

Université de Montréal

**Étude de la sortie du virus herpès simplex de type 1  
(HSV-1) hors du noyau**

par

Gaudeline Rémillard-Labrosse

Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)  
Au programme de pathologie et biologie cellulaire  
option biologie cellulaire

septembre 2009

© Gaudeline Rémillard-Labrosse, 2009



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de la sortie du virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) hors du noyau

présentée par :  
Gaudeline Rémillard-Labrosse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nicole Leclerc, présidente-rapporteuse  
Roger Lippé, directeur de recherche  
Éric A. Cohen, membre du jury  
Sylvie LaBoissière, examinatrice externe



## Résumé

Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) affecte la majorité de la population mondiale. HSV-1 cause de multiples symptômes délétères dont les plus communs sont les lésions orofaciales usuellement appelées feux sauvages. Le virus peut aussi causer des effets plus sérieux comme la cécité ou des troubles neurologiques. Le virus réside de façon permanente dans le corps de son hôte. Malgré l'existence de nombreux traitements pour atténuer les symptômes causés par HSV-1, aucun médicament ne peut éliminer le virus. Dans le but d'améliorer les connaissances concernant le cycle viral de HSV-1, ce projet cible l'étude du transport du virus dans la cellule hôte. Ce projet aura permis la collecte d'informations concernant le *modus operandi* de HSV-1 pour sortir des compartiments cellulaires où il séjourne. Les différentes expérimentations ont permis de publier 3 articles dont un article qui a été choisi parmi les meilleurs papiers par les éditeurs de « Journal of Virology » ainsi qu'un 4<sup>e</sup> article qui a été soumis.

Premièrement, un essai *in vitro* reproduisant la sortie de HSV-1 du noyau a été mis sur pied, via l'isolation de noyaux issus de cellules infectées. Nous avons démontré que tout comme dans les cellules entières, les capsides s'évadent des noyaux isolés dans l'essai *in vitro* en bourgeonnant avec la membrane nucléaire interne, puis en s'accumulant sous forme de capsides enveloppées entre les deux membranes nucléaires pour finalement être relâchées dans le cytoplasme exclusivement sous une forme non enveloppée. Ces observations appuient le modèle de transport de dé-enveloppement/ré-enveloppement.

Deuxièmement, dans le but d'identifier des joueurs clés viraux impliqués dans la sortie nucléaire du virus, les protéines virales associées aux capsides relâchées par le noyau ont été examinées. La morphologie multicouche du virus HSV-1 comprend un génome d'ADN, une capside, le tégment et une enveloppe. Le tégment est un ensemble de protéines virales qui sont ajoutées séquentiellement sur la particule virale. La séquence d'ajout des tégments de même que les sites intracellulaires où a lieu la tégmentation sont l'objet d'intenses recherches. L'essai *in vitro* a été utilisé pour étudier cette tégmentation. Les données recueillies suggèrent un processus séquentiel qui implique l'acquisition des

protéines U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37, ICP0, ICP8, U<sub>L</sub>41, U<sub>L</sub>42, U<sub>S</sub>3 et possiblement ICP4 sur les capsides relâchées par le noyau.

Troisièmement, pour obtenir davantage d'informations concernant la sortie de HSV-1 des compartiments membranaires de la cellule hôte, la sortie de HSV-1 du réseau *trans* golgien (TGN) a aussi été étudiée. L'étude a révélé l'implication de la protéine kinase D cellulaire (PKD) dans le transport post-TGN de HSV-1. PKD est connue pour réguler le transport de petits cargos et son implication dans le transport de HSV-1 met en lumière l'utilisation d'une machinerie commune pour le transport des petits et gros cargos en aval du TGN. Le TGN n'est donc pas seulement une station de triage, mais est aussi un point de rencontre pour différentes voies de transport intracellulaire.

Tous ces résultats contribuent à une meilleure compréhension du processus complexe de maturation du virus HSV-1, ce qui pourrait mener au développement de meilleurs traitements pour combattre le virus. Les données amassées concernant le virus HSV-1 pourraient aussi être appliquées à d'autres virus. En plus de leur pertinence dans le domaine de la virologie, les découvertes issues de ce projet apportent également de nouveaux détails au niveau du transport intracellulaire.

**Mots-clés** : assemblage viral, capsid, membrane nucléaire, PKD, réseau *trans* golgien, tégument, tégumentation, transport intracellulaire, virus herpès

## Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) affects the majority of the world population. HSV-1 causes various deleterious symptoms with the most common being facial mucosal lesions usually named cold sores. The virus can also contribute to more serious effects such as corneal blindness and neurological problems. The virus is permanently residing in the host body. Despite the existence of several treatments against HSV-1 symptoms, no drug is able to eliminate the virus. In order to improve knowledge of the viral cycle of HSV-1, this project focuses on the transport of the virus in the host cell. During this project we collect data to detail the *modus operandi* used by HSV-1 to leave cellular compartments such as the nucleus and the TGN. The different experimentations achieved during this PhD allowed the publication of three articles, including one selected as worthy of note by the editors of “Journal of virology” and a fourth article that has been submitted.

Firstly, an *in vitro* assay that reproduces the exit of HSV-1 virus from nuclei was established via the isolation of nuclei from infected cells. We found that, as in intact cells, capsids escaped the isolated nuclei in the *in vitro* assay by budding through the inner nuclear membrane, accumulated as enveloped capsids between the two nuclear membranes, and were released in cytoplasm exclusively as unenveloped capsids. These observations support the de-envelopment / re-envelopment model of transport.

Secondly, to identify viral players implicated in the nuclear egress of HSV-1, viral proteins associated with nuclear released capsids were investigated. HSV-1 has a multilayered morphology that includes a DNA genome, a capsid, a tegument and an envelope. The tegument represents viral proteins added sequentially on the viral particle. The sequential order and intracellular compartments where the tegument is added are the subject of intense research. The *in vitro* assay was used to investigate this tegumentation process. The acquired data suggest a sequential process that involved the acquisition of viral proteins U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37, ICP0, ICP8, U<sub>L</sub>41, U<sub>L</sub>42, U<sub>S</sub>3 and possibly ICP4 on capsids released by the nucleus.

Thirdly, to obtain information regarding another process of egress of HSV-1 from a membranous cellular organelle, the egress of HSV-1 from the TGN was also studied. The

study revealed the implication of the cellular protein kinase D (PKD) in HSV-1 post-TGN transport. The involvement of this kinase, known to regulate the transport of small cargos, highlights the post TGN trafficking of both small and large entities (such as HSV-1) by a common machinery, in sharp contrast to earlier steps of transport. This indicates that the TGN is not only a sorting station but also a meeting point where different intracellular routes can meet.

All these outcomes contribute to a better understanding of the complex maturation process of HSV-1 that could lead to the development of better tools to fight the virus. Results acquired concerning HSV-1 could also be applied to other viruses. Besides their relevance in the virology field, findings provided by this project also supply new details about cellular biology concerning intracellular transport.

**Keywords** : capsid, egress, herpesvirus, intracellular transport, nuclear membrane, PKD, tegument, tegumentation, *trans* Golgi network, virus assembly



*À mon amour, je t'aime TOI.*

*Aux gens qui m'ont donné des coups de pieds  
au derrière et qui m'ont permis de terminer  
ce long et enrichissant périple.*



*The most exciting phrase to hear in science,  
the one that heralds new discoveries,  
is not « Eureka ! » but « That's funny. . . »*

Isaac Asimov

*Puis, un jour, je n'ai pas pu résister  
Et je t'ai demandé de m'embrasser  
Tout de suite, tu t'es exécuté  
Et tu m'as transmis par un baiser*

*Le feu sauvage  
Le feu sauvage de l'amour  
La maladie du baiser, yé yé yé yé  
Le feu sauvage de l'amour*

RBO

*Happiness is when what you think, what you say, and what you do are in harmony.*

Mahatma Gandhi



## Remerciements

Je tiens à remercier toute l'équipe Lippé pour l'expérience inoubliable des dernières années. Merci Roger d'avoir pris une chance en m'engageant, de m'avoir supportée et de m'avoir laissée te contredire à quelques reprises... Merci Johanne d'avoir été là. Merci beaucoup pour ton écoute, merci énormément pour tes conseils et merci d'avoir partagé mes petites folies du vendredi. Merci aussi pour tout ce que tu fais pour le labo. Merci Geneviève pour tous ces repas à discuter de tout et de rien. Merci pour le support quand les fils se touchaient. Merci de m'avoir initiée au merveilleux monde de l'isolation des noyaux. (Je te revaudrai ça...) Merci Ginette pour ton expertise technique qui a su faciliter mon séjour dans le labo. Merci aussi à Josée Letellier et Michel Lauzon pour leur support technique et (souvent) moral. Merci Geneviève, Sophie, Jean-François, Michel, Sandra, Jie, Constantina, Pascal, Camille et Yordanka d'avoir été des collègues fantastiques et de m'avoir laissé du chocolat de temps en temps.

Merci également au personnel du Département de pathologie et biologie cellulaire qui à un moment ou un autre durant la durée de ce doctorat se sont dévoués pour le bon déroulement de mes études.

Merci à mon comité de « marrainage », Nicole Leclerc et Allégria Kessous qui m'ont donné de bons conseils tout au long de mes études.

Merci aux habitants de la planète Urde de m'avoir laissé partir pour faire un stage sur la planète Terre et d'avoir prolongé indéfiniment mon visa pour pouvoir y demeurer.

Un merci particulier à ma famille qui a su me supporter de bien des manières et qui m'a encouragée dans tous les projets que j'entreprends. Merci Pierre, Lorraine, Delphine et Zachary, je vous aime gros comme la Terre. Un petit merci aussi à Merguez d'avoir évité de dévorer ma thèse et d'avoir refusé de servir de cobaye (ce remerciement s'applique aussi à ma sœur et mon frère).

Le plus gros et le plus beau des mercis à Olivier pour tout. Merci d'être le meilleur chum au monde et de créer le bonheur autour de toi. Merci pour ton support essentiel qui m'a permis de conclure ce long, mais beau projet de doctorat. Merci de m'avoir sortie du tourbillon et d'avoir su m'écouter et m'encourager quand j'en avais besoin. Merci d'être devenu un expert de la sortie nucléaire à force de m'entendre préparer des présentations. Merci de m'avoir permis de compléter cette aventure et maintenant d'en commencer une nouvelle excitante et superbe. Je t'aime plus que tous les multivers réunis.

Merci à ma belle Lilou que j'aime plus que tout et qui m'a donné du courage pour compléter cette grande aventure.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Liste des tables</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xix</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Qu'est-ce que le virus HSV-1?</b> .....	<b>3</b>
Caractéristiques du virus herpès simplex de type 1 .....	3
Famille des virus herpès.....	3
Symptomatologie .....	3
Constituants du virion HSV-1 .....	4
Le génome viral .....	5
La capside virale .....	6
Le tégument.....	7
L'enveloppe virale .....	8
Cycle viral de HSV-1 .....	8
L'entrée du virus dans la cellule .....	8
L'expression des protéines virales .....	9
L'assemblage des capsides.....	10
Le transport du virus .....	11
La sortie du virus hors de la cellule .....	13
Phase latente vs phase active .....	14
Relation entre le virus HSV-1 et son hôte cellulaire.....	15
Défense antivirale et évasion immunitaire.....	15
Parasitisme obligatoire et utilisation des facteurs cellulaires.....	17
Interactions entre le virus HSV-1 et le cytosquelette.....	18
<b>Pourquoi étudier le virus HSV-1?</b> .....	<b>21</b>

Séroprévalence élevée et transmission aisée.....	21
Persistance de l'infection et potentiel de réactivation.....	22
Médication virucide inexistante .....	22
Symptômes graves et comorbidité .....	23
HSV-1 et cécité .....	23
HSV-1 et troubles neurologiques.....	24
Encéphalite.....	24
Paralysie de Bell.....	24
Maladie d'Alzheimer .....	24
HSV-1 et VIH .....	28
HSV-1 : outil intéressant comme modèle d'étude .....	28
Découvertes provenant de l'étude des virus.....	28
Caractéristiques du virus HSV-1 qui en fait un bon modèle de recherche .....	29
<b>Objectifs du projet de recherche .....</b>	<b>30</b>
<b>Résultats - présentation par articles.....</b>	<b>31</b>
Article I .....	31
Contribution des auteurs .....	31
Mise en contexte (article I) .....	32
Article.....	34
Introduction.....	34
Materials and methods .....	36
Results.....	40
Discussion .....	46
Acknowledgements.....	49
References.....	50
Figures et tables – Article I.....	59
Article II.....	72
Contribution des auteurs .....	72
Mise en contexte (article II).....	73
Article.....	75
Introduction.....	75

Materials and methods .....	77
Results .....	80
Discussion .....	84
Acknowledgements .....	88
References .....	88
Figures Article II .....	96
Article III .....	105
Contribution des auteurs .....	105
Article IV .....	106
Contribution des auteurs .....	106
Mise en contexte (articles III et IV) .....	107
Article III .....	108
Introduction .....	108
Results .....	109
Discussion .....	115
Materials and Methods .....	118
Acknowledgments .....	121
References .....	121
Figures – Article III .....	128
Article IV .....	136
Text .....	136
Acknowledgments .....	139
References .....	139
Figure – Article IV .....	142
<b>Discussion .....</b>	<b>144</b>
Contribution à l’avancement des connaissances .....	144
Travaux futurs .....	147
Implication de l’actine nucléaire dans la sortie nucléaire de HSV-1 .....	147
Implication du cholestérol dans la sortie nucléaire de HSV-1 .....	149
Implication de facteurs viraux dans la sortie nucléaire de HSV-1 .....	150
Analyse par fractionnement du cytosol .....	150



Utilisation de plusieurs souches virales et de plusieurs types cellulaires .....	151
Rôle du tégument primaire pour la sortie nucléaire de HSV-1 .....	151
Caractérisation de l'association des téguments.....	152
Comparaison du protéome des différents intermédiaires de HSV-1.....	153
Identification des protéines cellulaires associées aux capsides HSV-1 relâchées par le noyau .....	153
Impact de la polarité cellulaire sur le rôle de PKD dans le transport de HSV-1.....	153
Analyse des différents isoformes de PKD .....	154
Enrichissement de la transfection des ARNsi .....	154
Propriétés de l'interaction HSV-1 / PKD.....	155
Rôle de PKD dans le transport des gros cargos .....	155
<b>Conclusion.....</b>	<b>156</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>158</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>I</b>

## Liste des tables

- Table 1: Integrity of nuclei determined by their exclusion of dextran-TRITC (article I).....59
- Table 2: Preferential release of mature wild-type capsids by nuclei *in vitro* (article I).....65
- Table 1: Viral content of nuclear released HSV-1 particles identified by mass Spectrometry (article II).....104
- Table 1: protéines virales codées par le virus HSV-1 (annexe).....I

## Liste des figures

- Figure 1 : Schéma représentant le génome de HSV-1..... 5
- Figure 2 : Schématisation des modèles de transport hors du noyau de la cellule hôte pour le virus HSV-1..... 12

### Article I

- Figure 1 : Purity and integrity of isolated nuclei..... 60
- Figure 2 : Efficient separation of nuclei and virions..... 61
- Figure 3 : Quantitative analysis by PCR of capsids released..... 62
- Figure 4 : Quantitative analysis by scintillation counting of capsids released *in vitro*..... 63
- Figure 5 : Lack of significant leakage of PCNA..... 64
- Figure 6 : Cytosol from infected cells is slightly more efficient than mock-treated cytosol in releasing capsids *in vitro*..... 64
- Figure 7 : Negative staining of capsids liberated during the *in vitro* assay..... 66
- Figure 8 : Viral egress *in vitro*..... 67
- Figure 9 : The thermosensitive protease A V701 mutant behaves in the same way as the wild-type virus in the *in vitro* assay..... 69
- Figure 10 : Electron microscopy analysis of V701 capsids..... 70
- Figure 11: SQ analysis of viral DNA released..... 71

### Article II

- Figure 1 : Purification protocol..... 96
- Figure 2 : Determination of the fractions enriched in virus following gel filtration..... 97
- Figure 3 : Purity of *in vitro* released HSV-1 capsids..... 98
- Figure 4 : Western blot analysis of capsids released from infected nuclei incubated in mock cytosol..... 99

- Figure 5 : Intranuclear localization of primary tegument added on *in vitro* capsids. .... **100**
- Figure 6 : Total Western blot analysis to identify primary teguments. .... **102**

**Article III**

- Figure 1 : Viral egress is hampered by DAG inhibitors downstream of the nucleus ..... **128**
- Figure 2: DAG inhibitors trap HSV-1 in the TGN and are rescued by a DAG analog ..... **129**
- Figure 3: Kinase dead PKD mutant prevents HSV-1 egress and causes viral accumulation at the TGN ..... **130**
- Figure 4: Inhibition of PKD protein expression by siRNA ..... **132**
- Figure 5: PKD3 siRNA traps HSV-1 at the TGN ..... **133**
- Figure 6: Presence of enveloped virions at the TGN upon PKD knock down ..... **134**

**Article IV**

- Figure 1: The TGN is a meeting point where conventional and unconventional routes of intracellular transport merge ..... **142**

## Liste des sigles et abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
Apo E	apolipoprotéine E
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNmi	micro acide ribonucléique
ARNsi	petit acide ribonucléique d'interférence
ARPE-19	arising retinal pigment epithelia (lignée cellulaire)
CFH	facteur H du système du complément
COX-2	cyclooxygénase 2
CPE	effets cytopathiques
cPLA <sub>2</sub>	phospholipase A2 cytosolique
CMH I ou II	complexe majeur d'histocompatibilité classe I ou classe II
CMV	cytomégalovirus
ε4	allèle ε4 de l'apolipoprotéine E
EBV	virus Epstein-Barr
ERGIC	compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi
HHV	virus herpès humain (type 1 à 8)
hnRNP	ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire
HSV-1	virus herpès simplex de type 1
HSV-2	virus herpès simplex de type 2
HSVE	encéphalite causée par le virus herpes simplex
HVEM	récepteur médiateur de l'entrée des virus herpès

ICP	terme utilisé pour nommer certaines protéines virales (infected cell protein)
IFN	interféron
IL-	interleukine
Kpb	kilo paire de bases
LAT	transcrits associés à la latence
ND-10	domaine nucléaire 10
NPC	complexe du pore nucléaire
NK	cellules tueuses naturelles (natural killer)
Nup	nucléoporine
PKA	protéine kinase A
PKD	protéine kinase D
PKR	protéine kinase dépendante de l'ARN
PRV	virus de la pseudorabie (pseudorabies virus)
RE	réticulum endoplasmique
R <sub>L</sub>	séquence répétée longue du génome viral (repeated long)
R <sub>S</sub>	séquence répétée courte du génome viral (repeated short)
TGN	réseau <i>trans</i> -golgien ( <i>trans</i> -Golgi network)
TK	thymidine kinase
TNF	facteur nécrosant de tumeurs
U <sub>L</sub>	séquence unique longue du génome viral (unique long)
U <sub>S</sub>	séquence unique courte du génome viral (unique short)
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VP	terme utilisé pour nommer certaines protéines virales (viral protein)

## Introduction

Dans l'histoire, il est difficile de déterminer exactement l'apparition du virus « herpès ». Déjà dans la Grèce ancienne, il y a avait utilisation du mot « herpès » qui signifiait « rampant » et qui se rapportait aux lésions cutanées qui semblaient ramper à la surface de la peau [1, 2]. L'histoire rapporte aussi que l'empereur romain Tibère aurait décrété une interdiction de s'embrasser dans les rassemblements publics dans le but de limiter la propagation de ce qui devait être l'herpès labial. Le virus était même répandu dans l'entourage immédiat de l'empereur qui devait chaque matin embrasser sur la bouche chacun des sénateurs [3, 4]. Même avant la définition de ce qu'est le virus herpès simplex, il y a des références qui s'y rapportent dans la littérature populaire. Par exemple, William Shakespeare décrit des « lésions de peste » sur les lèvres de Juliette, faisant références aux lésions labiales communément appelées « feux sauvages », dans la célèbre pièce Roméo et Juliette [5]. La première description moderne de l'herpès labial est attribuée à Daniel Turner en 1714 [6]. Robert Willan et Thomas Bateman sont les premiers à avoir décrit les différences entre l'herpès labial et l'herpès génital, sans toutefois leur attribuer un caractère infectieux. En 1893, le dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal a associé la notion d'infectivité au virus herpès. Le terme herpès simplex a été utilisé au début des années 1900 et c'est Karl Schneweis qui a démontré l'existence de deux virus distincts, soit l'herpès simplex de type I (HSV-1), affectant surtout la région labiale et le virus herpès de type II (HSV-2), principalement associé à des lésions génitales [7].

