

2m11.3289.7

Université de Montréal

# Détermination du site de ré-enveloppement des capsides de HSV-1

par

Sophie Turcotte

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

Mai 2005

© Sophie Turcotte, 2005



W  
4  
U58  
2005  
V.104

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Détermination du site de ré-enveloppement des  
capsides de HSV-1**

Présenté par :  
Sophie Turcotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Paiement  
président-rapporteur

Dr. Roger Lippé  
directeur de recherche

Dr. Ivan Robert Nabi  
membre du jury

Mémoire accepté le 16 mai 2005

*À Éric et Persil...*

## Résumé

La biogenèse ainsi que le transport intracellulaire du Virus de l'Herpès Simplex de type 1 (HSV-1) sont des événements complexes dont les détails moléculaires sont peu connus. Le modèle favorisé de la progression virale propose que les capsides nouvellement assemblées dans le noyau soient initialement enveloppées par un bourgeonnement à travers la membrane nucléaire interne. Il s'ensuit une relâche de capsides nues dans le cytoplasme via la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane nucléaire externe. Subséquemment, ces capsides nues subissent un ré-enveloppement final en bourgeonnant à travers la cavité d'un organite intracellulaire pour ensuite être relâchées dans l'espace extracellulaire. Toutefois, bien que le *TGN* soit fréquemment cité comme site potentiel de ré-enveloppement, la littérature propose également d'autres sites. Ce projet de maîtrise porte sur l'identification de ce compartiment, lequel joue un rôle déterminant dans le cycle viral. Pour ce faire, nous avons suivi la progression du HSV-1 par immunofluorescence. L'infection était menée selon des conditions permettant de ralentir le transport intracellulaire et promouvoir l'accumulation des capsides au site de ré-enveloppement. D'une part, nos résultats indiquent que les capsides transitent par le TGN, l'identifiant comme étant le site majeur de ré-enveloppement, bien qu'une contribution des endosomes précoces ne peut être complètement exclue. D'autre part, nous avons démontré que sept glycoprotéines virales différentes sont présentes au TGN et cela, indépendamment de la progression des capsides. Finalement, les données indiquent que les capsides se trouvent souvent adjacentes aux glycoprotéines au TGN. Nos travaux ont ainsi montré le rôle primordial du TGN en terme de site de ré-enveloppement.

**Mots-clés:** virus, HSV-1, transport, ré-enveloppement, TGN, glycoprotéines

## Summary

The biogenesis and intracellular trafficking of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) are complex and poorly understood events. The prevailing model for capsid egress proposes an initial envelopment at the inner nuclear membrane for capsids newly assembled in the nucleus. Then, a de-envelopment is followed by fusion between the viral envelope and the outer nuclear membrane to release naked capsids in the cytoplasm. Subsequently, naked capsids undergo a final re-envelopment by budding through the downstream organelle before travelling to the plasma membrane to be release extracellularly. Whereas the TGN is most often cited, the literature proposes different potential sites of re-envelopment, including early or late endosomes, tegosomes, aggresomes and the ERGIC compartment. The goal of this master's project is to identify this compartment, since the decisive role of re-envelopment compartment in virus life cycle. To clarify this important issue, we followed HSV-1 egress by immunofluorescence. The infection was done under conditions that should slow the intracellular movement and promote accumulation of capsids at the re-envelopment site. The results indicate that the capsids transit by the TGN and point to this compartment as the main re-envelopment site, although a contribution by early endosomes cannot formally be excluded. We also demonstrated that seven different viral glycoproteins are localized at the TGN. Moreover, this localization occurred independently of capsids egress. Surprisingly, capsids were often found immediately adjacent to the viral glycoproteins at the TGN. Our data imply the TGN as an important re-envelopment compartment for HSV-1 egress.

**Keywords :** virus, HSV-1, egress, re-envelopment, TGN, glycoproteins

# Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Summary</i>	<i>ii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>viii</i>
<i>Avant-propos</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xi</i>

## 1 Introduction

1.1 Historique général des virus	1
1.2 Le virus de l'Herpès Simplex de type 1	2
1.2.1 Classification et structure	2
1.2.2 Organisation du génome	4
1.2.3 Pathogénèse	5
1.2.3.1 Infectivité au niveau de la cellule	5
1.2.3.2 Infectivité au niveau de l'organisme	5
1.2.4 Latence	6
1.2.5 Antiviraux et résistance	7
1.2.6 HSV-1 et son cycle de vie	7
1.2.6.1 L'entrée	7
1.2.6.2 Expression des gènes viraux	9
1.2.6.3 Réplication de l'ADN viral	10
1.2.6.4 Assemblage et encapsidation	11
1.2.6.5 Bourgeoisement nucléaire	13
1.2.6.6 Progression intracellulaire (deux modèles)	14
1.2.6.6.1 Premier modèle : voie de transport classique de biosynthèse	14
1.2.6.6.2 Modulation de la voie de transport classique de biosynthèse	15
1.2.6.6.3 Preuves supportant le premier modèle	15



1.2.6.6.4 Deuxième modèle : voie de dé-enveloppement/ré-enveloppement _____	18
1.2.6.6.5 Preuves supportant le deuxième modèle _____	18
1.2.6.6.6 Site favorisé pour le ré-enveloppement des capsides intracellulaires _____	19
1.2.6.6.7 Sites alternatifs de ré-enveloppement _____	20
1.2.6.6.8 Acquisition des glycoprotéines virales _____	22
1.2.6.7 Sortie du virus _____	22

## 2 Objectifs de recherche et approche \_\_\_\_\_ 24

### 3 Article

3.1 <i>Introduction</i> _____	28
3.2 <i>Materials and methods</i> _____	31
3.3 <i>Results</i> _____	34
3.4 <i>Discussion</i> _____	57

### 4 Résultats complémentaires

4.1 Présence des capsides virales au TGN dans les cellules BHK _____	73
4.2 Présence d'une enveloppe sur les capsides bloquées à 20°C _____	75
4.3 Colocalisation des capsides avec un second marqueur du TGN, le NBD _____	77
4.4 Colocalisation des endosomes précoces et du TGN dans les cellules 143B _____	79
4.5 Localisation des capsides par rapport au Golgi _____	81
4.6 Localisation de la glycoprotéine gC avec ou sans progression des capsides _____	83
4.7 Colocalisation des capsides au TGN au microscope confocal _____	86
4.8 Quantification des capsides au site de ré-enveloppement _____	88
4.9 Colocalisation des capsides aux TGN/Endosomes précoces au microscope électronique _____	88

## 5 Discussion

5.1 Détermination du modèle d'étude _____	93
5.2 Inhibition du transport intracellulaire à 20°C dans les cellules 143B _____	94
5.3 Cinétique de la progression virale _____	94
5.4 Site de ré-enveloppement _____	96
5.4.1 Colocalisation avec divers marqueurs des organites cellulaires _____	96
5.4.2 Présence des capsides virales au TGN même si dispersé _____	98
5.5 Localisation des glycoprotéines virales à 20°C _____	98
5.6 Localisation des glycoprotéines virales et des capsides à 20°C _____	99
5.7 Transport indépendant des glycoprotéines virales et des capsides virales _____	101

<b>6 Conclusion</b> _____	<b>103</b>
---------------------------	------------

<b>Bibliographie</b> _____	<b>105</b>
----------------------------	------------

## Liste des figures

### ➤ Incluses dans le chapitre I : Introduction

**Figure I-1 :** Représentation schématique des Herpesviridae (p.3)

**Figure I-2 :** Représentation schématique de la réplication de l'ADN de HSV-1 (p.10)

**Figure I-3 :** Formation des compartiments de réplication (p.11)

**Figure I-4 :** Représentation schématique du premier modèle de la progression intracellulaire des capsides de HSV-1, calqué sur le modèle de la voie de transport classique de biosynthèse (p.17)

**Figure I-5 :** Représentation schématique du modèle favorisé de la progression intracellulaire des capsides de HSV-1, incluant les étapes du processus et les divers organites cellulaires impliqués (p.21)

### ➤ Incluses dans le chapitre III : Article

**Fig. 1:** *Choice of cell line* (p.39)

**Fig. 2:** *Transport of the control VSV Gts045 glycoprotein at different temperatures* (p.41)

**Fig. 3:** *Viral kinetics* (p.43)

**Fig. 4:** *Titration of extracellular virus on Vero cells* (p.45)

**Fig. 5:** *Colocalization of capsids with the TGN* (p.47)

**Fig. 6:** *Confirmation of the presence of capsids at the TGN by disruption of the TGN with nocodazole* (p.49)

**Fig. 7:** *Presence of viral glycoproteins at the TGN* (p.51)

**Fig. 8:** *Colocalization of viral glycoproteins with capsids and TGN* (p.53)

**Fig. 9:** *Transport of the viral glycoproteins to the TGN independent of capsid egress* (p.55)

➤ **Incluses dans le chapitre IV : Résultats complémentaires**

**Figure 10** : Présence des capsides au TGN dans les cellules BHK (p. 74)

**Figure 11** : Titration des virus intracellulaires (p. 76)

**Figure 12** : Colocalisation des capsides avec un second marqueur du TGN, le NBD (p. 78)

**Figure 13** : Colocalisation des endosomes précoces et du TGN dans les cellules 143B (p. 80)

**Figure 14** : Localisation des capsides par rapport au Golgi (p. 82)

**Figure 15** : Présence de la glycoprotéine virale gC au TGN à 20°C (p. 84)

**Figure 16** : Localisation de la glycoprotéine gC par rapport à la membrane plasmique et aux endosomes précoces (p. 84)

**Figure 17** : Transport de la glycoprotéine virale gC au TGN indépendamment de la progression des capsides virales (p. 85)

**Figure 18** : Confirmation de la présence des capsides au TGN par microscopie confocale (p. 87)

**Figure 19** : Marquage des endosomes précoces via l'internalisation de billes de latex en microscopie électronique (p. 91)

**Figure 20** : Capacité d'internalisation du dextran pour les cellules 143B mock ou infectées (p. 92)

## Liste des abréviations

❖ Incluses dans le mémoire (Chapitres I, II, IV et V)

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
BFA	Brefeldine A
<i>BHK</i>	<i>Baby Hamster Kidney</i>
<i>CHO</i>	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMV	Cytomégalovirus
EBV	Virus Epstein-Barr
<i>EEA1</i>	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
<i>ERGIC</i>	<i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<i>HCF</i>	<i>Host Cell Factor</i>
hpi	heure post-infection
<i>HRP</i>	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
<i>HVEM</i>	<i>HerpesVirus Entry Mediator</i>
<i>ICP</i>	<i>Infected Cell Protein</i>
IgG	Immunoglobuline G
<i>ITR</i>	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
KDa	KiloDalton
<i>LAT</i>	<i>Latency-Associated-Transcript</i>
LBPA	Acide Lysobisphosphatidique
<i>MTOC</i>	<i>Microtubule Organization Center</i>
<i>NBD</i>	<i>NitroBenzoxaDiazole</i>
Pra	Protéase A
Prv	Pseudorabies
RE	Réticulum Endoplasmique

<i>TGN</i>	<i>Trans-Golgi Network</i>
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
<i>U<sub>L</sub></i>	<i>Unique Long</i>
<i>U<sub>S</sub></i>	<i>Unique Short</i>
VHH	Virus Herpès Humain
<i>VHS</i>	<i>Viral Host Shut-off</i>
<i>VP</i>	<i>Virion Protein</i>
VSVG	Protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculaire
VZV	Virus Varcella-Zoster

❖ **Incluses dans l'article (Chapitre III)**

ATP	Adénosine Tri-Phosphate
<i>BSA</i>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BUDR	5-Bromo-2'deoxyuridine
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>EM</i>	<i>Electronic Microscopy</i>
<i>FBS</i>	<i>Fœtal Bovine Serum</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffer Sodium</i>
<i>RT</i>	<i>Room Temperature</i>
<i>tsProt.A</i>	<i>thermosensitive Protease A</i>

## Avant-propos

La plupart des résultats décrits dans ce mémoire ont été présentés lors des congrès suivants :

- Turcotte Sophie, Lippé Roger. Détermination du site de ré-enveloppement des capsides de HSV-1 via implication des protéines Rabs.-Affiche- 20<sup>ième</sup> journée scientifique du Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Montréal, Mai 2003. (Attribution du second prix catégorie affiche)
- Turcotte Sophie, Lippé Roger. Détermination du site de ré-enveloppement des capsides de HSV-1. -Présentation orale- 21<sup>ième</sup> journée scientifique du Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Montréal, Septembre 2004.
- Turcotte Sophie, Letellier Josée et Lippé Roger. Re-envelopment of HSV-1 capsids at the TGN. -Affiche- 29<sup>th</sup> *International Herpesvirus Workshop.* Reno Nevada, Juillet 2004

## Remerciements

Pendant les deux dernières années, j'ai côtoyé des gens qui ont fait de mon passage au département un moment fort agréable. Les lignes qui suivent ont pour but de leur rendre hommage.

Je tiens sincèrement à remercier Geneviève *La gourmande* Taquet pour m'avoir ouvert la voie en tant que première graduée du laboratoire. Tu étais là au tout début et ta présence tout au long de ces deux dernières années n'a fait qu'améliorer mon plaisir d'être là. Merci pour tes judicieux conseils autant professionnels que personnels. Tu restes pour moi un incroyable modèle de persévérance et de dévouement.

Un grand merci aussi à Josée dit *Jiji* Letellier pour ta folie et ton immense sens de l'humour qui me décrochait à coup sûr un sourire et amenait tellement de vie au labo ! Tes histoires rocambolesques avec la gent masculine autant que nos conversations fort analytiques vont toujours me manquer, mais reste dans mes meilleurs souvenirs de mon passage au labo.

Un merci particulier aussi à Gaudeline *Fan de Ricardo* Rémillard-Labrosse pour ton dynamisme incroyable et tes petites danses du vendredi après-midi qui agrémentent tellement les journées de labo. Merci aussi de ta précieuse compagnie à Reno, ...car sans toi j'aurais peut-être passé à côté d'Engelbert !

Je remercie aussi sincèrement Johanne *Notre maman du Labo* Duron. Ton œil critique m'a été d'une aide toujours précieuse et je tiens à t'en remercier. Tu as su garder ton cœur d'enfant et c'est pour le plus grand plaisir de tous. Tu demeures un membre très important au sein du labo et pour tous les autres étudiants à venir, je leur souhaite que tu y restes longtemps.

Je tiens aussi à remercier Sandra Loret, pour les diverses discussions « de labo » et d'autres... qu'on a eu l'occasion de partager ensemble. J'ai bien apprécié ta compagnie et aurais bien aimé avoir eu le temps de te connaître davantage. Un merci aussi à notre chère Céline et ses visites quotidiennes qui agrémentent si bien nos



journées. Merci pour ton rire sonore, qu'on entend même dans notre petit corridor solitaire, et ce pour notre plus grand plaisir.

Je tiens également à remercier Michel Lauzon et le Dr. Nabi pour leur précieuse aide avec le microscope confocal, ce fut grandement apprécié.

Enfin, je suis très reconnaissante de la collaboration de mon directeur de recherche, Roger Lippé. Tout au long de ma maîtrise, tu as été très disponible et tes nombreuses idées m'ont motivée dans mon travail et ont grandement contribué à l'aboutissement de ce projet. Merci de m'avoir accueillie dans ton labo et m'avoir permis de rencontrer tous ces gens que je n'oublierai pas.

Encore une fois, Merci à vous tous.

# Chapitre I

## Introduction

### 1.1 HISTORIQUE GÉNÉRAL DES VIRUS

Le terme « virus » est issu du latin et signifie poison. Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, car ils ne peuvent se répliquer que dans une cellule hôte, ils vont ainsi tenter de modifier les directives du noyau pour faire fonctionner l'atelier cellulaire à leur propre compte. C'est là une synthèse claire qui fut exprimée jadis par le biologiste André Lwoff [1]. On lui doit aussi la première définition du concept de virion énoncée dans les années 50 et qui regroupe quatre critères. Tout d'abord, un virus contient un seul type d'acide nucléique, soit de l'ADN ou de l'ARN; deuxièmement, ce matériel génétique se multiplie; troisièmement, les virus ne possèdent pas de système enzymatique de production d'énergie. Enfin, ils ont des structures spécifiques comme par exemple la présence d'une capsidie protéique protégeant le génome, ce qui les distingue des procaryotes et des eucaryotes. Ils furent originalement isolés par Charles Chamberland, un assistant du très célèbre Pasteur, qui inventa en 1884 un filtre de porcelaine [2]. Ce filtre avait été désigné pour retenir toutes les bactéries et c'est grâce à ce filtre que l'on suspectera dès lors l'existence d'agents infectieux particuliers. On devra cependant attendre les années 1940 avant d'utiliser des techniques plus élaborées telles la microscopie électronique ou encore la culture des cellules *in vitro* afin de satisfaire notre curiosité face à l'existence de ces nouveaux microbes. Plus précisément à partir de cette époque, bon nombre de chercheurs vont tenter de comprendre en détails tout ce qui concerne les virus.

Grâce à leurs caractéristiques particulières, les virus demeurent des sujets d'études fort intéressants, car ce sont des agents pathogènes et ils représentent des outils permettant de mieux comprendre les cellules. Le Virus de l'Herpès Simplex de type 1 (HSV-1 pour *Herpes Simplex Virus type 1*) en est un bon exemple, ce dernier étant très étudié de par sa grande distribution à l'échelle planétaire. Les infections au

HSV furent documentées depuis la Grèce antique. La civilisation grecque avait employé le terme herpès, qui signifie ramper, en référence aux lésions cutanées qui semblaient effectivement « ramper » sur la surface de la peau des sujets infectés. On raconte aussi que certains écrits de Shakespeare laisse supposer qu'il était conscient de l'existence de lésions labiales récurrentes. Toutefois, ce n'est qu'en 1893 que Vidal émis son hypothèse quant à la façon de reconnaître la transmission de personne à personne du virus de l'herpès simplex [3].

## 1.2 LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1

### 1.2.1 Classification et structure

Le virus de l'herpès simplex de type 1 fait partie de la famille des herpesviridae, une très grande famille de virus basée sur l'architecture des virions. C'est en fait grâce à une percée technologique dans les années 1960 qu'est apparue le développement de la taxonomie virale. En effet, l'invention par Brenner et Horne de la technique de coloration négative pour la microscopie électronique a permis une meilleure visualisation des virus et ce, à l'échelle du nanomètre [4]. De cette façon, les virus ont été regroupés en famille grâce à leur taille, la présence ou non d'une enveloppe, leurs propriétés physiques, etc. Les virus herpétiques partagent ainsi certaines caractéristiques physiologiques. Par exemple, ces virus infectent une quantité d'hôtes variés et ont une structure particulière caractérisée par un large génome d'ADN double brin. De plus, la synthèse de leur matériel génétique ainsi que l'encapsidation s'effectuent dans le noyau. Finalement, l'infection est de type lytique et les virus herpès ont notamment la capacité d'établir la latence (terme qui sera expliqué ultérieurement).

Le virus HSV-1 fut le premier à être identifié et jusqu'à présent, neuf Virus Herpès Humains (VHH) ont été isolés (VHH-1 à -8 et VHH-6A et -6B). Dues à certaines particularités de leurs propriétés biologiques, la famille elle-même a été sous-divisée en trois familles, soit les *Alphaherpesvirinaes*, les *Betaherpesvirinaes* et les *Gammaherpesvirinaes*. Le virus HSV-1 appartient à la sous-famille des

*Alphaherpesvirinaes*, car il possède les caractéristiques propres de cette sous-famille, c'est-à-dire un large tropisme, une propagation rapide et la capacité de demeurer latent dans les ganglions sensoriels.

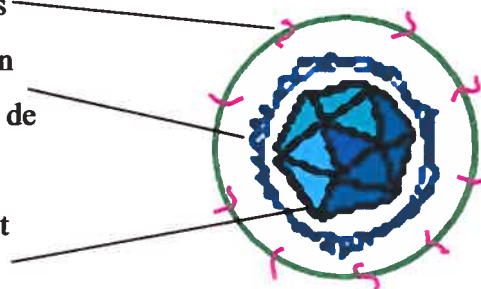
Noms	Noms communs	Sous-famille
Virus Herpès Humain 1	Virus herpès simplex 1 (VHS-1)	Alpha ( $\alpha$ )
Virus Herpès Humain 2	Virus herpès simplex 2 (VHS-2)	Alpha ( $\alpha$ )
Virus Herpès Humain 3	Virus Varcella-Zoster (VZV)	Alpha ( $\alpha$ )
Virus Herpès Humain 4	Virus Epstein-Barr (EBV)	Gamma ( $\gamma$ )
Virus Herpès Humain 5	Cytomégalo virus (CMV)	Bêta ( $\beta$ )
Virus Herpès Humain 6A, 6B		Bêta ( $\beta$ )
Virus Herpès Humain 7		Bêta ( $\beta$ )
Virus Herpès Humain 8	Herpès virus associé au Sarcome de Kaposi	Gamma ( $\gamma$ )

**Tableau 1 : Neufs Virus Herpès Humains de la famille des Herpesviridae avec leur nom commun et leur sous-famille respective.**

(Par Sophie Turcotte, tiré du livre *Fields Virology, Third Edition* [5])

En terme de structure, les virus appartenant aux Herpesviridae sont des virions sphériques ou pléomorphiques ayant un diamètre de 150 à 200 nm et possèdent les caractéristiques suivantes [6] :

- I) une enveloppe composée de glycoprotéines
- II) une couche de téguments qui consiste en un agrégat amorphe composé d'une douzaine de protéines virales différentes
- III) une structure protéinée nommée capsid et ayant une symétrie icosaédrique
- IV) un ADN génomique double-brin (À l'intérieur de la capsid).



**Figure I-1 : Représentation schématique des Herpesviridae**  
(Par Sophie Turcotte)

De façon plus détaillée, disons que le génome de HSV-1 est relativement volumineux, avec ses 152 kilobases sous forme d'ADN linéaire double-brin. La capsid, quant à elle, est constituée de 162 capsomères, 150 hexons et 12 pentons. Elle est entourée de la couche de téguments, terme qui a été introduit jadis par Roizman et Furlong dans les années 1970 [7]. Cette mince couche apparaissant fibreuse en coloration négative est entourée d'une enveloppe lipidique contenant 11 glycoprotéines. Parmi celles-ci, les glycoprotéines gB, gD, gH et gL seraient impliquées dans le processus d'entrée [8] [9]. La glycoprotéine gC faciliterait l'adsorption des virions et augmenterait l'infectivité. Les glycoprotéines gE et gI, quant à elles, forment un complexe stable pouvant se lier au domaine Fc des immunoglobulines G (IgG) [10]. Ce faisant, gE et gI augmentent la propagation virale et du même coup la virulence en protégeant le virus de la réponse immunitaire.

### 1.2.2 Organisation du génome

Le génome comprend trois origines de réplication spécifiquement nommées selon leur localisation, à savoir deux origines  $ori_S$  distinctes et une  $ori_L$ . Notons qu'une seule de ces copies s'avère nécessaire pour l'initiation de la réplication [11]. Le génome viral consiste en 2 régions uniques,  $U_L$  (*Unique Long*) et  $U_S$  (*Unique Short*) ayant à chacune de ses extrémités des *ITRs* (*Inverted Terminal Repeats*). Jusqu'à présent, la littérature scientifique propose 84 polypeptides différents codés par le HSV-1 [12], dont probablement 47 ne seraient pas essentiels à la réplication virale en culture cellulaire [13]. Cependant, ces 47 protéines peuvent avoir pour fonction d'altérer le métabolisme cellulaire ou encore d'inhiber les mécanismes de défense de la cellule hôte, comme c'est le cas de US3 identifié pour inhiber l'apoptose [14]. La nomenclature d'un gène viral se fait au moyen de sa localisation dans le segment UL ou US suivie d'un numéro correspondant à sa position relative dans le segment. Quant à la nomenclature des protéines virales, elles sont soit nommées en terme de protéine infectieuse cellulaire (*ICP* pour *Infected Cell Protein*) ou protéine du virion (*VP* pour *Virion Protein*) ou encore identifiées par le gène duquel elles sont transcrites.

### **1.2.3 Pathogenèse**

#### **1.2.3.1 Infectivité au niveau de la cellule**

Le virus de l'herpès simplex est un pathogène humain ayant un cycle de réplication lytique, c'est-à-dire que la production de virions implique la destruction de la cellule infectée. De façon plus explicite, l'infection virale induit le gonflement des cellules et l'apparition de chromatine condensée dans le noyau des cellules, suivie par la destruction subséquente du noyau cellulaire. Par la suite, les cellules infectées vont perdre l'intégrité de leur membrane plasmique et peuvent former des cellules géantes multinuclées.

#### **1.2.3.2 Infectivité au niveau de l'organisme**

Le virus HSV-1 est responsable de ses apparitions inopportunes sur le pourtour des lèvres communément appelées les feux sauvages. On estime que 40 à 80 % de la population a été en contact avec ce virus dans son enfance et qu'il affecte jusqu'à 90 % de la population mondiale. On définit ce virus comme étant ubiquitaire et dont la primo-infection peut s'étaler de l'enfance jusqu'à l'âge adulte. Précisons que le type 1 de l'herpès entraîne des infections labiales tandis que le type 2 infecte plutôt les muqueuses génitales. Cependant, il a été répertorié que 3% des cas d'herpès labial seraient causés par le HSV-2, alors que 10% des infections herpétiques génitales seraient attribuables à HSV-1 [15]. La transmission chez l'humain se fait au moyen d'un contact direct entre un individu infecté et un sujet sain. Mentionnons aussi que ce virus peut atteindre l'oculaire et provoquer dans ce cas un trouble permanent de la cornée et donc une baisse de l'acuité visuelle. Une autre maladie grave et potentiellement fatale, l'encéphalite herpétique, correspond à une dévastation neurologique sévère et a également pour cause le virus HSV-1. Bien que les infections au niveau du cerveau ne soient pas communes, elles sont pourtant possibles, signifiant le potentiel neurovirulent de HSV-1.

### 1.2.4 Latence

Le virus HSV-1 possède une propriété particulière, soit l'habileté d'infecter les neurones sensoriels. Dans ce cas, l'expression des gènes est restreinte et le virus n'engendre pas de pathologie apparente. Le virus est alors en période de latence. Durant cette période, le génome viral est sous forme circulaire épisomale dans le noyau des cellules nerveuses. En fait, seulement quelques transcrits, les *Latency-Associated-Transcripts (LAT)* pourront être détectés à ce moment, sans produit de traduction connu. Une propriété reconnue des transcrits *LAT* est leur activité anti-apoptotique. En effet, une étude a démontré que ces transcrits peuvent inhiber l'action de la caspase-8, protégeant ainsi le virus de la mort cellulaire programmée de leur cellule hôte [16]. Pour établir la latence proprement dite, les virus doivent pénétrer dans les terminaisons nerveuses des nerfs sensitifs, soit ceux innervant l'épithélium, pour ensuite être transportés jusqu'aux noyaux des cellules nerveuses par un transport le long de l'axone. Une fois la latence établie, les cellules nerveuses constituent un réservoir pour le virus, à l'abri du système immunitaire. Les infections latentes sont sujettes à la réactivation, et c'est pourquoi des virus infectieux peuvent se retrouver de nouveau dans les tissus périphériques. Un cas particulier de réactivation pour la famille des virus herpès est celui du virus de la varicelle (VZV). Il peut lui aussi demeurer latent dans un ganglion nerveux suite à la maladie infantile, mais il est réactivé sous forme d'une maladie différente chez l'adulte, la maladie du zona. De façon générale, les virus pourront être réactivés suite à la fatigue, aux radiations ultra-violettes (soleil), aux changements hormonaux, au stress, ou encore à divers contextes d'immuno-suppression. Lors d'une réactivation, les virus sont transportés de façon antérograde le long des axones des nerfs sensitifs infectés jusqu'au site de l'infection initiale. C'est au niveau de ce site périphérique que les virus se répliqueront et entraîneront une infection productive, laquelle sera associée ou non à des symptômes cliniques.

