 latency and reactivation: an update]. *Med Sci (Paris).* 2015;31(5):506-14. Epub 2015/06/11. Latence et reactivation du virus de l'herpes simplex de type 1 (HSV-1) - Une mise a jour.
345. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 2001;357(9267):1513-8. Epub 2001/05/30.
346. Rock DL, Fraser NW. Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region. *J Virol.* 1985;55(3):849-52. Epub 1985/09/01.

347. Deshmane SL, Fraser NW. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol.* 1989;63(2):943-7. Epub 1989/02/01.
348. Rock DL, Fraser NW. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature.* 1983;302(5908):523-5. Epub 1983/04/07.
349. Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 1):1-19.
350. Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM, Knipe DM. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):16055-9. Epub 2005/10/26.
351. Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science.* 1987;235(4792):1056-9. Epub 1987/02/27.
352. Zabolotny JM, Krummenacher C, Fraser NW. The herpes simplex virus type 1 2.0-kilobase latency-associated transcript is a stable intron which branches at a guanosine. *J Virol.* 1997;71(6):4199-208.
353. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454(7205):780-3.
354. Bloom DC. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol.* 2004;23(1-2):187-98.
355. Ahmed M, Lock M, Miller CG, Fraser NW. Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J Virol.* 2002;76(2):717-29. Epub 2001/12/26.
356. Thompson RL, Sawtell NM. HSV latency-associated transcript and neuronal apoptosis. *Science.* 2000;289(5485):1651. Epub 2000/09/23.
357. Chentoufi AA, Kritzer E, Tran MV, Dasgupta G, Lim CH, Yu DC, et al. The herpes simplex virus 1 latency-associated transcript promotes functional exhaustion of virus-specific CD8+ T cells in latently infected trigeminal ganglia: a novel immune evasion mechanism. *J Virol.* 2011;85(17):9127-38.

358. Cliffe AR, Garber DA, Knipe DM. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *J Virol.* 2009;83(16):8182-90.
359. Tang S, Bertke AS, Patel A, Wang K, Cohen JI, Krause PR. An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(31):10931-6. Epub 2008/08/06.
360. Thompson RL, Sawtell NM. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol.* 1997;71(7):5432-40.
361. Segal AL, Katcher AH, Brightman VJ, Miller MF. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *J Dent Res.* 1974;53(4):797-803. Epub 1974/07/01.
362. Kosz-Vnenchak M, Jacobson J, Coen DM, Knipe DM. Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons. *J Virol.* 1993;67(9):5383-93. Epub 1993/09/01.
363. Antinone SE, Smith GA. Two modes of herpesvirus trafficking in neurons: membrane acquisition directs motion. *J Virol.* 2006;80(22):11235-40. Epub 2006/09/15.
364. Wilcox CL, Smith RL, Freed CR, Johnson EM, Jr. Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro. *J Neurosci.* 1990;10(4):1268-75.
365. Hunsperger EA, Wilcox CL. Capsaicin-induced reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in sensory neurons in culture. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 5):1071-8.
366. Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJ. Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol.* 1996;70(8):5051-60.
367. Roizman B. The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: the role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *J Virol.* 2011;85(15):7474-82. Epub 2011/04/01.
368. de Bruyn Kops A, Knipe DM. Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein. *Cell.* 1988;55(5):857-68. Epub 1988/12/02.
369. Kristie TM, Vogel JL, Sears AE. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1229-33. Epub 1999/02/17.

370. Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM. De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. *PLoS Pathog.* 2009;5(3):e1000352. Epub 2009/03/28.
371. Baines JD, Roizman B. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J Virol.* 1993;67(3):1441-52.
372. Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol.* 1989;63(9):3792-800. Epub 1989/09/01.
373. Dijkstra JM, Visser N, Mettenleiter TC, Klupp BG. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J Virol.* 1996;70(8):5684-8.
374. Baradaran K, Dabrowski CE, Schaffer PA. Transcriptional analysis of the region of the herpes simplex virus type 1 genome containing the UL8, UL9, and UL10 genes and identification of a novel delayed-early gene product, OBPC. *J Virol.* 1994;68(7):4251-61. Epub 1994/07/01.
375. MacLean CA, Efstathiou S, Elliott ML, Jamieson FE, McGeoch DJ. Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins. *J Gen Virol.* 1991;72(Pt 4):897-906.
376. Stingley SW, Ramirez JJ, Aguilar SA, Simmen K, Sandri-Goldin RM, Ghazal P, et al. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J Virol.* 2000;74(21):9916-27.
377. Roizman B, Whitley RJ, Lopez C. *The Human herpesviruses.* Bernard Roizman RJW, Carlos Lopez, rédacteur. New York: Raven Press; 1993.
378. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 1998;14(4):378-9. Epub 1998/06/20.
379. Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Braun B, Kaaden OR, Baines JD. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J Virol.* 1996;70(6):4110-5.
380. Sadaoka T, Yanagi T, Yamanishi K, Mori Y. Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M. *J Virol.* 2010;84(7):3488-502.