Malgré le fait que le virus soit évoqué depuis plusieurs siècles, il manque toujours aujourd'hui des informations indispensables et nécessaires à la compréhension d'étapes clés du cycle viral de HSV-1. Parmi ces étapes, le transport intracellulaire du virus revêt une importance capitale puisqu'il est essentiel pour le virus d'atteindre différents sites précis dans la cellule hôte, tout au long de sa maturation. Ce projet de recherche a permis d'accumuler des données concernant le transport du virus HSV-1 entre le noyau et le cytoplasme de la cellule hôte et de mieux définir une étape plus tardive du transport de HSV-1, soit le transport entre le réseau *trans*-Golgien (TGN) et la membrane plasmique. Il sera donc question dans cette thèse d'un bref préambule au virus herpès simplex, servant à répondre aux interrogations suivantes : « qu'est-ce que le virus HSV-1? » et « pourquoi

s'intéresser au virus HSV-1? ». Les objectifs de cette thèse chevauchent deux univers intéressants : soit la biologie cellulaire et la virologie. Les articles présentés dans cette thèse dans les sections subséquentes servent à appuyer ces objectifs. Les deux premiers articles traitent spécifiquement de processus liés à la sortie du virus HSV-1 hors du noyau et l'article suivant, accompagné d'un addenda, démontre l'implication d'une protéine cellulaire, la protéine kinase D (PKD), dans le transport du virus hors du TGN. La contribution à l'avancement des connaissances de même que quelques propositions de travaux futurs pouvant découler des résultats publiés durant ce projet de doctorat sont ensuite présentées. Finalement, les recherches effectuées dans le cadre de ce projet de recherche, en plus de préciser certains aspects du cycle viral du virus HSV-1, pourront aussi contribuer à l'avancement des connaissances concernant les mécanismes cellulaires utilisés par le virus.



# Qu'est-ce que le virus HSV-1?

## Caractéristiques du virus herpès simplex de type 1

### Famille des virus herpès

Le virus herpès simplex de type 1 fait partie de la grande famille des virus herpès, les *Herpesviridae*. Cette famille peut être subdivisée en sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, dont fait partie HSV-1, les *Betaherpesvirinae* ainsi que les *Gammaherpesvirinae*. Les hôtes des virus herpès sont très nombreux comprenant entre autres les animaux de la ferme [8-10], les primates [11], les huîtres [12], le poisson zébré [13], sans oublier l'être humain. Il y a huit virus de la grande famille des virus herpès qui sont infectieux chez l'*homo sapiens* incluant chez les gamma-herpès virus, le virus associé au sarcome de Kaposi (herpès virus humain de type 8 ou HHV-8) et le virus Epstein-Barr (EBV) responsable de la mononucléose et pouvant causer divers lymphomes. Pour ce qui est des bêta-herpès virus, il y a le cytomégalovirus, le virus herpès humain de type 6 (HHV-6) causant la roséole de même que le virus herpès humain de type 7 (HHV-7). Finalement, chez les alpha-herpès virus, il y a le virus varicella-zoster qui cause la varicelle ou le zona ainsi que les deux virus herpès simplex, de type 2 (HSV-2) ou de type 1 (HSV-1), la grande vedette de cette thèse [14].

### Symptomatologie

Le virus herpès simplex de type 1 provoque de nombreux symptômes, le plus commun étant les lésions orolabiales, les fameux « feux sauvages ». Cependant, le virus HSV-1 peut également provoquer une multitude d'autres manifestations physiques : conjonctivite, gingivostomatite, amygdalite, diverses infections du système digestif (pharyngite, œsophagite), lésions génitales, eczéma herpétique avec des lésions généralisées sur différentes régions du corps, infections au niveau de la trachée et des bronches, etc. Le virus peut également occasionner des symptômes graves pouvant causer la mort, tel qu'une méningite ou une encéphalite ou encore entraîner une cécité due à une infection de la cornée. L'infection par HSV-1 peut entraîner des complications fatales chez les nouveau-nés et chez les patients immunodéficients [15-18]. Ces symptômes graves

seront traités plus en détails dans la section « Symptômes graves et comorbidité » du chapitre « Pourquoi étudier le virus HSV-1 ? ».

Le tropisme cellulaire du virus HSV-1 est ciblé sur les cellules neuronales et ganglionnaires du système nerveux central lors de la phase latente et les cellules épithéliales lors de la phase active du virus. Lors d'une infection active, les manifestations visibles de l'infection au niveau cellulaire sont appelés effets cytopathiques (CPE). Les effets cytopathiques du virus HSV-1 incluent les signes suivants : une augmentation de la taille des cellules; un arrondissement de la cellule et du noyau; des nucléoles plus proéminents et situés près de la membrane nucléaire; une marginalisation de la chromatine; l'apparition de nombreux corps denses induits par le virus; une dilatation de l'espace périnucléaire ainsi que de l'espace luminal du réticulum endoplasmique (RE) et même de l'appareil de Golgi; la multiplication du nombre de vacuoles cytoplasmiques; la fragmentation et dispersion des saccules de l'appareil de Golgi et du réseau *trans* golgien (TGN); une irrégularité au niveau de la membrane plasmique et finalement la formation de syncytiums inter-cellulaires qui permettent une transmission virale d'une cellule à une autre [19]. Tous ces signes sont visibles par microscopie (photonique ou électronique) et servent d'indices visuels pour repérer la présence du virus dans des cellules potentiellement infectées.

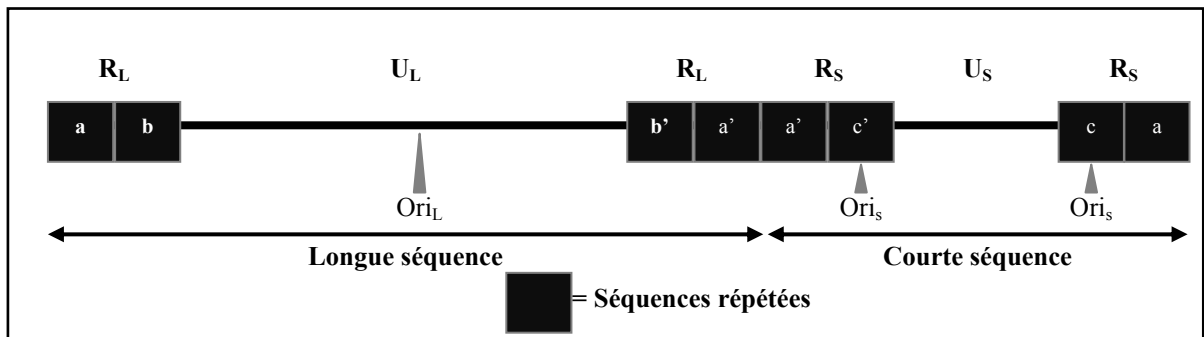
### **Constituants du virion HSV-1**

Tous les virus de la grande famille herpès possèdent des caractéristiques morphologiques communes : ce sont des virus possédant un génome fait d'ADN bicaténaire linéaire contenu dans une capsidie protéique icosaédrale. Cette coquille est englobée d'une couche de protéines hétéroclites nommée le tégument et par une enveloppe lipidique dérivée de la cellule hôte. Ces composantes assemblées forment le virion. Il sera donc question dans la section suivante d'une description des propriétés physiques des virions HSV-1.

(Veuillez prendre note qu'il y a une énumération complète des protéines virales codées par le virus HSV-1 dans la table 1 située en annexe de cette thèse, afin de servir de référence tout au long de cette thèse)

## Le génome viral

Le génome viral de HSV-1 se compose de 152 kpb (kilo paire de bases) dont la séquence génomique complète a été publiée en 1988 [20]. Le génome d'ADN bicaténaire se compose de deux segments liés de façon covalente, nommés séquence unique longue ( $U_L$ ) et séquence unique courte ( $U_S$ ). Des séquences répétées inversées constituent les extrémités des deux segments uniques ( $R_S$  et  $R_L$ ) (figure 1). La réplication du génome viral a lieu dans le noyau de la cellule hôte, dans des sites spécialisés nommés compartiments de réplication. Ces compartiments de réplication sont constitués entre autres par les protéines cellulaires PML et sp100 dans les domaines nucléaires 10 (ND10) des noyaux des cellules infectées. Le virus doit inactiver ces protéines cellulaires ayant un effet antiviral avant d'entreprendre la réplication de son génome. Le génome de HSV-1 contient trois sites d'origines de réplication,  $ori_L$  dans la séquence longue et  $ori_S$  (en deux copies) dans les séquences répétées encadrant la séquence courte [21, 22]. Ces sites d'origine ne sont toutefois pas suffisants pour initier la réplication virale [23, 24]. En effet, pour le virus HSV-1, sept protéines virales sont également requises pour enclencher la réplication :  $U_L9$ , la protéine qui se lie à l'origine de réplication;  $U_L29$  (ICP8) qui est une protéine liant l'ADN linéaire simple brin; le complexe hélicase-primase composé des protéines  $U_L5$ ,  $U_L8$



**Figure 1** : Schéma représentant le génome de HSV-1.

et  $U_L52$ ; ainsi que l'ADN polymérase virale formée d'une unité catalytique ( $U_L30$ ) et d'une unité accessoire ( $U_L42$ ). Après l'entrée du virus dans la cellule hôte, le génome linéaire de HSV-1 pénètre dans le noyau, où il se circularise. Le génome viral est alors répliqué sous le modèle de « cercle roulant » qui produit une longue chaîne constituée de plusieurs concatémères du génome viral liés les uns aux autres [25]. Cette chaîne sera clivée en

génomique unique lors de l'incorporation du matériel génétique dans la capsid, processus appelé encapsidation.

### **La capsid virale**

La capsid virale de HSV-1 mesure environ 100 nm de diamètre et est un polyèdre à 20 faces, un icosaèdre. La capsid est formée de sous-unités protéiques appelées capsomères constituées de la protéine VP5 (U<sub>L</sub>19) en cinq copies (pentons) ou six copies (hexons). Les capsomères sont connectés par des triplexes formés par la protéine VP19c (U<sub>L</sub>38) et un dimère (deux copies) de la protéine VP23 (U<sub>L</sub>18) [26]. Il y a aussi la protéine VP26 (U<sub>L</sub>35) qui se lie aux hexons de VP5 et y forme de petites pointes [27]. La capsid contient également une structure nommée « portal » composée de douze unités de la protéine U<sub>L</sub>6 et fermée par un bouchon formé par la protéine U<sub>L</sub>25. Le génome viral émerge de la capsid via le portal lors de l'injection initiale du matériel génétique dans le noyau et entre par ce portal lors de l'encapsidation [28, 29].

La capsid de HSV-1 immature est nommée procapsid. La procapsid diffère de la capsid mature notamment par sa forme qui est plutôt sphérique au lieu d'être icosaédrale; sa composition, puisque la protéine VP26 n'y est pas associée aux hexons [30] et les capsomères qui y sont beaucoup plus décontractés. Cette laxité pourrait expliquer pourquoi les procapsides sont beaucoup moins stables que les capsides. L'instabilité des procapsides cause leur désintégration à une température avoisinant 2 °C ce qui les rend difficiles à isoler [31]. Les capsides peuvent aussi être classées selon leur forme, en capsides A; B ou C. Lors de l'encapsidation, les protéines d'échafaudage (U<sub>L</sub>26/VP21, U<sub>L</sub>26.5/VP22a) qui aident à l'assemblage de la capsid sont clivées par une protéase virale (U<sub>L</sub>26/VP24) et retirées de la capsid pour laisser place au génome viral. Durant ce processus, les procapsides s'angularisent et incorporent le matériel génétique viral. Les capsides qui subissent correctement toutes ces étapes sont appelées capsides C. Les capsides C poursuivront leur maturation pour évoluer en particules infectieuses. Chez certaines capsides, il y a persistance des protéines d'échafaudage et aucune incorporation de l'ADN viral, ce sont les capsides B [32]. D'autres capsides, les capsides A, subissent un clivage des protéines d'échafaudage, mais il n'y a pas d'encapsidation du génome viral [33]. Pour la plupart des auteurs, les capsides A et B sont considérées comme un produit « cul-de-sac », sans

maturation subséquente. Toutefois, certaines études suggèrent que les capsides B peuvent maturer en capsides C [34-37]. La maturation des capsides C inclut notamment l'acquisition de protéines tégmentaires, voici donc une brève description de ce qu'est le tégment.

### **Le tégment**

Les protéines tégmentaires forment une couche de protéines diverses situées entre la nucléocapside (ADN viral et capside) et l'enveloppe lipidique du virus. Ces protéines sont acquises tout au long du périple du virus dans la cellule hôte et possèdent des fonctions indispensables à la maturation du virus. Il y aurait 24 protéines qui constituent le tégment chez HSV-1 et qui sont incorporées dans la particule virale (U<sub>L</sub>7; U<sub>L</sub>11; U<sub>L</sub>13; U<sub>L</sub>14; U<sub>L</sub>16; U<sub>L</sub>21; U<sub>L</sub>23; U<sub>L</sub>36; U<sub>L</sub>37; U<sub>L</sub>41; U<sub>L</sub>46; U<sub>L</sub>47; U<sub>L</sub>48; U<sub>L</sub>49; U<sub>L</sub>50; U<sub>L</sub>51; U<sub>L</sub>55; U<sub>S</sub>2; U<sub>S</sub>3; U<sub>S</sub>10; U<sub>S</sub>11; R<sub>L</sub>1; R<sub>L</sub>2; R<sub>S</sub>1) [38]. L'addition de tégments est séquentielle et peut se produire en différents sites dans la cellule hôte. Cette séquence d'ajout des tégments est peu détaillée et pourrait se révéler primordiale puisque les protéines tégmentaires jouent un rôle à toutes les étapes importantes du cycle viral de HSV-1. Les protéines qui constituent le tégment sont en effet impliquées dans : le ciblage des composantes virales vers les sites adéquats (site de réplication, site d'assemblage, site d'enveloppement secondaire, etc. ); le transport du virus (de l'entrée du virus jusqu'à sa sortie de la cellule hôte) via l'interaction avec différentes composantes du cytosquelette et le recrutement de moteurs; la régulation de l'expression des protéines et des gènes cellulaires ou viraux; l'assemblage des virions; etc [39-48]. Certaines protéines virales du tégment possèdent également une activité enzymatique fort utile au virus (protéine kinase, thymidine kinase, déubiquitinase, E3 ubiquitine ligase, deoxyuridine triphosphatase, etc.) [49-57]. Parmi les protéines du tégment identifiées dans le tégment de HSV-1, neuf sont conservées parmi les différentes familles des virus herpès (U<sub>L</sub>7; U<sub>L</sub>11; U<sub>L</sub>13; U<sub>L</sub>14; U<sub>L</sub>16; U<sub>L</sub>21; U<sub>L</sub>36; U<sub>L</sub>37; U<sub>L</sub>51) d'où l'importance de bien caractériser leur(s) rôle(s) [38, 39]. Les protéines tégmentaires forment des liens complexes entre elles, mais aussi avec les protéines de la capside et les protéines intégrées dans l'enveloppe du virus [39, 48, 58-63].

## **L'enveloppe virale**

L'enveloppe finale du virus HSV-1 est constituée de différents phospholipides et contient plusieurs glycoprotéines virales (gB; gC; gD; gE; gG; gH; gI; gJ; gK; gL; gM; gN) ainsi que quelques protéines virales associées (U<sub>L</sub>20; U<sub>L</sub>43; U<sub>L</sub>45; U<sub>L</sub>56; U<sub>S</sub>9) [39, 64]. Dans les dernières années, plusieurs organites ont été proposés comme étant le site d'acquisition de l'enveloppe finale de HSV-1 : la membrane nucléaire interne, le ERGIC (compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi), des sites spécialisés comme les tégusomes ou aggrésomes ou encore les corps multivésiculés (MVB) et divers éléments du système endosomal [65-74]. De plus en plus d'études convaincantes supportent le TGN comme étant le site d'enveloppement final du virus HSV-1 [74-79]. De plus, la composition lipidique de l'enveloppe des particules virales extracellulaires est enrichie en sphingomyéline et en phosphatidylsérine ce qui est typique des membranes situées en *trans* de l'appareil de Golgi. (i. e. *trans*-Golgi, TGN et membrane plasmique) [80]. L'enveloppe virale est essentielle pour l'infectivité du virus, puisque l'altération de l'enveloppe du virus par exemple en utilisant du détergent ou de l'éthanol cause une inactivation du virus [81, 82]. La taille du virus enveloppé augmente considérablement par rapport à la taille de la capsid et peut atteindre un diamètre de 200 à 300 nm. Les glycoprotéines de la membrane virale jouent plusieurs fonctions, notamment au niveau de la réponse immunitaire [83-86], toutefois, les glycoprotéines virales sont surtout étudiées pour leur rôle primordial lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte ainsi que pour leur rôle potentiel dans la relâche nucléaire du virus [87-92].

## **Cycle viral de HSV-1**

### **L'entrée du virus dans la cellule**

L'entrée du virus HSV-1 dans la cellule engage plusieurs éléments viraux et cellulaires, dont quatre glycoprotéines virales essentielles : gB; gD et le complexe gH/gL, de même qu'un récepteur cellulaire. Il y a différents modes d'entrée du virus HSV-1 qui malgré des mécanismes distincts utilisent tous une liaison avec un récepteur cellulaire et un processus de fusion. Premièrement, l'entrée peut se faire via la fusion directe entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique [93-95]. Deuxièmement, le virus entrant peut

utiliser la voie de l'endocytose, soit via un mode dépendant du pH [96, 97] ou bien via un processus d'endocytose indépendant du pH [98]. Pour pénétrer dans la cellule, le virus HSV-1 doit tout d'abord s'attacher à la cellule hôte. Bien que cette étape soit importante, elle n'est pas essentielle à l'infection par HSV-1 [99]. L'attachement consiste en l'interaction entre les polysaccharides formés d'héparans sulfates en surface de la cellule et les glycoprotéines gB [100] ou gC [101, 102] en surface de l'enveloppe virale. Suivant l'attachement, il y a liaison entre la glycoprotéine gD et un récepteur cellulaire de surface : la nectine-1 [103] ou le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM) [104] ou une forme spécifique d'héparan sulfate modifié par des 3-O-sulfotransférases [105]. La liaison du récepteur avec gD mène à l'étape finale de l'entrée : la fusion des membranes. Les glycoprotéines gB, gH et gL sont indispensables au mécanisme de fusion [106-108], pourtant les détails du mécanisme de fusion de HSV-1 sont plutôt clairsemés.

### **L'expression des protéines virales**

Pour se multiplier, le virus a besoin de former de nouvelles particules virales. Il doit générer de grandes quantités de protéines virales requises pour l'assemblage de nouveaux virions. L'ARN polymérase II est responsable de la synthèse des ARNs messagers (ARNm) viraux qui mènera à l'expression des protéines virales [109]. Les protéines du virus HSV-1 sont organisées en trois grandes classes, selon leur cinétique d'expression. Les protéines alpha, issues des gènes précoces-immédiats (ou IE pour immediate early) sont exprimées les premières et forment un groupe constitué de 5 protéines chez HSV-1 (ICP0/R<sub>L</sub>2; ICP4/R<sub>S</sub>1; ICP22/U<sub>S</sub>1 : ICP27/U<sub>L</sub>54 et ICP47/U<sub>S</sub>12). Les protéines requises pour initier l'expression des protéines alpha sont incorporées dans la particule virale, la transcription des gènes IE ne nécessite donc pas la synthèse *de novo* de protéines virales. La plus importante protéine nécessaire à l'activation de l'expression des protéines alpha est la protéine transactivatrice VP16 (U<sub>L</sub>48) [110]. La synthèse des protéines alpha promeut la transcription des gènes précoces (ou E pour early) qui donne lieu à l'expression des protéines bêta. Les protéines bêta sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans le métabolisme des acides nucléiques viraux. Aucune protéine bêta n'est produite en l'absence de synthèse des protéines alpha. L'initiation de la réplication du génome viral stimule l'expression de la 3<sup>e</sup> classe de protéines virales : les protéines gamma produites par les gènes tardifs (ou L pour late). Il y a deux sous-classes chez les protéines gamma : les

gamma-1 qui ne sont pas dépendantes de la réplication de l'ADN viral, mais qui sont stimulées par celle-ci et les gamma-2 qui requièrent absolument l'initiation de la réplication de l'ADN viral pour être exprimées. Les gènes tardifs encodent des protéines structurales du virus [111].