### 1.2.5 Antiviraux et résistance

Les antiviraux sont des composés pouvant par exemple cibler autant l'entrée du virus que la réplication virale. Les antiviraux disponibles contre le HSV-1 ciblent plutôt la réplication virale. En fait, la découverte de l'acyclovir triphosphate, un analogue de la 2'-déoxyguanosine, a été une découverte importante en vue du traitement des infections herpétiques. Ce composé agit en s'incorporant à l'ADN et met ainsi fin à la synthèse de la chaîne. La faible toxicité de cet agent antiviral est probablement imputable au fait qu'il inhibe de 30 à 50 fois plus efficacement la polymérase à ADN virale que son homologue cellulaire [17]. Cependant, tout juste après sa découverte, un groupe de chercheurs a démontré la résistance du virus à ce type de drogue [18]. Plus récemment, une étude a plutôt ciblé l'enzyme hélicase-primase virale en vue d'un traitement efficace contre HSV [19]. Cependant, aucun des présents traitements ne s'est avéré curatif. Ce faisant, les individus qui sont malheureusement infectés le resteront à vie.

### 1.2.6 HSV-1 et son cycle de vie

#### 1.2.6.1 L'entrée

Le virus de l'herpès simplex de type 1 est composé d'une enveloppe, laquelle comprend des glycoprotéines et ce sont ces dernières qui assurent l'attachement du virus aux récepteurs au niveau de la membrane cellulaire. L'héparine sulfate est l'une des molécules de liaison de la particule virale et le fait qu'elle soit retrouvée à la surface d'un grand nombre de cellules pourrait contribuer au large tropisme du virus HSV-1. Cette liaison serait gouvernée par la glycoprotéine virale gC, mais bien que ces interactions facilitent l'infection, la gC ne semble pas indispensable. En effet, la délétion de gC au niveau de l'enveloppe virale ou encore la suppression de l'héparine sulfate n'empêche pas l'infection, mais plutôt diminue son efficacité, probablement dû au fait que d'autres glycoprotéines de l'enveloppe telles gB ou gD soient aussi impliquées. En fait, la glycoprotéine virale gD joue un rôle important dans le



processus d'entrée, étant donné que le traitement des cellules avec la forme soluble de la protéine ou la présence d'anticorps contre cette protéine bloque l'infection [20] [21]. Cette glycoprotéine peut interagir avec différents récepteurs, lesquels incluent les récepteurs cellulaires nommés protéine herpétique de l'entrée virale (*HVEM* ; pour *Herpes Virus Entry Mediator*) et la protéine réceptrice nectin-1, aussi nommée *Hve C*. Bien que structurellement non reliés, les différents récepteurs peuvent indépendamment jouer un rôle dans l'entrée du virus HSV-1 [22]. La liaison de gD au récepteur serait requise comme événement initiateur de l'entrée. À la suite de cette interaction, il a été proposé qu'une portion spécifique de gD, nommée domaine de pro-fusion, recrute les glycoprotéines gB, gH et gL menant à la formation d'un complexe tripartite qui engendre la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique [23]. Les glycoprotéines gD, gB, gH et gL demeurent alors essentielles et fortement impliquées pour l'entrée et la fusion du virus avec la surface cellulaire.

L'endocytose du virus herpès semble aussi être possible. En effet, des études ont montré que le HSV infecte les cellules *CHO* (*Chinese Hamster Ovary*) ainsi que les cellules HeLa, et ce par un mécanisme endocytique [24]. Cela dit, pour plusieurs cellules en culture, par exemple les cellules Vero, l'infection au HSV est initiée par la liaison d'un récepteur et une fusion à pH neutre avec la surface cellulaire. Cependant, la voie majeure pour l'entrée du HSV dans les cellules HeLa et *CHO* serait dépendante de l'endocytose des capsides virales, suivie par la fusion de l'enveloppe virale avec les endosomes. Bref, les résultats suggèrent que le virus de l'herpès peut utiliser deux voies d'entrée distinctes dépendamment du type cellulaire.

Toutefois, que l'entrée s'effectue par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique ou les endosomes, le virus est libéré dans le cytoplasme sous la forme d'une capside nue, un qualificatif qui réfère à un virus dé-enveloppé, pour être dirigé au noyau via les microtubules [25] [26]. Ensuite, il y a liaison de la capside avec le pore nucléaire et seul le génome viral pénètre dans le noyau en vue de sa transcription. La limite d'exclusion du pore nucléaire étant de 40 à 70 KDa (KiloDalton), il ne permet pas le passage du virion qui lui est de 100 000 KDa [27].

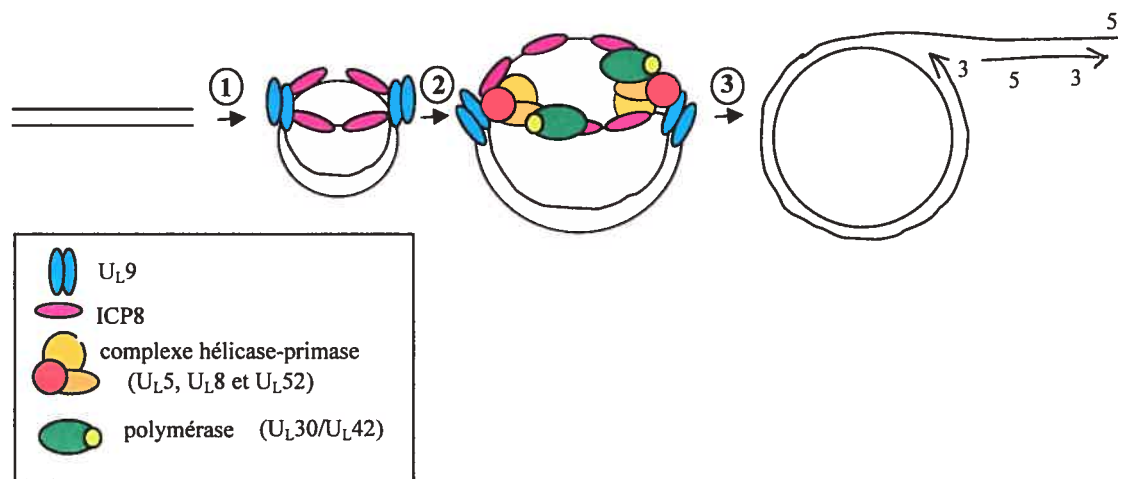
### 1.2.6.2 Expression des gènes viraux

Comme tant d'autres parasites intracellulaires, le virus HSV-1 tentera d'exploiter la cellule hôte de façon à pouvoir exprimer ses propres protéines aux dépens de celles de la cellule. C'est en fait grâce à l'ARN polymérase cellulaire II que la synthèse des ARNm viraux peut s'effectuer. L'expression des gènes viraux s'effectue de façon séquentielle. Tout d'abord, les premiers gènes à être exprimés sont les gènes « immédiats précoces » et mènent à la transcription des protéines  $\alpha$ . Ces protéines  $\alpha$  seront requises pour l'expression des gènes « précoces », les deuxièmes à être exprimés, qui mènent eux à la transcription des protéines  $\beta$ . Les protéines  $\beta$  sont celles qui seront nécessaires à la réplication de l'ADN viral. Enfin, les gènes « tardifs » seront exprimés suite à la synthèse du nouveau matériel génétique et mènent à la transcription des protéines structurales qui composent la particule virale, les protéines  $\gamma$ .

L'expression séquentielle des gènes viraux jouie d'une importante régulation. Premièrement, l'expression des gènes « immédiats précoces » est induite par la protéine VP16 présente dans le tégument des virions matures. Dès l'entrée du virus dans la cellule, VP16 recrute un co-facteur, *HCF (Host Cell Factor)* de sorte que VP16 est ciblé au noyau et ce complexe agit ensuite de concert avec une protéine octamère cellulaire déjà liée à l'ADN, Oct-1. Deuxièmement, une autre protéine du tégument, le produit du gène UL41, nommée *VHS* pour *Viral Host Shut-off*, a comme fonction de dégrader les ARNm cellulaires et viraux. Troisièmement, il y a expression très tôt suivant l'infection de la protéine ICP27 qui favorise les ARNm viraux. Cette protéine inhibe la maturation des ARNm en empêchant leur épissage [28]. Étant donné que comparativement aux gènes cellulaires, la plupart des transcrits viraux ne requièrent pas d'épissage, ICP27 affecte principalement la synthèse des protéines cellulaires. De plus, ICP27 exporte préférentiellement les ARNm viraux vers le cytoplasme.

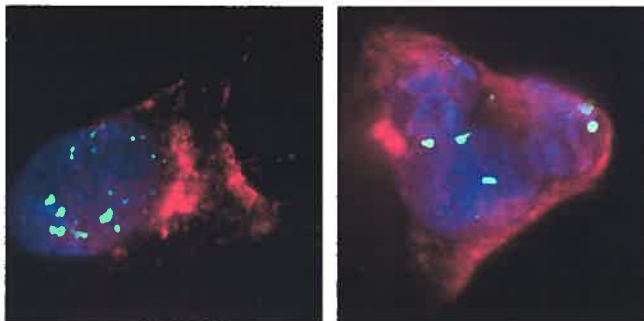
### 1.2.6.3 Réplication de l'ADN viral

En ce qui concerne la réplication virale, il a été observé que très tôt suivant l'infection (0,5 hpi ; heure post-infection), l'ADN viral s'accumule dans le noyau. Le génome linéaire se circularise ensuite et procède en deux phases, une phase initiale de réplication thêta, initiée à une ou plusieurs origines, suivie par le mode de réplication du cercle roulant (voir figure 2). Des concatémères d'ADN sont ainsi générés, lesquels seront ensuite clivés et empaquetés dans les particules virales infectieuses. L'étape de réplication s'effectue dans des régions distinctes du noyau, nommées compartiments de réplication [29] (voir figure 3).



**Figure I-2 : Représentation schématique de la réplication de l'ADN de HSV-1**

1) Circularisation du génome et liaison spécifique de U<sub>L</sub>9 à ori<sub>L</sub> ou ori<sub>S</sub> suivie du déenroulement de l'ADN et liaison de la protéine ICP8 à l'ADN simple brin. 2) Recrutement du complexe hélicase-primase suivi de l'association de la polymérase en vue d'une réplication en mode thêta. 3) Passage au mode de réplication du cercle roulant. (Par Sophie Turcotte, adapté de Lehman IR [30])



### Figure I-3 : Formation des compartiments de réplication

Les cellules BHK ont été infectées 7h à 37°C avec le virus HSV-1 K26GFP suivie de 1h à 20°C. Idem a), mais suivie plutôt d'une incubation de 3h à 20°C. On remarque une accumulation plus marquée des virus en des endroits précis du noyau, les compartiments de réplication. (Expérience effectuée par Sophie Turcotte)

#### 1.2.6.4 Assemblage et encapsidation

L'assemblage des nouvelles capsides requiert diverses protéines qui formeront la coquille de la capside en soit ainsi qu'une protéine d'échafaudage particulière, VP22, laquelle est nécessaire à la maturation de la capside. Une seconde protéine particulière, la protéine multimérique du Portal, composée de 12 protéines identiques, demeure pour sa part importante pour l'encapsidation, car elle forme un canal par lequel l'ADN peut se faufiler pour entrer dans la capside [31]. À priori, la capside naissante est appelée procapside et son assemblage est spontané dans le noyau. C'est une coquille essentiellement sphérique et instable à 4°C, sans ADN et dont les composantes prédominantes sont les 4 protéines structurales de la capside, soit la protéine majeure de la capside (VP5), les protéines VP19C et VP23 et la protéine d'échafaudage non-clivée (pré-VP22a). La maturation de la procapside implique un processus protéolytique de la protéine d'échafaudage VP22 par l'action de la protéase virale Pra et s'ensuit la relâche de cette protéine à l'extérieur de la capside, le clivage de l'ADN génomique et son empaquetage dans la capside. Ainsi, bien que la protéine d'échafaudage VP22 participe à la formation de la capside, elle n'est pas retrouvée dans la capside mature ou dans le virion extracellulaire [32]. Ces événements sont accompagnés par l'angularisation de la capside et finalement la formation d'une configuration icosaédrique stable. Trois types de capsides (A, B et

C) peuvent être isolées des cellules infectées par sédimentation sur gradient de sucrose [33]. Les capsides A ne contiennent ni ADN ni protéine d'échafaudage et demeureront vraisemblablement inactives sans produire de virions infectieux. Les capsides B ne contiennent pas d'ADN viral, mais plutôt des formes protéolytiques de la protéine d'échafaudage. Il existe deux types de capsides B, les « *large B* », celles que l'on appelle aussi les procapsides et les « *small core B* ». Les capsides « *small core B* » dérivent en fait des procapsides, sont pour leur part stables à 4°C et contiennent la protéine d'échafaudage clivée (VP22a). Enfin, les capsides C contiennent le génome viral et ce sont ces dernières qui deviendront éventuellement les virions infectieux. Finalement, bien qu'une des caractéristiques virales fondamentales soit l'infectivité des virions extracellulaires, la grande majorité des virions produits ne sont pas fonctionnels. En effet, précisons qu'il n'est pas rare d'observer des particules légères « L » pour *light particle* dans le cytoplasme des cellules infectées. Ces particules sont composées de téguments et d'une enveloppe, mais n'ont ni capsid, ni ADN. Elles sont formées indépendamment de la maturation des virions et sont évidemment non infectieuses.

Tel que discuté précédemment, la protéine VP22 est dépendante d'une protéine auxiliaire, la protéase A (Pra) laquelle est responsable de son clivage. Cette protéase demeure donc essentielle pour la formation et la maturation de la capsid virale. De ce fait, elle peut être ciblée et constituer un important outil pour l'étude du virus herpès. C'est le cas de la souche mutante V701 qui code pour une Pra thermosensible. Lors d'une incubation à la température non-permissive, (39°C) la protéase n'est pas fonctionnelle et la protéine d'échafaudage pré-VP22 demeure non-clivée. Des analyses en microscopie électronique ont révélé une importante accumulation de procapsides dans le noyau à cette température [34] consistant avec une accumulation de capsides immatures. Par ailleurs, si les cellules infectées sont incubées ensuite à la température permissive (31°C), les capsides suivent leur voie de maturation normale et forment des virions matures [35]. Cette mutation réversible et dépendante de la température fut exploitée par un groupe de chercheurs, ayant en tête le docteur Duncan Wilson. Ils ont développé des conditions permettant de relâcher

les capsides matures de façon rapide, efficace et synchronisée [36]. Le système employé à cette fin implique l'ajout de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, dans le but de bloquer toute nouvelle synthèse de protéines suite à la relâche du virus à la température permissive, ce qui permet une meilleure synchronisation. Normalement, le virus se réplique continuellement pendant 18 à 24 heures et conséquemment, les cellules contiennent des virus se référant à tous les stades de l'assemblage. Il devient donc difficile, sans un virus mutant par exemple, de déterminer l'ordre des événements durant la biogenèse virale. Le mutant V701 constitue donc un important outil pour l'analyse de la biogenèse du HSV-1, car il est possible de suivre une seule population de virions lesquels s'assemblent et voyagent de façon synchronisée.

L'utilisation du mutant V701 peut également être appliquée dans le but de déterminer la localisation intracellulaire des protéines virales individuelles à la température non permissive. En effet, bien que le virus mutant s'accumule dans le noyau, l'expression de ses protéines virales n'est point altérée [37]. Il a été établi que ce mutant génère la même quantité et la même composition de protéines que le virus sauvage. Bref, les protéines virales s'expriment même lorsque le virus se retrouve coincé dans le noyau, indépendamment de la maturation des virions.

En plus des virus mutants de type thermosensible, les virus dits recombinants sont aussi très utiles pour l'analyse de l'infection virale. Par exemple, l'introduction d'une protéine fluorescente, telle la *GFP* (*Green Fluorescent Protein*), permet une meilleure visualisation du virus. C'est le cas du virus HSV-1 K26GFP, lequel est généré en introduisant la protéine de fusion VP26-GFP dans le génome du virus HSV-1 de souche KOS. VP26 est une protéine virale localisée à la surface externe de la capsid [38].

#### 1.2.6.5 Bourgeonnement nucléaire

Suite à l'assemblage des capsides et l'encapsidation de l'ADN viral, la sortie des virions présents dans le noyau implique un processus de bourgeonnement au niveau de la membrane nucléaire interne pour ainsi générer une capsid enveloppée

dans l'espace péri-nucléaire, qui est contigu avec le réticulum endoplasmique (RE). Trois protéines sont étroitement liées à ce processus. D'abord le produit des gènes UL31 et UL34. En effet, ces deux protéines seraient impliquées dans la réorganisation de la chromatine et l'altération de la lamina nucléaire [39]. La protéine US3, étant également retrouvée au niveau de la membrane nucléaire et des virions périnucléaires, elle aurait aussi un rôle à jouer dans l'étape de bourgeonnement nucléaire. En effet, sa délétion cause l'accumulation de virions dans les invaginations de la membrane nucléaire, une réduction du titre viral ainsi qu'un délai dans la production de virus [40]. Suite à l'étape de bourgeonnement nucléaire, deux modèles différents ont été proposés quant à l'étape suivante de la progression des virions.

#### **1.2.6.6 Progression intracellulaire (deux modèles)**

##### **1.2.6.6.1 Premier modèle : voie de transport classique de biosynthèse**

Suite à la génération de capsides enveloppées dans l'espace péri-nucléaire, le premier modèle suggère que les virions présents dans cet espace maintiennent leur intégrité et atteignent la membrane plasmique en suivant la voie classique de biosynthèse [41] [42] [43] [44]. Cette voie est celle qu'empruntent les protéines transmembranaires ou destinées à être sécrétées. Ces dernières sont d'abord synthétisées au réticulum endoplasmique, où elles subissent les premières étapes de leur maturation. Ensuite, elles sont acheminées vers le compartiment intermédiaire ou *ERGIC* (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*). Leur transport se poursuit alors au niveau des diverses citernes de l'appareil de Golgi (cis, médiale et trans) pour atteindre le réseau trans-golgien (*Trans-Golgi Network, TGN*), le lieu de triage des protéines. C'est à ce moment qu'elles seront dirigées vers leur destination finale via leur signal de localisation cellulaire. Ainsi, il fut suggéré que le transport des capsides présentes au niveau du RE soit calqué sur cette voie. Ce modèle prédit alors que les glycoprotéines virales et les téguments sont ajoutés aux

capsides au niveau du noyau et subissent leur maturation en suivant la voie de transport classique de biosynthèse.

#### **1.2.6.6.2 Modulation de la voie de transport classique de biosynthèse**

Comme c'est le cas de toutes les voies de transport intracellulaire, la voie de transport classique de biosynthèse est sensible à la température. En effet, en ce qui concerne la voie de transport des protéines nouvellement synthétisées, une incubation à 15°C bloque les protéines dans le compartiment *ERGIC*, tandis qu'une incubation à 20°C les bloque plutôt au TGN. Ce blocage étant réversible, le procédé est d'autant plus intéressant. Ainsi, un variant thermosensible de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire retenu au niveau du RE à une température de 39°C atteint le compartiment *ERGIC* à 15°C, le TGN lors d'une incubation à 20°C ou la surface cellulaire à 31°C [45]. Cette protéine s'avère donc être un outil parfait pour élucider la voie de transport des protéines nouvellement synthétisées. À juste titre, des résultats très convaincants à propos du transport de cette protéine virale mutante ont fait l'objet d'un article publié dans *Nature* [46]. Cette étude exploite les techniques du marquage fluorescent et de vidéo microscopie afin de faire le suivi du transport de cette protéine dans des cellules vivantes. De cette façon, les chercheurs ont été en mesure de visualiser le transport du RE au Golgi de la glycoprotéine virale VSV G ts045 laquelle était marquée à la GFP.

En plus du blocage de façon température dépendante, plusieurs inhibiteurs de la voie classique de biosynthèse ont été utilisés par le passé afin de perturber le transport des protéines et inclus le monensin [43] [47], le tunicamycin [47] [48] et la Brefeldine A (*BFA*) [49] [50].

#### **1.2.6.6.3 Preuves supportant le premier modèle**

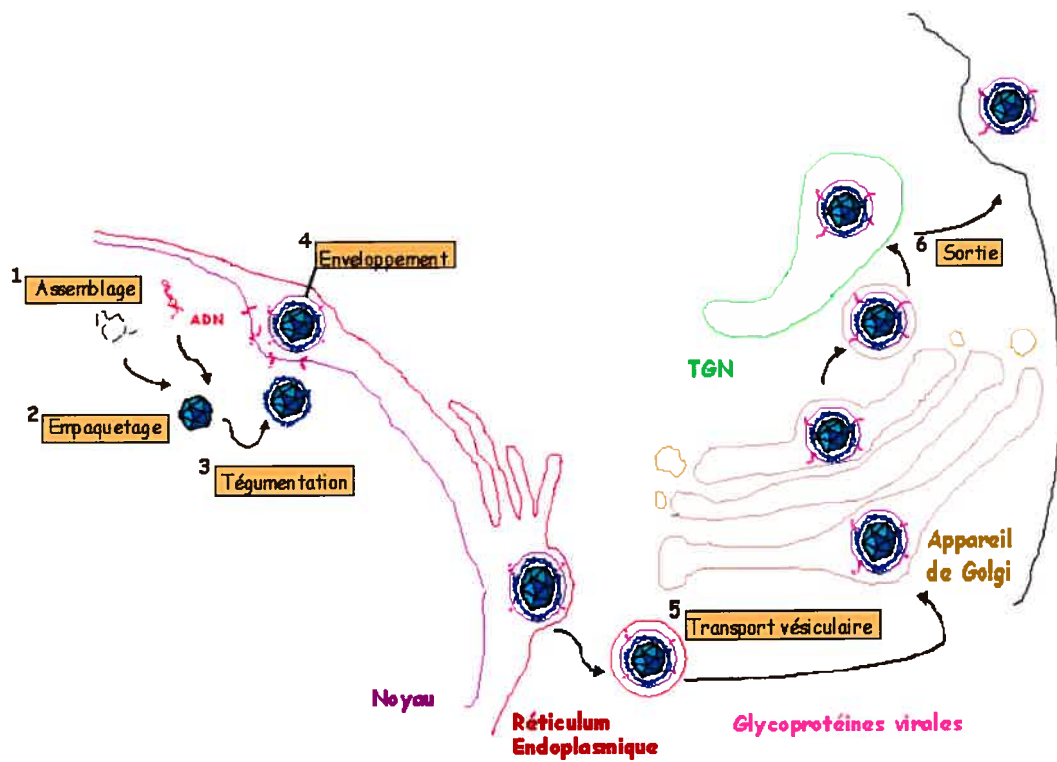
Plusieurs recherches ont suggéré que le transport intracellulaire du HSV-1 soit calqué sur le modèle du transport vésiculaire, basé entre autres sur des



expériences utilisant l'antibiotique monensin. Ces expériences démontraient que le monensin cause une accumulation de virions dans des vacuoles cytoplasmiques, lesquels possèdent des glycoprotéines immatures. Étant donné que le monensin a pour effet d'inhiber la maturation des sucres (*N-linked*) par le Golgi et puisque les virions extracellulaires contiennent normalement des glycoprotéines matures, les chercheurs ont conclu que les capsides doivent migrer à travers le Golgi [43]. Selon ce premier modèle, le virus acquiert son enveloppe à partir de la membrane nucléaire interne, qui elle comprend les formes immatures des glycoprotéines. Ce serait donc pendant le transit des capsides à l'intérieur des divers compartiments Golgiens que les glycoprotéines deviennent matures [51]. Cette affirmation fut également corroborée par des résultats de microscopie électronique faisant état de la présence de virus enveloppés dans le cytoplasme lesquels sont toujours à l'intérieur de vésicules [42] [52] [53]. Ces études suggéraient alors que ces capsides devaient dériver des vésicules de transport issues de l'appareil de Golgi. Dans certains cas, des capsides non-enveloppées dans le cytoplasme ont été observées, mais il fut suggéré que ces capsides étaient des *deads end*, n'ayant vraisemblablement pas le potentiel de former des capsides matures.

Ce modèle prédit que l'enveloppe des virions extracellulaires doit dériver de la membrane nucléaire interne et par conséquent, les glycoprotéines et les téguments sont ajoutés au niveau du noyau (voir figure 4). Cependant, des analyses de la composition et de la morphologie de l'enveloppe des virions extracellulaires suggèrent plutôt que cette dernière ne dérive pas de la membrane nucléaire interne [54] [55], ce qui mena à l'élaboration d'un modèle alternatif permettant de mieux expliquer la progression intracellulaire du virus.

Premier modèle de la progression intracellulaire des capsides HSV-1 :  
Voie de transport classique de biosynthèse



**Figure I-4** : Représentation schématique du premier modèle de la progression intracellulaire des capsides de HSV-1, calqué sur le modèle de la voie de transport classique de biosynthèse. (par Sophie Turcotte)

#### 1.2.6.6.4 Deuxième modèle : voie de dé-enveloppement/ré-enveloppement

Un modèle alternatif et jugé plus plausible émergea parallèlement au premier modèle, dont l'instigateur fut Christopher W. Stackpole. Ce modèle a d'abord été appliqué aux virus herpès chez la grenouille [53] et plus tard au HSV-1 humain [56]. Tout d'abord, étant donné la différence entre la composition de l'enveloppe des virions extracellulaires et celle de la membrane nucléaire, il fut suggéré que l'enveloppe virale dérive plutôt d'un compartiment intracytoplasmique, ce qui implique nécessairement une étape de dé-enveloppement. Le modèle alternatif propose donc que l'enveloppe virale primaire (présente sur les virions péri-nucléaires) fusionne avec la membrane nucléaire externe, résultant en la perte de l'enveloppe primaire. Il y aurait ensuite translocation des capsides nues dans le cytoplasme suivie d'un ré-enveloppement subséquent. Ce modèle prédit que les glycoprotéines virales subissent leurs étapes de maturation dans le Golgi indépendamment des capsides. Finalement, ce modèle propose que les téguments puissent être ajoutés aux capsides dans le cytosol et pas nécessairement exclusivement dans le noyau (voir figure 5).