381. Ziegler C, Just FT, Lischewski A, Elbers K, Neubauer A. A glycoprotein M-deleted equid herpesvirus 4 is severely impaired in virus egress and cell-to-cell spread. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 1):11-21.
382. König P, Giesow K, Keil GM. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Vet Microbiol.* 2002;86(1-2):37-49. Epub 2002/03/13.
383. Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M, Osterrieder N. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 5):997-1003.
384. Hobom U, Brune W, Messerle M, Hahn G, Koszinowski UH. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol.* 2000;74(17):7720-9.
385. Lake CM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection. *J Virol.* 2000;74(23):11162-72. Epub 2000/11/09.
386. Kawabata A, Jasirwan C, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation. *Virology.* 2012;429(1):21-8.
387. May JS, Colaco S, Stevenson PG. Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68. *J Virol.* 2005;79(6):3459-67.
388. MacLean CA, Robertson LM, Jamieson FE. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 6):975-83. Epub 1993/06/01.
389. Lau SY, Crump CM. HSV-1 gM and the gK/pUL20 complex are important for the localization of gD and gH/L to viral assembly sites. *Viruses.* 2015;7(3):915-38.
390. Striebinger H, Zhang J, Ott M, Funk C, Radtke K, Duron J, et al. Subcellular trafficking and functional importance of herpes simplex virus type 1 glycoprotein M domains. *J Gen Virol.* 2015;96(11):3313-25.
391. Klupp BG, Nixdorf R, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J Virol.* 2000;74(15):6760-8.

392. Seyboldt C, Granzow H, Osterrieder N. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein M: effect of deletions of transmembrane domains. *Virology*. 2000;278(2):477-89. Epub 2000/12/19.
393. Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp B, Mettenleiter TC. Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol*. 2004;78(6):3024-34. Epub 2004/03/03.
394. Striebinger H, Funk C, Raschbichler V, Bailer SM. Subcellular Trafficking and Functional Relationship of the HSV-1 Glycoproteins N and M. *Viruses*. 2016;8(3):83.
395. Turner A, Bruun B, Minson T, Browne H. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol*. 1998;72(1):873-5.
396. Koyano S, Mar EC, Stamey FR, Inoue N. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 6):1485-91.
397. Lake CM, Molesworth SJ, Hutt-Fletcher LM. The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J Virol*. 1998;72(7):5559-64. Epub 1998/06/17.
398. Lipinska AD, Koppers-Lalic D, Rychlowski M, Admiraal P, Rijsewijk FA, Bienkowska-Szewczyk K, et al. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol*. 2006;80(12):5822-32. Epub 2006/05/30.
399. Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol*. 2000;74(24):11881-92.
400. Rudolph J, Seyboldt C, Granzow H, Osterrieder N. The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J Virol*. 2002;76(6):2952-63. Epub 2002/02/28.
401. Wu SX, Zhu XP, Letchworth GJ. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J Virol*. 1998;72(4):3029-36. Epub 1998/04/03.
402. Fuchs W, Mettenleiter TC. The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res*. 2005;112(1-2):108-14. Epub 2005/07/19.