Une série de mécanismes sont mis en place par HSV-1 pour favoriser l'expression des protéines virales lors d'une phase active d'infection. Parmi ces mécanismes de régulation, il y a l'autorégulation de l'expression des protéines virales alpha et bêta pour favoriser l'expression des gènes tardifs [112, 113]. Le virus provoque aussi une inhibition de la synthèse de l'ARN, de l'ADN et des protéines cellulaires afin de détourner et d'utiliser les machineries cellulaires pour la fabrication de ses composantes virales. La protéine VHS (viral host shutoff/U<sub>L</sub>41) dégrade certains ARNm cellulaires au profit de la synthèse d'ARNm viraux [114, 115]. De plus, certaines protéines virales, telles que ICP27/U<sub>L</sub>54 qui inhibe l'épissage des ARNs cellulaires, bloquent la traduction adéquate des protéines cellulaires [116]. La déstabilisation de protéines cellulaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire favorise l'expression des protéines virales [117-119]. Le virus recrute également plusieurs facteurs cellulaires qui lui sont indispensables pour une transcription efficace [120]. Lors d'une infection active, une expression protéique robuste permet aux virus de générer rapidement les composantes nécessaires à la fabrication de nouvelles particules virales. Toutefois, ces éléments doivent être assemblés correctement pour devenir des particules infectieuses.

### **L'assemblage des capsides**

L'assemblage des capsides chez les virus herpès a été comparé à l'assemblage de la tête des bactériophages à génome d'ADN bicaténaire. Les caractéristiques similaires entre les virus herpès et les bactériophages à ADN double-brins laissent croire à un ancêtre commun [121]. En effet, dans les deux cas, il y a tout d'abord formation de coquilles vides à partir d'éléments structurels préformés. Les deux entités utilisent des protéines d'échafaudage pour construire ces coques. Les formes matures sont exemptes de ces protéines d'armature. Suite à la formation des coques, celles-ci sont remplies par le matériel génétique qui a été synthétisé sous forme de concatémères, mais qui est empaqueté sous forme de monomère [122-124]. La composition de la capside du virus HSV-1 a été discuté

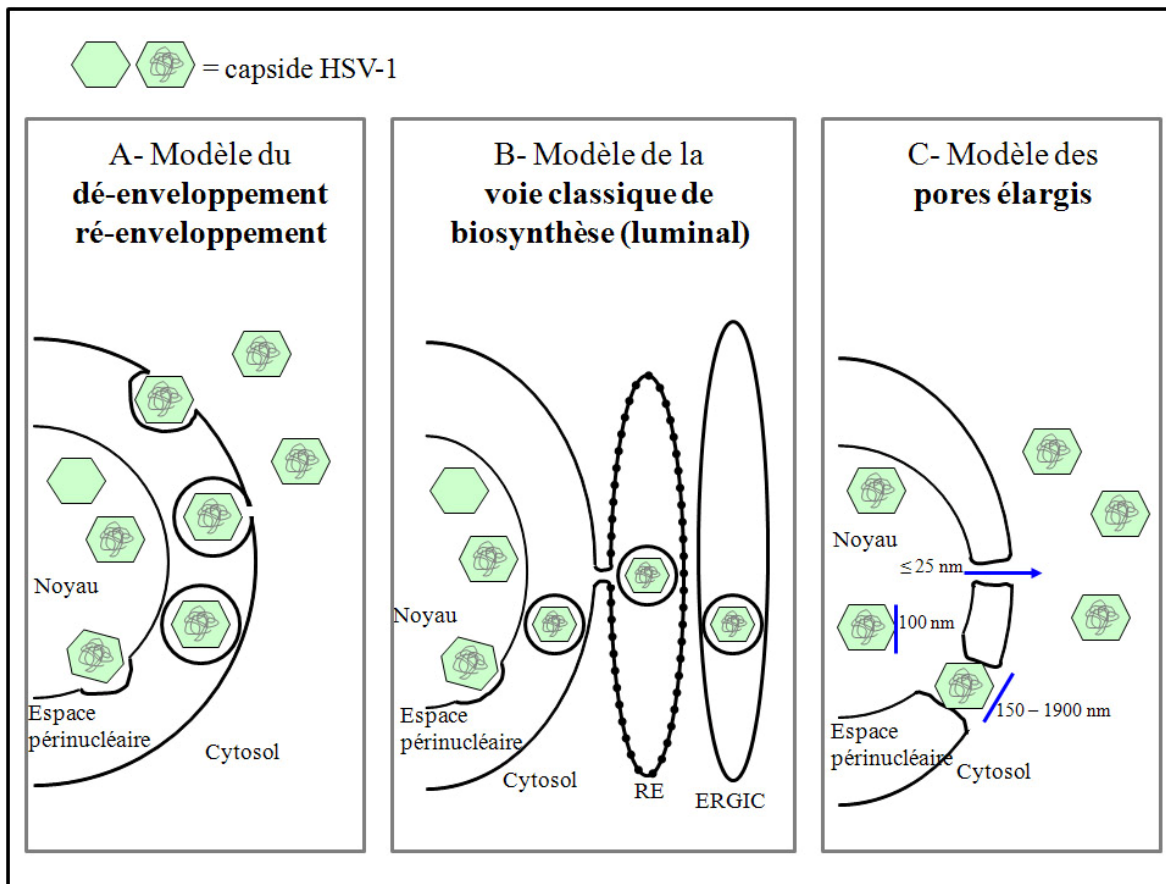


préalablement (voir section « La capsid virale »). Il est à noter que l'assemblage des unités de capsomères qui donnent naissance à la procapsid peut se produire dans un environnement *in vitro*, sans la présence d'aucune protéine cellulaire [125, 126]. L'étape d'encapsidation de l'ADN viral unit les voies d'assemblage et de réplication du génome viral. Le clivage des protéines d'échafaudage est étroitement lié à l'incorporation d'ADN dans la capsid. Leur expulsion rend la capsid plus stable et prête à recevoir l'ADN viral monomérique qui est empaqueté de manière concomitante [36, 127, 128]. Sept protéines sont requises pour le clivage et l'encapsidation du génome (U<sub>L</sub>6, U<sub>L</sub>15; U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>25, U<sub>L</sub>28, U<sub>L</sub>32 et U<sub>L</sub>33). Parmi celles-ci, la protéine U<sub>L</sub>6 forme le portal nécessaire à l'entrée du génome dans la capsid et les protéines U<sub>L</sub>15 et U<sub>L</sub>28 forment le complexe de la terminase [129-134]. Les protéines U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>25, U<sub>L</sub>32 de même que U<sub>L</sub>33 sont requises pour l'encapsidation de l'ADN viral [34, 134-138]. U<sub>L</sub>33 servirait de pont entre la machinerie d'encapsidation et le complexe de la terminase [132, 139, 140]. Les capsides nouvellement assemblées quittent ensuite le noyau dans le but de poursuivre leur maturation.

### **Le transport du virus**

Le transport des virus herpès demeure assez nébuleux et soulève plusieurs débats intéressants. À plusieurs étapes de déplacement du virus, différents modèles s'opposent pour tenter d'expliquer le processus de sortie.

Après son entrée dans la cellule hôte, le virus HSV-1 doit se diriger vers le noyau qui constitue le site de transcription et de réplication de l'ADN viral de même que le site d'assemblage de nouvelles capsides et d'empaquetage du génome viral. Le virus doit aiguiller son transport vers le noyau et les protéines tégumentaires sont indispensables pour ce ciblage [141]. Les capsides sont transportées notamment via l'interaction de la protéine virale tégumentaire U<sub>L</sub>36 avec les microtubules [47, 142-146]. Il y a ensuite arrimage du virus avec le complexe du pore nucléaire (NPC) qui servira de passage pour l'insertion du matériel génétique viral dans le noyau [147-151]. Les protéines virales U<sub>L</sub>6 (portal) et U<sub>L</sub>25 (bouchon du portal) ainsi que la protéine U<sub>L</sub>36 subissent des changements nécessaires à l'injection de l'ADN viral dans le noyau [152-155].



**Figure 2** : Schématisation des modèles de transport hors du noyau de la cellule hôte pour le virus HSV-1. A. Modèle de dé-enveloppement et ré-enveloppement développé par Stackpole (1969). B. Modèle luminal présenté par Darlington et Moss (1968) et C. Modèle des pores élargis amené par P. Wild (2005).

Ensuite le virus doit quitter le site d'assemblage et quelques modèles dans la littérature tentent d'expliquer le mode de transport de HSV-1. La première hypothèse est appelée « modèle de dé-enveloppement et ré-enveloppement ». Selon ce modèle, les capsides nucléaires quittent le noyau par un bourgeonnement à la membrane nucléaire interne, ce qui provoque l'accumulation de capsides enveloppées dans l'espace périnucléaire. Ces capsides se débarrassent ensuite de cette enveloppe primaire en fusionnant avec la membrane nucléaire externe pour se retrouver sans enveloppe, ou nues, dans le cytoplasme. Les capsides nues rejoignent ensuite le site d'acquisition de l'enveloppe finale, le TGN, par une voie non classique de transport au sein de la cellule

hôte [156-158]. Dans ce modèle, le virus HSV-1 subit deux enveloppements successifs. Dans le second modèle, le « modèle luminal », les capsides nucléaires bourgeonnent à la membrane nucléaire interne pour se retrouver enveloppées dans l'espace périnucléaire, tout comme dans le premier modèle. Toutefois, les capsides n'interagissent pas avec la membrane nucléaire externe, mais empruntent plutôt la voie classique de sécrétion des protéines. Les capsides sillonnent ainsi le compartiment luminal du RE qui est en continuité avec l'espace périnucléaire puis celui de l'appareil de Golgi et finalement du TGN en gardant toujours la même enveloppe acquise à la membrane nucléaire interne [65]. Plus récemment, un troisième modèle s'est ajouté pour tenter d'expliquer le transport des capsides fraîchement assemblées dans le noyau. Il s'agit du « modèle des pores élargis » qui suggère que les pores nucléaires dont le canal central qui mesure normalement moins de 25 nm, sont dilatés par un processus actif durant l'infection pour atteindre une taille capable d'accueillir le passage direct des capsides de plus de 100 nm. Ce modèle exclut le bourgeonnement entre les capsides intranucléaires et la membrane nucléaire interne [159, 160].

Un autre aspect du transport du virus HSV-1 qui suscite des débats considérables concerne le transport du virus dans les cellules neuronales. Certaines équipes croient que les composantes virales (enveloppe et nucléocapside) sont transportées séparément dans l'axone et qu'elles sont rassemblées loin du corps neuronal près de la terminaison de l'axone. Il s'agit du « modèle séparé » de transport axonal [161-168]. Un autre modèle « le modèle marié » suggère plutôt que le virus est complètement assemblé et enveloppé au niveau du corps du neurone. Les virions complets voyagent ensuite le long de l'axone dans des vésicules de transport [169-173].

### **La sortie du virus hors de la cellule**

Les virus herpès sont des virus cytolitiques, c'est-à-dire que dans un stade avancé de la phase active de leur infection, ils causent la destruction des cellules infectées et sont ainsi relâchés de la cellule hôte. Toutefois, les virus herpès ne causent pas une cytolyse chez toutes les cellules qu'ils infectent et utilisent aussi des moyens de sortie moins délétères pour la cellule. Très peu de détails sont connus en ce qui concerne l'étape finale de transport pour le virus HSV-1, c'est-à-dire le passage du TGN vers la membrane plasmique. Le virion HSV-1 serait incorporé dans une vésicule et c'est la fusion entre la

membrane de cette vésicule et la membrane plasmique qui permettrait le relâche de particules virales dans le milieu extracellulaire. Des équipes ont proposé que chez les alpha-herpès virus, les protéines virales  $U_L20$  et gK seraient impliquées dans ce processus [174-177]. Le principe de libération du virus HSV-1 dans l'espace extracellulaire peut s'apparenter à la relâche des molécules de sécrétion, ce qui laisse croire qu'en plus des protéines virales impliquées, la machinerie cellulaire pourrait aussi jouer un rôle.

### **Phase latente vs phase active**

Les virus herpès ont la particularité de persister toute la vie dans l'organisme de l'hôte infecté. Ils possèdent donc une phase d'infection active ou lytique et une phase inactive ou latente et ils ont la capacité de passer d'une phase à l'autre [178-180]. Quand le virus passe de l'état latent à l'état lytique, il s'agit d'une réactivation. Le déclenchement du mécanisme de réactivation pour le virus HSV-1 n'est pas bien compris et peut être provoqué par une multitude de stimuli tels que le stress, une exposition au soleil, des dommages nerveux, une déplétion du facteur NGF (nerve growth factor), les hormones, les métaux lourds et certains traumatismes. La réactivation peut être symptomatique ou non avec HSV-1, c'est-à-dire que même si le virus est réactivé il n'entraîne pas nécessairement des lésions. Chez HSV-1, cette persistance absolue s'établit dans le corps des neurones du nerf trijumeau et du ganglion de Gasser, qui innervent les régions où ont lieu la majorité des infections actives, les cellules épithéliales de la muqueuse buccale. La forme de latence chez HSV-1 est décrite comme étant des génomes viraux non répliquatifs dans des cellules qui ne se divisent pas. Dans un état latent, le génome de HSV-1 n'est pas répliqué, car il existe sous une forme de concatémères épisomaux qui ne possèdent pas de fragments terminaux et dont les monomères sont fusionnés les uns aux autres. Le génome latent est associé à de nombreuses histones hypoacétylées, il est donc très condensé et inadapté pour la réplication [181-185]. De plus, lors de la latence, il n'y a pas (ou très peu) d'expression de protéines virales. Donc, la protéine VP16/UL48 qui lors d'une infection active enclenche l'expression des protéines virales ne peut exercer son rôle de transactivation. Il doit donc y avoir des mécanismes d'activation de VP16 ou des modes de transactivation virale indépendants de VP16 lors de la réactivation [186-188]. Durant la latence, malgré l'absence de réplication et de traduction virale, il y a une maintenance d'une activité de transcription.

Cette transcription mène à la synthèse d'ARNs viraux particuliers nommés les LATs (transcrits associés à la latence) qui ont comme but de maintenir l'état de latence et d'assurer la réactivation, si nécessaire [189]. Ces ARNs viraux ne sont pas traduits en protéines [190, 191]. Ils ont entre autres comme fonctions : d'inhiber l'apoptose neuronale pour assurer la survie des neurones infectés de façon latente [192]; de dégrader les ARNs des gènes IE pour en empêcher l'accumulation lors de la latence [193] et aussi d'inhiber la fonction transactivatrice de la protéine virale ICP0/R<sub>L</sub>2 [194]. La protéine ICP0 pourrait jouer un rôle lors de la réactivation du virus HSV-1 [195]. Comme les autres protéines virales, son expression est réprimée lors de la latence. Toutefois, la fonction d'ICP0 pourrait être maintenue par l'activation de son expression par des facteurs cellulaires qui ciblent son promoteur ou encore par l'induction de protéines cellulaires capables d'imiter l'activité d'ICP0 [196, 197]. Ce mécanisme cellulaire qui induit une réactivation du virus a pour but de déclencher une réactivation du virus et de rendre ainsi le virus perceptible aux défenses antivirales de l'hôte. Les protéines virales VP22/U<sub>L</sub>49 et ICP4/R<sub>S</sub>1 seraient aussi impliquées dans la réactivation notamment dans le changement de configuration du génome. En effet, lors de la réactivation le génome viral doit passer d'une conformation circulaire hautement associée aux histones à une forme linéaire non nucléosomique. [120, 198, 199]. La réactivation du virus HSV-1, tout comme la plupart des étapes du cycle viral, est soumise aux stratégies de défense utilisées par le virus et l'organisme hôte et dont il sera question succinctement dans la section suivante.

## **Relation entre le virus HSV-1 et son hôte cellulaire**

### **Défense antivirale et évation immunitaire**

Dans la plupart des cas, la contamination par le virus HSV-1 ne cause pas de conséquences graves, même si le virus reste présent de façon permanente dans l'organisme hôte. Cette tolérance peut être expliquée par la cohabitation entre les virus herpès et leurs hôtes qui remonte à plusieurs millions d'années [200]. Cette longue coévolution a mené au développement d'un *modus vivendi* qui permet à l'organisme hôte de ne pas être tué par le virus et dans lequel le virus persiste indéfiniment. Pourtant, plusieurs tactiques de défense sont développées de part et d'autre.

Les défenses antivirales contre HSV-1 impliquent plusieurs éléments du système immunitaire. En première ligne, il y a l'attaque des cellules infectées par les macrophages et les cellules NK, qui utilisent tout un arsenal de protection incluant certaines cytokines et le système du complément. Par exemple, la production des interférons (IFNs) alpha, bêta et gamma par l'activation des récepteurs TLR (toll like receptor) amène une protection relativement efficace contre HSV-1 [201-204]. En deuxième ligne, on retrouve le système des anticorps neutralisants et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), de même qu'une participation active des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les glycoprotéines de surface (comme gB ou gD) de même que certaines protéines internes (comme VP16/U<sub>L</sub>48; ICP27/U<sub>L</sub>54) servent de cibles pour stimuler l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [205]. Une clairance du virus est observée suite à l'infiltration des lésions par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [206]. Certaines de ces défenses sont contrecarrées par les mécanismes d'évasion déployés par le virus.

Tel que mentionné précédemment (voir la section « Phase latente vs phase active »), lorsque le virus HSV-1 est sous sa forme latente, il n'y a pas de production de protéines virales, il n'y a donc pas d'antigènes viraux produits, ce qui empêche la détection du virus par le système immunitaire. Le virus HSV-1 sous sa forme active évite également une rencontre avec les éléments extracellulaires antiviraux en induisant la formation de syncytiums qui lui permettent une transmission cellule-cellule sans avoir à transiter par le milieu extracellulaire [47, 207-210]. De plus, le virus HSV-1 inhibe la fonction des cellules dendritiques, en empêchant leur maturation et en stoppant la production des interférons de type I qui les stimulent [211-213]. Pour empêcher la propagation du virus, il peut y avoir initiation de l'apoptose dans les cellules infectées, toutefois le virus possède différents moyens de bloquer cette apoptose [214-217]. Pour déjouer les effets antiviraux des interférons, le virus HSV-1 inhibe leur activation et certains de leurs effecteurs, tel que l'IFN alpha et PKR [218-220]. Un autre mode d'évasion immunitaire du virus HSV-1 se produit via les glycoprotéines gE/gI qui bloquent la fonction des anticorps neutralisants [221]. Le virus perturbe aussi l'exposition d'antigènes viraux à la surface cellulaire via la liaison de la protéine virale ICP47/U<sub>S</sub>12 au transporteur TAP empêchant ainsi l'apprêtement de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) [222, 223]. Pour troubler la réponse immunitaire, les virus peuvent aussi produire des

protéines virales qui imitent divers éléments du système immunitaire. Dans cette catégorie on retrouve entre autres, les virokines, des copies piratées de cytokines produites par le virus. Chez HSV-1, la glycoprotéine gD contient des sites de liaisons lui permettant de s'associer aux récepteurs TNF et empêcher le lien entre le récepteur et son ligand naturel le TNF-alpha (une cytokine impliquée entre autres dans la réponse antivirale via l'activation des macrophages) [222]. Une autre glycoprotéine virale, la glycoprotéine C (gC) se lie au facteur C3 du système du complément, ce qui inhibe complètement la destruction médiée par le complément [221, 224]. Tous ces mécanismes d'évasion immunitaire déployés par HSV-1 ne doivent pas entraîner la mort de l'hôte, puisque le virus a besoin de celui-ci pour se répliquer.

### **Parasitisme obligatoire et utilisation des facteurs cellulaires**

Les virus sont des parasites obligatoires. Ils ont absolument besoin d'une cellule hôte vivante pour se répliquer. Ils utilisent la machinerie de la cellule infectée pour assurer leur propre propagation. Le virus HSV-1 illustre bien les deux dénouements pouvant découler de cette interaction hôte/virus : la lyse cellulaire et la persistance virale. Par cette relation obligée, le virus emploie plusieurs molécules cellulaires, parfois en coopération avec la cellule, mais souvent en détournant ces molécules de leur fonction physiologique et en les utilisant uniquement pour son propre essor.