#### 1.2.6.6.5 Preuves supportant le deuxième modèle

Plusieurs découvertes au sujet du virus HSV-1 supportent le modèle de dé-enveloppement et de ré-enveloppement au niveau d'un compartiment intracytoplasmique. Ainsi, des virus mutants auxquels les glycoprotéines virales de l'enveloppe gH étaient restreintes au RE par un signal de rétention, produisaient des virions extracellulaires ne contenant pas de quantité détectable de gH, tandis que les virions péri-nucléaires en contenaient [57]. Ceci implique que les virus perdent leur enveloppe initiale durant leur progression intracellulaire pour en obtenir une seconde d'un autre compartiment. Ceci fut confirmé indépendamment en examinant la distribution de la glycoprotéine gD, elle aussi maintenue au RE et les résultats permirent une fois de plus de conclure que l'enveloppe des virions péri-nucléaires

doit être perdue durant la maturation et la progression virale [58]. De plus, il est facile d'expliquer selon ce modèle la présence de capsides non-enveloppées dans le cytoplasme, ces dernières étant générées suivant l'étape de dé-enveloppement au niveau de la membrane nucléaire externe. D'ailleurs, le rôle de la membrane nucléaire externe dans la production de capsides cytoplasmiques nues via un événement de fusion a clairement été mis en évidence [56]. Par ailleurs, certaines études ont démontré la présence exclusive de téguments dans le cytoplasme, ce qui supporte le modèle de ré-enveloppement [59] [60]. Il a aussi été suggéré que les capsides et les glycoprotéines de l'enveloppe soient transportées indépendamment les unes des autres jusqu'à la terminaison axonale des cellules neuronales, s'opposant au fait que les capsides soient déjà enveloppées au niveau du noyau dans le corps cellulaire [61]. Cependant, la propagation du virus dans les neurones demeure un sujet de controverse étant donné que des résultats de vidéo-microscopie d'un autre laboratoire propose plutôt que la capside et les téguments tels VP13/14 et VP16 soient associés pendant leur transport axonal [62]. En somme, le modèle favorisé de la progression virale dans les cellules épithéliales propose que les capsides acquièrent leur enveloppe finale d'un organe cellulaire autre que le noyau.

#### **1.2.6.6.6 Site favorisé pour le ré-enveloppement des capsides intracellulaires**

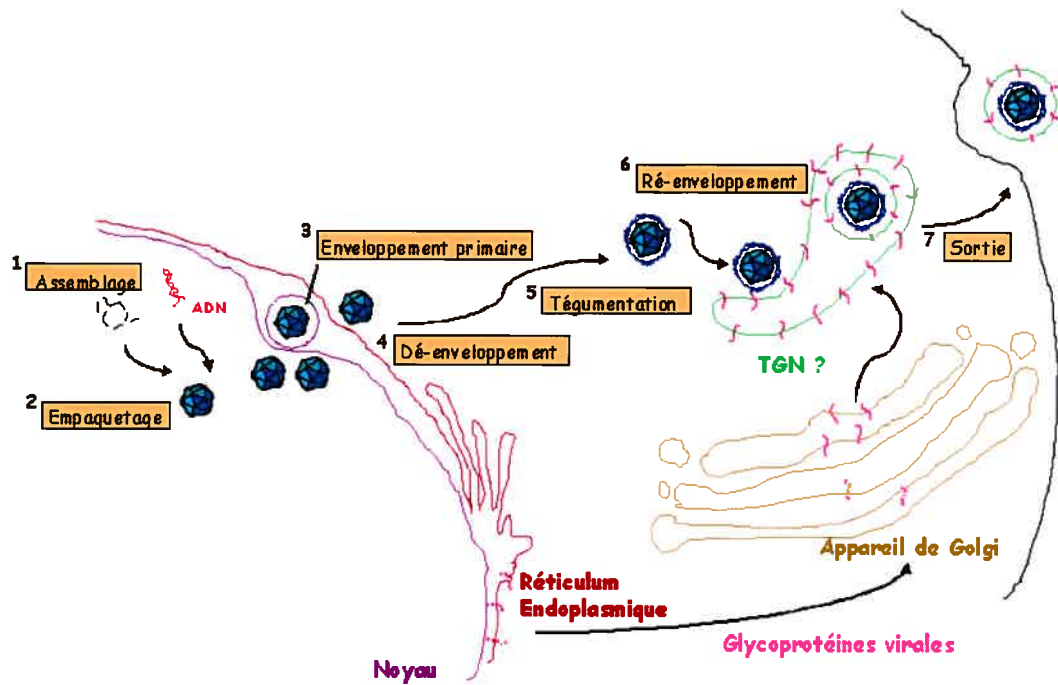
Certaines études ont examiné le site où les capsides herpès acquièrent leur enveloppe finale. Tout d'abord, l'analyse du virus VZV en microscopie électronique a révélé que ce dernier se ré-enveloppe au niveau du réseau trans-golgien [63]. Par ailleurs, l'utilisation d'un sérum anti-TGN38 suivie par l'ajout d'un anticorps secondaire lié à des particules d'or a permis de démontrer que pour quatre différents alphaherpesvirus, dont HSV-1, l'enveloppement secondaire des capsides se produisait au niveau des membranes du TGN [54]. Le groupe du docteur Duncan Wilson a pour sa part établi, par fractionnement cellulaire, que les virus retrouvés dans l'espace cytoplasmique sont associés avec les marqueurs du TGN et des endosomes [35]. Toutes ces observations sont aussi corroborées par la composition

lipidique des virions extracellulaires qui est semblable à celle des membranes du TGN/Golgi [55]. Collectivement, ces études sont consistantes avec la notion que pour différents membres de la famille des alphaherpesvirus, dont le virus HSV-1, les capsides semblent transiter par le TGN et/ou les endosomes.

#### **1.2.6.6.7 Sites alternatifs de ré-enveloppement**

En dépit de toutes ces observations semblant pointer le TGN comme site de ré-enveloppement, plusieurs sites alternatifs ont été suggérés. Les tégusomes, qui seraient des compartiments sphériques intranucléaires dérivant d'une invagination cytoplasmique dans le noyau, ont notamment été proposés. Le Virus Herpès Humain VHH-6, un autre membre de la famille des alphaherpesvirus, bourgeonnerait dans la cavité de ces tégusomes dans le but d'acquérir ses téguments et par le fait même, son enveloppe [64]. Il a aussi été suggéré que les agrésomes soient le site de ré-enveloppement du virus HSV-2. Les agrésomes sont des structures cellulaires où se concentrent les protéines n'étant pas repliées adéquatement. Les capsides nouvellement synthétisées s'accumuleraient dans des domaines juxtaposés au noyau lesquels partagent les caractéristiques des agrésomes [65]. De plus, les endosomes tardifs ont également été proposés comme site de ré-enveloppement, et ce, pour le virus HSV-1. Cette affirmation était basée sur le fait qu'une importante fraction de la protéine majeure de la capsid (VP5) a été trouvée dans les endosomes tardifs, ce qui laissait supposer une accumulation de virions dans ce compartiment endosomal [66]. Enfin, tel que discuté antérieurement, les endosomes précoces sont également cités comme site potentiel de ré-enveloppement [35]. Bref, le véritable site du ré-enveloppement de HSV-1 reste à être clarifié.

Deuxième modèle de la progression intracellulaire des capsides HSV-1 :  
Voie de dé-enveloppement/ré-enveloppement



**Figure I-5** : Représentation schématique du modèle favorisé de la progression intracellulaire des capsides de HSV-1, incluant les étapes et les divers organites cellulaires impliqués. (par Sophie Turcotte)

Par ailleurs, bien qu'il semble établi que pour les cellules épithéliales, les capsides acquièrent leur enveloppe par bourgeonnement à travers un organite cellulaire post-RE, le TGN est absent dans les axones et les terminaisons axonales. Ce faisant, le débat demeure ouvert à savoir qu'elle est le site de ré-enveloppement dans le cas des cellules neuronales.

#### **1.2.6.6.8 Acquisition des glycoprotéines virales**

Puisque l'enveloppe finale du virus comprend les glycoprotéines virales, ces dernières devraient se retrouver au site exact où se produit l'événement de ré-enveloppement. Pour HSV-1, au moins 5 des 11 glycoprotéines [67] se sont avérées être présentes au TGN. D'une part, il a été clairement démontré que la glycoprotéine gE du virus HSV-1 s'accumule de façon stable au TGN de par ses domaines cytoplasmiques présentant des motifs de signalisation au TGN [68] [69]. D'autre part, il fut démontré que c'est également le cas de la glycoprotéine gB laquelle a été localisée au TGN via des expériences avec la glycoprotéine marquée à la GFP [70]. Une autre recherche a pour sa part présenté l'évidence que gM/N de HSV-1 cause la relocalisation de plusieurs protéines de la membrane plasmique vers le TGN, incluant les glycoprotéines de l'enveloppe gD, gH et gL. Ces données suggèrent que le complexe gM/N peut être impliqué dans la localisation adéquate des protéines de l'enveloppe virale au site de l'enveloppement secondaire [71]. Enfin, une étude a examiné plus spécifiquement l'étape d'ajout des glycoprotéines gD et gH, ainsi que des protéines du tégument et ce, dans les cellules neuronales de rat. Les résultats recueillis via la microscopie électronique suggéraient que ces protéines étaient incorporées aux capsides non-enveloppées se trouvant au niveau du TGN [60].

#### **1.2.6.7 Sortie du virus**

Les dernières étapes du processus de propagation virale impliquent que les virions matures atteignent la surface de la cellule où ils seront relâchés dans l'espace extracellulaire en tant que virus infectieux. Cependant, aucune étude n'a clairement

établi le mécanisme relié à la sortie du virus HSV-1. Néanmoins, quelques recherches semblent démontrer que les virus HSV-1 naissants pourraient être transportés vers des domaines spécifiques de la membrane plasmique, c'est-à-dire aux jonctions cellulaires épithéliales [72] [73]. Par le fait même, les virus ne se retrouveraient jamais dans l'espace extracellulaire. Ainsi, le complexe de glycoprotéine gE/gI ainsi que gB et TGN46 se déplacent tous aux jonctions cellulaires, via leur colocalisation avec une protéine elle-même localisée aux jonctions cellulaires, la  $\beta$ -caténine [74].



## Chapitre II

### Objectifs de recherche et approche

À la lumière des recherches précédemment décrites, plusieurs sites de ré-enveloppement sont proposés pour HSV-1. La présente étude a tenté d'identifier clairement le site de ré-enveloppement par immunofluorescence en utilisant divers marqueurs cellulaires bien établis.

Certains outils s'avéraient nécessaires afin de mener à terme ces objectifs de recherche. Tout d'abord, dans le but de synchroniser l'infection, le virus mutant V701 a été utilisé. En plus de ce mutant, un autre virus HSV-1 a été employé, soit le virus HSV-1 K26GFP. Ce virus est utile puisqu'on peut visualiser directement les capsides en immunofluorescence. Nous avons également exploité une méthode largement utilisée en biologie cellulaire, celle du blocage du transport intracellulaire entre le RE et la membrane plasmique avec une incubation à 20°C. Ce principe a été appliqué dans l'optique de ralentir la progression du virus lors de sa sortie et lui permettre de s'accumuler au TGN, étape transitoire, présumée de courte durée.

De plus, bien que plusieurs études aient individuellement démontré la présence de glycoprotéines virales au TGN, aucune étude n'a évalué collectivement leur présence au site de ré-enveloppement, ce qui a été examiné dans le présent travail. En effet, en plus de déterminer le site de ré-enveloppement du virus HSV-1, nous avons testé la prédiction que la majorité des glycoprotéines virales s'accumulent à ce même site, et ce indépendamment du transport des capsides. Les résultats de ces travaux seront bientôt publiés dans *Journal of Virology*.

## Chapitre III

### Article

Cet article a été accepté le 21 mars 2005 et sera publié bientôt à la revue scientifique *Journal of Virology* sous le titre suivant :

***HSV-1 capsids transit by the TGN, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress***

Sophie Turcotte, Josée Letellier and Roger Lippé\*

Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal,

Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Note : Cet article sera également en vedette dans la section « JVI Spotlight » du journal, car il a été sélectionné par les éditeurs comme l'un des 5-10 meilleurs articles parmi ceux publiés dans le même numéro, soit un total d'environ 75 articles.

► État explicite de l'apport original, indépendant et spécifique du premier auteur, Sophie Turcotte :

J'ai moi-même fait la grande majorité du travail expérimental présenté dans cet article. En effet, des 9 figures présentées dans l'article, 8 d'entre elles consistent principalement à mon travail personnel. J'ai aussi écrit une première version de plusieurs sections de l'article, tels matériels et méthodes, résultats et légende des figures. J'ai aussi fait tous le formatage et la mise en page adéquate des 9 figures.

► Rôle joué par tous les coauteurs de l'article :

Josée Letellier a fait l'expérience de transfection avec un marqueur bien établi du transport intracellulaire permettant l'ajout d'un contrôle important. Elle a donc permis la conception de la figure 2 de l'article.

Roger Lippé a participé en grande partie à l'écriture de l'article et à la révision des textes que je lui ai fournis.

**HSV-1 capsids transit by the TGN, where viral glycoproteins accumulate  
independently of capsid egress**

Sophie Turcotte, Josée Letellier and Roger Lippé\*

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


Running title: HSV-1 capsids and glycoproteins transit by the TGN

Word count for the abstract: 208

Word count for the text: 5690

\*Corresponding author:

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



## ABSTRACT

Egress of herpes capsids from the nucleus to the plasma membrane is a complex multi-step transport event that is poorly understood. The current model proposes an initial envelopment at the inner nuclear membrane of capsids newly assembled in the nucleus. The capsids are then released in cytosol by fusion with the outer nuclear membrane. They are finally re-enveloped at a downstream organelle before travelling to the plasma membrane for their extracellular release. Although the TGN is often cited as a potential site of re-envelopment, other organelles have also been proposed, including the Golgi, ERGIC, aggresomes, tegusomes and early or late endosomes. To clarify this important issue, we followed HSV-1 egress by immunofluorescence under conditions that slow intracellular transport and promote the accumulation of the otherwise transient re-envelopment intermediate. The data show that the capsids transit by the TGN and point to this compartment as the main re-envelopment site, although a contribution by endosomes cannot formally be excluded. Given that viral glycoproteins are expected to accumulate where capsids acquire their envelope, we examined this prediction and found that all tested could indeed be detected at the TGN. Moreover, this accumulation occurred independently of capsids egress. Surprisingly, capsids were often found immediately adjacent to the viral glycoproteins at the TGN.

### 3.1 INTRODUCTION

The release of newly assembled herpesviruses requires passage through several host membranes by mechanisms that are poorly understood. Following their assembly and maturation in the nucleus, the capsids acquire a primary envelope by budding through the inner nuclear membrane (16, 58, 82) to end up in the perinuclear space, which is contiguous with the ER lumen. One model suggests these perinuclear virions escape the cell via the host biosynthetic pathway, which requires an obligatory transit through the Golgi (16, 44). However, the currently favoured model proposes that the enveloped perinuclear capsids fuse with the outer nuclear membrane to produce naked cytosolic capsids (81, 82). These would in turn acquire a secondary envelope downstream from an intracellular compartment, before reaching the plasma membrane and being released extracellularly by a second fusion event. This re-envelopment model appears valid for several, if not all, members of the herpesvirus family and is supported by several approaches, including EM, immunofluorescence, freeze-fracture, lipid content, as well as analysis of the site of tegument addition and the use of various viral mutants (23, 53, 54).

HSV-1 is a member of the herpes family that has extensively been studied for egress. Unfortunately, its relatively short life cycle makes it difficult to analyze the vectorial movement of the virus during its rapid egress. Furthermore, EM analysis often gives a static snapshot without detailed information regarding the direction of transport or sequence of events. One way to circumvent these limitations is to synchronize the infection, for example with the ts1201 strain (69), tsProt. A (29) or V701 (71). These mutants encode a thermosensitive UL26 protease, which is required for capsid maturation and DNA encapsidation (12, 29, 69, 73). Incubation at the non permissive temperature results in the accumulation of immature procapsids in the nucleus (12, 71). Upon incubation at the permissive temperature, mature capsids are formed and released in a tight synchronized wave (12, 37). Using this tool, Wilson and colleagues were able to identify an ATP requirement for capsid assembly and DNA packaging, a need for acidification of the endosomal / TGN

compartments for viral egress and evidence supporting the secondary re-envelopment egress model (10, 11, 17, 37). An important feature of this approach is the expression and transport of the individual viral proteins to their normal intracellular locations at non permissive temperature (72).

The re-envelopment model supposes the presence of an intermediate transient egress stage at an intracellular organelle where capsids acquire their secondary envelope. Several studies point to the trans-Golgi network (TGN) as site of re-envelopment, including EM (30-32, 46) and immunofluorescence (92, 93) reports. This is also corroborated by the lipid composition of extracellular virions reportedly resembling that of the TGN/Golgi (89). In addition, Wilson and colleagues showed that HSV-1 biochemically co-purifies with the TGN and/or endosomes during a synchronized infection (37). Finally, a number of viral proteins have been identified at the TGN (see below). However, the exact site of re-envelopment is unclear, since alternative sites have also been proposed, including the ER-Golgi intermediate compartment (76), post Golgi vacuoles (39), tegusomes (74), aggresomes (59), early (37) as well as late endosomes (8, 27). Given the critical role of the re-envelopment compartment in the life cycle of the virus, it is essential to identify it to permit a detailed analysis of the mechanism of re-envelopment and consider potential alternative means to control herpes infections.

The cellular compartment used for re-envelopment not only contributes an envelope to herpesviruses but also several proteins. The egress model infers the presence at the site of re-envelopment of all the viral glycoproteins found on extracellular virions. Of the 11 glycoproteins present in the viral envelope (54) gB, gD, gE/gI, gK, gM and perhaps gH have individually been reported at the TGN for HSV-1 and other members of the herpes family (1-3, 6, 14, 25, 35, 42, 52, 56, 75, 83, 96, 97). However, not all studies used established cellular markers to confirm their precise locations. Furthermore, no study collectively evaluated the presence of the different viral glycoproteins at the site of re-envelopment in the context of an infection.

HSV-1 glycoproteins, like host glycoproteins, are synthesized at the ER and travel through the Golgi and TGN before reaching their final destination. Various inhibitors of this pathway have been used in the past to perturb cellular and viral glycoproteins transport, including monensin (44, 88), tunicamycin (65, 88) and BFA (18, 92). Furthermore, intracellular transport is a temperature dependent process. For instance, all transport steps are normally arrested at 4°C (40, 47, 80). In the case of the biosynthetic pathway, incubation at 20°C reversibly and specifically stops newly made proteins in the TGN (34, 51, 77). Given the common route of transport between host and viral glycoproteins, viral egress should also be sensitive to a 20°C temperature shift. This was an interesting option given the suggestion in the literature of the TGN as site of herpes re-envelopment. Although the biogenesis of the individual herpes proteins does not necessarily define the site of re-envelopment, one predicts that the viral glycoproteins and capsids should meet there.

To better understand HSV-1 egress, we set to examine the site of HSV-1 capsid re-envelopment and the concomitant presence of the viral glycoproteins. To this end, we first synchronized the infection with V701, encoding a thermosensitive protease in strain 17, and a 20°C chase to arrest the intracellular transport out of the TGN. The data show that the synchronization protocol worked as anticipated. Using established subcellular markers, we further found a prevalence of capsids at the TGN, while some colocalized with early endosomes. Surprisingly, we also found that a GFP tagged wt virus (strain KOS) also accumulated at the TGN, pointing at the potency of the 20°C block to arrest capsid egress and the extension of the results to two different strains. In addition, all the viral glycoproteins tested were present at the TGN, confirming its likely importance as the main site of re-envelopment. However, in contrast to the other glycoproteins, gB and to some extent gL did not completely colocalize with the TGN46 marker. As expected, the accumulation of the viral glycoproteins at the TGN occurred independently of capsid egress. Surprisingly, while some capsids colocalized with both the TGN and viral glycoproteins, many seem to be immediately adjacent. These results confirm the above predictions and are consistent with the re-envelopment egress model.

### 3.2 MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** Baby Hamster Kidney (BHK), Vero and human 143B osteosarcoma tumour cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Medicorp), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For 143B cells, 15 µg/ml 5-Bromo-2'deoxyuridine (BUdR) (Sigma-Aldrich) was added in the medium, except upon infection. The HSV-1 V701 ts 80-1C2 mutant (strain 17), supplied by Bruce Register and Jules A. Shafer (71), is identical to the well characterized ts1201 mutant, which encodes a thermosensitive UL26 protease (69). The HSV-1 K26GFP mutant (strain KOS) carries a GFP tagged capsid protein VP26 and was kindly provided by Phrasant Desai (21). Both viruses were propagated on BHK cells and titrated on Vero cells.

**Antibodies and reagents.** Immunohistochemical staining was performed using antibodies against TGN46 (Serotec), EEA1 (given by Marino Zerial), LBPA (provided by Jean Gruenberg), SKL (obtained from Rick Rachubinski) and calnexin (Stressgen Biotechnologies). Anti-golgin-97, BSA complexed NBD labelled C<sub>6</sub>-ceramide, LysoTracker Red DND-99 as well as Alexa 350, 488 and 568 secondary antibodies were all from Molecular Probes. Viral glycoproteins antibodies were generously provided by various laboratories: MAb 1D3 (gD) was from Roselyn J. Eisenberg and Gary H. Cohen, while MAb 3104 (gI) was from Nigel Stow. David Johnson provided MAb 15βB2 (gB), 3114 (gE) and anti-syn1 (gK), while LP11 (gH) was from Helena Browne and MAb VIII 87-1 (gL) was from Patricia G. Spear. Finally, two distinct VP5 antibodies were used. MAb 8F5 (kindly provided by Jay Brown) is specific for VP5 present in mature capsids (86). Alternatively, the antibody ICP5 (Virusys Corporation) was used to detect total VP5 (i.e. both mature and immature capsids).

**VSV G plasmid transfection.** 143B cells were cultured on glass coverslips in DMEM without antibiotics or BUdR until 60-70% confluence was reached. Cells in 24-well plates were then transfected with 0,8 µg pVSV G3 (SP) GFP, using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). This



plasmid was obtained from Patrick Keller and encodes a GFP tagged thermosensitive Vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV G tsO45). After an initial incubation of 4 hours at the non permissive temperature (39°C) in transfection medium (i.e. without serum), the medium was replaced with medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 10 mM sodium butyrate (Research Chemicals Ltd). Cells were cultured for an additional 24 hours at 39°C before switching them to 20°C in CO<sub>2</sub> independent medium supplemented with 4 mM L-glutamine for 2 hours to allow the egress of VSV G tsO45 to the TGN. When indicated, VSV G tsO45 was chased out of the TGN by incubation at 31°C for various times. Cells were then fixed, permeabilized and immunofluorescence staining performed as below.

**Infection.** Cells were plated in DMEM (without BUdR for 143B) on glass coverslips in 24-well tissue culture plates and grown overnight. Cells were mock treated or infected with HSV-1 K26GFP or HSV-1 V701 at a multiplicity of infection of 5 for 1 hour at 37°C. Cells were then grown at 39°C (V701) or 37°C (K26GFP) for 7 hours. Thirty minutes prior to downshift, 20 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) was added to ensure a single pulse of viral assembly (12). Cells were then shifted to 20°C for the times indicated. To reverse the 20°C block, the samples were subsequently incubated at 31°C for various periods. Finally, 20 µM nocodazole (Sigma) was added at 11 hpi for 2 hours when indicated. All samples were treated for immunofluorescence or analyzed by plaque assays as indicated below.

**Plaque assays.** Infected 143B grown in 60 mm dishes were infected as above with V701 and incubated at 39°C for 7 hours to accumulate the capsids in the nucleus and at 20°C for 6 hours to chase them to the TGN. When indicated, the 20°C block was released at 31°C for 24 hours. As a control, we incubated the cells at 39°C for 7 hours followed by a chase of 30 hours at 31°C. In each case, the extracellular medium was collected and the virus concentrated 1 hour at 39 000 g. The viral pellet was resuspended in MNT (30 mM MES (Sigma), 100 mM NaCl (Fisher Scientific), 20 mM Tris (Rose Scientific) at pH 7,4) and titrated on Vero cells.

**Immunofluorescence staining.** Uninfected, infected or transfected cells were washed in PBS, fixed in 3% paraformaldehyde for 30 min on ice, washed with PBS and neutralized with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 30 min at room temperature (RT).

Samples were permeabilized with 0,1% Triton X-100 for 4 min and blocked with 10% FBS in PBS for 20 min at RT before being washed and stained 30 min at RT with primary antibodies diluted in 10% FBS/PBS. Cells were then washed with PBS and incubated 20 min with secondary antibodies diluted in PBS and washed again. Samples were mounted on glass slides in Mowiol containing 0,1 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei, except when performing triple colocalization experiments, in which case the Hoechst was omitted.

**Fluorescence microscopy and image processing.** Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide field fluorescence microscope (Zeiss) equipped with filters and a Retiga 1300 Camera (Q Imaging). The images were acquired and analyzed with the Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging). They were processed and assembled with Photoshop 6.0 (Adobe). To better reveal the colocalization between gB and the TGN, we performed a Boolean analysis of the images according to Douglass and colleagues (22). In brief, overlays were analyzed with the Boolean operator “AND”, whereby any green (ex: gB<sup>+</sup>/TGN46<sup>-</sup>) or red only pixels (ex: gB<sup>-</sup>/TGN46<sup>+</sup>) were converted to black, while yellow pixels (ex: colocalizing gB<sup>+</sup>/TGN46<sup>+</sup>) were left yellow. This is merely a mean to visually enhance colocalization.

**Confocal microscopy and Z slices:** Confocal microscopy was performed with a Leica DM IRBE Inverted Microscope equipped with a Leica SP1 spectrometer and argon (488 nm), argon/krypton (568 nm) and helium/neon (647 nm) lasers. A set of 22 optical slices, collected at 126 nm steps for a combined thickness of 2.77 microns, was acquired with a 100X objective and a pinhole of 0.75. The images were processed as above.

### 3.3 RESULTS

**Choice of cell line.** BHK cells are often used to propagate and study HSV-1, given their fast growth, susceptibility to HSV-1 infection and good morphology by microscopy. However, a number of studies have indicated that infection by HSV-1 alters the integrity of the Golgi in some cell lines (4, 9), a phenomenon attributed to gK (26). It was not known however whether the infection also perturbs the TGN. Since it may be the site of capsid re-envelopment, we set to evaluate if that compartment remains intact upon infection and hence whether BHK cells could be used for our studies. In parallel, we used 143B cells whose Golgi has been documented to resist disruption by HSV-1 (9). We therefore infected BHK and 143B cells with K26GFP virus, a GFP labelled HSV-1 virus, for its easy monitoring by immunofluorescence microscopy. To minimize the impact of the infection on the morphology of the cells, but to permit sufficient assembly of capsids, we chose to examine the cells at 7 hpi (12). As expected, the results indicate that the virus substantially perturbed the morphology of the Golgi in BHK, but not in 143B cells (Fig. 1). In BHK cells, the virus also disrupted the TGN, rendering difficult the use of that cell line for our assays. In contrast, the morphology of the TGN was relatively intact in infected 143B cells, at least at the times examined (Fig. 1). It should be noted that HSV-1 did partially disrupt the TGN in some 143B cells by 7 hpi and in most cells late in infection (data not shown). This nonetheless allowed us to pursue our study with the 143B cell line.