403. Jons A, Dijkstra JM, Mettenleiter TC. Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol.* 1998;72(1):550-7.
404. Mach M, Kropff B, Krzyzaniak M, Britt W. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J Virol.* 2005;79(4):2160-70. Epub 2005/02/01.
405. Krzyzaniak MA, Mach M, Britt WJ. HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. *Traffic.* 2009;10(10):1439-57. Epub 2009/09/19.
406. Barker DE, Roizman B. The unique sequence of the herpes simplex virus 1 L component contains an additional translated open reading frame designated UL49.5. *J Virol.* 1992;66(1):562-6.
407. Barnett BC, Dolan A, Telford EA, Davison AJ, McGeoch DJ. A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. *J Gen Virol.* 1992;73(Pt 8):2167-71.
408. Ross J, Williams M, Cohen JI. Disruption of the varicella-zoster virus dUTPase and the adjacent ORF9A gene results in impaired growth and reduced syncytia formation in vitro. *Virology.* 1997;234(2):186-95.
409. Mach M, Osinski K, Kropff B, Schloetzer-Schrehardt U, Krzyzaniak M, Britt W. The carboxy-terminal domain of glycoprotein N of human cytomegalovirus is required for virion morphogenesis. *J Virol.* 2007;81(10):5212-24. Epub 2007/01/19.
410. Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res.* 2000;31(1):99-115.
411. Kawabata A, Serada S, Naka T, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 12):2769-77.
412. Wills E, Mou F, Baines JD. The U(L)31 and U(L)34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells. *J Virol.* 2009;83(10):4800-9.
413. Fossum E, Friedel CC, Rajagopala SV, Titz B, Baiker A, Schmidt T, et al. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000570. Epub 2009/09/05.
414. Rozen R, Sathish N, Li Y, Yuan Y. Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.* 2008;82(10):4742-50. Epub 2008/03/07.

415. Rudolph J, Osterrieder N. Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology*. 2002;293(2):356-67.
416. Liang X, Chow B, Raggo C, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol*. 1996;70(3):1448-54. Epub 1996/03/01.
417. Ren Y, Bell S, Zenner HL, Lau SY, Crump CM. Glycoprotein M is important for the efficient incorporation of glycoprotein H-L into herpes simplex virus type 1 particles. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 2):319-29.
418. Idevall-Hagren O, Lu A, Xie B, De Camilli P. Triggered Ca²⁺ influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering. *EMBO J*. 2015;34(17):2291-305. Epub 2015/07/24.
419. Idevall-Hagren O, Lü A, Xie B, De Camilli P. Triggered Ca(2+) influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering. *The EMBO Journal*. 2015;34(17):2291-305.
420. Wang Z, Chapman ER. Rat and Drosophila synaptotagmin 4 have opposite effects during SNARE-catalyzed membrane fusion. *J Biol Chem*. 2010;285(40):30759-66. Epub 2010/08/07.
421. Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, et al. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science*. 2001;294(5544):1111-5.

Annexe

Annexe 1 : Liste des gènes et des protéines d'HSV-1

GÈNE	PROTÉINE	GÈNE	PROTÉINE
RL1	ICP34.5, facteur de neurovirulence, module la synthèse protéique par la liaison à la protéine	U_L34	PU _L 34 (NEMP), protéine membranaire de type II associée à la membrane nucléaire interne
RL2	ICP0, E3 ubiquitine ligase	U_L35	VP26, petite protéine de la capside, placé au sommet de chaque hexon de la capside
R_s1	ICP4, facteur de transcription viral majeur	U_L36	ICP1/2, VP1/2, large protéine du tégment
UL1	gL, glycoprotéine, forme un complexe avec gH, impliquée dans l'entrée et la propagation cellule en cellule.	U_L37	ICP32, LTPpb, protéine du tégment avec un signal d'export nucléaire, impliquée dans la sortie.
U_L2	Uracil-ADN-glycosylase, UDG	U_L38	VP19C, sous unité du triplex de la capside.
U_L3	pU _L 3, phosphoprotéine nucléaire	U_L39	ICP6, sous unité de la ribonucléase réductase.
U_L4	pU _L 4, protéine nucléaire, co-localise avec U _L 3 et ICP22.	U_L40	Sous unité de la ribonucléase réductase.
U_L5	ADN hélicase (HP1), sous-unité du complexe primase-hélicase	U_L41	Vhs, virion host shut off, impliquée dans la dégradation de l'ARN messenger.
U_L6	PORT, associée à la capside, sous-unité du complexe portal.	U_L42	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase
U_L7	EEP, associée à la capside intracellulaire	U_L43	NEMP, protéine associée à la membrane
U_L8	Sous-unité du complexe primase-hélicase.	U_L44	gC, glycoprotéine; initiation de la fixation.
U_L9	OriBP, protéine de liaison à l'origine de réplication.	U_L45	pU _L 45 protéine membranaire de type II.
U_L10	gM, glycoprotéine, régulateur de fusion, rôle dans l'enveloppement secondaire.	U_L46	VP11/12, interagit avec UL48 (VP16).
U_L11	CETP, Protéine du virion myristolée, impliquée dans la sortie.	U_L47	VP13/14, protéine du tégment qui déclenche l'expression des gènes IE (immédiats-précoces).
U_L12	NUC, Exonucléase alcaline, intervient dans l'empaquetage de l'ADN viral.	U_L48	VP16, ICP25, α -TIF, protéine du tégment, stimule l'expression des gènes IE (immédiats-précoces).