Ainsi, lors de l'entrée du virus dans la cellule, tel que décrit précédemment (voir la section «L'entrée du virus dans la cellule»), le virus HSV-1 interagit avec les récepteurs cellulaires de surface, dont : les héparans sulfates; le récepteur HVEM, membre de la famille des récepteurs du facteur nécrosant de tumeur (TNF) ainsi que les nectines, membres de la superfamille des immunoglobulines [88, 89]. Après son entrée dans la cellule, le virus interagit avec le cytosquelette pour voyager jusqu'au noyau [64, 144, 225]. Par ailleurs, au noyau, la capsid interagit avec le complexe du pore nucléaire, notamment avec les nucléoporines Nup 124, 214 et 358 [149, 150, 226] lors de l'injection du génome viral dans le noyau. En parallèle avec ces étapes hâtives, immédiatement après l'entrée du virus, la protéine virale VHS engage le processus de dégradation des ARNm cellulaires. Toutefois, le virus ne dégrade pas tous les ARNm et entretient les ARNm pouvant être utiles à sa maturation ou ceux possédant un motif ARE (AU-rich instability elements). Les ARNm portant ce motif facilitent la dégradation des autres ARNm cellulaires [227]. Au

sein du noyau, la transcription des gènes viraux est stimulée par l'interaction de la protéine virale VP16 et les facteurs cellulaires Oct-1 et HCF-1 [120]. Les premières protéines virales exprimées, celles du groupe des protéines très précoces (IE), interagissent toutes avec des protéines cellulaires. ICP0, de par son activité E3 ubiquitine ligase, interfère avec le système de dégradation du protéasome dépendant de l'ubiquitine. Ce qui permet entre autres au virus de dégrader certaines protéines cellulaires impliquées dans la défense antivirale, telles que SP100 ou PML [228-231]. ICP4 recrute de nombreux facteurs de transcription directement sur les promoteurs des gènes viraux pour en stimuler l'expression [232-234]. ICP22 mobilise l'ARN polymérase II cellulaire pour accroître l'expression des gènes tardifs (L) [235]. ICP27 s'associe à de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans la régulation des ARNm [116] et ICP47, tel que mentionné précédemment s'associe au transport cellulaire TAP, dans un mécanisme d'évasion virale. De plus, pendant la réplication du génome viral, le virus s'assure de l'inhibition de la réplication du génome cellulaire. Par exemple, il crée une déstabilisation des chromosomes cellulaires en modifiant l'activité de la protéine cellulaire MCM4 (protéine de maintenance des minichromosomes) [236]. HSV-1 entraîne aussi un ralentissement de l'expression cellulaire en arrêtant l'épissage des gènes de la cellule hôte [236-238]. Une fois le virus assemblé dans le noyau, plusieurs modifications de composantes nucléaires sont requises pour permettre au virus de poursuivre sa route. Notamment des modifications au niveau des lamines nucléaires, des ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNPs) et de l'organisation de la chromatine [239-243]. Durant le processus de maturation des virus herpès, plusieurs composantes du cytosquelette cellulaire sont modifiées [225, 244-249] (pour plus de détails voir la section suivante). Ce survol incomplet des nombreuses interactions HSV-1/hôte permet de souligner l'importance des facteurs cellulaires dans le cycle viral et d'invoquer le fait que malgré les abondantes recherches sur ce sujet, il reste d'innombrables associations virus/hôte à identifier et à décrire.

#### *Interactions entre le virus HSV-1 et le cytosquelette*

L'utilisation et la modification du cytosquelette par le virus HSV-1 est essentielle pour la multiplication du virus. Dans la littérature, malgré la description de certaines interactions HSV-1/cytosquelette, de nombreux éléments de cette relation sont inconnus,



d'où l'intérêt d'approfondir la recherche sur le sujet. Au niveau cellulaire, le cytosquelette participe à diverses fonctions telles que : le maintien de la forme de la cellule; la force structurale des cellules; la croissance cellulaire; le réarrangement mitotique; la motilité; le transport intracellulaire; le maintien et le développement de la polarité cellulaire ainsi que la signalisation cellulaire. Le cytosquelette est composé de trois classes de fibres : les microtubules (faits de tubulines); les filaments intermédiaires (dont les lamines nucléaires, les kératines et la vimentine) et les microfilaments (faits d'actine). Différents moteurs assurent le transport le long des rails formés par les fibres du cytosquelette. Les myosines circulent sur les microfilaments alors que le transport sur les microtubules est effectué par les moteurs de kinésine et de dynéine. Plusieurs autres protéines cellulaires sont également impliquées dans les multiples fonctions du cytosquelette. Par exemple, la dynactine sert d'agent de connexion entre certains cargos et la protéine motrice dynéine.

HSV-1 interagit avec les trois types de filaments du cytosquelette ainsi qu'avec divers moteurs qui lui permettent son déplacement dans la cellule hôte. Durant son cycle viral, le virus HSV-1 utilise et modifie le cytosquelette à plusieurs étapes. L'interaction HSV-1/cytosquelette débute immédiatement lors du contact entre le virus et la cellule cible. Le cytosquelette joue un rôle primordial dans les deux phases du processus d'entrée du virus, soit l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule hôte. Au moment de l'attachement du virus avec les récepteurs en surface cellulaire, l'actine joue un rôle important. En effet, la distribution des protéoglycans, dont les héparans sulfates qui servent de récepteurs d'entrée pour le virus, est organisée par les filaments d'actine. Une perturbation de ces microfilaments inhibe l'adsorption du virus [250]. Le remodelage des filaments d'actine induit lors de l'attachement du virus permet ensuite son passage dans la cellule [251, 252]. Ce remodelage, consécutif à l'entrée du virus dans la cellule, implique des modifications des microfilaments et une rupture de la fibronectine qui causent l'arrondissement typique retrouvé chez les cellules infectées [253].

Dans la cellule, le virus doit parcourir de longues distances pour atteindre différents sites cellulaires primordiaux pour sa maturation (*e.g.* le noyau, le TGN, la membrane plasmique). La diffusion passive du virus dans le cytoplasme ne serait pas efficace pour accomplir ces déplacements [254]. Lors de l'infection, le virus utilise donc le système des microtubules pour assurer son trafic dans le cytoplasme. L'utilisation des microtubules par

HSV-1 réorganise la structure du centre d'organisation des microtubules (MTOC) puisque le virus réarrange les filaments de tubuline pour favoriser son propre transport [255, 256].

Puisque le site de réplication et d'assemblage du virus HSV-1 se situe dans le noyau, après son entrée, le virus doit traverser le cytoplasme pour rejoindre le noyau. Le virus est transporté vers le noyau sur les microtubules à l'aide d'un complexe moteur formé par la dynéine et la dynactine [43, 142, 225, 254]. U<sub>L</sub>36 et U<sub>L</sub>37 jouent un rôle primordial dans le transport des capsides entre la membrane plasmique et le noyau [43, 144, 150]. De plus, U<sub>L</sub>34 et U<sub>L</sub>9 sont des candidats potentiels à l'association avec la dynéine [44, 240, 257-259]. Toutefois, il est à noter que ces protéines, U<sub>L</sub>9 et U<sub>L</sub>34 ne font pas partie du virion extracellulaire. Elles pourraient donc difficilement aider le virus entrant dans la cellule à se rendre jusqu'au noyau.

Dans le noyau, HSV-1 recrute et utilise plusieurs composantes du nucléosquelette (éléments du cytosquelette présents dans le noyau) [240, 246, 247, 260, 261]. Par exemple, le virus doit modifier les lamines et l'émerine qui sont associées à la membrane nucléaire interne et qui contribuent au maintien de la structure du noyau. Ces structures nucléaires forment une barrière et empêchent le virus d'accéder à la membrane nucléaire interne. À l'aide des protéines virales U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34, U<sub>S</sub>3, U<sub>L</sub>13 et de la kinase cellulaire PKC, HSV-1 brise et relocalise les lamines nucléaires ce qui lui permet de sortir du noyau [45, 239, 243, 261-264].

Le virus doit ensuite quitter le noyau et voyager de nouveau dans le cytoplasme pour atteindre le site d'enveloppement secondaire puis la membrane plasmique. Les microtubules sont également impliqués dans cette étape de transport post-nucléaire [64, 225, 245, 254, 265, 266]. U<sub>L</sub>49 s'associe aux microtubules puis agit comme une MAP (protéine associée aux microtubules) [267-270] et un complexe viral formé notamment par U<sub>S</sub>11 s'associe à certaines kinésines [271-273]. Les microtubules sont également indispensables au transport axonal de HSV-1, auquel participe entre autres la protéine virale US9 [64, 225, 245, 254, 265, 266, 274].

Plusieurs protéines du cytosquelette sont incorporées dans les particules virales de HSV-1. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de détecter l'actine, certaines annexines, la cofiline, la kératine et la profiline dans des virions extracellulaires HSV-1

purifiés [38]. Certaines équipes suggèrent même que des filaments d'actine (F-actine) seraient retrouvés à l'intérieur du virus [275]. Le rôle de ces composantes du cytosquelette incorporées dans les virions HSV-1 n'est pas encore défini. Ce phénomène d'inclusion de composantes du cytosquelette dans les particules virales est également présent chez les autres membres de la famille des virus herpès [276-280].

## **Pourquoi étudier le virus HSV-1?**

### **Séroprévalence élevée et transmission aisée**

Après avoir brièvement décrit les caractéristiques principales du virus HSV-1, il sera maintenant question des raisons qui motivent l'intérêt d'étudier davantage ce virus. Tout d'abord, le nombre de personnes séropositives pour le virus HSV-1 est faramineux. On estime à plus de 70-80% la séroprévalence du virus, dans la population adulte mondiale [281-283]. Avec un taux de prévalence si élevé, la transmission est bien sûr très répandue. De plus, plusieurs individus porteurs du virus HSV-1 sont asymptomatiques ou présentent des infections sous-cliniques. Néanmoins, ces patients sont tout de même infectieux et transmettent sans le savoir le virus [284]. Le virus HSV-1 se transmet en général via des contacts directs avec les muqueuses infectées (avec ou sans lésions) d'un individu porteur. Le virus HSV-1 se transmet surtout via la salive, toutefois, chaque site touché par une infection active devient un portal de transmission. Contrairement à la croyance populaire qui associe le virus HSV-1 uniquement aux lésions orolabiales, il est à noter que 10%-30% des cas d'herpès génital sont causés par le virus HSV-1 et que 2-5% des infections d'herpès labiale sont causées par le virus HSV-2 [16, 285, 286]. De plus, un individu peut s'auto-infecter et propager le virus sur plusieurs parties de son corps (bouche, yeux, peau, organes génitaux, etc.). Le virus HSV-1 affecte donc une grande population et se transmet facilement d'un individu à l'autre.

## **Persistance de l'infection et potentiel de réactivation**

Une autre raison qui justifie l'utilité des recherches concernant le virus HSV-1 est son caractère permanent. Tel qu'indiqué dans la section « Phase latente vs phase active », les virus herpès ont la capacité d'exister dans l'organisme hôte sous une forme latente. Il y a maintenance du génome viral sous une forme non-pathogénique et imperceptible par le système immunitaire. Le virus HSV-1 ainsi caché dans le système nerveux constitue un réservoir qui peut servir à la production de nouveaux virions [178]. Le mécanisme de réactivation est mal connu, mais de 20-40% des gens atteints du virus HSV-1 subiront des réactivations fréquentes qui peuvent causer des manifestations désagréables [282, 287-289]. La persistance durable du virus HSV-1 signifie qu'un individu infecté est porteur du virus pour toute sa vie et est ainsi susceptible de subir la récurrence des épisodes actifs du virus de façon permanente. La poursuite des recherches concernant HSV-1 est donc nécessaire pour tenter d'élucider les zones nébuleuses du cycle viral, telle que la phase de latence et être mieux outillé pour combattre le virus.

## **Médication virucide inexistante**

Actuellement, la persistance du virus HSV-1 n'est combattue par aucune drogue disponible sur le marché. Il y a plusieurs traitements pour soigner les manifestations cliniques causées par le virus HSV-1, mais aucun ne cause l'élimination du virus de l'organisme hôte. Ces médicaments peuvent réduire la charge virale ce qui permet : d'atténuer la sévérité des symptômes; de diminuer la production active de nouveaux virus et de restreindre la transmission. Toutefois, le risque de réactivation est toujours présent, car les drogues utilisées n'ont pas d'effet virucide sur le virus latent. Plusieurs mécanismes d'action ont été développés pour lutter contre le virus. Tout d'abord, les médicaments les plus communément utilisés tels qu'*acyclovir*, *valacyclovir* et *forscarnet* sont des analogues de nucléosides qui interagissent avec la polymérase d'ADN virale. Ces médicaments inhibent la multiplication virale en stoppant la réplication du génome viral [284, 290]. Un autre processus employé dans la thérapie antivirale contre HSV-1 est l'inactivation du complexe hélicase-primase requis pour la réplication de l'ADN viral [291, 292]. Une inhibition de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire par un agent

médical peut aussi diminuer la propagation en empêchant l'entrée du virus dans la cellule [293]. Tous les mécanismes thérapeutiques décrits ci-haut agissent au niveau de protéines virales ce qui rend les médicaments spécifiques aux cellules infectées et empêchent les dommages collatéraux aux cellules saines. Toutefois, avec l'utilisation de ces drogues, le virus HSV-1 a su s'adapter et évoluer à l'aide de mutations qui lui étaient favorables ce qui a déclenché une résistance aux médicaments disponibles [294, 295]. La recherche de nouveaux agents antiherpétiques s'oriente donc maintenant vers des cibles cellulaires [296], d'où l'importance de poursuivre la recherche et d'identifier les partenaires cellulaires du virus HSV-1 à différentes étapes de son cycle viral.

## **Symptômes graves et comorbidité**

Naturellement, les symptômes communs du virus HSV-1, c'est à dire les ulcérations au niveau de la peau et des muqueuses ne sont pas fatales, même si elles peuvent être douloureuses. Même si le virus induit de multiples infections asymptomatiques, il peut aussi avoir des conséquences très importantes et même létales dans certains cas. Ces effets graves sont surtout à craindre pour les nouveau-nés et les patients avec un système immunitaire affaibli, mais les patients immunocompétents peuvent aussi en être victimes. Les manifestations sérieuses incluent des maladies de la cornée de l'œil, différents troubles du système nerveux et des problèmes sérieux causés par une co-infection avec le virus HSV-1 et d'autres pathogènes.

## **HSV-1 et cécité**

Plusieurs pathologies oculaires peuvent être occasionnées par le virus HSV-1, notamment des infections inflammatoires au niveau de la paupière (blépharite), la conjonctive (conjonctivite), la cornée (kératite) et même de l'iris et du cristallin (iridocyclite). La propagation à l'œil peut se faire via un contact direct entre des lésions infectées ailleurs sur le corps et l'œil ou lors d'une réactivation du virus qui cause le transport antérograde du virus de la région nerveuse du nerf trijumeau vers la région oculaire [297]. Le virus HSV-1 est la cause principale de la cécité causée par une altération de la cornée dans les pays industrialisés [298, 299]. Certains traitements existent pour traiter les affections oculaires provoquées par HSV-1, mais ils sont inefficaces contre les

virus non répliquant (latents) et peuvent entraîner des effets secondaires plutôt néfastes [300, 301].

## **HSV-1 et troubles neurologiques**

### **Encéphalite**

Le virus HSV-1 est la principale cause du développement des encéphalites nécrosantes. L'incidence de l'HSVE (encéphalite causée par le virus herpès simplex) est rare (1-3 personnes / 1 000 000). Les signes cliniques de l'HSVE annonçant un développement fulgurant sont la fièvre, des maux de tête, de la confusion et des convulsions. En présence de ces symptômes, si aucun traitement n'est apporté rapidement au patient, le taux de mortalité peut atteindre 70%. Une amélioration des connaissances concernant le virus HSV-1 permettrait un meilleur diagnostic et le développement d'outils plus efficaces pour soigner les encéphalites causées par le virus [302, 303].

### **Paralysie de Bell**

La paralysie de Bell affecte le nerf crânien facial et empêche le contrôle adéquat des muscles faciaux concernés. Le virus HSV-1 a été détecté dans le nerf facial et les muscles qu'ils innervent chez plus de 60% des patients atteints de la paralysie de Bell [304]. En plus, les patients avec la paralysie de Bell sont plus sujets aux réactivations fréquentes de HSV-1 [305]. Ceci suggère que le virus HSV-1 serait impliqué dans la pathogenèse de cette maladie.

### **Maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui amène des troubles au niveau de la faculté de pensée et de la mémoire. Il s'agit de la forme de démence la plus commune. Il est estimé que plus de 750 000 personnes seront atteintes au Canada d'ici l'an 2031 [306]. Peu d'évidences sont connues concernant les facteurs déclenchant la maladie. Le virus HSV-1 pourrait être un facteur de risque du développement de la maladie d'Alzheimer [307]. Voici donc brièvement quelques pistes qui ont été émises pour expliquer le lien possible entre l'infection par le virus HSV-1 et le développement de la maladie d'Alzheimer.

L'infection de l'organisme par HSV-1 cause un dérèglement important de l'expression protéique chez son hôte, ce qui conduit à l'inhibition ou la surexpression de certaines protéines. Ces perturbations ont comme but de favoriser la multiplication du virus, souvent au détriment des cellules hôtes. Par exemple, le virus HSV-1 entraîne une surexpression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la phospholipase cytosolique A2 (cPLA<sub>2</sub>). Ces deux enzymes sont impliquées dans le cycle de l'acide arachidonique (AA) et la biosynthèse lipidique, elles sont donc importantes pour maintenir la cohésion de la membrane plasmique. La surexpression de COX-2 et cPLA<sub>2</sub> causée par HSV-1, déstabilise l'équilibre membranaire. Cette perturbation au niveau de la membrane plasmique aurait comme effet de favoriser l'entrée du virus dans les cellules cibles. La surexpression de COX-2 et cPLA<sub>2</sub> entraîne également le déclenchement de signaux pro-inflammatoires et apoptotiques ce qui contribue à la dégénérescence des cellules, notamment au niveau du cerveau. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, il y a une surabondance de COX-2 et cPLA<sub>2</sub> dans les lésions cérébrales [308].

En plus d'agir sur l'expression protéique, le virus HSV-1 module également les ARNs cellulaires. Une étude a démontré que le virus HSV-1 augmente la présence du microARN 146a [308]. Ce microARN est présent dans le cerveau et a pour cible la protéine CFH (facteur H du complément). Le CFH est un répresseur du système immunitaire et il régule la voie alternative du système du complément. Dans le cerveau, une augmentation de la quantité des microARNs 146a diminue la biodisponibilité du CFH et cause des effets délétères via la stimulation accrue du système immunitaire qui entraîne une inflammation soutenue et une cytolysse.

L'infection par le virus HSV-1 entraîne également une réponse immunitaire qui stimule la production de plusieurs cytokines. Parmi ces cytokines plusieurs ont une activité pro-inflammatoire, comme l'IL-1 $\beta$  qui est abondante au niveau du cerveau et qui peut induire l'expression de COX-2. Chez les patients atteints d'Alzheimer, il y a un excès inexplicable d'IL-1 $\beta$  au niveau du cerveau. Le virus HSV-1 provoque aussi une surproduction de plusieurs autres cytokines, telles que l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8) et le facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Il y a une surabondance notoire de ces cytokines spécifiquement aux sites de réactivation du virus HSV-1, qui se situent dans le système nerveux central. La quantité excessive de ces cytokines pro-inflammatoires,

provoquée par l'infection virale, peut causer des lésions cérébrales. La surexpression d'IL-6 chez la souris provoque une neurodégénérescence similaire à la maladie d'Alzheimer. Chez les patients atteints d'Alzheimer, il y a une quantité importante de cytokines pro-inflammatoires aux sites de lésions cérébrales [309, 310]. L'infection par HSV-1 pourrait donc mener à une dégénérescence prématurée des cellules cérébrales via la surexpression soutenue de cytokines pro-inflammatoires et provoquer des lésions s'apparentant à la maladie d'Alzheimer.