**Block of intracellular transport at 20°C.** Given that newly synthesized HSV-1 glycoproteins travel through the biosynthetic pathway (see introduction) and that HSV-1 capsids are often presumed to join this pathway at the TGN, this opens the possibility to trap the virus at that stage and facilitate their detection at this otherwise likely transient step. To first insure that it is possible to perform a block of intracellular transport in 143B cells, we examined a well established marker for the biosynthetic pathway, namely VSV G tsO45. This transmembrane mutant viral protein has been widely used to study membrane transport, because of its retention in the ER at 39°C, its accumulation in the TGN at 20°C and its ability to move out of

the TGN and reach the cell surface when the temperature is shifted to 31°C (13, 19, 34, 50, 68, 78, 85). We therefore transfected 143B cells with a plasmid coding GFP tagged VSV G tsO45 and followed by immunofluorescence its transport at different temperatures. The data confirm that VSV G accumulates at the ER at the non permissive temperature (Fig. 2, panel A) and travels to the TGN but failed to reach the plasma membrane at 20°C (Fig. 2, panel B). In contrast, VSV G could reach the plasma membrane at 31°C (see arrows in Fig. 2, panels C and D), despite a significant remaining intracellular pool consistent with the literature. The intracellular transport in 143B cells can therefore be modulated by a 20°C block.

**Kinetics of viral egress.** Considering that HSV-1 infections proceed very quickly, we wished to synchronise the viral egress to more readily identify the site of re-envelopment. To achieve this goal, we chose the mutant HSV-1 V701, which is identical to the ts1201 strain and encodes a thermosensitive protease. Building on our knowledge that egress of cellular and viral proteins out of the TGN is hampered in 143 cells by an incubation at 20°C (Fig. 2), we accumulated the capsids at 39°C and chased them at 20°C instead of the usual permissive temperature in an attempt to slow down viral egress and accumulate the virus at the TGN. Our reasoning was that under these conditions, the virus may accumulate at the TGN if it is an important egress station, thus making them easier to detect. To monitor the TGN, we labelled it with TGN46, an established marker for this organelle (66, 67). In order to follow capsids exiting the nucleus, we used 8F5, an anti-VP5 monoclonal that only recognizes VP5 present on mature capsids (86) (Fig. 3, panels B-C). However, to detect the immature capsids in the nucleus at 39°C we used ICP5, a commercial antibody detecting all VP5 proteins (Fig. 3, panel A). Figure 3 shows that the bulk of virus required a minimum of 4 hours at 20°C to leave the nucleus (data not shown for shorter times). In some experiments, it was necessary to incubate the cells another hour or two to fully chase the virus, so we picked 6 hours (Fig. 3C). Interestingly, the capsids seem to accumulate at or near the TGN under these conditions.

To ensure this colocalization was not an artefact, we chased the capsids out of the TGN with an additional 31°C incubation and determined their intracellular location by immunofluorescence. Based on the results of Wilson and colleagues

(12), we opted to examine the virus after a chase of 2-4 hours at 31°C. The data show that the virus could indeed escape the TGN at 31°C and reach the periphery of the cells (Fig. 3, panels D-F). Furthermore, to examine whether the 20°C block was specific to the V701 mutant, we infected the cells with the GFP labelled wild type virus (K26GFP) for 7 hours at 37°C and chased it at 20°C for 4 or 6 hours. To our surprise, the 20°C block also caused the accumulation of the wild type virus at the TGN (Fig. 3, panels G-I). Finally, we confirmed by plaque assay the reversibility of the 20°C block by measuring the virus released extracellularly. To insure that the bulk of the virus could escape the cells, we released the block with a longer incubation at 31°C. Figure 4 shows that hardly any virus escaped the cells after 6 hours at 20°C. In contrast and consistent with our immunofluorescence data (Fig. 3), the virus escaped the TGN when further incubated at 31°C for 24 hours (Fig. 4). The amount of virus in the medium nearly reached the level found in the control infection chased for the entire period at 31°C (i.e. 30 hours). These results show that the 20°C block is reversible and that the capsids are not aberrantly accumulating at the TGN. This suggested that the TGN is a major egress station for HSV-1 and that the accumulation of the virus at the TGN was not due to the mutation in the protease or an artefact. Given our results, we used incubations of 7 hours at 39°C (V701) or 37°C (K26GFP) followed by 6 hours at 20°C as our standard protocol.

**Site of re-envelopment.** Our results already suggested that the virus transits by the TGN. To confirm this and identify the putative site(s) of re-envelopment, we examined the colocalization of HSV-1 capsids with various subcellular markers by immunofluorescence. Using our previously established kinetic and 20°C block, we confirmed our previous finding that capsids travel to the TGN (Fig.5, panels A-C). As pointed out above, the TGN was not always tightly packed in 143B infected cells. However, the capsids still colocalized with the TGN, even when dispersed (Fig. 5, panels D-F). As an independent control, we used NBD labelled ceramide, a fluorescent marker that stains lipids present in both the Golgi and TGN (48, 49, 61, 62), and found that the dye stained the region where the virus was found (data not shown). Thin slice analysis (Z stacks) by confocal further confirmed the colocalization of V701 and K26GFP capsids with the TGN46 (data not shown).

Despite these findings, some virus did not colocalize with either the nucleus or TGN. To address where they might be, we tested various other organelle markers. Upon staining of the early endosomes with an EEA1 antibody (Fig. 5G-I), we detected some minor colocalization of capsids with the EEA1 marker, suggesting a potential secondary re-envelopment site. Unfortunately, staining of peroxisomes or late endosomes was unsuccessful in these cells with the antibodies tested. However, staining of lysosomes with lysotracker (Fig. 5J-L), the ER with calnexin or the Golgi with golgin-97 failed to show any colocalization (data not shown), indicating that the capsids are not reaching intracellular compartments randomly. Clearly, while some virus perfectly colocalized with the TGN46 marker, some seem immediately adjacent to it, a phenomena repeatedly observed (see for example Fig. 3). To be sure that the capsids were at the TGN, we incubated the cells with nocodazole, a drug that disassembles microtubules and disperses the TGN (94). Figure 6 confirms the disruption of the TGN by the drug. More important, many capsids, although not all, were also redistributed and remained associated with the TGN46 marker. Taken together, these results implicate the TGN as an important compartment for HSV-1 re-envelopment, while early endosomes may represent a secondary site of re-envelopment.

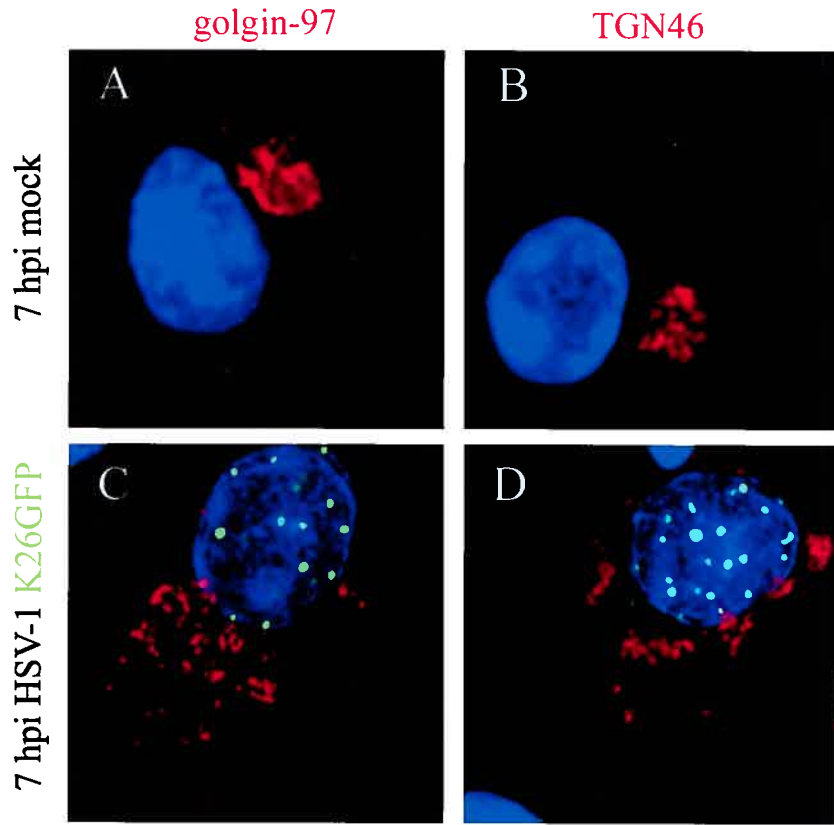
**HSV-1 glycoproteins localize to the TGN at 20°C.** The current model of egress stipulates that the viral glycoproteins present in the final envelope should be present at the site of re-envelopment. To confirm this, we examined their localization by immunofluorescence. Antibodies reactive with various viral glycoproteins were used to stain infected 143B cells according to the viral kinetic established earlier (i.e. with the 20°C block). Immunofluorescence analysis revealed a clear colocalization of the HSV-1 glycoproteins gD, gE, gH and gI with the TGN46 marker (Fig. 7). In addition, gB and to some extent gL also localized to the TGN, but not completely (see Fig. 7, panels M-R). To confirm that the more weakly TGN associated gB really colocalized with the TGN, we processed the overlays with a Boolean approach (22) to better reveal the colocalization signal. Hence, all overlapping green (capsids) and red (TGN) pixels were left untouched (i.e. yellow), while all other pixels were converted to black (see Materials and Methods for details). The data confirmed that

while partial, a significant colocalization of gB with the TGN46 marker was nonetheless detectable (inset of Fig. 7, panel R).

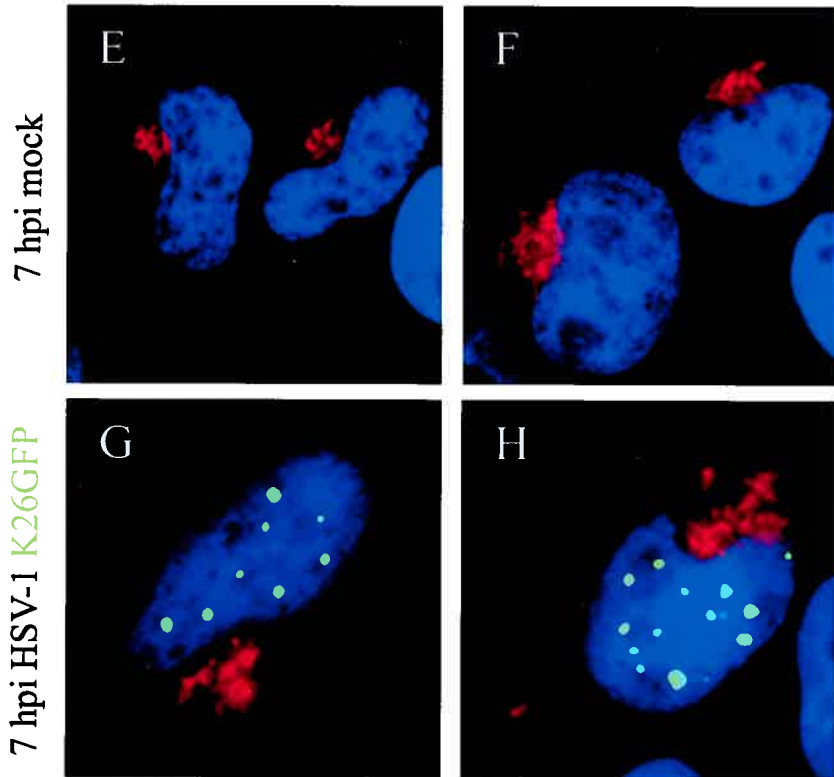
Given the presence of the viral capsids and glycoproteins at the TGN, we examined whether they colocalized with each other. Unfortunately, we could not perform triple labelling experiments with V701, since two of the three antibodies were from the same species and attempts to use the Zenon technology or direct antibody coupling (Molecular Probes) were not successful. Consequently, we used K26GFP and antibodies against TGN46 and the viral glycoproteins. Figure 8 confirms that the three viral glycoproteins tested localized extensively with TGN46. However, only a partial colocalization of the capsid, glycoprotein and TGN was detected (see arrows in Fig. 8). Thus, capsids and viral glycoproteins accumulated at the TGN, although not necessarily at the exact same site.

**The viral glycoproteins travel to the TGN independently of capsid egress.** So far, the results are consistent with the re-envelopment of HSV-1 capsids by membranes of the TGN, where the viral glycoproteins accumulate. To examine whether the viral glycoproteins precede the capsids at the TGN, we examined their localization in the absence of capsid egress. To address this issue, we made use of the V701 mutant that expresses all viral proteins, yet accumulate its newly formed capsids in the nucleus at the non permissive temperature. We examined the localization of the viral glycoproteins after an incubation of 7 hours at 39°C, but without the subsequent chase at 20°C. It should be noted that under these conditions, the capsids do not escape the nucleus (Fig. 3, panel A). Our colocalization results clearly demonstrated that once again all the glycoproteins were present at the TGN (Fig. 9). Consistent with our previous results, gB was only partially present in the TGN (Fig. 9, panel R and inset). Oddly, gL now repeatedly colocalized near perfectly with the TGN (Fig. 9, panel O).

BHK cells

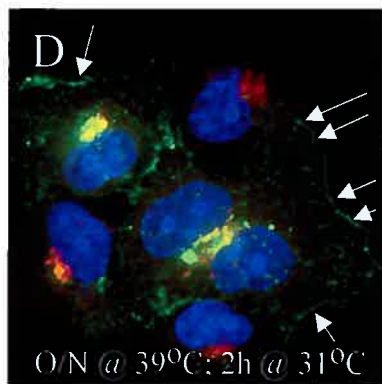
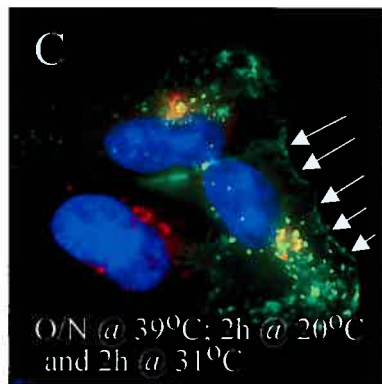
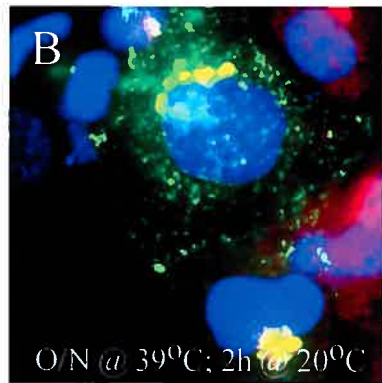
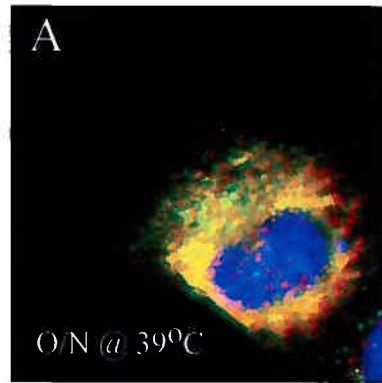


143B cells



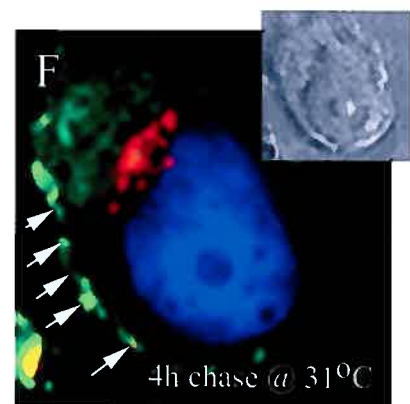
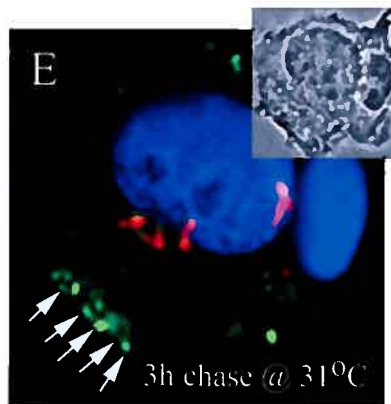
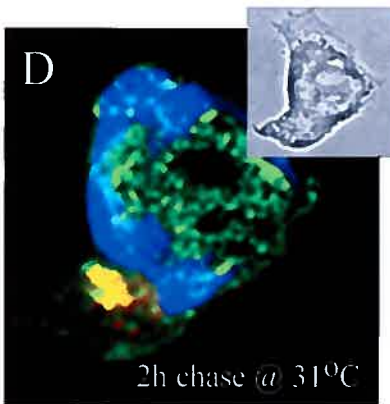
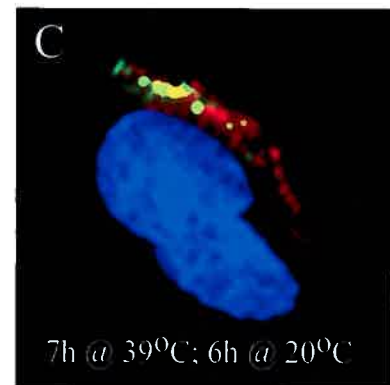
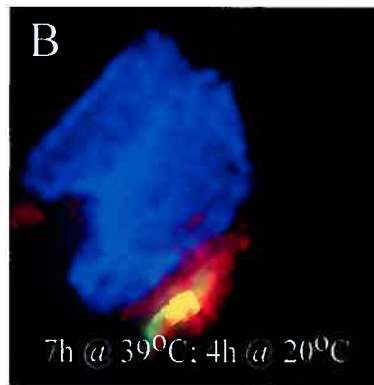
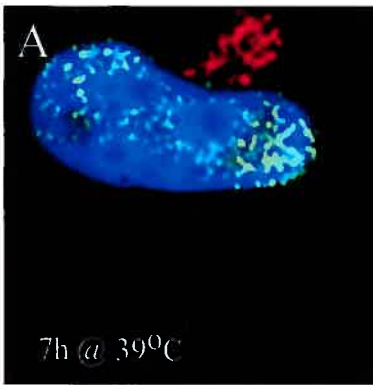


**Fig. 1: Choice of cell line.** To assess the disruption of the Golgi and TGN upon HSV-1 infection, BHK and 143B cells were mock treated or infected with HSV-1 K26GFP for 7 hours at 37°C and labelled in parallel with golgin-97 (Golgi) or TGN46 (TGN) primary antibodies followed with Alexa 568 secondary antibody. The samples were then examined by immunofluorescence (green: virus; red: Golgi or TGN). Comparison between BHK mock-infected cells (panels A, B) and BHK infected cells (panels C, D) demonstrated a clear disruption of the Golgi and the TGN upon infection. In contrast, the morphology of the Golgi (panels E-G) and the TGN (panels F-H) were usually intact for 143B cells.

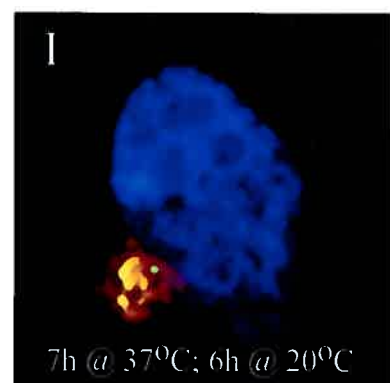
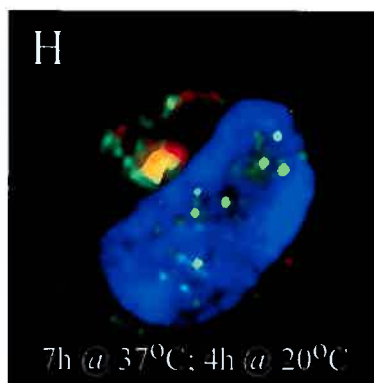
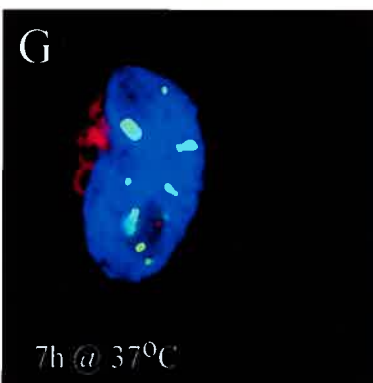


**Fig. 2: Transport of the control VSV G ts045 glycoprotein at different temperatures.** 143B cells were transfected with GFP tagged VSV G tsO45 and incubated at 39°C (non permissive temperature) for 24 hours and examined immediately by immunofluorescence (panel A) or following a further 2 hours at 20°C (panel B) or 31°C (panel D). In panel C, the cells were incubated at 39°C for 24 hours, then at 20°C for 2 hours and finally chased at 31°C for another 2 hours. In panels B-D, the cells were fixed and stained for TGN46 (in red), whereas in panel A they were stained with calnexin (an ER marker – also in red). As expected, VSV G tsO45 was transported to the TGN at 20°C (panel B) and could reach the plasma membrane at 31°C (see arrows in panel D). Upon release of the 20°C block, the block was reversed and the protein reached the cell surface (see arrows in panel C). Please note that under these conditions, only a portion of VSV G tsO45 travels to the plasma membrane at the permissive temperature, as widely reported in the literature.

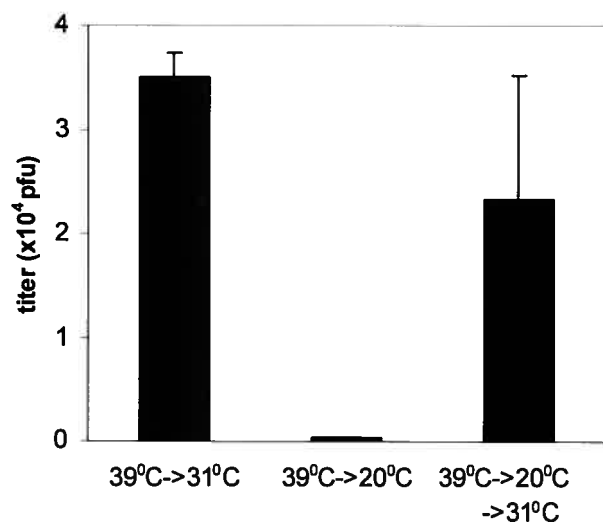
## HSV-1 V701



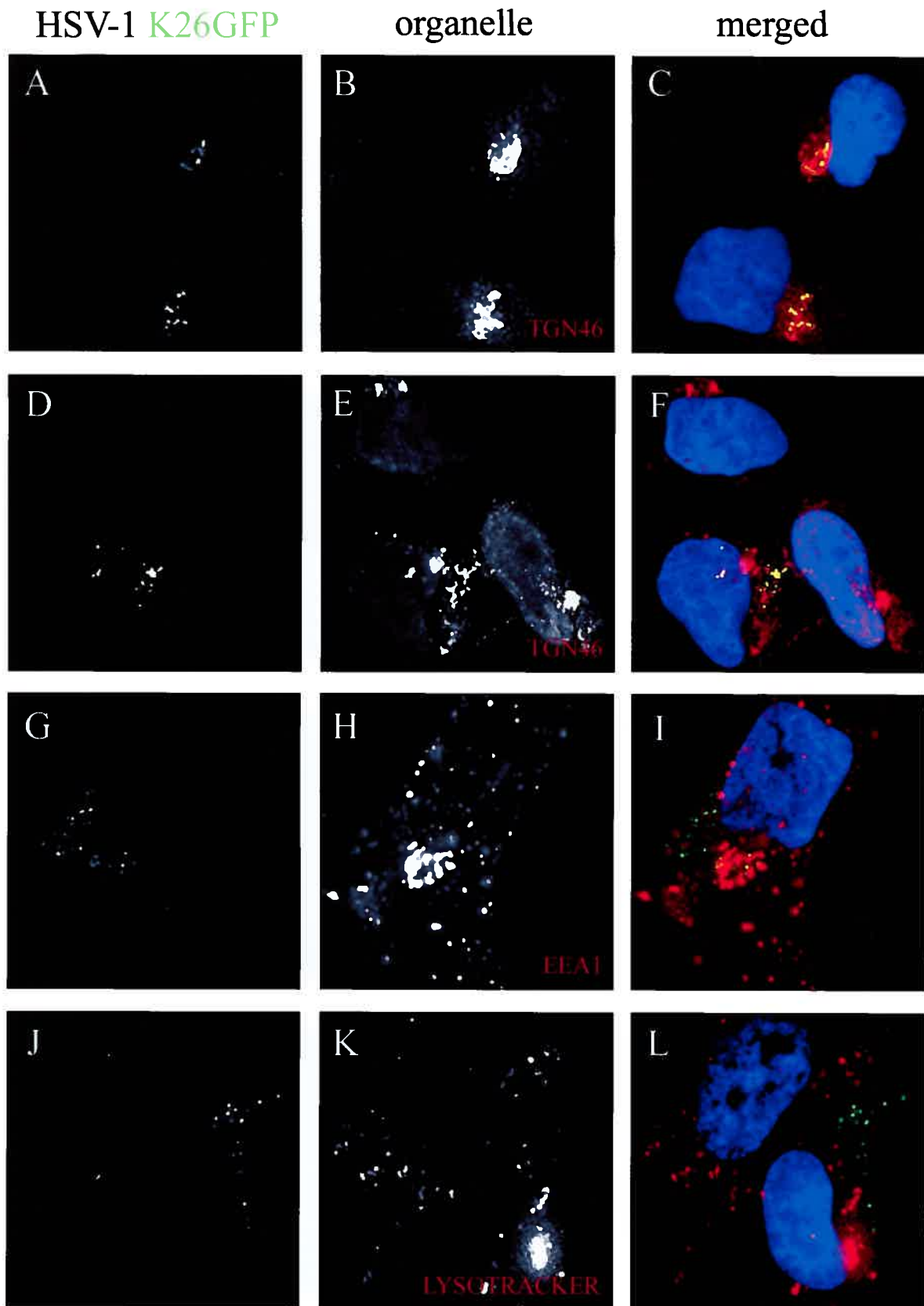
## HSV-1 K26GFP



**Fig. 3: Viral kinetics.** 143B cells were infected with HSV-1 V701 for 7 hours at the non permissive temperature (panels A-F). Following the accumulation of immature capsids in the nucleus (panel A), the capsids were chased out by incubation at 20°C for 4 and 6 hours (panels B, C). To release the 20°C block, the cells were additionally incubated at 31°C for 2-4 hours (panels D-F). The samples were then fixed and stained with antibodies specific for the TGN (red) and the viral capsid protein VP5 (green). The antibody ICP5 (detecting total VP5) was used in all panels, except in panels B and C where the antibody 8F5 (detecting VP5 present in mature capsids only) was used. The arrows in panels E-F denote the presence of virus at the periphery of the cells, as revealed by phase contrast (see insets). For comparison, 143B cells were also infected with the wild type GFP labelled virus (K26GFP) and chased at 20°C for 4 and 6 hours (panels G-I) (K26GFP in green and TGN in red). Note that both viruses showed a similar egress kinetic.