U_L12.5	pU _L 12.5, Activité exonucléase	U_L49	VP22, protéine du tégument, rôle dans le trafic intercellulaire.
U_L13	Protéine kinase sérine/thréonine	U_L49.5	gN, U _L 49A glycoprotéine, forme un complexe avec gM en stimulant la fusion membranaire.
U_L14	Sous-unité du complexe de la terminase	U_L50	dUTPase, désoxyuridine triphosphatase
U_L15	TER1, activité ADN-terminase	U_L51	CEF1, protéine du virion palmitoylée, associée au Golgi.
U_L16	CETPpb, protéine du tégument, impliquée dans l'empaquetage de l'ADN viral.	U_L52	Sous-unité du complexe primase-hélicase
U_L17	Protéine d'empaquetage de l'ADN.	U_L53	gK, glycoprotéine, impliquée dans la sortie du virus, plusieurs mutations syncytiales
U_L18	VP23, sous-unité du triplex de la capsid, forme un complexe avec VP19c.	U_L54	ICP27 (MRE), régulation post-transcriptionnelle de l'expression gènes.
U_L19	VP5, ICP5, protéine majeure de la capsid	U_L55	pU _L 55, protéine nucléaire, protéine de liaison à la matrice nucléaire
U_L20	pU _L 20, impliquée dans la sortie.	U_L56	pU _L 56, protéine membranaire de type II, associée au Golgi et aux endosomes primaires.
U_L21	CEF2, protéine du tégument associée aux microtubules	U_S1	ICP22, stimule l'expression des gènes tardifs.
U_L22	gH, glycoprotéine forme un complexe avec gL, impliquée dans l'entrée et la propagation cellule en cellule.	U_S2	pU _S 2, protéine du virion, interagit avec cytokératine.
U_L23	Thymidine kinase, TK	U_S3	Protéine kinase sérine/thréonine
U_L24	pU _L 24, protéine du virion, impliquée dans les modifications nucléaires durant l'infection et dans la sortie nucléaire de la capsid.	U_S4	gG glycoprotéine, protéine de l'enveloppe impliquée dans l'entrée et la sortie.
U_L25	Protéine d'empaquetage de l'ADN	U_S5	gJ glycoprotéine, protéine de l'enveloppe impliquée dans la protection de l'apoptose médiée par Fas.
U_L26	Protéine d'échafaudage VP21 et VP24 (protéase)	U_S6	gD glycoprotéine, rôle dans l'entrée, se lie au HVEM.
U_L26.5	VP22a, protéine d'échafaudage clivée de la capsid après l'encapsidation de l'ADN.	U_S7	gI glycoprotéine, forme un complexe avec gE, propagation cellule à cellule.

U_L27	gB, glycoprotéine, forme un dimère et essentielle pour l'entrée.	U_S8	gE, glycoprotéine, forme un complexe avec gI, propagation cellule à cellule.
U_L28	ICP18.5, sous unité du complexe de la terminase	U_S8.5	pU _S 8.5
U_L29	ICP8, protéine de liaison à l'ADN simple brin.	U_S9	pU _S 9, protéine membranaire de type II
U_L30	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase	U_S10	pU _S 10 Protéine du tégment associée à la capsid.
U_L31	pUL31, interagit avec UL34, protéine de liaison à la matrice nucléaire	U_S11	Protéine du tégment, de liaison à l'ARN
U_L32	Protéine de l'empaquetage de l'ADN	U_S12	ICP47, TAPpb, protéine de liaison à TAP, impliquée dans la régulation négative de (CMH-I)
U_L33	Sous-unité du complexe de la terminase		