Les recherches en génétique ont démontré l'implication de certains gènes dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Parmi ces gènes, il y a l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E (Apo E). L'apolipoprotéine E possède 3 isoformes :  $\epsilon 3$  (fonctionnel);  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$  (dysfonctionnels). L'apolipoprotéine E a plusieurs rôles, mais c'est son rôle au niveau de la protéolyse de la  $\beta$ -amyloïde qui la relie à la maladie d'Alzheimer. L'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E étant dysfonctionnel, il est beaucoup moins efficace pour catalyser la réaction de clivage de la  $\beta$ -amyloïde, ce qui conduit à l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde dans le cerveau. Cette accumulation cause la formation de plaques de  $\beta$ -amyloïde dans le cortex cérébral. Les plaques d'amyloïde dans le cerveau sont un signe clinique typique de la maladie d'Alzheimer. La fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  est beaucoup plus élevée chez les patients atteints d'Alzheimer que dans la population générale. Toutefois la présence de cet allèle chez un individu n'est pas nécessaire ni suffisant pour le développement de la maladie d'Alzheimer [311, 312]. Le lien entre cet allèle, la maladie d'Alzheimer et le virus HSV-1, n'est pas encore clair, mais chez les personnes infectées par le virus HSV-1 qui subissent des récurrences symptomatiques fréquentes (20-40% des personnes séropositives pour HSV-1), l'allèle  $\epsilon 4$  est également prépondérant. Le mauvais fonctionnement de l'isoforme  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E stimulerait les infections actives par le virus HSV-1. Les mécanismes expliquant cette observation sont nébuleux, mais pourraient être liés au fait que l'allèle fonctionnel de l'apolipoprotéine E possède des sites communs de liaison aux cellules avec le virus HSV-1. L'Apo E fonctionnel est donc en compétition avec le virus pour entrer en contact avec les récepteurs de surface cellulaire et il diminue ainsi les possibilités d'infection pour le virus. L'allèle  $\epsilon 4$  de l'Apo E n'est pas aussi efficace pour



lier les récepteurs, il stimulerait donc l'infection par HSV-1 en augmentant l'entrée du virus dans les cellules [313, 314]. De plus, la dysfonction de l'Apo E  $\epsilon$ 4 entraînerait des dommages plus importants au niveau du cerveau lors des réactivations du virus, à cause d'un moins bon contrôle des réactions inflammatoires [315]. Les lésions plus importantes et l'inflammation causées par les réactivations fréquentes de HSV-1 seraient la cause d'une dégradation cérébrale augmentant le risque de l'apparition de la maladie d'Alzheimer chez les individus porteurs de l'allèle  $\epsilon$ 4 de l'Apo E [316, 317].

Une autre hypothèse tentant d'exposer le lien entre le virus HSV-1 et la maladie d'Alzheimer, concerne la glycoprotéine virale B (gB). En effet, gB partage une forte homologie avec la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Tel que décrit précédemment, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la formation de plaques de  $\beta$ -amyloïde qui sont le résultat d'une forte accumulation de  $\beta$ -amyloïde suite au clivage désordonné de l'APP. De par sa grande homologie avec l'APP, la glycoprotéine gB de HSV-1 pourrait potentiellement déclencher la cascade menant à la formation et au dépôt de plaques d'amyloïde dans l'encéphale et ainsi favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer [318].

En plus des plaques de  $\beta$ -amyloïde, la maladie d'Alzheimer peut aussi être caractérisée par des enchevêtrements de neurofibrilles composés de la protéine TAU hyperphosphorylée dans le cerveau des patients atteints. La protéine TAU est une protéine associée aux microtubules qui assure la stabilité des microtubules et qui est retrouvée dans les axones au niveau du système nerveux central. Normalement, chez un sujet sain, la protéine TAU est retrouvée sous sa forme soluble. Toutefois, l'hyperphosphorylation de TAU par différentes kinases, dont la protéine kinase A (PKA), conduit à la génération d'enchevêtrements de fibrilles de TAU, qui créent des grosses masses non-solubles de TAU dans les cellules nerveuses. Ces agrégats causent une désintégration des microtubules ce qui altère le système de transport neuronal et peut entraîner la mort cellulaire [319, 320]. La protéine kinase virale U<sub>S</sub>3 du virus HSV-1 est un homologue de la protéine cellulaire PKA, HSV-1 pourrait donc induire l'hyperphosphorylation de TAU via U<sub>S</sub>3 et ainsi contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer [321].

L'approfondissement des connaissances concernant le virus HSV-1 peut donc servir à éclaircir la pathogenèse d'une autre maladie, la maladie d'Alzheimer.

## **HSV-1 et VIH**

L'obtention de nouveaux éclaircissements sur HSV-1 via la recherche permet d'en apprendre plus sur ce virus, mais permet aussi l'application des découvertes à d'autres virus. Parfois chez un individu, il y a coinfection simultanée avec différents virus, ce qui complique l'analyse des données, mais peut aussi permettre d'en apprendre plus sur le cycle viral d'un virus particulier. Puisque le virus HSV-1 persiste de façon permanente chez l'hôte, il y a un haut risque d'infections concomitantes par des pathogènes multiples. Par exemple, il existe une forte association entre les lésions génitales herpétiques majoritairement dues à HSV-2, mais pouvant aussi être causées par HSV-1 (voir la section « Séroprévalence élevée et transmission aisée») et la présence du virus d'immunodéficience humaine (VIH) [322]. La réponse antivirale contre le virus HSV-1 provoque l'agrégation de lymphocytes T CD4+ dans les ulcères herpétiques qui deviennent une cible d'infection idéale pour le VIH. De plus, l'infection par le VIH intensifie la fréquence, la sévérité et la durée des infections actives de HSV [323, 324]. Certains gènes des virus HSV augmenteraient la transcription des gènes du virus VIH [325]. De façon réciproque le traitement de l'une des infections peut réduire la gravité des effets de l'autre infection.

## **HSV-1 : outil intéressant comme modèle d'étude**

### **Découvertes provenant de l'étude des virus**

Les virus peuvent être perçus comme étant des systèmes simplifiés qui par leur étude permettent d'élucider différents mécanismes cellulaires et moléculaires plus complexes. Plusieurs concepts fondamentaux ont été mis à jour par la virologie, par exemple dans les domaines de la génétique, de l'immunologie et du transport des protéines. En génétique, l'emploi des virus en recherche a notamment contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement des promoteurs, entre autres via l'étude du virus simien 40 (SV40) [326, 327]. L'étude du gène  $U_L23$  (ou Thymidine kinase / TK) du virus HSV-1 a permis de mieux définir la fonction des promoteurs eucaryotes [328]. Aujourd'hui, l'utilisation du promoteur du virus CMV (cytomégalovirus) est chose commune dans les laboratoires qui utilisent des techniques de transfection. La découverte des séquences

nucléotidiques IRES (internal ribosome entry site) impliquées dans l'initialisation de la traduction des ARNm est aussi attribuable à l'étude de virus [329, 330]. L'étude des adénovirus a mené à la découverte du processus d'épissage des ARNs [331-333]. L'étude des bactériophages, ces virus qui infectent les bactéries, a également contribué grandement à révéler des mécanismes de base de génétique moléculaire : mutation et réparation de l'ADN; transduction du génome; identification de l'ADN comme étant le matériel génétique; modifications de l'ADN; définition d'un épisome; découverte de l'ARNm; régulation de l'expression génique; interprétation de la signification des codons [334], etc. L'étude des virus chez les végétaux, tel que le virus de la mosaïque du tabac a aussi permis de souligner l'importance du potentiel génétique de l'ARN, de même que la découverte des relations ARNs/protéines [335]. Le concept des ribozymes, des enzymes faits d'acides nucléiques, a été détaillé grâce à l'étude de virus tel que le VIH ou les virus à hépatite [336]. L'explication de la transcription inverse [337] et de la polyadénylation de l'extrémité 3' des ARNm [338, 339] provient également de l'étude des virus. Les microARNs sont de courtes molécules simple-brin d'ARN qui régulent l'expression des gènes et qui sont notamment présents chez plusieurs virus, comme chez le virus HSV-1 (ARNmi LAT, voir la section « Phase latente vs phase active »).

Par rapport à l'immunologie, la recherche sur les virus a permis de clarifier la nécessité de présentation des antigènes par le CMH de classe I pour enclencher l'activité de destruction accomplie par les lymphocytes T CD8+ [340-342]. L'étude du virus HSV-1 a également démontré une voie non classique de présentation des antigènes, unissant le CMH de classe I et l'autophagie [343]. Les voies de transport intracellulaire ne sont pas encore toutes définies, mais l'analyse de protéines virales a permis de mieux définir certains mécanismes de triage protéique impliquant par exemple l'ubiquitine [344-346]. Cet examen du transport des protéines virales dans la cellule hôte a aussi contribué à définir la fonction de repliement des protéines du RE [347]. Les mécanismes du transport des ARNs ont aussi bénéficié des recherches en virologie [348]. Toutes ces découvertes illustrent l'apport de la recherche en virologie à plusieurs autres domaines d'étude.

### **Caractéristiques du virus HSV-1 qui en fait un bon modèle de recherche**

La prévalence et diverses implications médicales du virus HSV-1 attestent de l'importance de mieux comprendre ce virus. Les caractéristiques du virus HSV-1 qui en

font un bon modèle de recherche sont : sa capacité d'infecter un grand nombre de types cellulaires; sa cinétique de réplication rapide (cycle viral complet en moins de 18 heures d'infection [19]); la disponibilité des séquences génomique et protéique du virus; la facilité de se procurer des réactifs variés (anticorps, souches virales mutantes, bacmide contenant le génome complet, etc. ) et finalement un risque réduit pour la santé des expérimentateurs (le virus est sensible aux désinfectants courants comme l'éthanol 70% et il ne survit pas longtemps à l'extérieur de l'organisme [349]). De plus, le cycle viral est conservé entre les différents membres de la famille des virus herpès, donc les connaissances acquises via le virus HSV-1 s'appliquent généralement aux autres *Herpesviridae*.

## **Objectifs du projet de recherche**

Les domaines de la biologie cellulaire et de la virologie sont intriqués dans cette thèse. L'utilisation d'un modèle viral devait servir à 1) recueillir de nouvelles informations s'appliquant au virus HSV-1 et 2) éclaircir certains processus cellulaires de l'hôte. Les buts précis de cette recherche étaient les suivants :

- Caractériser la sortie du virus HSV-1 hors du noyau de la cellule hôte
- Clarifier le modèle de transport de sortie utilisé par le virus HSV-1
- Étudier un mécanisme de transport intracellulaire de sortie du noyau non conventionnel
- Approfondir l'implication de protéines cellulaires et virales dans le processus de sortie de HSV-1 des compartiments membranaires (TGN, noyau)
- Détailler le transport du virus HSV-1 entre le TGN et la membrane plasmique

## Résultats - présentation par articles

### Article I

Titre : Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress *in vitro*.  
Auteurs : G. Rémillard-Labrosse, G. Guay et R. Lippé  
Publié dans : J Virol, 2006. 80(19): p. 9741-53.

#### Contribution des auteurs

Gaudeline R. Labrosse\* : conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article  
Ginette Guay : réalisation des techniques liées à la microscopie électronique  
Roger Lippé : création et supervision du projet, conception des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

\*premier auteur

## Mise en contexte (article I)

Le virus HSV-1 rejoint rapidement le noyau après son entrée dans la cellule infectée. Le noyau est en fait la manufacture du virus, puisque c'est dans le noyau qu'a lieu la réplication à grande échelle du génome viral de même que l'assemblage des nouvelles capsides. Tel que décrit précédemment dans cette thèse, (voir section «Le transport du virus») différents postulats tentent de décrire le mode de transport utilisé par le virus pour s'évader du noyau. Parmi les trois modèles décrits : le modèle luminal, le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement et le modèle des pores élargis, il semble y avoir un plus large soutien au modèle des deux enveloppements. Toutefois, la quête du modèle de transport des virus herpès a suscité bien des passions dans la communauté de la recherche sur les virus herpès [157, 350] et le consensus n'a toujours pas été obtenu.

L'étude d'une étape spécifique de transport est problématique lorsqu'on utilise des cellules entières. Parmi les complications rencontrées dans l'étude de la sortie du virus HSV-1 du noyau, c'est la rapidité à laquelle se produit cette étape et le manque de synchronisation de l'infection. Par conséquent, il est difficile de visualiser les intermédiaires distinctifs de cette étape dans une cellule complète. Une autre difficulté soulevée dans les débats concernant les modèles de transport est le manque d'identification de molécules impliquées, cellulaires ou virales, dans la sortie du virus du noyau.

Dans le but de caractériser spécifiquement la sortie nucléaire de HSV-1, un essai *in vitro* utilisant des noyaux isolés de cellules infectées et incubés dans un environnement permettant la relâche de capsides HSV-1 a été mis sur pied. Le choix de l'essai *in vitro* comme modèle expérimental a déjà fait ses preuves dans l'étude du virus HSV-1 [125, 142, 144, 148, 245] et d'autres virus [351-356], de même que dans l'étude du transport intracellulaire [357-361]. De plus, il y a plusieurs avantages à utiliser un essai *in vitro*. C'est un système flexible où l'on peut tester une multitude de réactifs et obtenir des résultats rapidement. D'autre part dans l'essai *in vitro*, il est possible de tester un arsenal varié de molécules qui peuvent atteindre directement le noyau, ce qui n'est pas le cas avec les cellules entières à cause de l'incapacité de certaines substances à franchir la membrane plasmique. La provenance des capsides relâchées est sans équivoque puisque l'essai ne comporte qu'une seule source de virus : le noyau. De plus, l'essai *in vitro* permet de

synchroniser le virus puisqu'il n'y a qu'une seule étape à l'étude plutôt que plusieurs intermédiaires à différents stades de maturation comme dans une cellule entière.

Les premières étapes de ce projet de doctorat ont été ciblées sur la mise sur pied de l'essai *in vitro* et les étapes sous-jacentes à son développement. Tout d'abord, il a fallu mettre au point une méthode d'isolation de noyaux à partir de cellules infectées et vérifier l'intégrité de ces noyaux isolés. Ensuite, nous avons cherché un tampon d'incubation et un milieu de congélation adéquats pour conserver les noyaux isolés. Puis, il a fallu préparer les éléments requis pour l'essai *in vitro* de base, c'est-à-dire : du cytosol provenant de cellules non infectées et infectées ainsi qu'un système fournissant l'énergie requise au processus de transport. Afin de permettre l'étude du matériel relâché dans l'essai *in vitro*, nous avons dû tester diverses méthodes permettant de séparer les virus relâchés de ceux encore prisonniers des noyaux. Puis dans le but de quantifier la sortie du virus dans l'essai *in vitro*, nous avons utilisé différentes techniques, telles que la quantification de l'ADN viral subséquente à un PCR contre un gène viral ou la mesure de radioactivité incorporée dans le génome viral. Les nombreux essais-erreurs de ces étapes préliminaires ont mené à la mise sur pied d'un modèle pratique et efficace présenté dans cet article.

Dans ce premier article, il y a également une analyse de la relâche *in vitro* de virus HSV-1 qui a démontré : une dépendance au temps, à la température et à la présence d'un système d'énergie. De plus, il a été observé que la présence de cytosol lors de l'incubation est nécessaire à la relâche de capsides HSV-1 par le noyau. Le cytosol provenant de cellules non infectées est suffisant pour supporter cette libération, ce qui laisse supposer l'implication de protéines cellulaires dans le processus de sortie nucléaire du virus HSV-1. L'analyse des caractéristiques du matériel relâché dans l'essai *in vitro* de même que l'observation de la route empruntée par le virus pour sortir du noyau ont aussi permis d'amasser des preuves qui appuient le modèle de dé-enveloppement / ré-enveloppement pour expliquer le mode de transport intracellulaire du virus HSV-1.

## Article

### Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) replicates and assembles its capsids in the nucleus. It must then find its way to the plasma membrane for release in the extracellular environment. Given the restrictive nature of the much smaller nuclear pores, it has been assumed that the capsids could escape the nuclei only by budding through the inner nuclear membrane. Numerous electron microscopy (EM) observations of enveloped virions in the gap between the two nuclear envelopes, herein called the perinuclear space, indeed support this view (11, 23, 49, 72). Once in the perinuclear space, the virions must traverse the outer nuclear membrane. Given the continuity between the perinuclear space and the reticulum endoplasmic, a luminal model claims that the virions travel through the biosynthetic pathway (11,30). They would thus reach the Golgi, *trans*-Golgi network, and plasma membrane in transport vesicles in much the same way that secreted proteins do. In this scenario, naked capsids would be released only accidentally in the cytoplasm and would not reach the extracellular medium. A second, more widely accepted model suggests that the perinuclear virions rather fuse with the outer nuclear membrane, thereby releasing naked capsids in the cytoplasm (70, 72). These capsids would then be reenveloped later on, likely at the *trans*-Golgi network (22-24, 26, 35, 74, 78). Interestingly, this deenvelopment/reenvelopment model may be valid for all members of the herpesvirus family (15, 43, 44). Finally, a third model has recently been proposed and implies the disassembly and dilatation of the nuclear pores, such that the capsids within the nucleus could reach the cytoplasm directly through the pores (39,79). In this last model, naked cytoplasmic capsids would also be produced but would apparently quickly fuse with diverse membranes, including the outer nuclear membrane and Golgi apparatus. As for the previous model, naked cytoplasmic capsids would not be a dead-end product but an important intermediate. The route of HSV-1 nuclear egress is thus an issue not yet fully resolved that warrants further examination.

The molecular details of herpesvirus egress out of the nucleus are scarce. On the one hand, deletion of U<sub>L</sub>31 or U<sub>L</sub>34 results in the accumulation of naked capsids in the nucleus



(5, 20, 32, 33, 57, 58, 61), while deletion of U<sub>s</sub>3 causes the accumulation of enveloped virions in nuclear membrane invaginations (32, 58) or between the two nuclear envelopes (77). Interestingly, U<sub>i</sub>31 and U<sub>i</sub>34 form a complex targeted to the inner nuclear membrane (20, 40, 56, 57) and U<sub>i</sub>34 is a substrate for the U<sub>s</sub>3-encoded viral kinase (53, 62). This complex is further regulated by U<sub>i</sub>13, a kinase that phosphorylates U<sub>s</sub>3 (31). These interactions result in the depolymerization of the nuclear lamins via protein kinase C, presumably to allow the capsids to reach the nuclear periphery (3, 46, 51, 56, 66, 68, 69). Meanwhile, HSV-1 deletion mutants lacking VP16 or U<sub>i</sub>20 induce the accumulation of perinuclear virions (2, 45), though deletion of VP16 in equine herpesvirus blocked secondary reenvelopment (76). In the case of U<sub>i</sub>20, this phenotype has been attributed to U<sub>i</sub>20.5 or a combination of U<sub>i</sub>20 and U<sub>i</sub>20.5 (18). A recent report suggests that U<sub>i</sub>11 may also be involved in HSV-1 nuclear egress (1) but not in those of the two related viruses pseudorabies virus and equine herpesvirus (36, 64). Finally, Luxton and colleagues reported that U<sub>i</sub>36 and U<sub>i</sub>37 may modulate pseudorabies virus nuclear egress (41), a phenotype not yet seen by others (14, 19, 34). On the other hand, besides protein kinase C as mentioned above, no cellular protein has directly been implicated in HSV nuclear egress. Nonetheless, brefeldin A, a drug that typically inhibits transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi (65), blocks HSV-1 nuclear egress under certain circumstances (6, 13, 29, 78). The mechanism by which the drug perturbs viral egress, however, remains unclear. Finally, actin has been shown to be required for the active transport of capsids within the nucleus, presumably from the site of assembly to the nuclear periphery (17). Thus, the molecular details of nuclear herpes egress remain unclear at this point.

In the past decade, much effort has been dedicated to the understanding of intracellular transport. *In vitro* reconstitution assays played an important role in identifying the molecules and mechanisms driving the transport of host and viral proteins (10). These assays have demonstrated their usefulness by virtue of their rapidity and flexibility compared with whole-cell experimentation. Most important, they accurately identified a variety of proteins and lipids involved in intracellular transport and addressed their molecular mechanisms (27, 37, 75, 81). For example, an *in vitro* assay reconstituting vesicular transport along the endocytic route could identify over 20 different effectors (7). Interestingly, a number of very informative *in vitro* assays reconstituting various steps of the herpesvirus life cycle are emerging (38, 47, 50, 71, 80). Given the limited knowledge

about herpesvirus egress, for instance, from the nucleus to the cytoplasm, an *in vitro* assay could be very useful. Furthermore, an assay performed when other organelles are largely depleted would allow one to concentrate on that egress step.