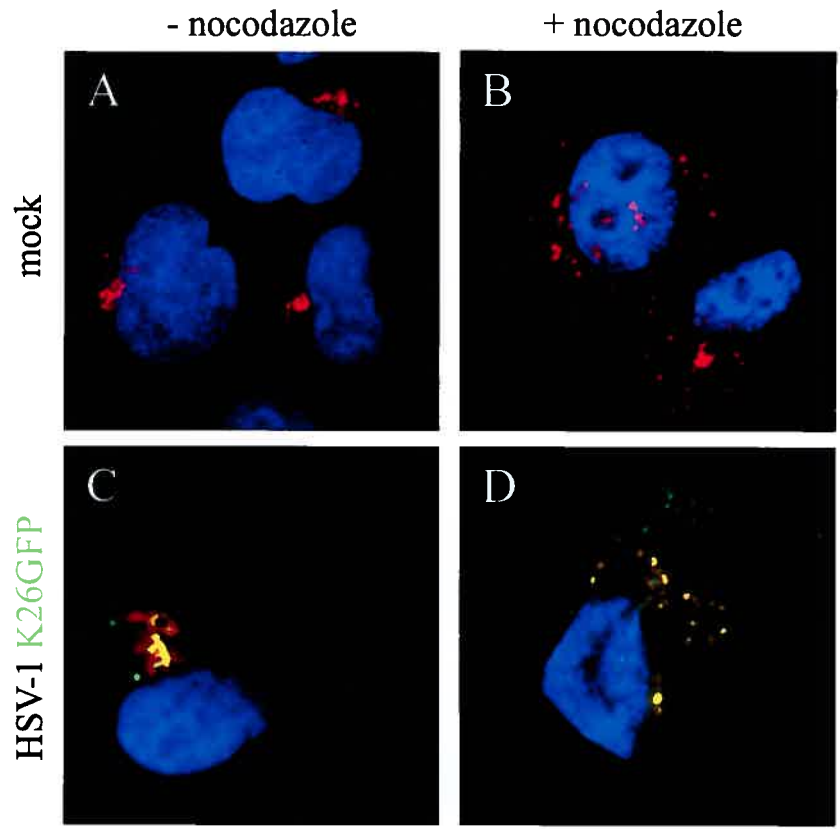


**Fig. 4: Titration of extracellular virus on Vero cells.** 143B cells were incubated with HSV-1 V701 for 7 hours at 39°C and then at 20°C for 6 hours. The 20°C block was reversed by an incubation at 31°C for 24 hours. The control cells were incubated for 30 hours at 31°C without the 20°C block. The extracellular medium was collected and titrated on Vero cells for 4 days at 31°C.

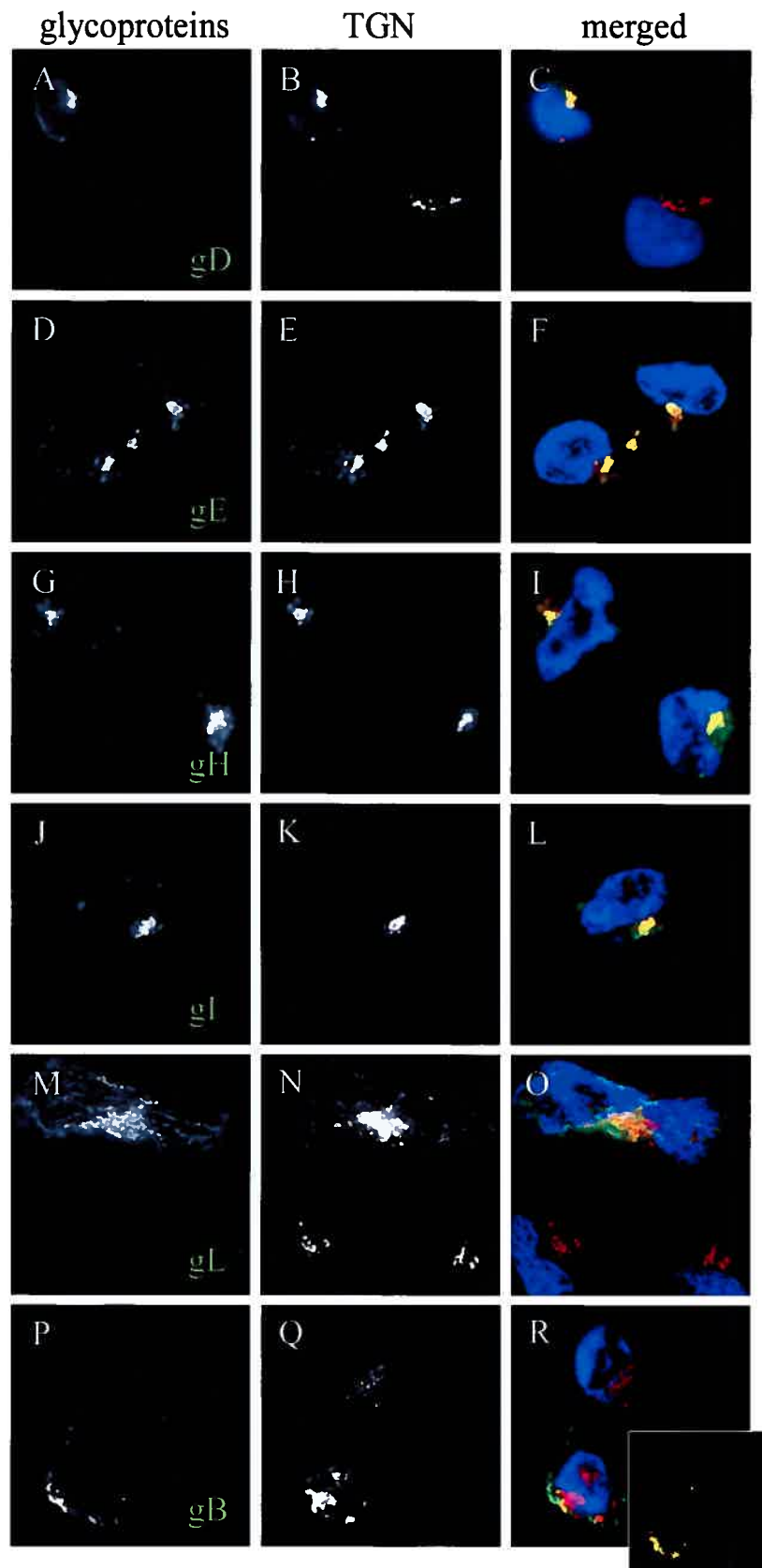




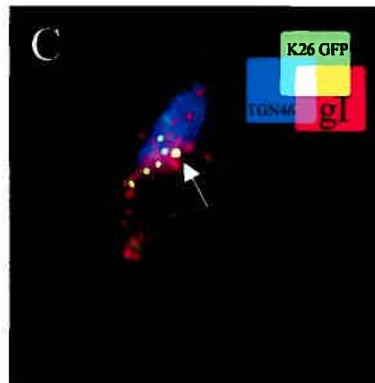
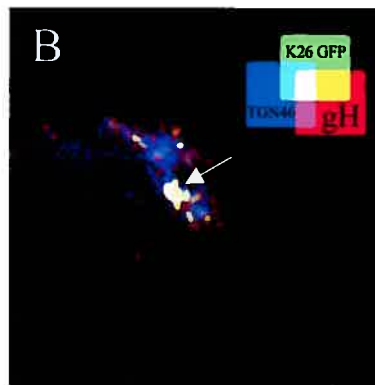
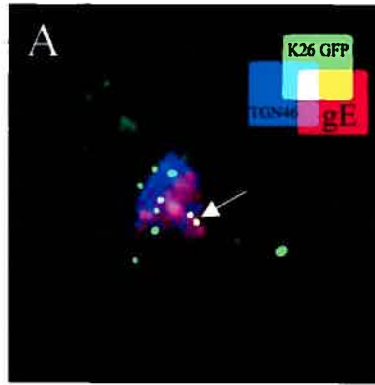
**Fig. 5: Colocalization of capsids with the TGN.** 143B cells were infected with wild type K26GFP virus (in green), incubated for 7 hours at 37°C and chased at 20°C for 6 hours. They were then fixed and stained for various subcellular markers (in red), including TGN46 (panels A-F), EEA1 (panels G-I) and LysoTracker (panels J-L).



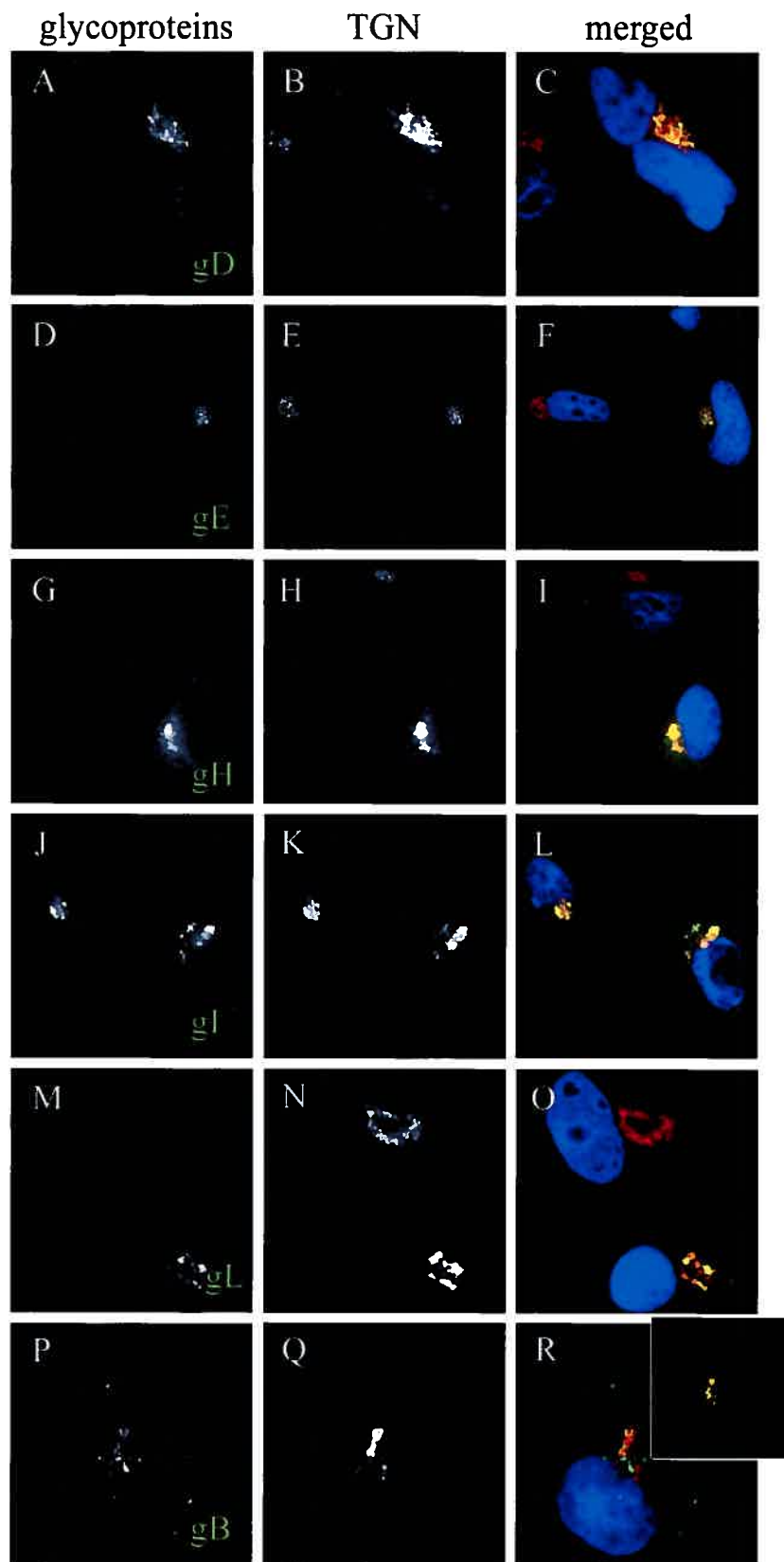
**Fig. 6: Confirmation of the presence of capsids at the TGN by disruption of the TGN with nocodazole.** To disrupt the TGN, mock treated (panels A, B) or HSV-1 K26GFP infected (panels C, D) 143B cells were treated with 20  $\mu$ M nocodazole for the last 2 hours of the 20°C chase and labelled with TGN46 primary antibodies (in red). Comparison between untreated (panels A, C) and treated cells (panels B, D) demonstrated a clear disruption of the TGN when nocodazole was added. K26GFP capsids (in green) largely remained associated with the TGN46 marker, even when the TGN was disrupted by the drug.



**Fig. 7: Presence of viral glycoproteins at the TGN.** 143B cells were infected with V701 and stained with TGN46 (in red) and antibodies against various viral glycoproteins (in green), including gD (panels A-C), gE (panels D-F), gH (panels G-I), gI, (panels J-L), gL (panels M-O) and gB (panels P-R). All glycoproteins showed a strong colocalization with TGN46, with the exception of gB, and to some extent gL, which were also found elsewhere. For gB, which showed the weakest co-localization with the TGN, the overlay was treated by a Boolean analysis so that only the overlapping green and red pixels are shown, as described in Materials and methods as well as the results (see inset of panel R).



**Fig. 8: Colocalization of viral glycoproteins with capsids and TGN.** 143B cells were infected with wild type K26GFP virus (in green) to allow the three colors staining. Cells were incubated for 7 hours at 37°C and chased for 6 hours at 20°C. They were then fixed and stained with antibodies specific for the TGN (blue) and against viral glycoproteins gE (panel A), gH (panel B) or gI (panel C) in red. It should be noted that the three color staining prohibited us from staining the nuclei and hence distinguish the capsids still trapped in the nucleus. The arrows show the site of partial colocalization of the capsids with both the TGN46 and glycoproteins (white labelling).





**Fig. 9: Transport of the viral glycoproteins to the TGN independent of capsid egress.** 143B cells were treated as in figure 7, except that they were analyzed immediately after the incubation of 7 hours at non permissive temperature (without any 20°C chase). They were stained with TGN46 (in red) and the viral markers (in green). All the glycoproteins localized at the TGN, although gB was also detected elsewhere as before. Unlike Fig. 7, gL was only found at the TGN. The inset of panel R shows the Boolean analysis for gB, as performed in Fig. 7.

### 3.4 DISCUSSION

The current model of herpes egress stipulates that the viral capsids escape the nuclei by budding and fusion through the two nuclear membranes, thereby releasing naked capsids into the cytosol. The capsids then acquire a secondary and final envelope, which is found on the extracellular virions. Three simple predictions can be derived from this model, namely that i) the capsids acquire their envelope from a compartment other than the nucleus, ii) the viral glycoproteins found in the extracellular virions should accumulate at the site of re-envelopment and iii) the viral glycoproteins likely precede the capsid where they acquire their envelope.

This study examines the above predictions using a 20°C temperature chase to arrest the transport out of the TGN. We reasoned that if the virus uses the TGN for capsid re-envelopment, the capsids and glycoproteins should accumulate there, thereby promoting the likely transient accumulation of re-envelopment capsid intermediates. For these studies, we used the 143B cell line, since both the morphology of the Golgi and TGN proved relatively resistant to HSV-1 disruption under the conditions used (Fig. 1), a result which greatly facilitates the interpretation of the immunofluorescence images. We also confirmed that the 143B cell line behaves as expected when incubated at 20°C. To this end, we used the well studied VSV G tsO45 protein (Fig. 2), known to reversibly be arrested at the TGN at 20°C when newly synthesized (see introduction). Finally, we determined the kinetics of egress of V701 and found that capsids arrested in the nuclei at the non permissive temperature accumulated in the TGN at 20°C and could be chased to the cell surface at 31°C (Fig. 3, panels A-F). Surprisingly, a wild type virus encoding a normal UL26 protease behaved the same way as the V701 mutant (Fig. 3, panels G-I), hinting at the potency of the 20°C block. This is important, since it shows that the results are not specific for the mutated V701 virus, applies to “wt” virus (albeit GFP labelled), two different viral strains (17 and KOS respectively) as well as two different cell lines (see below). This accumulation was unlikely an artefact, as the block was reversible as determined by immunofluorescence (Fig. 3, panels D-F) and plaque assays (Fig. 4). Furthermore, our conclusion is supported by other reports pointing at the TGN as site of re-envelopment

for herpesviruses in the absence of a 20°C temperature block (30, 32, 33, 37, 45, 46, 79, 82, 89, 92, 96). In addition, this block has extensively been used since the mid 1980's with no report to our knowledge of artefactual localizations. It has in fact been instrumental in elucidating transport along the biosynthetic pathway.

Using the above parameters and various subcellular markers, our data show a reproducible colocalization of the viral capsids with the TGN (Fig. 5, but also Fig. 3). Two distinct markers, including TGN46 and NBD ceramide (a marker of lipids found in both the Golgi and the TGN (48, 49, 61, 62)), corroborated these findings. This was supported by confocal analyses (data not shown) and disruption of the TGN by nocodazole, where capsids remained associated with TGN46 (Fig. 6). Although the TGN was not always the tightly packed perinuclear structure one could hope for, the capsids were nonetheless found at or near the TGN46 marker whether the TGN was tightly packaged or not (fig. 5). Finally, the capsids also colocalized with the much dispersed TGN in BHK cells at 20°C (not shown). In contrast, capsids were not found in lysosomes, the ER or the Golgi, indicating the virus does not randomly acquire an envelope from other cellular compartments (Fig. 5 and data not shown). A few capsids seem to co-label with EEA1, a typical marker of early endosomes (57). We were intrigued by the possible presence of capsids at two different compartments. Given that the viral glycoproteins recycle to the TGN from the plasma membrane via endosomes (2, 5, 7, 15, 42, 60, 63, 70, 84, 87, 90, 91), it is possible that the capsids were recruited to early endosomes because of the presence of recycling viral glycoproteins. This would be consistent with the results of Wilson and colleagues, which found HSV-1 capsids in both TGN and early endosomes fractions (37). However, the partial colocalization of EEA1 and TGN46 in 143B cells complicates the interpretation of the results (data not shown). Taken together, these findings support the TGN as major re-envelopment site, consistent with various studies implying the TGN as source of secondary envelope (30, 32, 33, 37, 45, 46, 79, 82, 89, 92, 96), while a secondary re-envelopment site at the early endosomes cannot formally be ruled out

Given that the glycoproteins present on the extracellular virions need to be incorporated at the site of re-envelopment, we examined their cellular localization.

Not surprisingly, the glycoproteins tested were all present at the TGN upon an HSV-1 infection (Fig. 7). This confirms our results and extends previous publications that individually reported accumulation of HSV-1 glycoproteins at the TGN (3, 5, 14, 25, 52, 56). An interesting case was gB, and to some extent gL, which were clearly found at the TGN, but not as completely as for the other viral glycoproteins (Fig. 7). Presumably, their amount at the TGN is sufficient to support viral entry at the next round of infection into the neighbouring cells. The significance of their accumulation in other compartments is unclear at present and may reflect additional functions. Moreover, we cannot readily explain the partial presence of gL at the TGN at 20°C (Fig. 7), but its near complete colocalization at 39°C (Fig. 9). However, given that gL targeting to the TGN is dependant on its association with gH (41), it is possible that their association at 20°C may be incomplete.

We also examined the localization of the viral glycoproteins in the absence of capsid egress. We made use of the V701 mutant, whose capsid egress is severely impaired at the non permissive temperature, and examined whether the viral glycoproteins still migrated to the TGN without the 20°C chase. Importantly, all capsids are fully retained in the nucleus under these conditions (Fig. 3). The results confirmed that all viral glycoproteins examined were detectable at the TGN at 39°C in the context of an infection (Fig. 9). These results once again support the TGN as the site of re-envelopment. They are also consistent with the targeting of viral glycoproteins to the TGN in transfected cells (1, 14, 24, 96, 97) and by the presence of TGN targeting signals in some glycoproteins (2, 3, 24, 43, 52, 97). The possible transport of the glycoproteins independent of capsid egress in axons (38, 55, 56, 64) would also be consistent with this view, but remains disputed (20). Taken together, the data strongly support the notion that the transport of the viral glycoproteins to the TGN is independent of capsid egress. Interestingly, Browne and colleagues (14) recently showed that gM targets several viral glycoproteins to the TGN. Similarly, some of the glycoproteins may contain information that promotes targeting of the capsids to the TGN. However, reports of the interaction between viral glycoproteins and teguments hint at an indirect targeting mechanism (28, 36, 53, 95).

Surprisingly, capsids colocalized with the TGN, but were often immediately adjacent to the TGN46 marker. This was evident by wide field microscopy (Fig. 3, 6) and confocal (data not shown). Furthermore, in triple labelling experiments, the capsids and glycoproteins did not always perfectly colocalize (Fig. 8). It may be that some capsids are in the lumen of the TGN, while others are in the process of re-envelopment. EM analyses are currently under way to examine these possibilities.

In conclusion, although we cannot rule out a contribution by endosomes, our results strongly hint at the TGN as the major site of re-envelopment, since both capsids and viral glycoproteins predominantly accumulate there. Moreover, the glycoproteins travel to the TGN independently of capsids egress, as expected from the current model of HSV-1 egress.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Heidi McBride, Joël Lanoix, Sylvie LaBoissière and Allégria Kessous for critical reading of the manuscript. We are indebted to Bruce Register, Jules A. Shafer and Phrasant Desai for supplying viruses and Patrick Keller for the VSV G ts045 construct. Special thanks to Michel Lauzon for his help with the confocal. Finally, we are grateful to Marino Zerial, Jean Gruenberg, Rick Rachubinski, Roselyn Eisenberg, Gary Cohen, Nigel Stow, David Johnson, Helena Browne, Patricia Spear and Jay Brown for antibodies. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant # MOP 12679), and establishment grants from the Canadian Foundation for Innovation and the Fonds de la recherche en santé du Québec. RL is a recipient of a CIHR scholarship.

## REFERENCES

1. **Alconada, A., U. Bauer, L. Baudoux, J. Piette, and B. Hoflack.** 1998. Intracellular transport of the glycoproteins gE and gI of the varicella-zoster virus. gE accelerates the maturation of gI and determines its accumulation in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* **273**:13430-6.
2. **Alconada, A., U. Bauer, and B. Hoflack.** 1996. A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network. *Embo J* **15**:6096-110.
3. **Alconada, A., U. Bauer, B. Sodeik, and B. Hoflack.** 1999. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol* **73**:377-87.
4. **Avitabile, E., S. Di Gaeta, M. R. Torrisci, P. L. Ward, B. Roizman, and G. Campadelli-Fiume.** 1995. Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol* **69**:7472-82.
5. **Beitia Ortiz de Zarate, I., K. Kaelin, and F. Rozenberg.** 2004. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J Virol* **78**:1540-51.
6. **Brideau, A. D., B. W. Banfield, and L. W. Enquist.** 1998. The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J Virol* **72**:4560-70.
7. **Brideau, A. D., L. W. Enquist, and R. S. Tirabassi.** 2000. The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J Clin Virol* **17**:69-82.
8. **Brunetti, C. R., K. S. Dingwell, C. Wale, F. L. Graham, and D. C. Johnson.** 1998. Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *J Virol* **72**:3330-9.
9. **Campadelli-Fiume, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrisci.** 1993. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi

apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2798-802.

10. **Chi, J. H., and D. W. Wilson.** 2000. ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J Virol* **74**:1468-76.

11. **Church, G. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson.** 1998. Herpes simplex virus DNA packaging without measurable DNA synthesis. *J Virol* **72**:2745-51.

12. **Church, G. A., and D. W. Wilson.** 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol* **71**:3603-12.

13. **Cosson, P., I. de Curtis, J. Pouyssegur, G. Griffiths, and J. Davoust.** 1989. Low cytoplasmic pH inhibits endocytosis and transport from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Biol* **108**:377-87.

14. **Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, and H. M. Browne.** 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol* **85**:3517-27.

15. **Crump, C. M., C. H. Hung, L. Thomas, L. Wan, and G. Thomas.** 2003. Role of PACS-1 in trafficking of human cytomegalovirus glycoprotein B and virus production. *J Virol* **77**:11105-13.

16. **Darlington, R. W., and L. H. d. Moss.** 1968. Herpesvirus envelopment. *J Virol* **2**:48-55.

17. **Dasgupta, A., and D. W. Wilson.** 1999. ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *J Virol* **73**:2006-15.

18. **Dasgupta, A., and D. W. Wilson.** 2001. Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J Gen Virol* **82**:1561-7.

19. **de Curtis, I., and K. Simons.** 1988. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8052-6.

20. **Del Rio, T., T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross, and L. W. Enquist.** 2005. Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* **79**:3903-19.



21. **Desai, P., and S. Person.** 1998. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* **72**:7563-8.
22. **Douglas, M. W., R. J. Diefenbach, F. L. Homa, M. Miranda-Saksena, F. J. Rixon, V. Vittone, K. Byth, and A. L. Cunningham.** 2004. Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* **279**:28522-30.
23. **Enquist, L. W., P. J. Husak, B. W. Banfield, and G. A. Smith.** 1998. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* **51**:237-347.
24. **Fan, Z., M. L. Grantham, M. S. Smith, E. S. Anderson, J. A. Cardelli, and M. I. Muggeridge.** 2002. 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* **76**:9271-83.
25. **Foster, T. P., J. M. Melancon, T. L. Olivier, and K. G. Kousoulas.** 2004. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. *J Virol* **78**:13262-77.
26. **Foster, T. P., G. V. Rybachuk, X. Alvarez, O. Borkhsenius, and K. G. Kousoulas.** 2003. Overexpression of gK in gK-transformed cells collapses the Golgi apparatus into the endoplasmic reticulum inhibiting virion egress, glycoprotein transport, and virus-induced cell fusion. *Virology* **317**:237-52.
27. **Fraile-Ramos, A., A. Pelchen-Matthews, T. N. Kledal, H. Browne, T. W. Schwartz, and M. Marsh.** 2002. Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic* **3**:218-32.
28. **Fuchs, W., H. Granzow, B. G. Klupp, M. Kopp, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* **76**:6729-42.
29. **Gao, M., L. Matusick-Kumar, W. Hurlburt, S. F. DiTusa, W. W. Newcomb, J. C. Brown, P. J. McCann, 3rd, I. Deckman, and R. J. Colonno.** 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J Virol* **68**:3702-12.

30. **Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, and M. D. Gershon.** 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* **68**:6372-90.
31. **Granzow, H., C. Birghan, T. C. Mettenleiter, J. Beyer, B. Kollner, and E. Mundt.** 1997. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol* **71**:8879-85.
32. **Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**:3675-84.
33. **Granzow, H., F. Weiland, A. Jons, B. G. Klupp, A. Karger, and T. C. Mettenleiter.** 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* **71**:2072-82.
34. **Griffiths, G., S. Pfeiffer, K. Simons, and K. Matlin.** 1985. Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J Cell Biol* **101**:949-64.
35. **Grose, C.** 1990. Glycoproteins encoded by varicella-zoster virus: biosynthesis, phosphorylation, and intracellular trafficking. *Annu Rev Microbiol* **44**:59-80.
36. **Gross, S. T., C. A. Harley, and D. W. Wilson.** 2003. The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* **317**:1-12.
37. **Harley, C. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson.** 2001. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J Virol* **75**:1236-1251.
38. **Holland, D. J., M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, P. Armati, and A. L. Cunningham.** 1999. Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *J Virol* **73**:8503-11.
39. **Homman-Loudiyi, M., K. Hultenby, W. Britt, and C. Soderberg-Naucler.** 2003. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived

vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol* **77**:3191-203.