To clarify the route of egress of herpesvirus capsids at the level of the nucleus and ultimately identify the molecular players involved, an *in vitro* nuclear egress assay for HSV-1 was set up. This assay is based on the isolation of nuclei from HSV-1-infected cells and their incubation in the test tube under various conditions. We now report that the assay reconstitutes HSV-1 egress from the nucleus to the cytoplasm. Interestingly, the assay has the usual hallmarks of intracellular transport assays, namely, temperature, time, and energy dependence. Surprisingly, HSV-1 egress is also supported by cytosol prepared from mock-treated cells, while cytosol prepared from infected cells enhances it, suggesting a potential role for both host and viral proteins. EM analysis of both isolated nuclei and intact cells revealed identical routes of egress, namely, the budding of capsids through the inner nuclear membrane, the accumulation of enveloped particles in the perinuclear space, and the release of exclusively naked capsids in the cytosol. These results are most consistent with the widely accepted deenvelopment/reenvelopment model of egress. Finally, nuclei isolated from cells infected with V701, a thermosensitive mutant for the viral U<sub>L</sub>26 protease (55,74), were also competent to produce capsids *in vitro* and shared the same properties as those isolated from cells infected with the wild-type (WT) virus. The possible reconstitution of capsid maturation and nuclear egress is discussed. The assay should be useful for identification of molecules involved in herpesvirus egress.

## Materials and methods

**Cells and viruses.** HeLa cells adapted to culture in suspension were grown in Joklik's modified Eagle's medium (JMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% fetal bovine serum (Medicorp), 0.1 mM MEM nonessential amino acid solution, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Wild-type HSV-1 17<sup>+</sup> virus, provided by Beate Sodeik, and the V701 *ts*80-1C2 mutant (also of strain 17<sup>+</sup>), supplied by Bruce Register and Jules A. Shafer (55), were expanded on BHK cells and titrated on Vero cells as described previously (74).

**Isolation of nuclei.** HeLa cells grown in suspension were infected with HSV-1 17<sup>+</sup> at 37°C or with V701 at 39.5°C for 8 h at a multiplicity of infection of 3. For radiolabeled preparations, a protocol adapted from the work of Church and Wilson was used (9). Briefly, cells were starved for thymidine in JMEM and 3% dialyzed fetal bovine serum (Multicell), subsequently infected, and finally incubated in JMEM, 3% dialyzed fetal bovine serum, and 25 µCi/ml of [<sup>3</sup>H] thymidine (PerkinElmer). Eight hours postinfection (hpi), cold or <sup>3</sup>H-labeled cells were pelleted, washed with phosphate-buffered saline (PBS)-5 mM MgCl<sub>2</sub>, and resuspended in reticulocyte standard buffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl [pH 8.4], 5 mM MgCl<sub>2</sub>) before being broken mechanically by cavitation. The resulting cell lysate was centrifuged at 300 x g for 15 min on a 40% iodixanol cushion (Axis-shield), and the nuclei were collected and enriched on a 25 to 40% discontinuous iodixanol gradient at 10,000 x g for 30 min. The nuclear fraction was collected, adjusted to 50% glycerol and 1 mM dithiothreitol, and stored at -80°C. For wild-type infections, the isolation of the nuclei took place at 4°C, while V701-infected nuclei were isolated at 20°C.

**Preparation of cytosol.** Mock-treated or HSV-1 17<sup>+</sup>-infected HeLa cells were collected 8 hpi. They were pelleted, washed in PBS-5 mM MgCl<sub>2</sub>, and resuspended in KEHM (50 mM KCl, 10 mM EGTA, 50 mM HEPES [pH 7.4], 2 mM MgCl<sub>2</sub>) supplemented with 1 mM dithiothreitol and a cocktail of protease inhibitors (8.25 mM chymostatin, 1.05 µM leupeptin, 0.38 µM aprotinin, and 0.73 µM pepstatin A [Sigma-Aldrich]). They were then broken mechanically as described above, and the cell lysate was centrifuged at 4°C for 20 min at 800 x g and finally spun at 267,000 x g for 30 min. The resulting cytosol was stored at -80°C.

***In vitro* assay.** Nuclei were incubated in duplicates with nuclear buffer (20 mM Tris-Cl [pH 7.4], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol) for various times and at different temperatures, as indicated in the figure legends. Cytosol, usually 4 mg/ml, and an energy-regenerating system (17.3 mM creatine phosphate, 87 µg/ml creatine kinase, 2.17 mM ATP; Roche) (28) were added unless otherwise indicated. At the end of the incubation period, the capsids released *in vitro* by the nuclei were recovered in the flowthrough of a spin column mounted with a 0.45-µm cellulose acetate filter (Costar) and centrifuged at 825 x g for 10 min at 4°C. After a wash with PBS, both the flowthrough and the wash were pooled and digested with 500 U/ml of DNase I (Roche) for 1 h at 37°C to

ensure that only encapsidated DNA was quantified. The total encapsidated viral pool present in nuclei was evaluated by breakage of the nuclei with several cycles of freeze-thawing in distilled water and measurement of trichloroacetic acid (TCA)-precipitable, DNase I-resistant counts as described above. Efficiency of capsid release was determined by dividing the number of counts per minute (cpm) found in the virus released for 6 h *in vitro* by the number of cpm found in the nuclei at 0 h.

**Detection by PCR.** Viral DNA from the capsids produced in the nuclear egress assay was extracted by phenol-chloroform and ethanol precipitation (4). The positive control was 100 ng of DNA extracted from extracellular viruses, while the negative control was devoid of DNA. To quantify the viral DNA, a 669-bp fragment of U<sub>L</sub>20 was amplified by conventional PCR with HSV-1-specific primers. The PCR products were then subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide before being photographed on a UV illuminator.

**Detection by liquid scintillation.** Capsids produced in the *in vitro* assay were deposited on a paper filter (P5; Fisherband), dried, and subjected to trichloroacetic precipitation (63). Briefly, the samples were washed three times in ice-cold TP buffer (5% TCA, 20 mM sodium pyrophosphate), washed with 70% ethanol, and dried again. Levels of TCA-precipitated radioactivity were measured on an LKB Beta rack 1211 counter by liquid scintillation.

**Exclusion of TRITC dextran.** Nuclei were incubated *in vitro* as described above for various times and at different temperatures, as indicated in Table 1. The capsids were then recovered with a spin column and incubated for 10 min on ice with 0.1 g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei and labeled with 0.2 mg/ml tetramethyl rhodamine isocyanate (TRITC) and 155-kDa dextran (Sigma-Aldrich). Untreated or 0.1% Triton X-100-permeabilized cells (10 min prior to addition of the TRITC-dextran) served as controls for the experiment. Cells were visualized 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 Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging) and manually counted. Intact nuclei stained for Hoechst but excluded the dextran.

**Western blot against PCNA.** Capsids produced *in vitro* and isolated as described above were boiled for 10 min in sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Controls included total nuclei or the nuclear buffer used for the *in vitro* assay. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and probed with a 1:500 dilution of E78 anti-PCNA (mouse anti-human proliferation cell nuclear antigen monoclonal antibody; Chemicon International) and a 1:5,000 dilution of horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch). The detection was done on Kodak BioMax MR film and Super Signal West Pico chemiluminescent substrate from Pierce.

**Electron microscopy.** HeLa cells infected with HSV-1 17<sup>+</sup> or V701 for 8 h at their respective permissive temperatures were fixed with 2.5% glutaraldehyde (Canemco and Marivac) in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2 to 7.4) for 1 h at room temperature and postfixed 1 h in 1% osmium tetroxide-0.1 M sodium cacodylate (Mecalab). They were then contrasted for 1 h at 4°C with 2% aqueous uranyl-acetate (Canemco and Marivac), gradually dehydrated in alcohol, embedded in Epon 812 (Mecalab), and ultrathin sectioned with a Reichert Ultracut S ultramicrotome. Seventy-five-nanometer sections were analyzed with a Philips 300 transmission electron microscope. For negative staining, the capsids released *in vitro* were deposited on hexagonal 200-mesh copper grids coated with Formvar and carbonated (Canemco and Marivac). Excess liquid was blotted away with filter paper, and the samples were contrasted with 2% of uranyl acetate (Canemco and Marivac). The grids were finally washed in distilled water and dried on filter paper. Samples were examined with the same transmission EM as that described above. When desired, these samples were quantified by counting mature and immature capsids in multiple fields from a minimum of three independent experiments.

**SQ analysis.** DNA was extracted from capsids produced *in vitro* with phenol-chloroform and ethanol precipitation (4), digested with BamHI, and subjected to electrophoresis and Southern blot analysis. Membranes were probed with the BamHI SQ junction fragment of plasmid pNN9, provided by Sandra K. Weller (42), which was <sup>32</sup>P labeled with a High Prime kit according to the manufacturer's instructions (Roche). As an

encapsidated control, we used DNA extracted from extracellular HSV-1 17<sup>+</sup> WT particles, while our unencapsidated control consisted of a bacmid containing the entire circular genome of HSV-1 provided by Beate Sodeik.

## Results

**Isolation of infected nuclei.** The aim of the work described here was to establish an *in vitro* assay that reconstitutes the exit of HSV-1 capsids from nuclei. Our approach was to isolate nuclei from infected cells and determine whether they could release capsids in the test tube. To this end, HeLa cells were chosen because they can be adapted to suspension culture and thus provide biochemical amounts of material, a must for any successful *in vitro* strategy. HeLa cells were therefore infected with WT HSV-1 and harvested at 8 hpi, a time when new capsid assembly is at an advanced stage but only at the onset of viral egress. After mechanical rupture of the cells, the nuclei were passed over an iodixanol gradient to enrich them and separate them from cytosolic components and other organelles. Since the integrity of the isolated nuclei was of primary importance, they were examined by EM. Figure 1 shows that the nuclei, despite their storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , were relatively pure and intact, contained plenty of viral capsids, and retained both of their nuclear membranes. This made possible the storage of large preparations of nuclei, an important aspect, as it would technically be demanding to use freshly isolated nuclei for each assay. Finally and most importantly, the nuclei retained their functionality, as shown by their ability to release viral capsids in a controlled manner (see below). It was thus possible to isolate intact and functional nuclei.

**Separation of capsids and nuclei.** It was crucial to distinguish between the capsids present in the nuclei from the ones released *in vitro*. Given the propensity of the capsids to easily pellet, even at low speed (Taquet and Lippé, unpublished observations), we evaluated the ability of spin columns to quickly separate nuclei from the virus. To evaluate the efficiency of this procedure, extracellular virions were first passed over a column. Figure 2A shows that most virions were found in the flowthrough, with a few residual virions needing a washing step to fully recover them. In contrast, nuclei isolated from infected cells

did not pass through the column (Fig. 2 B). Moreover, the procedure did not rupture the nuclei, as their  $^3\text{H}$ -labeled content did not travel through the column (Fig. 2C). The data thus indicated that we could readily distinguish between capsids still present in the nuclei from the ones released *in vitro*.

***In vitro* release of capsids.** One of the main advantages of *in vitro* transport assays is their quantitative nature. Two complementary methods were used to quantify capsid egress. First, DNA extracted from the released capsids was quantified by PCR with HSV-1-specific primers. Although real-time PCR is a better option, semiquantitative PCR was initially performed to quickly establish whether the assay was working. As control, HSV-1 DNA purified from extracellular virions was used and amplified under various PCR cycling conditions to find appropriate parameters yielding a semilinear quantification of viral DNA (Fig. 3A). To confirm the results, viral DNA present in increasing numbers of nuclei isolated from infected cells was also quantified (Fig. 3B). The results clearly showed that it is possible to quantify viral egress by using this approach.

Using our previously established PCR protocol, we proceeded to measure the amount of viral DNA released *in vitro* in the egress assay. Nuclei were incubated in the presence of energy, cytosol, and buffer. Since it was unclear whether host and/or viral cytosolic proteins were needed, high-speed cytosol derived from infected cells was included. It should be noted that this cytosol was completely devoid of virus, as determined by PCR and EM (data not shown). Figure 3C shows that the capsids indeed escaped the nuclei *in vitro* in a measurable way. As expected from intracellular transport assays, no egress occurred when the assay was performed at 4°C. In addition, little egress took place when cytosol or both cytosol and energy were omitted. In contrast, the sole omission of energy permitted some capsid release, which was attributed to the presence of energy in the cytosol preparation itself. Thus, as with most intracellular transport assays, our HSV nuclear egress assay was dependent on energy and temperature. Surprisingly, it was also dependent on cytosol, a finding that was not necessarily predictable since HSV-1 egress could conceivably have occurred without it. HSV-1 nuclear capsid egress was therefore measurable and dependent on the same factors as most intracellular transport steps.

Having established that the assay was working and given the semiquantitative nature of normal PCR, we turned to [ $^3\text{H}$ ]thymidine and scintillation counting as a better tool by

which to evaluate egress and confirm the results. Hence, after metabolic labeling of cells during the infection, nuclei were isolated as described above and used in the *in vitro* assay. Following the separation of nuclei and capsids with a spin column, the samples were treated with DNase I to ensure that only encapsidated DNA was measured (see Materials and Methods). Figure 4 shows that the results were identical to those obtained with PCR, namely, an indication of strong dependence on temperature, energy, and cytosol. Since intracellular transport is typically dependent on time, egress was also measured after different incubation times to determine the optimal moment to monitor capsid release (Fig. 4B). The data indicate that HSV-1 release increased steadily with time and peaked by 6 h, a time that was subsequently adopted. Given the more quantitative nature of liquid scintillation, this method of quantification was used for the remaining experiments. By comparison of the DNase-resistant nuclear pool and the capsids produced, it was estimated that up to 31% of the encapsidated DNA present in nuclei was released (data not shown).

**Nuclear integrity.** The lack of capsid release at 4°C or in the absence of cytosol and energy suggested that HSV-1 egress was an active and regulated step. It also suggested that the capsids were not simply released owing to the rupture of the nuclei during the reaction. To confirm this, we performed several additional experiments. First, nuclei were examined by phase contrast and no noticeable difference in appearance before or after their incubation *in vitro* was found (data not shown). Second, no loss in the number of nuclei was detected upon incubation, as measured with a hemacytometer (Fig. 4A, lower panel). Third, we examined the ability of the nuclei to exclude large fluorescent dextrans, molecules too big to travel through the nuclear pores. In such an assay, only damaged or leaky nuclei can pick up the dextran (50). As shown in Table 1, control cells mixed with 155-kDa TRITC-coupled dextran were completely impermeable to this molecule, while none of the Triton X-100-permeabilized cells prevented the entry of the fluorescent probe. In comparison, nuclei mostly excluded the dextran both prior to and following incubation for 6 h in the test tube, suggesting that the much larger capsids could not leak out. Fourth, we probed by Western blotting the propensity of the nuclei to release PCNA, a 36-kDa nuclear protein, which would be indicative of instability. As anticipated, only marginal amounts of the nuclear marker leaked out (Fig. 5). Finally, if capsids were released by simple leakage or rupture of the nuclei, all capsids present in nuclei would indiscriminately be released. To test this



directly, the capsid content of nuclei was compared by EM to the capsid produced *in vitro*. Table 2 shows that purified nuclei primarily contained immature capsids, as do intact cells (data not shown). This was even true after a 6-h incubation of the nuclei *in vitro*. In contrast, mature C capsids were preferentially released in the test tube. Altogether, these data indicate that the capsids were not simply produced by ruptured or leaky nuclei but that mature capsids were specifically released.

**Enhancement of nuclear egress by infected cytosol.** Given the ability of infected cytosol to support HSV-1 nuclearegress, it was interesting to evaluate whether cytosol from mock-treated cells could be equally effective. Cytosol from mock-treated cells was prepared and compared in the *in vitro* assay with cytosol obtained from infected cells. Interestingly, the presence of viral proteins in the cytosol was not obligatory, as cytosol from mock-treated cells also permitted egress (Fig. 6). However, a small and reproducible stimulation of egress was found when using cytosol from infected cells. Although not essential, cytosolic viral proteins enhanced HSV-1 nuclear egress.

**Release of mature naked capsids.** The deenvelopment/reenvelopment model of egress suggests that the capsids released should be naked, as newly assembled capsids in the nucleus would escape by budding through the inner nuclear membrane and subsequently fuse with the second nuclear envelope (15, 43, 44). Although much data support this view, one could always debate whether the naked capsids found in the cytoplasm of intact cells originated from the nucleus or from another compartment. We therefore examined this issue by using the assay, since it was relatively free of "contaminating" organelles (Fig. 1). An *in vitro* nuclear egress assay was performed, and the capsids produced were examined by negative staining. As can be seen in Fig. 7, all capsids were naked, without a single case of enveloped capsids being detected. For comparison, Fig. 7F shows a control extracellular enveloped capsid. Thus, capsids escaped the nuclei exclusively as naked particles.

It has recently been suggested that naked cytosolic capsids could arise by the direct passage of newly assembled capsids from the nucleus through vastly enlarged nuclear pores (39, 79). To examine whether the virus used the same route of egress in isolated nuclei as in intact cells and to examine the possible role of enlarged pores in that egress, infected nuclei and cells were prepared for conventional Epon embedding and examined by EM. As expected from the literature, naked nuclear capsids, enveloped perinuclear virions, and

capsids in the process of envelopment and deenvelopment at the nuclear membranes were observed in infected cells (data not shown). Similarly, numerous nuclear naked capsids were seen in isolated nuclei (Fig. 8A). Furthermore, enveloped perinuclear virions were often present in enriched nuclei (Fig. 8B and C). Finally, capsids seemingly in the process of envelopment at the inner nuclear membrane (Fig. 8D to G) and deenvelopment at the outer nuclear membrane (Fig. 8G and H) were detected. With the exception of rare cases of enlarged nuclear pores in damaged nuclei, only pores of normal size and appearance were seen in intact cells (data not shown). In isolated nuclei, it was unfortunately difficult to detect normal pores because of their propensity to have large perinuclear spaces when filled with virus. Nonetheless, the nuclear envelopes were usually intact all around the organelle (Fig. 1 and 8). Despite this limitation, the data reveal similar egress patterns in both isolated nuclei and cells and suggest that the capsids escaped nuclei *in vitro* by budding into the perinuclear space rather than exiting via enlarged nuclear pores.

**Likely reconstitution of capsid maturation.** HSV-1 capsids are initially assembled in the nucleus into large B-core capsids (procapsids). These procapsids differ from mature C capsids by their lack of viral DNA, their shape, and their protein content. Their transformation into mature capsids involves the concomitant packaging of monomeric viral DNA, the cleavage of preVP22a and U<sub>L</sub>26, and the angularization of the capsids (25). The U<sub>L</sub>26 viral protease plays a central role in these processes. Thermosensitive mutants of the protease, such as ts1201 (52), tsProt. A (21), and V701 (55), are deficient for these steps at the nonpermissive temperature of 39.5°C but proceed normally at 31°C (9, 21, 52, 59,74). Since the *in vitro* assay clearly reconstitutes nuclear egress of HSV-1 capsids, we were curious to determine whether it could also reconstitute DNA encapsidation and capsid maturation. To this end, HeLa cells were infected with V701 at 39.5°C and the nuclei isolated at 20°C instead of the usual 4°C, since these thermosensitive protease mutants readily disassemble their immature capsids at 4°C (60). These nuclei were then assayed for their ability to release capsids *in vitro*. To our surprise, capsid egress took place at the permissive temperature of 31°C (Fig. 9) and were equal in efficiency to wild-type virus (on average, 13,603 ± 4,948 cpm for wild-type virus and 14,202 ± 1,924 cpm for V701). As for wild-type virus, capsid egress was abolished at 4°C or in the absence of energy and cytosol.

The protease mutant V701 thus seemingly shared with wild-type virus its dependence on energy, cytosol, and temperature (Fig. 9) as well as time (data not shown).

Given the leaky nature of the U<sub>126</sub> protease mutants (9; J. Duron and R. Lippé, unpublished observations), it was possible that only mature capsids already formed at the nonpermissive temperature escaped *in vitro*. To examine this issue, capsid egress at 39.5°C was evaluated. Figure 9 reveals a minimal level of egress barely above those seen for the 4°C control, suggesting that few preexisting mature capsids were released *in vitro*. As an additional control, cells infected with V701 at 39.5°C were examined by conventional Epon embedding and EM. As indicated above, they should contain immature capsids at the nonpermissive temperature but should release mature C-type capsids upon incubation at the permissive temperature. Figure 10A and B show that, as previously reported (55), large B-core capsids were indeed the predominant form of capsids in their nuclei. As anticipated, this was also the case in nuclei isolated from V701-infected cells incubated at the nonpermissive temperature (Fig. 10C AND D). In comparison, capsids produced at 31°C *in vitro* and visualized by negative staining and EM revealed the exclusive presence of mature C-type capsids (Fig. 10 E and F). As shown by Church and Wilson for a similar U<sub>126</sub> mutant (9), one sees limited numbers of mature capsids in the nuclei of tissue culture cells upon incubation at the permissive temperature. This is because they tend to egress quickly. Consistently, our EM data suggest that the distribution of capsid types in the nuclei of intact cells at 39.5°C is 0.1% type A, 93.2% type B, and 6.8% type C ( $n = 1125$ ), while at 31°C, the distribution shifts to 3.2% type A, 78.3% type B, and 18.5% type C ( $n = 341$ ). Notably, capsids released *in vitro* are exclusively of the C type (100%;  $n = 137$ ). Hence, maturation of capsids seemingly takes place in our *in vitro* assay. To examine whether DNA encapsidation also occurred, we isolated the DNA from both wild-type and V701 capsids produced in the test tube and performed an SQ test. This test determines whether cleavage of the concatemers of viral DNA occurs and is often used to evaluate whether the concomitant encapsidation step takes place (8,42). Figure 11 shows that cleavage of the SQ restriction fragment into the BamHI S and Q terminal fragments could indeed be detected for control wild-type DNA. The same was true for V701 in intact cells. However, no detectable encapsidation was seen for V701 *in vitro* using this assay, either prior to or after its incubation in the test tube. This contrasted with the obvious presence of DNA in the capsids seen by EM (Fig. 10) or detected by PCR (data not shown) and [<sup>3</sup>H]thymidine (Fig.

9). Taken together, these findings indicate that the V701-infected nuclei isolated at the nonpermissive temperature contained immature capsids and that they released mature capsids at the permissive temperature *in vitro*. Unfortunately, encapsidation could not be detected under these conditions.

## Discussion

We have established an *in vitro* assay that reconstitutes HSV-1 egress from the nucleus to the cytoplasm. This assay relies on the isolation of nuclei from infected cells and their incubation in the test tube under controlled conditions. These nuclei maintain the integrity of their two envelopes (Fig. 1) and their functionality (Fig. 3, 4, and 6) and actively release capsids (Fig. 3 and 4). While the basal signal observed at 4°C or in the absence of energy and cytosol may be interpreted as meaning that some nuclei break in the course of the assay, the impact of free [<sup>3</sup>H]thymidine, thymidine incorporated in host DNA, and thymidine found in nonencapsidated viral genomes is limited since we measure only TCA-precipitated, DNase I-resistant material (i. e. , only encapsidated viral DNA). Moreover, it is clear that leaky or ruptured nuclei played a minimal role, as confirmed by five independent other criteria. First, the data could not simply be explained by more active proteases and lipases at higher temperatures, since the V701 protease mutant yielded lower capsid release at 39. 5°C (Fig. 9). Second, EM and phase-contrast examination of the samples also failed to detect nuclear damage over the course of the assay (data not shown). Moreover, the number of nuclei remained stable for the full 6 h of the assay (Fig. 4). Third, a minimal amount of PCNA was found outside the nucleus following the *in vitro* assay (Fig. 5). Fourth, the nuclei excluded large dextrans, molecules much smaller than capsids (Table 1). Finally, the preferential release of mature C capsids by nuclei otherwise containing a majority of immature capsids further supports this conclusion (Table 2). We therefore estimate that the assay reconstitutes nuclear HSV-1 egress in the test tube.

As expected from an intracellular transport assay, the egress of HSV-1 capsids is a temperature-, time-, and energy-dependent process (Fig. 3 and 4). Although a characteristic of most intracellular transport assays, viral egress was surprisingly also dependent on the presence of cytosol. This was not necessarily anticipated, since the virus moves from the nucleus and through the perinuclear space, where cytosolic components should be absent a

priori. However, a role for cytosol is still possible, as the virus eventually reaches the cytoplasmic compartment. Perhaps it plays a role at the cytosolic face of the outer nuclear membrane, where fusion of perinuclear virions with the outer nuclear membrane occurs. Some cytosolic components may also be imported through the nuclear pores, since the pores are normally active under *in vitro* conditions (16,50). Interestingly, cytosol prepared from mock-treated cells efficiently supported egress, while cytosol prepared from infected cells slightly and reproducibly enhanced it (Fig. 6). This suggests that viral proteins present in the cytosol, including cytosolic teguments, are not absolutely essential for this step of egress. It does, however, indicate that both host and viral proteins play some role. Given the modulation by HSV-1 of host protein expression in infected cells (54,73), it is not clear whether cytosolic viral proteins play a direct role in nuclear egress or whether our results simply reflect a different host protein composition in infected cytosol. Further work will be required to clarify this issue. It will be interesting to analyze which teguments are found on the capsids released *in vitro* in the presence of either mock-treated or infected cytosol. From these results, it is clear that the assay reproduces nuclear HSV-1 egress in a quantifiable manner and has all the hallmarks of intracellular transport assays, i. e. , temperature, time, energy, and even cytosol dependence. Interestingly, the efficiency of this assay (up to 30%) compares favorably to those of other intracellular assays (67).

Analysis by EM of the capsids released *in vitro* revealed the exclusive presence of naked capsids (Fig. 7). This is significant, as the capsids can come only from the nuclei in the assay. The absence of capsids in either the mock-treated cytosol or the infected cytosol preparations further supports this assertion (data not shown). This finding is consistent with the deenvelopment/reenvelopment model of egress but also partly coherent with the enlarged-nuclear-pore model of Wild and colleagues (39,79). They suggest that newly assembled naked capsids reach the cytoplasm through enlarged and dissociated nuclear pores. These capsids apparently retrogradely bud into the perinuclear space from the cytosolic face of the nucleus rather than the inner nuclear face. In this model, nuclear capsids never interact with the inner nuclear membrane, but rather travel through dilated pores. Finally, they suggest that these perinuclear virions could travel to the Golgi via tubular structures directly linking the reticulum endoplasmic to the Golgi. While such events may be difficult to detect without rapid freezing, we find this model unlikely. First, aside from obviously much-damaged nuclei, we did not see any evidence for enlarged pores in

either isolated nuclei or infected cells (data not shown). Second, EM analysis revealed abundant virions in the perinuclear space in both isolated nuclei and infected cells. Third, though we found evidence of deenvelopment at the outer nuclear membrane (Fig. 8), this cannot distinguish between the large-pore model of Wild and colleagues (39,79) and the envelopment/deenvelopment/reenvelopment model. This is because it would look the same as budding from the cytosol (Wild's model). However, budding at the inner nuclear membrane can only be reconciled with the envelopment/deenvelopment/reenvelopment model, which is clearly shown in Fig. 8 and for which we found several examples. Fourth, the enlarged-pore model assumes that the perinuclear virions would leave the nucleus via the biosynthetic pathway. This is a well-characterized pathway that normally involves the transport of molecules from the reticulum endoplasmic to the Golgi in COPII-coated vesicles (48). Consistently, one would then predict the release of doubly enveloped virions, which was never observed in our nuclear enriched assay (Fig. 8). Finally, if perinuclear capsids were to travel as proposed via a continuous luminal passage to the Golgi, capsids should not egress in our assay since they are deprived of such an option. Although not a definitive proof, the data suggest that perinuclear virions are more likely to arise by budding from the nuclear side and that they are released as naked capsids in the cytosol, where they are later reenveloped.

An unexpected finding was the discovery that nuclei isolated from V701-infected cells arrested at the nonpermissive temperature could support HSV-1 egress when incubated at the permissive temperature *in vitro* (Fig. 9). This egress is unlikely to have originated from already-mature V701 capsids present in the nuclei since large B-core capsids and very few C capsids were found at 39.5°C in either isolated nuclei or intact cells (Fig. 10). Second, little egress took place at 39.5°C (Fig. 9). Third, although the U<sub>i</sub>26 protease mutation is slightly leaky, very few mature capsids are synthesized at the nonpermissive temperature, as evidenced by the 2- to 3-log decrease in viral titers in tissue culture (9; Duron and Lippé, unpublished observations). Fourth, nuclei exclusively released mature C capsids upon incubation at the permissive temperature (Fig. 9 and 10). Finally, no encapsidation was detected in V701-containing nuclei following their isolation at 39.5°C (i. e. , prior to their incubation at the permissive temperature *in vitro*). Consequently, capsid maturation seemingly occurs upon shifting of nuclei to the permissive temperature.

Unfortunately, the concomitant encapsidation step could not be observed with the classical SQ test (Fig. 11), despite the obvious presence of DNA in the capsids as judged by EM (Fig. 10), PCR (data not shown), and the presence of [<sup>3</sup>H]thymidine (Fig. 9). The reasons for this apparent contradiction are unclear to us. Unless concatemeric DNA can be packaged in capsids, which is unlikely (12), there must be DNA cleavage occurring. Since the nuclei are isolated at 20°C (see Materials and Methods), some of the DNA is perhaps the target of DNases that prevent us from detecting the more minor S and Q fragments (as evidenced by the slight smearing seen in Fig. 11 and many other attempts, including larger-scale preparations). Further work will be needed to elucidate this question.

In conclusion, we have set up an *in vitro* assay that reconstitutes the egress of HSV-1 capsids from the nucleus to the cytoplasm and may reconstitute capsid maturation and DNA encapsidation. To our knowledge, this is a significant breakthrough, as this is the first time that this has been achieved. This nuclear egress assay shares with other transport assays its dependence on cytosol, energy, time, and temperature. Host cytosolic proteins clearly play a role in this process, while viral proteins enhance it. This assay should now be useful for identification of molecules involved in nuclear egress and characterization of their functions.

### **Acknowledgements**

We thank Joël Lanoix and Allégria Kessous for critical reading of the manuscript and excellent suggestions. We are indebted to Bruce Register and Jules A. Shafer for the V701 strain, Sandra Weller for the pNN9 plasmid, and Beate Sodeik for supplying wild-type viruses, the pHSV-1 blueox bacmid, and continued support. We particularly wish to thank the excellent technical support of Johanne Duron.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant no. MOP 12679) and establishment grants from the Canadian Foundation for Innovation and the Fonds de la recherche en santé du Québec. R. L. is a recipient of a CIHR scholarship.

**References**

1. Baines, J. D., and B. Roizman. 1992. The U<sub>L</sub>11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *J. Virol.* 66:5168-5174.
2. Baines, J. D. , P. L. Ward, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman. 1991. The U<sub>L</sub>20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J. Virol.* 65:6414-6424.
3. Bjerke, S. L. , and R. J. Roller. 2006. Roles for herpes simplex virus type 1 U(L)34 and U(S)3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* 347:261-276.
4. Brown, S. M. , and A. R. MacLean. 1998. Herpes simplex virus protocols. Humana Press, Totowa, N. J.
5. Chang, Y. E. , C. Van Sant, P. W. Krug, A. E. Sears, and B. Roizman. 1997. The null mutant of the U<sub>L</sub>31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J. Virol.* 71:8307-8315.
6. Cheung, P. , B. W. Banfield, and F. Tufaro. 1991. Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *J. Virol.* 65:1893-1904.
7. Christoforidis, S. , H. M. McBride, R. D. Burgoyne, and M. Zerial. 1999. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397:621-625.
8. Church, G. A. , A. Dasgupta, and D. W. Wilson. 1998 . Herpes simplex virus DNA packaging without measurable DNA synthesis. *J. Virol.* 72:2745-2751.
9. Church, G. A. , and D. W. Wilson. 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J. Virol.* 71:3603-3612.
10. Cook, N. R. , and H. W. Davidson. 2001. *In vitro* assays of vesicular transport. *Traffic* 2:19-25.
11. Darlington, R. W. , and L. H. Moss III. 1968. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* 2:48-55.



12. Dasgupta, A. , and D. W. Wilson. 1999. ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *J. Virol.* 73:2006-2015.
13. Dasgupta, A. , and D. W. Wilson. 2001. Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J. Gen. Virol.* 82:1561-1567.
14. Desai, P. J. 2000. A null mutation in the U<sub>L</sub>36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J. Virol.* 74:11608-11618.
15. 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.
16. Finlay, D. R. , D. D. Newmeyer, P. M. Hartl, J. Horecka, and D. J. Forbes. 1989. Nuclear transport *in vitro*. *J. Cell Sci. Suppl.* 11:225-242.
17. Forest, T. , S. Barnard, and J. D. Baines. 2005. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat. Cell Biol.* 7:429-431.
18. Foster, T. P. , J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas. 2004. The herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J. Virol.* 78:5347-5357.
19. Fuchs, W. , B. G. Klupp, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter. 2004. Essential function of the pseudorabies virus U<sub>L</sub>36 gene product is independent of its interaction with the U<sub>L</sub>37 protein. *J. Virol.* 78:11879-11889.
20. Fuchs, W. , B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter. 2002. The interacting U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J. Virol.* 76:364-378.
21. Gao, M. , L. Matusick-Kumar, W. Hurlburt, S. F. DiTusa, W. W. Newcomb, J. C. Brown, P. J. McCann III, 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.* 68:3702-3712.

22. 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.* 68:6372-6390.
23. Granzow, H. , B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter. 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* 75:3675-3684.
24. 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.
25. Homa, F. L. , and J. C. Brown. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* 7:107-122.
26. 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.* 77:3191-3203.
27. Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 1744:493-517.
28. 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* 90:1149-1159.
29. Jensen, H. L. , and B. Norrild. 2002. Temporal morphogenesis of herpes simplex virus type 1-infected and brefeldin A-treated human fibroblasts. *Mol. Med.* 8:210-224.
30. 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.
31. Kato, A. , M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase U<sub>L</sub>13

- phosphorylates viral US3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors U<sub>L</sub>34 and U<sub>L</sub>31. *J. Virol.* 80:1476-1486.
32. Klupp, B. G. , H. Granzow, and T. C. Mettenleiter. 2001 . Effect of the pseudorabies virus U<sub>S</sub>3 protein on nuclear membrane localization of the U<sub>L</sub>34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* 82:2363-2371.
  33. Klupp, B. G. , H. Granzow, and T. C. Mettenleiter. 2000 . Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the U<sub>L</sub>34 gene product. *J. Virol.* 74:10063-10073.
  34. Klupp, B. G. , H. Granzow, E. Mundt, and T. C. Mettenleiter. 2001. Pseudorabies virus U<sub>L</sub>37 gene product is involved in secondary envelopment. *J. Virol.* 75:8927-8936.
  35. 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.
  36. Kopp, M. , H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, E. Mundt, A. Karger, and T. C. Mettenleiter. 2003. The pseudorabies virus U<sub>L</sub>11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. *J. Virol.* 77:5339-5351.
  37. Kreis, T. E. , and R. Pepperkok. 1994. Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:533-537.
  38. Lee, G. E. , J. W. Murray, A. W. Wolkoff, and D. W. Wilson. 2006. Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking *in vitro*. *J. Virol.* 80:4264-4275.
  39. Leuzinger, H. , U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild. 2005 . Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J. Virol.* 79:13047-13059.
  40. Liang, L. , and J. D. Baines. 2005. Identification of an essential domain in the herpes simplex virus 1 U<sub>L</sub>34 protein that is necessary and sufficient to interact with U<sub>L</sub>31 protein. *J. Virol.* 79:3797-3806.

41. Luxton, G. W. , J. I. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith. 2006. The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J. Virol.* 80:201-209.
42. Martinez, R. , R. T. Sarisky, P. C. Weber, and S. K. Weller. 1996. Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J. Virol.* 70:2075-2085.
43. Mettenleiter, T. C. 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106:167-180.
44. Mettenleiter, T. C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76:1537-1547.
45. Mossman, K. L. , R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley. 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J. Virol.* 74:6287-6299.
46. Muranyi, W. , J. Haas, M. Wagner, G. Krohne, and U. H. Koszinowski. 2002 . Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* 297:854-857.
47. Newcomb, W. W. , F. L. Homa, D. R. Thomsen, Z. Ye, and J. C. Brown. 1994. Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* 68:6059-6063.
48. Nickel, W. , and F. T. Wieland. 1998. Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem. Cell Biol.* 109:477-486.
49. Nii, S. , C. Morgan, and H. M. Rose. 1968. Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence of development. *J. Virol.* 2:517-536.
50. Ojala, P. M. , B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 20:4922-4931.
51. Park, R. , and J. D. Baines. 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J. Virol.* 80:494-504.

52. 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.* 45:1056-1064.
53. Purves, F. C. , D. Spector, and B. Roizman. 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the U<sub>s</sub>3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the U<sub>L</sub>34 gene. *J. Virol.* 65:5757-5764.
54. Ray, N. , and L. W. Enquist. 2004. Transcriptional response of a common permissive cell type to infection by two diverse alphaherpesviruses. *J. Virol.* 78:3489-3501.
55. Register, R. B. , and J. A. Shafer. 1996. A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the U<sub>L</sub>26 protease gene in HSV-1. *J. Virol. Methods* 57:181-193.
56. Reynolds, A. E. , L. Liang, and J. D. Baines. 2004 . Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34. *J. Virol.* 78:5564-5575.
57. Reynolds, A. E. , B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller. 2001. U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J. Virol.* 75:8803-8817.
58. Reynolds, A. E. , E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines. 2002 . Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34, and U<sub>s</sub>3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* 76:8939-8952.
59. Rixon, F. J. , A. M. Cross, C. Addison, and V. G. Preston. 1988. The products of herpes simplex virus type 1 gene U<sub>L</sub>26 which are involved in DNA packaging are strongly associated with empty but not with full capsids. *J. Gen. Virol.* 69:2879-2891.
60. Rixon, F. J. , and D. McNab. 1999. Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of *in vitro*-assembled procapsids. *J. Virol.* 73:5714-5721.

61. Roller, R. J. , Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, and D. DeSalvo. 2000. Herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>34 gene product is required for viral envelopment. *J. Virol.* 74:117-129.
62. Ryckman, B. J. , and R. J. Roller. 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: U<sub>L</sub>34 protein modification and the U<sub>S</sub>3-U<sub>L</sub>34 catalytic relationship. *J. Virol.* 78:399-412.
63. Sambrook, J. , and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
64. Schimmer, C. , and A. Neubauer. 2003. The equine herpesvirus 1 U<sub>L</sub>11 gene product localizes to the trans-Golgi network and is involved in cell-to-cell spread. *Virology* 308:23-36.
65. Sciaky, N. , J. Presley, C. Smith, K. J. Zaal, N. Cole, J. E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia, and J. Lippincott-Schwartz. 1997 . Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.* 139:1137-1155.
66. Scott, E. S. , and P. O'Hare. 2001. Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 75:8818-8830.
67. 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. *Nature* 394:494-498.
68. Simpson-Holley, M. , J. Baines, R. Roller, and D. M. Knipe. 2004 . Herpes simplex virus 1 U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J. Virol.* 78:5591-5600.
69. Simpson-Holley, M. , R. C. Colgrove, G. Nalepa, J. W. Harper, and D. M. Knipe. 2005. Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J. Virol.* 79:12840-12851.

70. Smith, J. D. 1980. An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus. *Intervirology* 13:312-316.
71. Sodeik, B. , M. W. Ebersold, and A. Helenius. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136:1007-1021.
72. 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.
73. Stingley, S. W. , J. J. Ramirez, S. A. Aguilar, K. Simmen, R. M. Sandri-Goldin, P. Ghazal, and E. K. Wagner. 2000. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J. Virol.* 74:9916-9927.
74. Turcotte, S. , J. Letellier, and R. Lippe. 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the *trans*-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* 79:8847-8860.
75. van Meer, G. , and H. Sprong. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:373-378.
76. von Einem, J. , D. Schumacher, D. J. O'Callaghan, and N. Osterrieder. 2006. The  $\alpha$ -TIF (VP16) homologue (ETIF) of equine herpesvirus 1 is essential for secondary envelopment and virus egress. *J. Virol.* 80:2609-2620.
77. Wagenaar, F. , J. M. Pol, B. Peeters, A. L. Gielkens, N. de Wind, and T. G. Kimman. 1995. The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J. Gen. Virol.* 76:1851-1859.
78. 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.* 65:1066-1081.
79. Wild, P. , M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther. 2005 . Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* 79:1071-1083.

80. Wolfstein, A. , C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik. 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules *in vitro*. *Traffic* 7:227-237.
81. Zerial, M. , and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:107-117.