40. **Horiuchi, H., R. Lippe, H. M. McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann, and M. Zerial.** 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**:1149-59.

41. **Hutchinson, L., H. Browne, V. Wargent, N. Davis-Poynter, S. Primorac, K. Goldsmith, A. C. Minson, and D. C. Johnson.** 1992. 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* **66**:2240-50.

42. **Jarvis, M. A., K. N. Fish, C. Soderberg-Naucler, D. N. Streblow, H. L. Meyers, G. Thomas, and J. A. Nelson.** 2002. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from cell surface is not required for virus envelopment in astrocytoma cells. *J Virol* **76**:5147-55.

43. **Jarvis, M. A., T. R. Jones, D. D. Drummond, P. P. Smith, W. J. Britt, J. A. Nelson, and C. J. Baldick.** 2004. Phosphorylation of human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) at the acidic cluster casein kinase 2 site (Ser900) is required for localization of gB to the trans-Golgi network and efficient virus replication. *J Virol* **78**:285-93.

44. **Johnson, D. C., and P. G. Spear.** 1982. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* **43**:1102-12.

45. **Jones, F., and C. Grose.** 1988. Role of cytoplasmic vacuoles in varicella-zoster virus glycoprotein trafficking and virion envelopment. *J Virol* **62**:2701-11.

46. **Komuro, M., M. Tajima, and K. Kato.** 1989. Transformation of Golgi membrane into the envelope of herpes simplex virus in rat anterior pituitary cells. *Eur J Cell Biol* **50**:398-406.

47. **Lippe, R., M. Miaczynska, V. Rybin, A. Runge, and M. Zerial.** 2001. Functional Synergy between Rab5 Effector Rabaptin-5 and Exchange Factor Rabex-5 When Physically Associated in a Complex. *Mol Biol Cell* **12**:2219-28.

48. **Lipsky, N. G., and R. E. Pagano.** 1983. Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2608-12.
49. **Lipsky, N. G., and R. E. Pagano.** 1985. A vital stain for the Golgi apparatus. *Science* **228**:745-7.
50. **Lotti, L. V., M. R. Torrisi, M. C. Erra, and S. Bonatti.** 1996. Morphological analysis of the transfer of VSV ts-045 G glycoprotein from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment in vero cells. *Exp Cell Res* **227**:323-31.
51. **Matlin, K. S., and K. Simons.** 1983. Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* **34**:233-43.
52. **McMillan, T. N., and D. C. Johnson.** 2001. Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus gE Causes Accumulation in the trans-Golgi Network, a Site of Virus Envelopment and Sorting of Virions to Cell Junctions. *J Virol* **75**:1928-1940.
53. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**:167-80.
54. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**:1537-47.
55. **Miranda-Saksena, M., P. Armati, R. A. Boadle, D. J. Holland, and A. L. Cunningham.** 2000. Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol* **74**:1827-39.
56. **Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, P. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol* **76**:9934-51.
57. **Mu, F. T., J. M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R. G. Parton, P. L. Campbell, J. McCluskey, J. P. Yeo, E. P. Tock, and B. H. Toh.** 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* **270**:13503-11.
58. **Nii, S., C. Morgan, and H. M. Rose.** 1968. Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence of development. *J Virol* **2**:517-36.

59. **Nozawa, N., Y. Yamauchi, K. Ohtsuka, Y. Kawaguchi, and Y. Nishiyama.** 2004. Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Exp Cell Res* **299**:486-97.
60. **Olson, J. K., and C. Grose.** 1997. Endocytosis and recycling of varicella-zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail. *J Virol* **71**:4042-54.
61. **Pagano, R. E.** 1990. The Golgi apparatus: insights from lipid biochemistry. *Biochem Soc Trans* **18**:361-6.
62. **Pagano, R. E., M. A. Sepanski, and O. C. Martin.** 1989. Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J Cell Biol* **109**:2067-79.
63. **Pasieka, T. J., L. Maresova, and C. Grose.** 2003. A functional YNKI motif in the short cytoplasmic tail of varicella-zoster virus glycoprotein gH mediates clathrin-dependent and antibody-independent endocytosis. *J Virol* **77**:4191-204.
64. **Penfold, M. E., P. Armati, and A. L. Cunningham.** 1994. Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6529-33.
65. **Pizer, L. I., G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 1980. Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production. *J Virol* **34**:142-53.
66. **Ponnambalam, S., M. Girotti, M. L. Yaspo, C. E. Owen, A. C. Perry, T. Suganuma, T. Nilsson, M. Fried, G. Banting, and G. Warren.** 1996. Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *J Cell Sci* **109 ( Pt 3)**:675-85.
67. **Prescott, A. R., J. M. Lucocq, J. James, J. M. Lister, and S. Ponnambalam.** 1997. Distinct compartmentalization of TGN46 and beta 1,4-galactosyltransferase in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **72**:238-46.
68. **Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz.** 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**:81-5.

69. **Preston, V. G., J. A. Coates, and F. J. Rixon.** 1983. Identification and characterization of a herpes simplex virus gene product required for encapsidation of virus DNA. *J Virol* **45**:1056-64.
70. **Radsak, K., M. Eickmann, T. Mockenhaupt, E. Bogner, H. Kern, A. Eishubinger, and M. Reschke.** 1996. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* **141**:557-72.
71. **Register, R. B., and J. A. Shafer.** 1996. A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1. *J Virol Methods* **57**:181-93.
72. **Rixon, F. J., C. Addison, and J. McLauchlan.** 1992. Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Gen Virol* **73**:277-84.
73. **Rixon, F. J., A. M. Cross, C. Addison, and V. G. Preston.** 1988. 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* **69**:2879-91.
74. **Roffman, E., J. P. Albert, J. P. Goff, and N. Frenkel.** 1990. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol* **64**:6308-13.
75. **Sanchez, V., K. D. Greis, E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* **74**:975-86.
76. **Sanchez, V., E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* **74**:3842-51.
77. **Saraste, J., and E. Kuismanen.** 1984. Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* **38**:535-49.

78. **Scales, S. J., R. Pepperkok, and T. E. Kreis.** 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90**:1137-48.
79. **Siminoff, P., and M. G. Menefee.** 1966. Normal and 5-bromodeoxyuridine-inhibited development of herpes simplex virus. An electron microscope study. *Exp Cell Res* **44**:241-55.
80. **Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark.** 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion [see comments]. *Nature* **394**:494-8.
81. **Smith, J. D.** 1980. An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus. *Intervirology* **13**:312-6.
82. **Stackpole, C. W.** 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol* **4**:75-93.
83. **Tirabassi, R. S., and L. W. Enquist.** 1999. Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE. *J Virol* **73**:2717-28.
84. **Tirabassi, R. S., and L. W. Enquist.** 1998. Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle. *J Virol* **72**:4571-9.
85. **Toomre, D., P. Keller, J. White, J. C. Olivo, and K. Simons.** 1999. Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* **112**:21-33.
86. **Trus, B. L., W. W. Newcomb, F. P. Booy, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 1992. Distinct monoclonal antibodies separately label the hexons or the pentons of herpes simplex virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11508-12.
87. **Tugizov, S., E. Maidji, J. Xiao, and L. Pereira.** 1999. An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *J Virol* **73**:8677-88.
88. **van Drunen Littel-van den Hurk, S., and L. A. Babiuk.** 1985. Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* **143**:104-18.

89. **van Genderen, I. L., R. Brandimarti, M. R. Torrisi, G. Campadelli, and G. van Meer.** 1994. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* **200**:831-6.
90. **Van Minnebruggen, G., H. W. Favoreel, and H. J. Nauwynck.** 2004. Internalization of pseudorabies virus glycoprotein B is mediated by an interaction between the YQRL motif in its cytoplasmic domain and the clathrin-associated AP-2 adaptor complex. *J Virol* **78**:8852-9.
91. **Wang, Z. H., M. D. Gershon, O. Lungu, Z. Zhu, and A. A. Gershon.** 2000. Trafficking of varicella-zoster virus glycoprotein gI: T(338)-dependent retention in the trans-Golgi network, secretion, and mannose 6-phosphate-inhibitable uptake of the ectodomain. *J Virol* **74**:6600-13.
92. **Whealy, M. E., J. P. Card, R. P. Meade, A. K. Robbins, and L. W. Enquist.** 1991. Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol* **65**:1066-81.
93. **Whiteley, A., B. Bruun, T. Minson, and H. Browne.** 1999. Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *J Virol* **73**:9515-20.
94. **Yang, W., and B. Storrie.** 1998. Scattered Golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans-Golgi proteins. *Mol Biol Cell* **9**:191-207.
95. **Zhu, Q., and R. J. Courtney.** 1994. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **204**:590-9.
96. **Zhu, Z., M. D. Gershon, Y. Hao, R. T. Ambron, C. A. Gabel, and A. A. Gershon.** 1995. Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* **69**:7951-9.
97. **Zhu, Z., Y. Hao, M. D. Gershon, R. T. Ambron, and A. A. Gershon.** 1996. Targeting of glycoprotein I (gE) of varicella-zoster virus to the trans-Golgi network by an AYRV sequence and an acidic amino acid-rich patch in the cytosolic domain of the molecule. *J Virol* **70**:6563-75.



## COMPLÉMENT À LA SECTION MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Traitement des images :** Toutes les images présentées dans la section suivante (résultats complémentaires), ainsi que celles de l'article, ont été traitées avec Photoshop. Chacune des images a été analysée intégralement et en aucun cas une partie de l'image a été traitée différemment du reste de l'image. Plus spécifiquement, nous avons ajusté le niveau de gris de façon à ce qu'il couvre la totalité des valeurs disponibles. Par exemple, supposons qu'une image se compose de niveaux de gris entre 50 et 255, nous avons alors étendu cette plage à 0-255. De plus, nous avons modifié la luminosité et le contraste des images. Ces opérations visent à reproduire le plus fidèlement possible les images examinées directement au microscope à fluorescence. Dans certains cas, une analyse booléenne a été faite (Fig. 7, 9, 15 et 17). Cette analyse examine chacun des pixels individuellement et analyse uniquement ceux ayant une valeur en intensité de couleur entre 5 et 256 de façon à éliminer, pour l'ensemble de l'image, la fluorescence non spécifique. Les pixels seulement verts, donc positifs pour les glycoprotéines mais négatifs pour le TGN (i.e. glyco<sup>+</sup> / TGN<sup>-</sup>) sont convertis par le logiciel en pixels noirs. De la même façon, les pixels rouges, donc positifs pour le TGN mais négatifs pour les glycoprotéines (i.e. glyco<sup>-</sup> / TGN<sup>+</sup>) sont aussi convertis en pixels noirs. Finalement, les pixels positifs pour les deux marqueurs sont convertis en pixels jaunes.

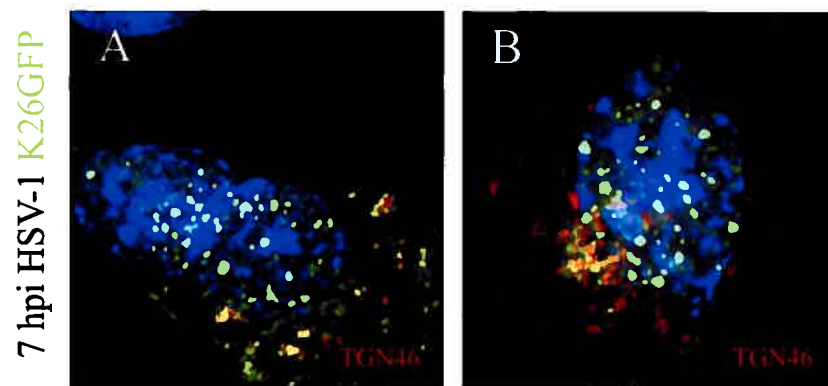
## Chapitre IV

### Résultats complémentaires

*Les résultats présentés ci-après ne sont pas inclus dans l'article du Chapitre III. Ce sont des résultats complémentaires au présent projet de recherche.*

#### **4.1 Présence des capsides virales au TGN dans les cellules BHK**

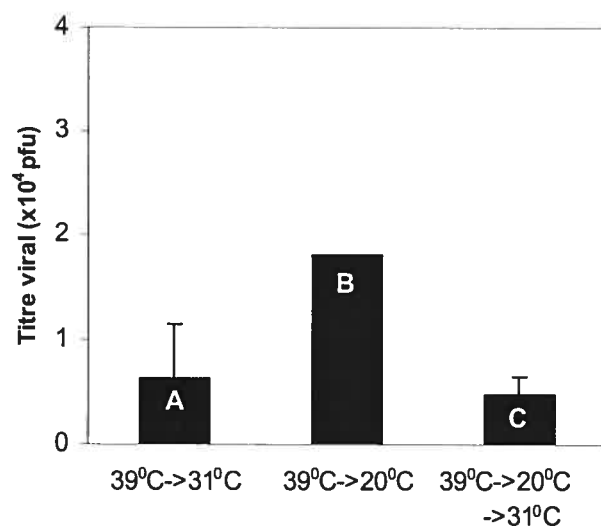
Il est connu que le virus HSV-1 cause la fragmentation du TGN dans les cellules BHK. Nous avons tenté de vérifier si les capsides virales se trouvent toujours associées au TGN même lorsque celui-ci est dispersé à travers la cellule. Les cellules BHK ont donc été infectées avec le virus sauvage marqué à la GFP selon la cinétique de 7 heures à 37°C suivie de 6 heures à 20°C. Les résultats démontrent que les capsides colocalisent avec le TGN, bien que ce dernier soit fragmenté (figure 10).



**Figure 10 : Présence des capsides au TGN dans les cellules BHK.** Les cellules BHK ont été infectées avec le virus HSV-1 K26GFP pour 7h à 37°C. Les panneaux A et B démontrent clairement la dispersion du TGN (rouge) suivant l'infection et les capsides (vertes) colocalisent toujours avec le TGN malgré sa fragmentation.

## 4.2 Présence d'une enveloppe sur les capsides bloquées à 20°C

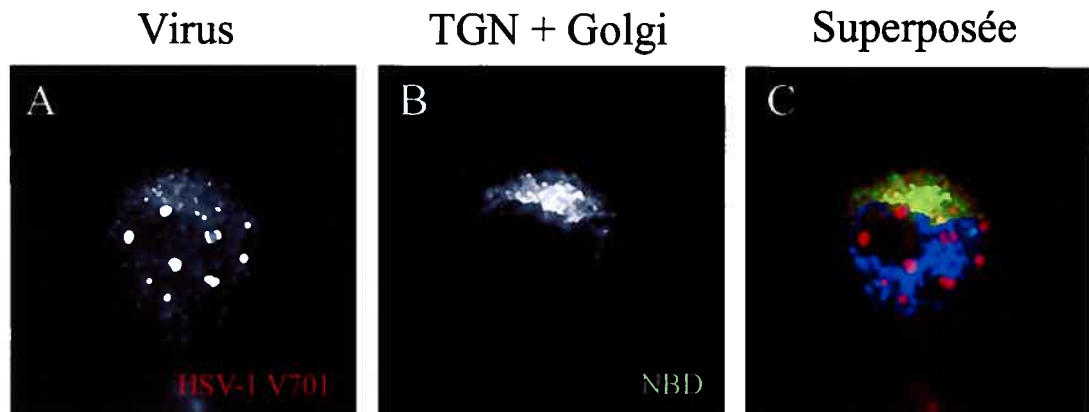
Les résultats précédents indiquent que les capsides transitent par le TGN, mais il n'est pas clair si elles sont enveloppées ou pas. La microscopie électronique serait très utile pour déterminer la présence ou non d'une enveloppe sur les capsides présentes au TGN à 20°C. Cependant, puisque l'addition d'une enveloppe sur les capsides au TGN implique que les virions sont infectieux, on peut aussi titrer ces virus par essais de plaques afin de savoir si les capsides sont enveloppées ou pas à 20°C. Ceci nous a permis de constater qu'une importante quantité de virions sont infectieux suite au blocage à 20°C (figure 11) et révèle donc la présence de virus enveloppés au TGN à cette température. De plus, nos résultats d'essais de plaques nous permettent de constater que la majorité des virus intracellulaires sortent de la cellule suite à une période d'incubation à température permissive (comparaison entre les virus extracellulaires et intracellulaires des figures 4 et 11 respectivement).



**Figure 11 : Titration des virus intracellulaires.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 V701 pour 7h à 39°C suivi de 6h à 20°C (B). Le blocage à 20°C a ensuite été suivi par une incubation à 31°C pour 24h (C). Les cellules contrôles ont été incubées pour 30h à 31°C sans le blocage à 20°C (A). Les virus présents à l'intérieur des cellules 143B ont été récoltés et titrés sur des cellules Vero pour 4 jours à 31°C. Cette figure complète la figure 4 du chapitre III.

### 4.3 Colocalisation des capsides avec un second marqueur du TGN, le NBD

Nos données suggèrent fortement le TGN comme site de ré-enveloppement. Néanmoins, le marqueur utilisé lors de cette recherche pour visualiser cet organite est l'anticorps TGN46. Bien que ce soit un marqueur bien établi pour le TGN, nous avons tout de même procédé à un marquage avec le *NBD-C<sub>6</sub> ceramide (NitroBenzoxaDiazole)*, un marqueur des lipides retrouvés dans le TGN et le Golgi. La figure 12 confirme la colocalisation des capsides avec ce deuxième marqueur du TGN, selon la cinétique virale précédemment établie.

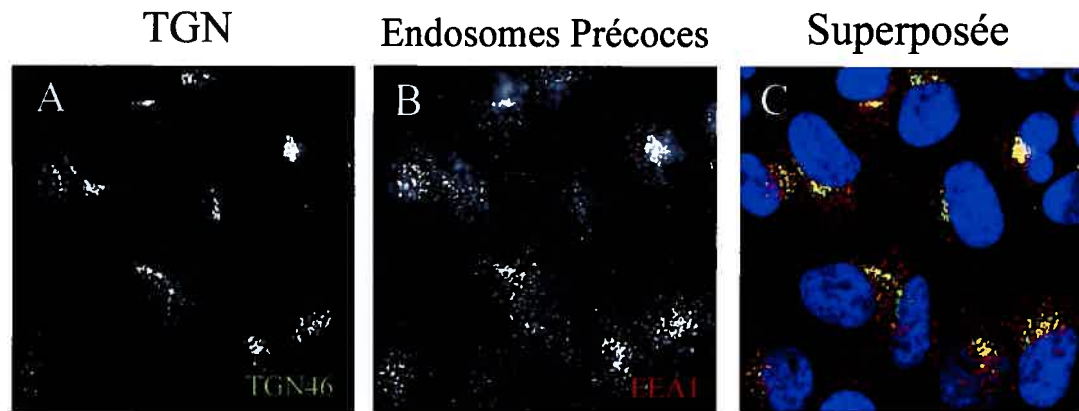


**Figure 12 : Colocalisation des capsides avec un second marqueur du TGN, le NBD.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 V701 pour 7h à 39°C suivi de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées, le virus a été marqué avec l'anticorps ICP5 (reconnait capsides matures et immatures) (A) et le TGN/Golgi a été révélé par un céramide lié à un marqueur fluorescent (le NBD) (B). Les capsides (rouge) présentes dans le cytoplasme colocalisent avec le marqueur NBD (vert) (C).

#### 4.4 Colocalisation des endosomes précoces et du TGN dans les cellules 143B

Puisque les capsides colocalisent aussi avec les endosomes précoces (figure 5I) en plus du TGN, nous avons vérifié si ces deux marqueurs présentent deux marquages distincts. La figure 13 révèle plutôt une importante colocalisation du TGN46 et de *EEA1* (*Early Endosome Antigen 1*) dans les cellules 143B.

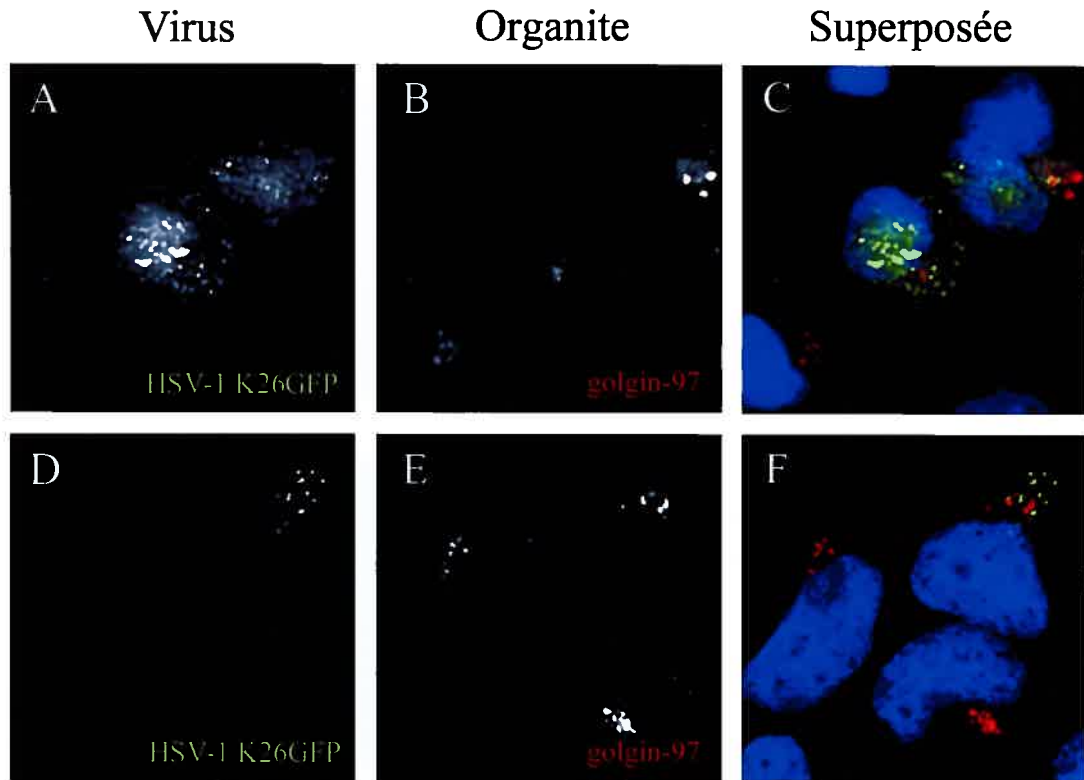




**Figure 13 : Colocalisation des endosomes précoces et du TGN dans les cellules 143B.** Les cellules 143B ont été marquées à la fois avec l'anticorps TGN46 (vert) et *EEA1* (rouge). Ce double marquage révèle une importante colocalisation de ces deux compartiments.

#### 4.5 Localisation des capsides par rapport au Golgi

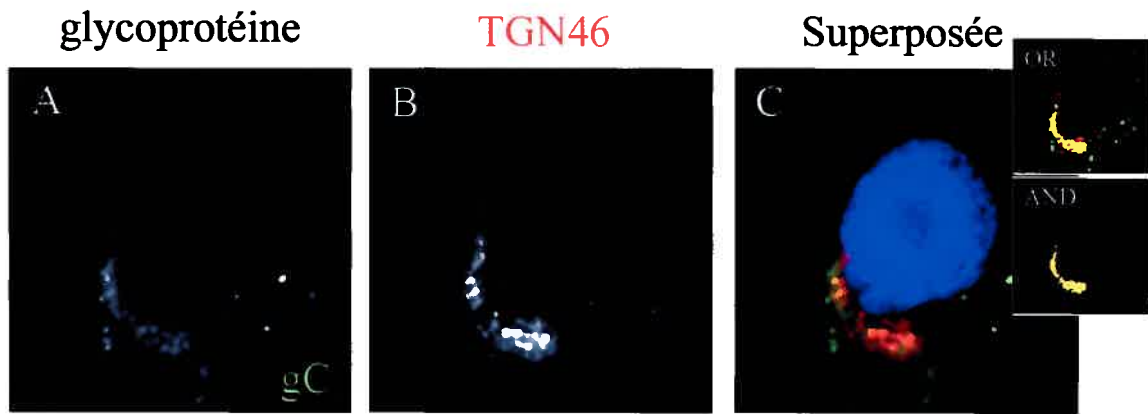
Un éventail de compartiments intracellulaires a été évalué dans le but d'examiner les autres sites potentiels de ré-enveloppement (figure 5). La figure 14 démontre quant à elle que les cellules infectées avec le virus sauvage marqué à la GFP ne présentent pas de colocalisation des capsides à 20°C avec Golgin-97, un marqueur du compartiment golgien.



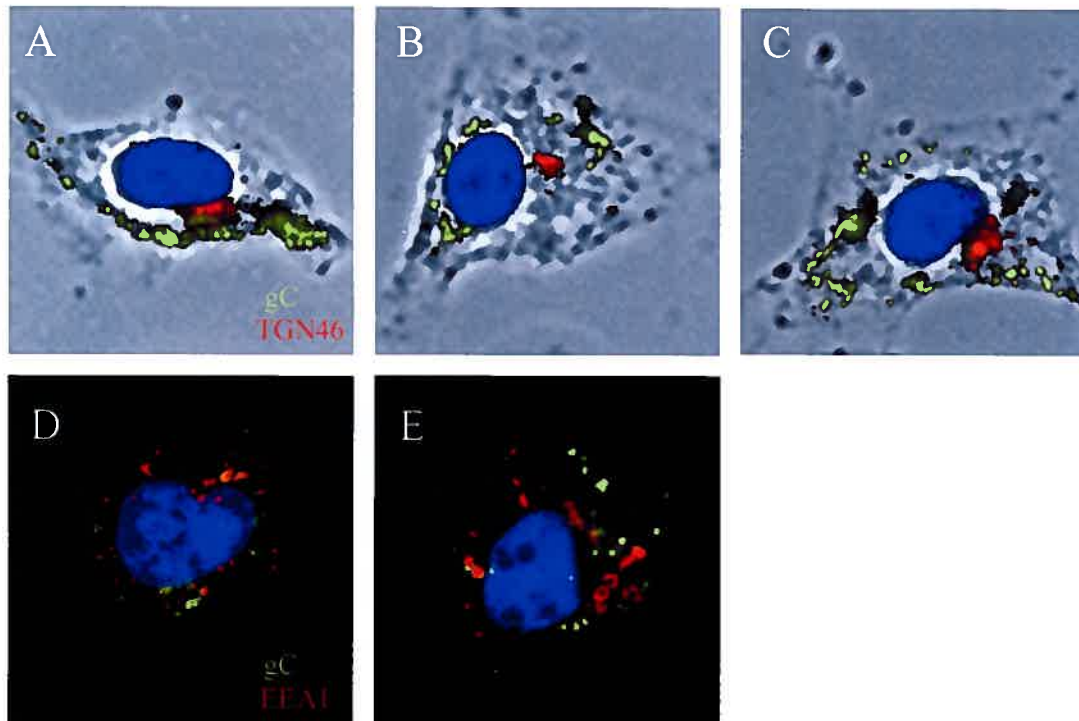
**Figure 14 : Localisation des capsides par rapport au Golgi.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 K26GFP pour 7h à 37°C suivi de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées et le Golgi a été marqué via Golgin-97 (B, E). Les capsides (vert) présentes à l'extérieur du noyau ne colocalisent pas avec le Golgi (rouge) (C, F).

#### 4.6 Localisation de la glycoprotéine virale gC avec ou sans progression des capsides

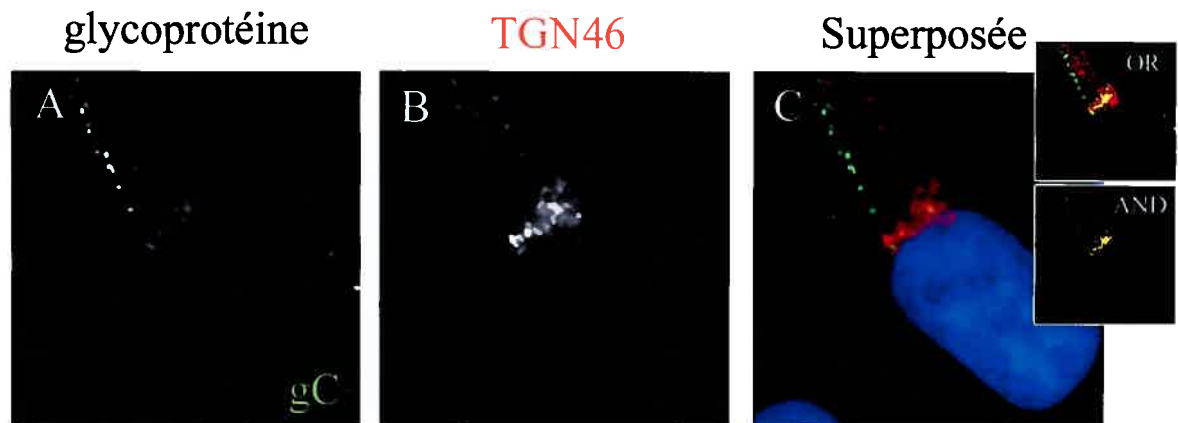
Nos images d'immunofluorescence ont démontré l'importante colocalisation des glycoprotéines gD, gE, gH et gI avec le TGN, suite à la cinétique de 7 heures à 39°C suivie de 6 heures à 20°C (figure 7). On remarque que la glycoprotéine gC, tout comme les glycoprotéines gB et gL (figures 7O et 7R), colocalise plutôt partiellement avec le TGN selon cette cinétique (figure 15). C'est pourquoi nous avons appliqué l'approche booléenne [75], laquelle consiste à ne retenir que les pixels où les glycoprotéines et le TGN colocalisent, alors que tous les autres pixels sont convertis en noir. Ce faisant, nous confirmons la colocalisation de gC avec le marqueur TGN46 (encadré de la figure 15C). Néanmoins, une certaine portion de gC ne semble pas colocaliser avec le TGN de sorte que nous avons tenté d'identifier où se trouve gC. Les résultats présentés à la figure 16 révèlent pourtant que gC n'est pas vraiment présente au niveau de la membrane plasmique (figure 16A-C), ni aux endosomes précoces (figure 16D, E). Nous avons également vérifié la colocalisation de gC avec le TGN, en absence de migration des capsides. Dans ce cas-ci également, la glycoprotéine gC colocalise partiellement avec le TGN (figure 17), bien que cette colocalisation demeure significative, telle que démontré par l'analyse booléenne (encadré de la figure 17C).



**Figure 15 : Présence de la glycoprotéine virale gC au TGN à 20°C.** Les cellules 143B ont été infectées pour 7h à 39°C suivie de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées avec un anticorps contre gC, V-II 13-7 (A) et l'anticorps TGN46 (B). La glycoprotéine gC (vert) montre une faible colocalisation avec le TGN (rouge) (C). Le panneau C a été traité par une analyse booléenne telle que décrit à la figure 7 et dans la section *materials and methods* du chapitre III. L'image *OR* présente les pixels verts (gC) OU rouges (TGN46) tandis que l'image *AND* présente uniquement les pixels (jaunes) positifs pour gC ET TGN46. La présence de pixels jaunes démontre une réelle colocalisation.



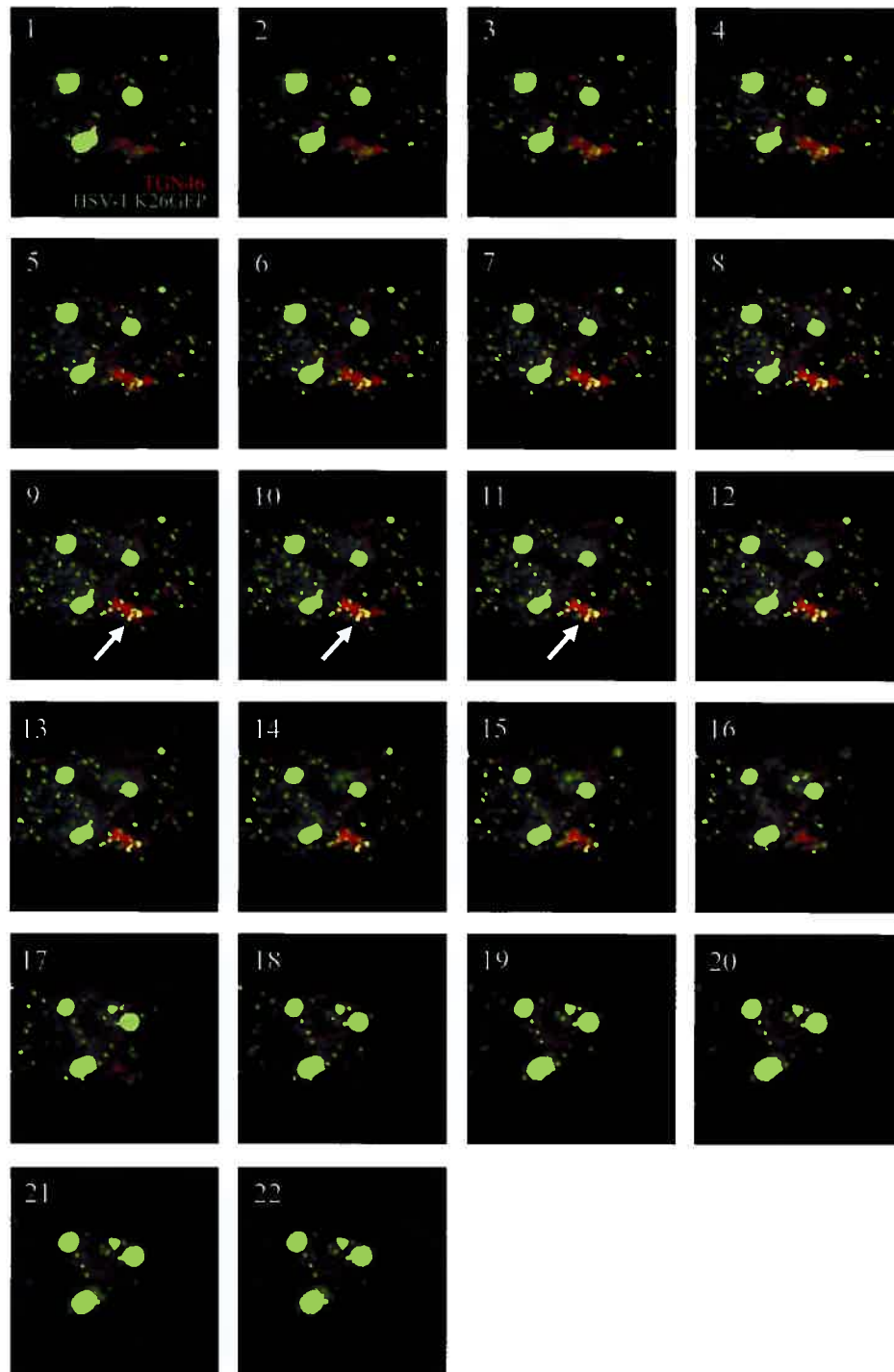
**Figure 16 : Localisation de la glycoprotéine gC par rapport à la membrane plasmique et aux endosomes précoces.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 V701 pour 7h à 39°C suivie de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées et le TGN a été marqué avec l'anticorps TGN46, alors que les endosomes précoces ont été révélés par le marqueur *EEA1* et que l'anticorps V-II 13-7 a été utilisé pour visualiser la glycoprotéine gC. Les images de contraste de phase ont aussi été prises de façon à détecter la surface cellulaire (A-C). La glycoprotéine gC (vert) colocalise très peu avec le TGN (rouge) (A-C) et qu'occasionnellement avec la membrane plasmique (A). Aucune glycoprotéine gC (vert) ne se trouve au niveau des endosomes précoces (rouge) (D,E).



**Figure 17 : Transport de la glycoprotéine virale gC au TGN indépendamment de la progression des capsides virales.** Les cellules 143B ont été infectées pour 7h à la température non-permissive (39°C), sans une relâche à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées avec un anticorps contre gC, V-II 13-7 (A) et l'anticorps TGN46 (B). La glycoprotéine gC (vert) montre une faible colocalisation avec le TGN (rouge) (C). Le panneau C a été traité par une analyse booléenne comme auparavant. L'image *OR* présente les pixels verts (gC) OU rouges (TGN46) tandis que l'image *AND* présente uniquement les pixels (jaunes) positifs pour gC ET TGN46. Les pixels jaunes démontrent une colocalisation partielle de gC avec le TGN.

## 4.7 Colocalisation des capsides au TGN au microscope confocal

En appliquant la cinétique virale de 7 heures à 39°C suivie de 6 heures à 20°C, nos données montrent une colocalisation reproductible des capsides virales avec le TGN. Cependant, les images recueillies proviennent d'images prises avec un microscope photonique à fluorescence et par le fait même, ces images ne tiennent pas compte de l'épaisseur de la cellule, si bien que les capsides et le TGN pourraient être l'un par-dessus l'autre et produire néanmoins une apparente colocalisation. La meilleure façon de résoudre ce problème consiste à examiner cette colocalisation au microscope confocal en fonction de l'axe des Z. Nous avons donc généré des couches, au nombre de 22, qui représentent des coupes de 126 nm d'épaisseur. L'analyse de ces photos confirme que les capsides sont belles et bien présentes au TGN et ce, autant pour le virus HSV-1 K26GFP (figure 18) que le virus mutant V701 (données non montrées). Malheureusement, le microscope confocal n'est pas muni d'un laser pour les UVs, le noyau n'a donc pu être marqué au Hoechst comme dans le cas des images prises au microscope à fluorescence. Par ailleurs, le confocal n'est pas équipé pour le contraste de phase. Il est donc plus difficile de distinguer les capsides au TGN de celles toujours présentes au noyau. Une façon de remédier à ce problème est de prendre des images en contraste différentielle d'interférence, communément appelé Nomarski. Cependant, ces images n'étaient pas très éloquentes, car on ne voyait pas clairement le noyau, peut-être parce que les 143B sont très aplaties. Les images en microscopie confocal confirment tout de même la colocalisation d'un certain nombre de capsides avec le TGN, lui concédant ainsi un rôle important dans le ré-enveloppement. Par ailleurs, elles confirment que plusieurs capsides sont adjacentes au marqueur TGN46.



**Figure 18 : Confirmation de la présence des capsides au TGN par microscopie confocale.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 K26GFP pour 7h à 37°C suivie de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été fixées et le TGN a été marqué via TGN46 (rouge). L'échantillon a ensuite été coupé en 22 couches dans l'axe Z de 126 nm d'épaisseur chacune. Ces images confirment que les capsides colocalisent avec le TGN (visible plus particulièrement dans les panneaux 9, 10 et 11).



#### 4.8 Quantification des capsides au site de ré-enveloppement

Bien que les résultats présentés dans cette étude prédisent le rôle important du TGN comme site de ré-enveloppement, il est utile de quantifier la portion des capsides totales s'y retrouvant. Pour ce faire, il est possible d'utiliser un logiciel<sup>1</sup> pour quantifier la colocalisation (pixels rouges et verts aux mêmes endroits). Le pourcentage de colocalisation des capsides au TGN représente le rapport du nombre de pixels ayant à la fois une valeur de rouge et de vert (virus au TGN) avec le nombre de pixels ayant uniquement une valeur de vert (virus total). Pour une moyenne de 25 cellules individuellement analysées, nous avons obtenu un pourcentage de colocalisation de l'ordre de 50,3%. Cependant, ce type d'analyse peut générer dans le cas présent des données discutables, car les capsides sont souvent présentes de façon plutôt adjacente au TGN, ce qui permet d'expliquer un résultat de colocalisation de 50%.

#### 4.9 Colocalisation des capsides aux TGN/Endosomes précoces au microscope électronique

Dans le cadre de la présente recherche, la microscopie électronique serait fort utile afin d'examiner la colocalisation des capsides au TGN, suite à une incubation de 7 heures à 39°C et 6 heures à 20°C. De plus, étant donné que des capsides semblaient se trouver aux endosomes précoces à 20°C (figure 5G-I), nous avons aussi tenté de confirmer cette colocalisation. Une analyse par microscopie électronique s'avère particulièrement justifiée, car la résolution de la microscopie à fluorescence n'est pas suffisante. La visualisation du TGN peut théoriquement se faire via l'emploi d'un anticorps spécifique couplé à des billes d'or. Le Golgi/TGN peut aussi se visualiser directement dans les cellules à cause de leur morphologie

---

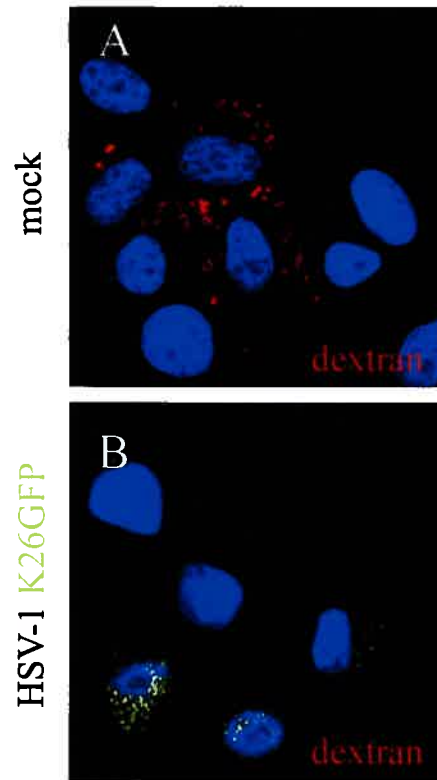
<sup>1</sup> Logiciel informatique *Tiffworker* programmé par Éric Paquet pour fin d'analyse de quantification sur des images de microscopie de fluorescence. Logiciel similaire : *Northern Eclipse*

caractéristique. Cette dernière approche a d'abord été essayée, car elle ne dépend pas de l'identification d'un anticorps adéquat contre le TGN et parce que les virions sont aisément reconnaissables par microscopie électronique en épon. Les endosomes précoces peuvent pour leur part être visualisés via des anticorps spécifiques couplés à des billes d'or ou encore via l'internalisation directe de billes d'or, de billes de latex, ou encore de l'enzyme *HRP* (*Horse Radish Peroxidase*). Dans le cas présent, nous avons plutôt procédé à l'endocytose de billes de latex. Les cellules ont donc été infectées pour 7 heures à 39°C suivi de 6 heures à 20°C et subséquemment incubées pour cinq minutes à 37°C avec un milieu contenant des billes de latex (100 nm de diamètre). Selon la voie d'endocytose, il a été établi qu'une période de cinq minutes est suffisante pour retrouver les composés internalisés au niveau des endosomes précoces. Cependant, seule une image (figure 19) expose la présence de billes de latex dans une vacuole cytoplasmique, pouvant être un endosome vu sa forme et sa taille, mais dans une cellule non-infectée. Nous avons donc vérifié si l'infection perturbe l'endocytose. À cette fin, le polysaccharide dextran, une macromolécule de 66 kilodaltons, fut employée pour l'internalisation au lieu des billes de latex. Celui-ci étant couplé au fluorophore TRITC, il pouvait donc être visualisable au microscope à fluorescence et permettait de faire une analyse plus rapide. Comme le démontre la figure 20, on remarque que les cellules non-infectées internalisent le dextran à 37°C. Au contraire, les cellules infectées ne montrent aucune molécule de dextran internalisée. En somme, ces images indiquent que HSV-1 perturbe l'endocytose. Il n'était donc pas possible de colocaliser les capsides avec les endosomes précoces révélés avec des billes de latex par endocytose. D'autre part, bien que le TGN soit quelque peu difficile à localiser dans les cellules, la problématique majeure a été l'absence quasi totale de virus dans les 143B infectées. Pourtant, les cellules 143B sont tout à fait infectables selon les conditions utilisées, comme nous l'avons précédemment démontré via la technique d'immunofluorescence. De toute évidence, la manipulation des échantillons à l'époque ne nous permettait pas de conserver les

virus intacts à l'intérieur des cellules. En ce qui concerne le marquage des endosomes précoces, nous aurions pu poursuivre l'expérimentation en appliquant plutôt la technique de l'immuno-EM afin de marquer les endosomes précoces, mais étant donné que l'on n'était pas en mesure de voir de virus dans les cellules infectées, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie. Cependant, mentionnons que cette particularité des cellules infectées à ne pas endocyter de molécules provenant du milieu extérieur représente une avenue intéressante à explorer.



**Figure 19 : Marquage des endosomes précoces via l'internalisation de billes de latex en microscopie électronique.** Les cellules 143B ont été infectées avec le virus HSV-1 V701 pour 7h à 39°C suivi de 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été incubées pour 5 minutes à 37°C avec un milieu contenant des billes de latex (100 nm de diamètre). Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et ensuite avec du tampon cacodylate 0,2M (gardé sur glace). Les cellules ont par la suite été fixées pour 3 heures à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde 2,5%. Les cellules ont été une fois de plus lavées avec le tampon cacodylate 0,1M et post-fixées à l'osmium 1 heure à 4°C. Par la suite, on a procédé à la déshydratation à l'éthanol et à l'infiltration avec un mélange épon/éthanol pour 1 heure à la température pièce, suivie d'une seconde infiltration cette fois dans l'épon pur toute la nuit. Le lendemain, les pétris ont été déposés au four à 60°C pour 3 jours. Après 3 jours, les blocs ainsi produits ont été coupés et déposés sur une grille pour visualisation au microscope électronique. La cellule visualisée présente vraisemblablement un endosome précoce lequel comprend des billes de latex (voir les flèches).



**Figure 20 : Capacité d'internalisation du dextran pour les cellules 143B mock ou infectées.** Les cellules 143B ont été infectées ou pas avec le virus HSV-1 K26GFP pour 7h à 37°C et 6h à 20°C. Les cellules ont ensuite été incubées pour 5 minutes à 37°C avec un milieu contenant du dextran-TRITC. Les cellules ont par la suite été lavées deux fois avec du PBS 1X et fixées. La comparaison entre les cellules mock-infectées (A) et les cellules infectées (B) démontre la capacité d'internalisation du dextran uniquement pour les cellules non-infectées.

## Chapitre V

### Discussion

#### 5.1 Détermination du modèle d'étude

Afin de déterminer le site de ré-enveloppement du virus HSV-1, il fallait préalablement déterminer le modèle d'étude. Une lignée cellulaire candidate était les cellules BHK (*Baby Hamster Kidney*), car ce sont des cellules souvent utilisées pour l'étude du virus HSV-1, dues à leur croissance rapide, leur susceptibilité à l'infection et leur bonne morphologie en microscopie. Cependant, la littérature révèle que pour ces cellules, l'infection au HSV-1 provoque la fragmentation du Golgi et par le fait même, la dispersion des glycoprotéines et des glycolipides résidentes du Golgi [76]. Toutefois, il n'était pas clair si c'était le cas également pour le TGN, le site possible de ré-enveloppement des capsides virales. Afin de déterminer si le TGN se comporte comme le Golgi, nous avons examiné l'aspect du TGN via TGN46, un marqueur bien établi pour cet organite [77] [78] et nous avons employé Golgin-97 pour détecter l'allure du Golgi [79] et ce, lors d'une infection. Nous avons testé en parallèle les cellules 143B, dont le Golgi semble résister à l'infection [80]. En fait, seulement une autre lignée cellulaire est connue pour résister à la fragmentation du Golgi suite à l'infection par HSV, les Mewo, mais ce sont des cellules dont la croissance est très lente, ce qui représente un inconvénient majeur pour ce type d'étude. Nos données présentées à la figure 1 indiquent que HSV-1 cause la fragmentation autant du Golgi que du TGN pour les cellules BHK, mais qu'ils sont relativement intacts dans les cellules 143B, du moins pour la période de temps examinée, soit à 7 hpi. Il est à noter que le virus perturbe parfois le TGN dans certaines cellules 143B suite à une plus longue durée d'infection (figure 5). Cela dit, la relative stabilité du TGN pour les cellules 143B permet une analyse plus simple par immunofluorescence comparativement aux cellules BHK. C'est pourquoi nous avons plutôt opté pour l'utilisation de la lignée 143B comme modèle d'étude.

## 5.2 Inhibition du transport intracellulaire à 20°C dans les cellules 143B

De nombreuses études ont démontré la possibilité de bloquer le transport intracellulaire des protéines de façon température dépendante. Puisque HSV-1 transite vraisemblablement par le TGN et que le transport entre le TGN et la membrane plasmique est bloqué à 20°C, nous avons exploré cette option pour perturber le transport des capsides virales. Afin de s'assurer que ce transport peut également être bloqué dans la lignée 143B, nous avons examiné par immunofluorescence la migration de VSV G ts045 marquée à la GFP, une protéine thermosensible couramment utilisée à cette fin. Tel que prévu, elle s'accumule au RE lors d'une incubation à température non permissive (39°C) (figure 2A) et atteint la membrane plasmique à 31°C (figure 2C). Les données confirment aussi que la protéine est bloquée au TGN suivant une incubation à 20°C (figure 2B). Finalement, le blocage au TGN est réversible, car la protéine peut atteindre la surface de la cellule à 31°C (figures 2 D, voir les flèches). Ce contrôle permet de déduire que le transport le long de la voie de biosynthèse peut être modulé par un blocage au TGN à 20°C pour les cellules 143B. Il est donc possible de piéger les glycoprotéines virales ainsi que les capsides au TGN lors de leur transit, si elles passent évidemment à cet endroit durant leur transport intracellulaire.

## 5.3 Cinétique de la progression virale

Considérant le fait que l'infection par HSV-1 est très rapide et que le transport des protéines peut être bloqué au TGN par une incubation à 20°C, nous avons évalué la cinétique de l'infection à cette température. Le virus employé était le mutant HSV-1 V701 et nous avons d'abord évalué la cinétique de localisation des capsides par rapport au TGN, car ce site est l'endroit potentiel du ré-enveloppement. Afin de suivre la progression des capsides, nous avons employé un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine VP5 présente sur les capsides matures [81] et un anticorps

contre VP5 reconnaissant toutes les capsides (matures et immatures) [82]. Les données révèlent que les virus prisonniers dans le noyau à 39°C (figure 3A) quittent le noyau suite à une incubation minimale de 4 heures à 20°C (figure 3B). Concernant les incubations pour les plus courtes périodes à 20°C, les capsides étaient toujours présentes au noyau (données non montrées). Par ailleurs, il était parfois nécessaire de poursuivre l'incubation pour 6 heures à 20°C afin de chasser la majorité des virus du noyau (figure 3C) et dans ces conditions, une importante proportion de capsides semble s'accumuler au TGN. La cinétique employée pour les expériences subséquentes a donc été fixée à 7 heures à 39°C suivie de 6 heures à 20°C.

De plus, afin de s'assurer que les capsides ne s'accumulent pas de façon aberrante au TGN à 20°C, nous avons poursuivi l'infection en ajoutant une période d'incubation à 31°C (température permissive). Les images d'immunofluorescence révèlent que les virus peuvent en effet s'échapper du TGN et atteindre la périphérie de la cellule après 3 à 4 heures à 31°C (figure 3 D-F, voir les flèches). Il était aussi important de vérifier que cette cinétique n'était pas spécifique à V701 et causée par la mutation de la protéase. Une analyse avec une souche sauvage a donc été faite. Les résultats présentés à la figure 3G-I démontrent que le blocage à 20°C peut aussi causer l'accumulation du virus sauvage au TGN. Ceci montre que les résultats ne sont pas spécifiques au virus mutant V701 et qu'ils s'appliquent à deux souches virales différentes, soit la souche 17<sup>+</sup> pour le virus mutant et la souche KOS dans le cas du virus sauvage marqué à la GFP. Des essais de plaques confirment aussi la réversibilité du blocage à 20°C, étant donné que des virus infectieux sont relâchés dans le milieu extracellulaire à 31°C (figure 4). En somme, ces observations permettent d'affirmer que la progression de HSV-1 est sensible à une incubation à 20°C et suggèrent que le virus transite par le TGN. Par ailleurs, l'accumulation du virus au TGN est réversible et n'est pas dépendante de la mutation de la protéase de V701.



## 5.4 Site de ré-enveloppement

### 5.4.1 Colocalisation avec divers marqueurs des organites cellulaires

Les résultats suggèrent le TGN comme site de transit potentiel durant le cycle viral. Pour confirmer ceci, une gamme de compartiments intracellulaires a été évaluée afin d'examiner tous les sites potentiels. Pour ce faire, nous avons regardé par immunofluorescence la colocalisation des capsides virales avec divers organites. Selon la cinétique préalablement établie, nos données confirment que les capsides sont localisées en grande majorité au TGN, tel que révélé par l'anticorps TGN46 (figure 5A-C). Comme mentionné précédemment, le virus perturbe parfois le TGN dans certaines cellules 143B. Toutefois, les capsides colocalisent toujours avec le TGN, même lorsque celui-ci est dispersé (figure 5D-F). Afin de confirmer cette colocalisation, un second marqueur du TGN fut employé, soit le *NBD*. La figure 12 montre que les virus s'échappant du noyau colocalisent en grande partie avec ce marqueur. Enfin, l'analyse des couches en Z au microscope confocal confirme aussi la colocalisation des capsides de V701 (données non montrées) et K26GFP (figure 18) avec le TGN. HSV-1 transite donc par le TGN.

La figure 5 (G-I) révèle une certaine colocalisation des capsides avec les endosomes précoces. Ceci peut s'expliquer de maintes façons. Tout d'abord, bon nombre d'études ont démontré que des glycoprotéines des virus herpès sont internalisées de la membrane plasmique via les endosomes précoces [83] [84] [85] [86] [87] [88]. Il est donc possible que les capsides retrouvées au niveau des endosomes précoces y migrent à cause de la présence de glycoprotéines virales. Deuxièmement, il n'est pas impossible que les capsides acquièrent leur enveloppe à partir de ce compartiment, constituant ainsi un site secondaire de ré-enveloppement. À cet effet, nos résultats sont consistants avec ceux du Docteur Duncan Wilson, qui a retrouvé des capsides de HSV-1 dans une fraction contenant du TGN et des endosomes précoces [35]. Finalement, un double marquage avec TGN46 et *EEA1*

révèle une importante colocalisation de ces deux marqueurs dans les cellules 143B (figure 13). Ainsi, il est possible que les quelques capsides apparemment présentes aux endosomes précoces se trouvent en fait au TGN.

Contrairement au TGN et aux endosomes précoces, aucune capsidite ne s'est retrouvée dans le RE, le Golgi (figure 14), ou les lysosomes (figure 5J-L). Puisque le RE et l'enveloppe nucléaire sont généralement considérés comme en continuité, on pourrait s'attendre à voir des capsides au RE. Toutefois, nos résultats ne sont pas étonnants, compte tenu que nous examinons la localisation des capsides dans leur état statique à 20°C (« *steady state* »). De plus, nous employons une cinétique leur permettant de s'accumuler au site de ré-enveloppement, c'est-à-dire que l'infection est synchronisée et en présence de cycloheximide durant la chasse pour prévenir la synthèse/assemblage de nouvelles capsides. Aussi, selon cette cinétique, les capsides ne suivent pas la voie de dégradation lysosomiale, car elles ne sont pas observées au niveau des lysosomes. Ceci indique que le virus ne cible pas n'importe lequel des compartiments pour son ré-enveloppement. À cet égard, nous avons également tenté de marquer les endosomes tardifs, mais l'anticorps contre le LBPA (Acide Lysobisphosphatidique), un phospholipide exclusivement localisé dans ces compartiments, n'a pas généré de marquage conclusif pour la lignée cellulaire 143B. Il n'a également pas généré de signal conclusif dans ces cellules par immunobuvardage. Toutefois, cet anticorps fonctionne bien en immunofluorescence avec les cellules BHK [89]. On ne peut donc conclure de la présence du LBPA avec cet anticorps dans les 143B. Par ailleurs, nous n'avons pas obtenu de marquage concluant pour l'anticorps anti-SKL [90], un marqueur des peroxisomes, bien qu'il fonctionne par immunobuvardage avec les 143B (mémoire de Geneviève Taquet, 2005). Il s'avère donc que l'antigène n'est pas détecté par la technique d'immunofluorescence dans les cellules 143B. En somme, ces résultats ciblent collectivement le TGN comme étant le compartiment le plus important pour le ré-enveloppement du HSV-1.

#### 5.4.2 Présence des capsides virales au TGN même lorsque celui-ci est dispersé

Afin de confirmer que les capsides se trouvent bien au TGN à 20°C, les cellules infectées furent incubées avec du nocodazole. Ce dernier est un agent antimitotique ayant pour effet de perturber la liaison de la  $\beta$  tubuline. Ceci inhibe la dynamique des microtubules et cause la fragmentation du complexe golgien, du *MTOC* (*Microtubule Organization Center*) et du TGN [91]. Cette drogue peut donc être utilisée afin de déterminer si les capsides demeurent associées au TGN, même lorsque celui-ci est dispersé par le nocodazole. La figure 6 montre que tel est le cas, et ce pour la plupart des capsides. Ceci suggère alors que les capsides se retrouvent à l'intérieur des citernes du TGN ou directement associées à l'extérieur de celles-ci. La microscopie à fluorescence ne peut évidemment pas nous permettre de faire la distinction entre ces deux événements. Le laboratoire évalue présentement cette question par microscopie électronique.

Puisque le nocodazole affecte non seulement le TGN, mais aussi d'autres organites tel le Golgi, nous avons examiné la localisation des capsides dans les cellules BHK, dans lesquelles le HSV-1 cause une dispersion naturelle du TGN (figure 1). Nos données confirment que les capsides colocalisent toujours avec le TGN (figure 10). Ceci confirme que les capsides se trouvent au TGN à 20°C, même si ce dernier est réparti à travers la cellule. Ensemble, ces dernières données confirment que le TGN est un important compartiment pour le ré-enveloppement du HSV-1, et ce pour au moins deux lignées cellulaires différentes.

### 5.5 Localisation des glycoprotéines virales à 20°C

Le modèle de ré-enveloppement prédit que les glycoprotéines virales devraient se retrouver au site de ré-enveloppement. Afin de confirmer cette prédiction, leur localisation fut observée, toujours selon la cinétique de 7 heures à 39°C suivie de 6 heures à 20°C. L'analyse des images d'immunofluorescence a

révélé une colocalisation considérable des glycoprotéines gD, gE, gH et gI avec le marqueur TGN46 (figure 7). Quant à elle, la glycoprotéine gL colocalise partiellement avec le TGN et sous ces conditions, les glycoprotéines gB et gC semblent présentes plus faiblement au niveau du TGN (figures 7 et 15). Afin de s'assurer qu'une portion de gB et gC colocalise effectivement avec le TGN, nous avons traité nos images avec une approche booléenne. Les figures analysées confirment la colocalisation significative de gB et gC avec le marqueur TGN46 (encadrés des figures 7R et 15C). Ces résultats supportent le modèle de ré-enveloppement puisqu'ils démontrent, pour une même étude, que toutes les glycoprotéines virales testées sont présentes au TGN. Cette conclusion est importante, car des publications antérieures avaient plutôt rapporté l'accumulation individuelle de certaines glycoprotéines au TGN [68] [69] [70] [71].

Une certaine portion de gL, gB et gC ne colocalise pas avec le TGN à 20°C (figures 7O, 7R et 15C respectivement). Nous avons tenté dans un premier temps d'identifier où gC se trouvait. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de le déterminer. D'une part, gC ne se retrouve pas aux endosomes précoces ni à la membrane plasmique (figure 16). D'autre part, nos anticorps ne fonctionnent pas pour les endosomes tardifs et les peroxisomes. La signification de la présence de trois des sept glycoprotéines dans un compartiment autre que le TGN n'est pas clair à présent et pourrait refléter des fonctions additionnelles pour ces protéines virales. Il est toutefois permis de penser que la portion de gB, gC et gL retrouvée au TGN est incorporée à l'enveloppe du virus en quantité suffisante pour l'infectivité des virions produits.

## **5.6 Localisation des glycoprotéines virales et des capsides à 20°C**

Nos résultats démontrent nettement la présence à la fois des capsides (figures 3 et 5) et de sept glycoprotéines virales différentes (figures 7 et 15) au niveau du TGN à 20°C. Nous avons donc examiné si les capsides et les glycoprotéines virales

colocalisent exactement au même endroit du TGN. Malheureusement, la triple immunofluorescence avec le virus thermosensible HSV-1 V701 n'a pu être possible puisque deux des trois anticorps provenaient de la souris. Nous avons tout de même tenté de contourner ce problème en utilisant la technologie du Zenon et le couplage direct de l'un des anticorps avec l'Alexa 647, mais aucune de ces deux méthodes n'a fourni de marquage concluant. Nous avons donc réalisé l'immunofluorescence avec des cellules infectées avec le virus HSV-1 K26GFP. Des trois glycoprotéines examinées, toutes colocalisent une fois de plus avec le marqueur TGN46 (figure 8). On remarque toutefois qu'elles ne se trouvent pas toujours exactement au même endroit du TGN que les capsides, puisque le marquage blanc (combinaison des trois couleurs) est très peu abondant (voir les flèches de la figure 8). Ainsi, bien que les capsides et les glycoprotéines virales semblent s'accumuler au TGN, tout porte à croire que ce n'est pas nécessairement au même endroit du TGN. Ceci pourrait suggérer l'existence de sous domaines au TGN, où les glycoprotéines se retrouvent au même endroit que TGN46 et les capsides immédiatement adjacentes à ce marqueur. Ceci serait consistant avec nos données qui suggèrent que les capsides soient souvent adjacentes au TGN (voir les figures 3, 5 et 6), alors que les glycoprotéines colocalisent parfaitement avec le TGN. (voir les figures 7 et 8). Le pourcentage de colocalisation de 50,3% est également consistant avec cette suggestion. Néanmoins, l'analyse des virus intracellulaires suggère au moins qu'une certaine portion des capsides est enveloppée suite au blocage à 20°C, car ces capsides se sont révélées infectieuses lors de l'expérience d'essai de plaque (figure 11). Mais bien que ce type d'essai nous donne une indication de l'infectivité des virus, c'est pourtant la microscopie électronique qui permet de dévoiler les caractéristiques morphologiques des capsides présentes au TGN à 20°C. Cette technologie a été expérimentée, mais étant donné la difficulté à observer les capsides sous les conditions utilisées et l'incapacité des cellules infectées à internaliser par endocytose (figure 20), nous n'avons pas été en mesure de tirer de conclusion. Mentionnons cependant qu'un protocole de microscopie électronique a récemment été mis au point

avec succès au laboratoire et qu'il est maintenant possible de révéler les capsides par cette technique. Il serait donc envisageable de refaire l'expérimentation.

## 5.7 Transport indépendant des glycoprotéines virales et des capsides virales

Les résultats démontrent l'accumulation des capsides et des glycoprotéines virales au niveau du TGN, selon la cinétique virale incluant une relâche des capsides à 20°C. Puisque les glycoprotéines marquent vraisemblablement le site de ré-enveloppement, elles devraient précéder les capsides au TGN. Cette hypothèse a été testée en examinant la localisation des glycoprotéines en absence du transport des capsides, c'est-à-dire en omettant la relâche des capsides à 20°C. Les cellules ont donc été infectées pour 7 heures à 39°C avec le virus V701, lequel exprime la totalité de ces protéines virales, tandis que les capsides nouvellement synthétisées restent bloquées dans le noyau (figure 3A). Les résultats démontrent une fois de plus une colocalisation substantielle de toutes les glycoprotéines virales avec le TGN (figure 9). Comme auparavant, les glycoprotéines gB et gC colocalisent partiellement avec le TGN (encadrés des figures 9R et 17C), tandis que la glycoprotéine gL colocalise complètement avec TGN46 à 39°C. Ces données indiquent que les glycoprotéines virales s'accumulent au TGN, même en absence du transport des capsides, ce qui implique un transport indépendant des capsides et des glycoprotéines virales. Ces données supportent de ce fait le TGN comme site de ré-enveloppement. Ces résultats sont consistants avec des études antérieures lesquelles avaient identifiées certaines glycoprotéines virales au TGN dans des cellules transfectées [92] [93] [94] et la présence de signaux de localisation au TGN dans certaines glycoprotéines, en particulier gE [68] [69], gB [70] et gM [71].

Selon le modèle actuel, les glycoprotéines virales devraient contribuer à cibler les capsides au TGN, mais peu d'information est disponible au sujet de ce ciblage. Certains articles semblent indiquer une interaction plutôt indirecte des glycoprotéines avec les capsides, c'est-à-dire via les protéines du tégument. Une étude en ce sens,

publiée en 2003, montre la liaison de la portion cytoplasmique de gH de HSV-1 avec la protéine VP16 du tégument, autant in vitro qu'in vivo [95]. Par ailleurs, une autre étude montre que la protéine VP16 du tégument est associée à gB [96] alors que la protéine majeure de la capside semble interagir physiquement avec une protéine du tégument, soit le produit du gène UL36 [97]. De plus, une analyse d'interaction par double hybride montre que la queue cytoplasmique de gE interagit avec la protéine de tégument UL49 et vice versa [69]. Bref, il serait opportun d'examiner plus en détails ce qui permet aux capsides de se retrouver au TGN.

## Chapitre VI

### Conclusion

Nos résultats suggèrent fortement le TGN comme site majeur de ré-enveloppement, puisque les capsides et les glycoprotéines virales s'y accumulent de façon prédominante. Notre recherche est en fait la première à démontrer spécifiquement que sept glycoprotéines virales différentes sont simultanément présentes au TGN, et ce dans le contexte d'une infection et non pas de cellules transfectées. De plus, nos données démontrent que ces glycoprotéines se rendent au TGN indépendamment de la progression des capsides. Ces données sont consistantes avec les travaux de Wilson et ses collègues [35] quant au site probable du ré-enveloppement. Ces résultats supportent donc complètement le modèle actuellement favorisé pour la progression des capsides du virus HSV-1, soit celui du dé-enveloppement/ré-enveloppement.

Nos données d'essais de plaques ont révélé que le blocage à 20°C était réversible et laissent supposer qu'une certaine proportion des capsides présentes au TGN sont enveloppées, car infectieuses. La microscopie électronique devrait permettre de déterminer si les capsides se trouvent ou non dans la lumière du TGN à 20°C. Il serait aussi intéressant de pouvoir déterminer la localisation de gB, gC et gL outre au TGN. Ces résultats soulèvent en effet certaines questions, notamment concernant le rôle spécifique que pourrait jouer ces glycoprotéines dans le cycle viral. Il serait également pertinent de déterminer quelles glycoprotéines virales ciblent les capsides au TGN, car le mécanisme exact qui sous-tend ce processus reste encore à être révélé. Pour ce faire, nous envisageons de muter individuellement les glycoprotéines virales via un bacmide contenant la totalité du génome viral. Par la suite, l'impact sur la production des virions infectieux sera observé. L'utilisation du bacmide pourrait aussi être appliqué afin d'introduire la protéine GFP dans l'une ou l'autre des protéines du tégument. Cette approche permettrait d'observer directement leur localisation lors de la cinétique virale étant donné que, pour le moment, la disponibilité d'anticorps spécifique est restreinte. Aussi, puisque HSV-1 semble



transiter par le TGN, nous allons examiner l'impact de réactifs qui bloquent le transport entre le TGN et la membrane plasmique. Enfin, mentionnons que notre laboratoire a récemment reçu le virus K26GFPTs1201, généreusement fourni par le Docteur Phrasant Desai. Ce virus thermosensible marqué GFP s'avèrera d'une grande utilité pour la poursuite de ce projet, car à l'aide de la vidéo-microscopie, sa progression intracellulaire pourra être visualisée en temps réel. De même, la localisation du site de ré-enveloppement pourrait aussi être visualisable via l'élaboration d'une lignée cellulaire exprimant la protéine TGN46 fluorescente ou via l'utilisation du marqueur VSVGts045. Bref, de par ces quelques exemples, maintes perspectives de recherche sont intéressantes à envisager pour la continuité de ce projet de recherche.

## Bibliographie

1. Référence internet: [www.fnclcc.fr/fr/patients/dico/definition.php?id\\_definition=1722](http://www.fnclcc.fr/fr/patients/dico/definition.php?id_definition=1722)
2. Référence internet : [www.anne.decocter.free.fr/d1viro/vgvirus.html](http://www.anne.decocter.free.fr/d1viro/vgvirus.html)
3. **Wildy P.** 1973. Herpes : history and classification. Kaplan AS, ed. The herpesvirus. New York: Academic Press. 1-25
4. **Brenner S. Horne RW.** 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Bi ochim Biophys Acta* 34 :103-110.
5. **Fields Virology**, Third Edition edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Chapitre 2 p.51
6. **Fields Virology**, Third Edition edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Chapitre 2 p.45
7. **Fields Virology**, Third Edition edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Chapitre 73 p.2299
8. **Pertel PE, Fridberg A, Parish ML, Spear PG.** 2001. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology*. Jan 5;279(1):313-24
9. **Foster TP, Rybachuk GV, Kousoulas KG.** 2001. 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.* Dec;75(24):12431-8
10. **Chapman TL, You I, Joseph IM, Bjorkman PJ, Morrison SL, Raghavan M.** 1999. Characterization of the interaction between the herpes simplex virus type I Fc receptor and immunoglobulin G. *J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 11, 6911-6919
11. **Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM.** 2002. Herpes simplex virus, *Front Biosci.* Mar 1;7:d752-64
12. **Rajcani J, Andrea V, Ingeborg R.** 2004. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes.* Apr;28(3):293-310.
13. **Roizman B.** 1999. HSV gene functions: what have we learned that could be generally applicable to its near and distant cousins? *Acta Virol.* Apr-Jun;43(2-3):75-80.

14. **Benetti L, Roizman B.** 2004. Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 22;101(25):9411-6.
15. Référence internet: [www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/publicat/std-mts/its\\_k.html](http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/publicat/std-mts/its_k.html)
16. **Peng W, Jin L, Henderson G, Perng GC, Brick DJ, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C.** 2004. Mapping herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that protect from apoptosis mediated by a plasmid expressing caspase-8. *J Neurovirol.* Aug;10(4):260-5.
17. **Furman PA, St Clair MH, Spector T.** 1984. Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *J Biol Chem.* Aug 10;259(15):9575-9
18. **Crumpacker CS, Schnipper LE, Marlowe SI, Kowalsky PN, Hershey BJ, Levin MJ.** 1982. Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir N. *Engl J Med.* 305:343-346
19. **Kleymann G, Fischer R, Betz UA, Hendrix M, Bender W, Schneider U, Handke G, Eckenberg P, Hewlett G, Pevzner V, Baumeister J, Weber O, Henninger K, Keldenich J, Jensen A, Kolb J, Bach U, Popp A, Maben J, Frappa I, Haebich D, Lockhoff O, Rubsamen-Waigmann H.** 2002. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med.* 8(4): 392-8
20. **Johnson DC, Burke RL, Gregory T.** 1990. Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J Virol.* Jun;64(6):2569-76
21. **Fuller AO, Spear PG.** 1987. Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;84(15):5454-8.
22. **Krummenacher C, Baribaud F, Ponce de Leon M, Baribaud I, Whitbeck JC, Xu R, Cohen GH, Eisenberg RJ.** 2004. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. *Virology.* May 1;322(2):286-99

23. **Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH, Campadelli-Fiume G.** 2004. The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 11;101(19):7445-50.
24. **Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol.* May;77(9):5324-32.
25. **Marozin S, Prank U, Sodeik B.** 2004. Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol.* Apr;85(Pt 4):775-86
26. **Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* Mar 10;136(5):1007-21.
27. **Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A.** 2000 Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* Jul;20(13):4922-31.
28. **Hardy WR, Sandri-Goldin RM.** 1994. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol.* Dec;68(12):7790-9.
29. **Quinlan MP, Chen LB, Knipe DM.** 1984. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell.* Apr;36(4):857-68.
30. **Lehman IR, Boehmer PE.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem.* 274:28059-62.
31. **Newcomb WW, Thomsen DR, Homa FL, Brown JC.** 2003. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *J Virol.* Sep;77(18):9862-71.

32. **Gibson W, Roizman B.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol.* Nov;10(5):1044-52.
33. **Homa, F. L., and J. C. Brown.** 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* 7:107-122.
34. **Register, R. B., and J. A. Shafer.** 1996. A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1. *J Virol Methods* 57:181-93.
35. **Harley, C. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson.** 2001. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J Virol* 75:1236-1251.
36. **Church, G. A., and D. W. Wilson.** 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol* 71:3603-12.
37. **Rixon, F. J., C. Addison, and J. McLauchlan.** 1992. Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Gen Virol* 73:277-84.
38. **Desai, P., and S. Person.** 1998. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* 72:7563-8.
39. **Simpson-Holley M, Baines J, Roller R, Knipe DM.** 2004. Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J Virol.* 78:5591-600.
40. **Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol. Sep;*76(17):8939-52.
41. **Campadelli-Fiume, G., F. Farabegoli, S. Di Gaeta, and B. Roizman.** 1991. Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 65:1589-1595.
42. **Darlington, R., and L. Moss.** 1968. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* 2:48-55.

43. **Johnson, D. C., and P. G. Spear.** 1982. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.* 43:1102-1112
44. **Torrise, R. M., C. DiLazzaro, A. Pavan, L. Pereira, and G. Campadelli-Fiume.** 1992. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J. Virol.* 66:554-561
45. **Griffiths, G., S. Pfeiffer, K. Simons, and K. Matlin.** 1985. Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J Cell Biol* 101:949-64.
46. **Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz.** 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-5.
47. **van Drunen Littel-van den Hurk, S., and L. A. Babiuk.** 1985. Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* 143:104-18.
48. **Pizer, L. I., G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 1980. Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production. *J Virol* 34:142-53.
49. **Dasgupta, A., and D. W. Wilson.** 2001. Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J Gen Virol* 82:1561-7.
50. **Whealy, M. E., J. P. Card, R. P. Meade, A. K. Robbins, and L. W. Enquist.** 1991. Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol* 65:1066-81.
51. **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.* Jan;66(1):554-61.
52. **Lycke E, Hamark B, Johansson M, Krotochwil A, Lycke J, Svennerholm B.** 1988. Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study, *Arch Virol.* 101(1-2):87-104.

53. **Stackpole CW.** 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol.* 4(1):75-93.
54. **Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC.** 2001. Egress of alphaherpesviruses : comparative ultrastructure study. *J Virol.* Apr;75(8):3675-84.
55. **Van Genderen, I. L., R. Brandimarti, M. Torrisi, G. Campadelli, and G. van Meer.** 1994. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of the host cell nuclei. *Virology* 200:831-836.
56. **Smith JD.** 1980. An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus. *Intervirology.* 13(5):312-6
57. **Browne H, Bell S, Minson T, Wilson DW.** 1996. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions : evidence for reenvelopment during egress. *J Virol.* Jul;70(7):4311-6.
58. **Skepper JN, Whiteley A, Browne H, Minson A.** 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol.* Jun;75(12):5697-702.
59. **Elliott G, O'Hare P.** 1999. Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J Virol.* May;73(5):4110-9.
60. **Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, P. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol* 76:9934-51.
61. **Miranda-Saksena, M., P. J. Armati, R. A. Boadle, D. J. Holland, and A. L. Cunningham.** 2000. Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J. Virol.* 74:1827-1839.
62. **Del Rio, T., T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross, and L. W. Enquist.** 2005. Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* 79:3903-19.

63. **Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, and M. D. Gershon.** 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* 68:6372-90.
64. **Roffman, E., J. P. Albert, J. P. Goff, and N. Frenkel.** 1990. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol* 64:6308-13.
65. **Nozawa, N., Y. Yamauchi, K. Ohtsuka, Y. Kawaguchi, and Y. Nishiyama.** 2004. Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Exp Cell Res* 299:486-97
66. **Brunetti, C. R., K. S. Dingwell, C. Wale, F. L. Graham, and D. C. Johnson.** 1998. Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *J Virol* 72:3330-9.
67. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76:1537-47.
68. **Alconada A, Bauer U, Sodeik B, Hoflack B.** 1999. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol.* 73:377-87.
69. **McMillan TN, Johnson DC.** 2001 Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *J Virol.*75:1928-40.
70. **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.
71. **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.* Dec;85(Pt 12):3517-27.
72. **Collins WJ, Johnson DC.** 2003. Herpes simplex virus gE/gI expressed in epithelial cells interferes with cell-to-cell spread. *J Virol.* 77:2686-95.
73. **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.



74. **Wisner TW, Johnson DC.** 2004. Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol.* Nov;78(21):11519-35
75. **Douglas, M. W., R. J. Diefenbach, F. L. Homa, M. Miranda-Saksena, F. J. Rixon, V. Vittone, K. Byth, and A. L. Cunningham.** 2004. Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* 279:28522-30.
76. **Campadelli-Fiume, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrasi.** 1993. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2798-802.
77. **Ponnambalam, S., M. Girotti, M. L. Yaspo, C. E. Owen, A. C. Perry, T. Suganuma, T. Nilsson, M. Fried, G. Banting, and G. Warren.** 1996. Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *J Cell Sci* 109 ( Pt 3):675-85.
78. **Prescott, A. R., J. M. Lucocq, J. James, J. M. Lister, and S. Ponnambalam.** 1997. Distinct compartmentalization of TGN46 and beta 1,4-galactosyltransferase in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 72:238-46.
79. **Griffith KJ, Chan EK, Lung CC, Hamel JC, Guo X, Miyachi K, Fritzler MJ.** 1997. Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* Sep;40(9):1693-702.
80. **Ward PL, Avitabile E, Campadelli-Fiume G, Roizman B.** 1998. Conservation of the architecture of the Golgi apparatus related to a differential organization of microtubules in polykaryocytes induced by syn- mutants of herpes simplex virus 1. *Virology.*15;241(2):189-99.
81. **Trus, B. L., W. W. Newcomb, F. P. Booy, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 1992. Distinct monoclonal antibodies separately label the hexons or the pentons of herpes simplex virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11508-12.

82. **Spear PG, Roizman B.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J Virol.* Jan;9(1):143-59
83. **Brideau, A. D., L. W. Enquist, and R. S. Tirabassi.** 2000. The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J Clin Virol* 17:69-82.
84. **Olson, J. K., and C. Grose.** 1997. Endocytosis and recycling of varicella-zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail. *J Virol* 71:4042-54.
85. **Pasieka, T. J., L. Maresova, and C. Grose.** 2003. A functional YNKI motif in the short cytoplasmic tail of varicella-zoster virus glycoprotein gH mediates clathrin-dependent and antibody-independent endocytosis. *J Virol* 77:4191-204.
86. **Tirabassi, R. S., and L. W. Enquist.** 1998. Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle. *J Virol* 72:4571-9.
87. **Tugizov, S., E. Maidji, J. Xiao, and L. Pereira.** 1999. An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *J Virol* 73:8677-88.
88. **Van Minnebruggen, G., H. W. Favoreel, and H. J. Nauwynck.** 2004. Internalization of pseudorabies virus glycoprotein B is mediated by an interaction between the YQRL motif in its cytoplasmic domain and the clathrin-associated AP-2 adaptor complex. *J Virol* 78:8852-9.
89. **Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J.** 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* Mar 12;392(6672):193-7.
90. **Szilard RK, Titorenko VI, Veenhuis M, Rachubinski RA.** 1995. Pay32p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is an intraperoxisomal component of the matrix protein translocation machinery. *J Cell Biol.* Dec;131(6 Pt 1):1453-69.
91. **Storrie B, White J, Rottger S, Stelzer EH, Suganuma T, Nilsson T.** 1998. Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J Cell Biol.* Dec 14;143(6):1505-21

92. **Alconada, A., U. Bauer, L. Baudoux, J. Piette, and B. Hoflack.** 1998. Intracellular transport of the glycoproteins gE and gI of the varicella-zoster virus. gE accelerates the maturation of gI and determines its accumulation in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 273:13430-6.
93. **Zhu, Z., M. D. Gershon, Y. Hao, R. T. Ambron, C. A. Gabel, and A. A. Gershon.** 1995. Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* 69:7951-9.
94. **Zhu, Z., Y. Hao, M. D. Gershon, R. T. Ambron, and A. A. Gershon.** 1996. Targeting of glycoprotein I (gE) of varicella-zoster virus to the trans-Golgi network by an AYRV sequence and an acidic amino acid-rich patch in the cytosolic domain of the molecule. *J Virol* 70:6563-75
95. **Gross, S. T., C. A. Harley, and D. W. Wilson.** 2003. The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317:1-12.
96. **Zhu Q, Courtney RJ.** 1994. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* Nov. 1 :204(2)590-9
97. **McNabb, D. R Courtney.** 1992. Characterization of the large tegument protein ICP1/2 of herpes simplex virus type 1. *Virology* 190:221-232.