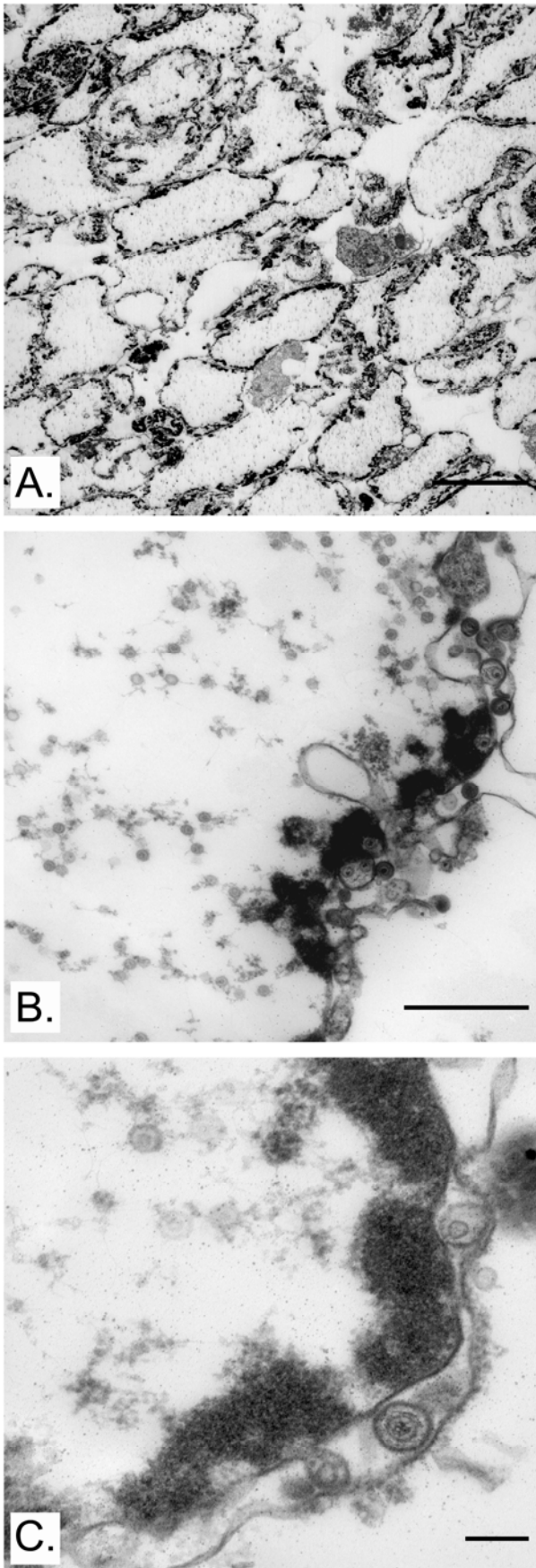


## Figures et tables – Article I

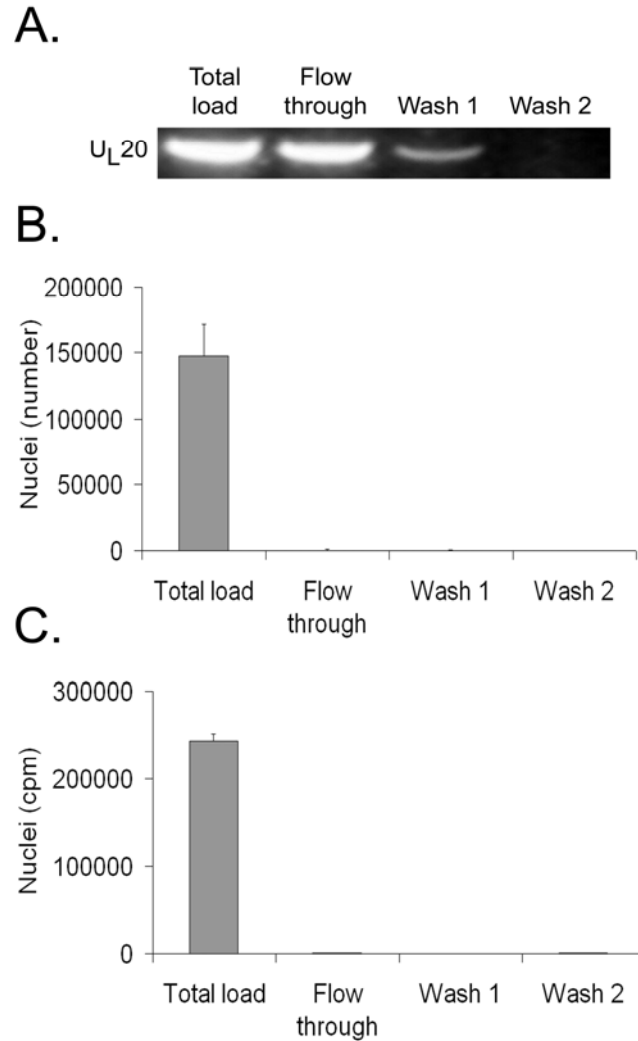
**TABLE 1.** Integrity of nuclei determined by their exclusion of dextran-TRITC

Description of cells or nuclei	Value for incubation		% Impermeable material
	Time (h)	Temp (°C)	
Control cells	0		95 ± 0
Permeabilized cells <sup>a</sup>	0		0 ± 0
Wild-type nuclei	0		86 ± 6
	6	4	88 ± 10
	6	37	82 ± 10
V701 nuclei	0		62 ± 2
	6	4	63 ± 6
	6	31	72 ± 9
	6	39.5	66 ± 5

<sup>a</sup> Cells were treated for 10 min with 0.1% Triton X-100 on ice.



**FIG. 1.** Purity and integrity of isolated nuclei. Nuclei isolated from HSV-1 17+ infected HeLa cells were mounted in Epon and analyzed by electron microscopy. Panel A indicates the relative purity of the preparation at low magnification (X 960), while panels B and C show that the isolation procedure preserved the integrity of both nuclear envelopes at higher magnification (X 12,400 and X 31,200, respectively). Note the presence of multiple capsids both in the nuclei matrix and in the perinuclear space. Bars represent (A) 10  $\mu$ m, (B) 1  $\mu$ m, and (C) 200 nm.



**FIG. 2.** Efficient separation of nuclei and virions. (A) Extracellular virions were passed over a spin column and washed twice, and the different fractions were collected. DNA from each fraction was extracted, PCR amplified using HSV-1 UL20-specific primers, and analyzed on an ethidium bromide agarose gel. (B) Nuclei isolated from [<sup>3</sup>H]thymidine-labeled, infected cells were passed over a spin column and the nuclei present in each fraction counted with a hemacytometer and phase contrast. (C) Same procedure as that shown in panel B, except that leakage of 3H-labeled virions from nuclei was measured by liquid scintillation. Average values for duplicate experiments are shown, and error bars represent the standard deviations of the means. Note that the nuclei remained intact during this procedure.

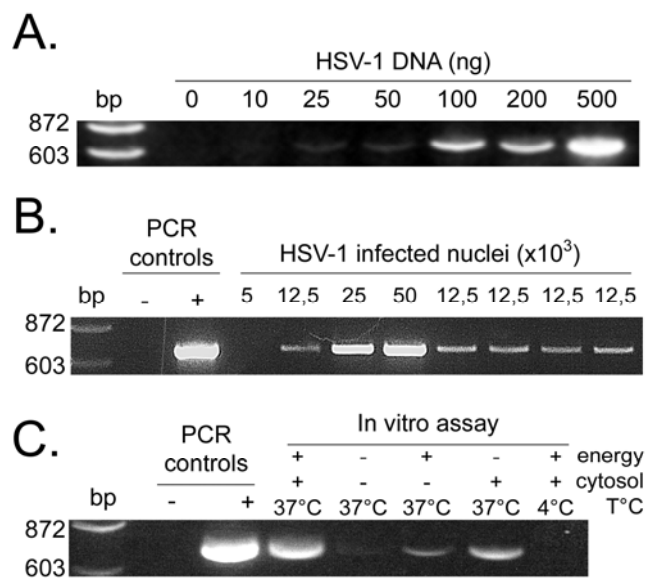


FIG. 3. Quantitative analysis by PCR of capsids released. (A) Various amounts of purified HSV-1 DNA were amplified by PCR with UL20-specific primers under limited cycling conditions (see Materials and Methods). (B) The viral DNA from increasing numbers of nuclei isolated from infected cells was extracted and amplified by PCR as described above. (C) Nuclei isolated from HSV-1 17+-infected cells were incubated *in vitro* 6 h at 4°C or 37°C in the presence (4 mg/ml) or absence of cytosol from infected cells and with (+) or without (-) an energy regeneration system. Capsids released in the assay were separated from nuclei on spin columns, and DNA was extracted from the capsids and amplified by PCR as described in the text. PCR controls: -, no DNA; +, DNA from HSV-1 17+-infected cells.

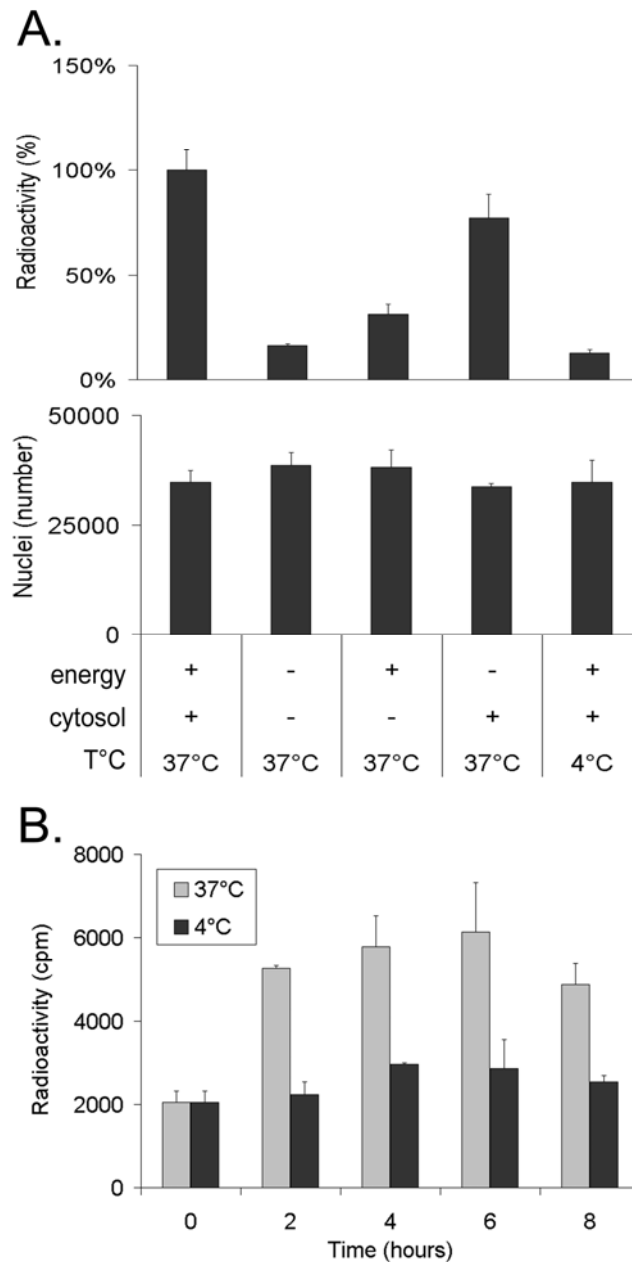


FIG. 4. Quantitative analysis by scintillation counting of capsids released *in vitro*. (A) Isolated nuclei containing radiolabeled HSV-1 17+ capsids were incubated for 6 h at 4°C or 37°C with 0 or 4 mg/ml of infected cytosol and with (+) or without (-) an energy regeneration system. The capsids released in the test tubes were separated from nuclei on spin columns, their DNA was extracted, and TCA was precipitated on paper filters and finally analyzed in a liquid scintillation counter (top panel). The stabilities of the nuclei were determined by counting each sample with a hemacytometer after the incubation period of 6 h (middle panel). (B) To determine the optimal incubation time, nuclei were incubated for various times at 4°C or 37°C in the presence of energy and 4 mg/ml of infected cytosol and analyzed by scintillation counting as described above. The panels show average values for representative experiments, and error bars represent the standard deviations of the means, depicting the variation among the duplicates within each experiment.

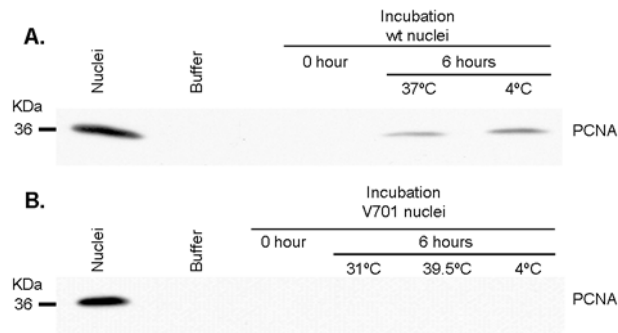


FIG. 5. Lack of significant leakage of PCNA. To evaluate the leakiness of the nuclei during the *in vitro* assay, the presence in the flowthrough of spin columns of PCNA, a nuclear resident protein, was examined by Western blotting as described in Materials and Methods. The total PCNA nuclear pool is shown by loading the same number of nuclei as in the assay. The results indicate that both (A) WT and (B) V701 nuclei are relatively stable, with a minimal release of PCNA. Note that upon prolonged exposure, a signal can be seen for V701. The negative-control “Buffer” was the *in vitro* assay buffer.

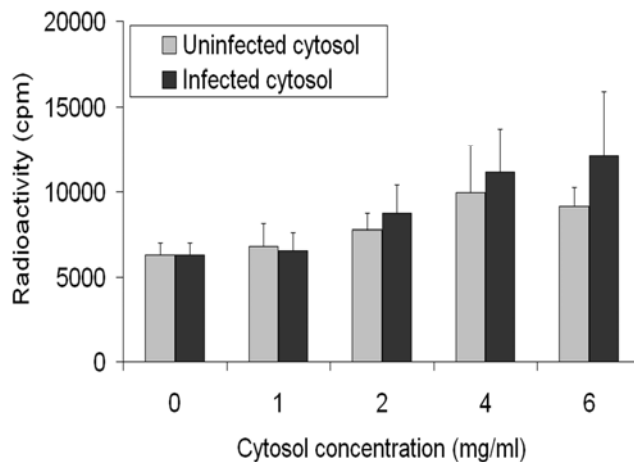


FIG. 6. Cytosol from infected cells is slightly more efficient than mock-treated cytosol in releasing capsids *in vitro*. Isolated nuclei containing radiolabeled HSV-1 17+ capsids were incubated for 6 h at 37°C with energy and increasing amounts of cytosol obtained from mocktreated or infected cells. The capsids released *in vitro* were separated from nuclei in spin columns and analyzed by liquid scintillation as in Fig. 4. The results combine average values for five independent experiments, each done in duplicate, and error bars represent the standard deviations of the means.

**TABLE 2.** Preferential release of mature wild-type capsids by nuclei *in vitro*

Description of capsids	Incubation <sup>a</sup> time (h)	Value for capsids		
		% Mature	% Immature <sup>b</sup>	No. of capsids counted
Present in nuclei	0	32	68	793
	6	42	58	747
Released <i>in vitro</i>	6	68	32	196

<sup>a</sup>Incubation at 37°C in nuclear buffer, cytosol, and energy.

<sup>b</sup>A, B, and atypical capsids.

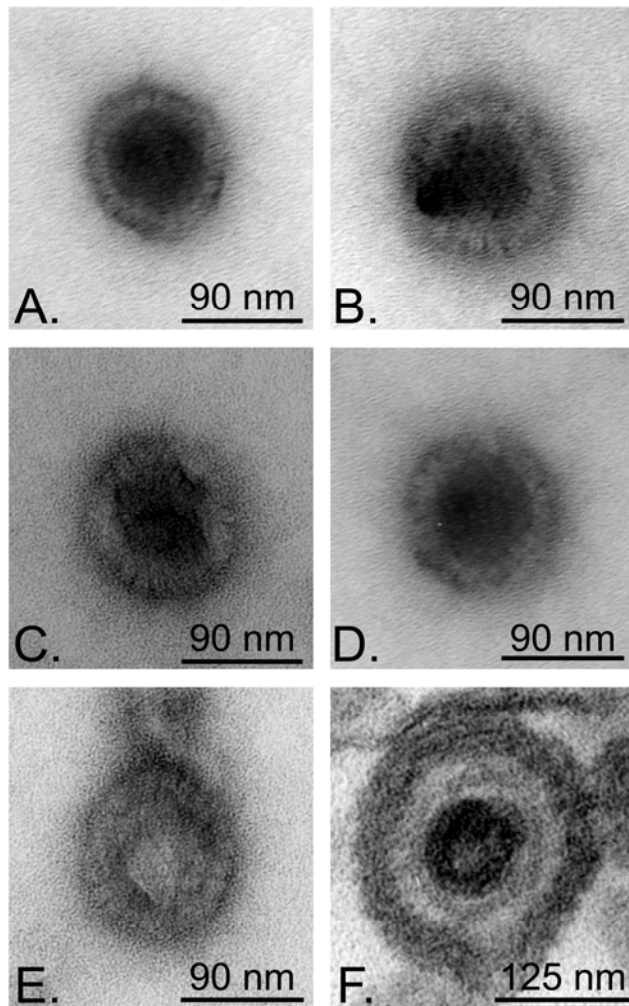
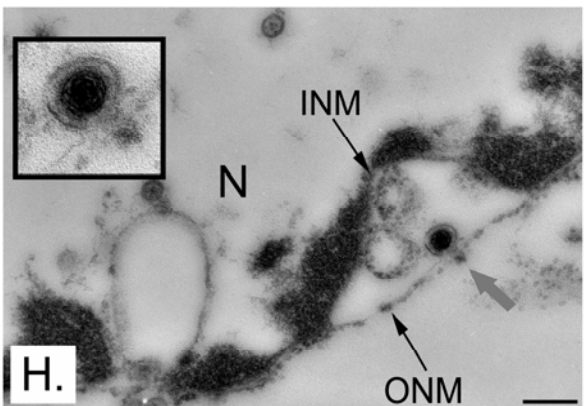
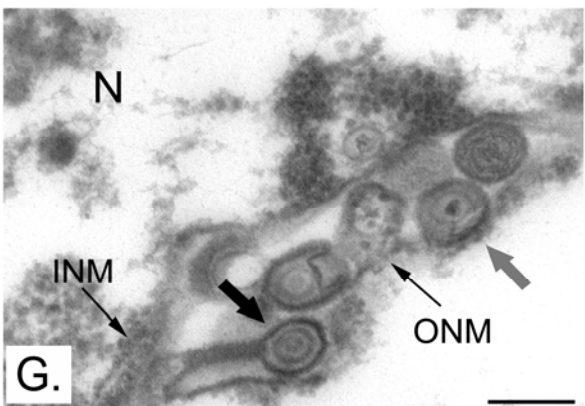
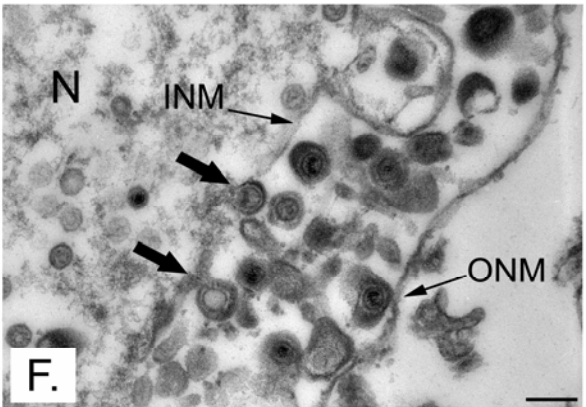
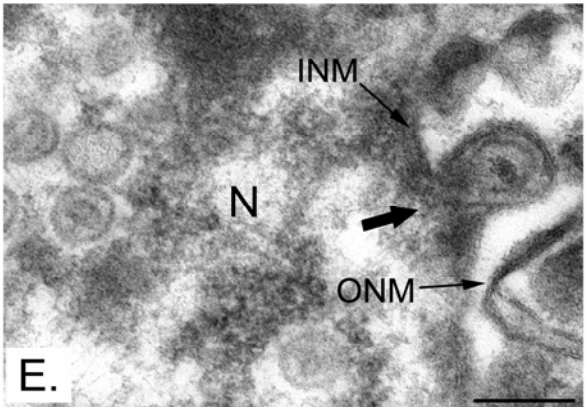
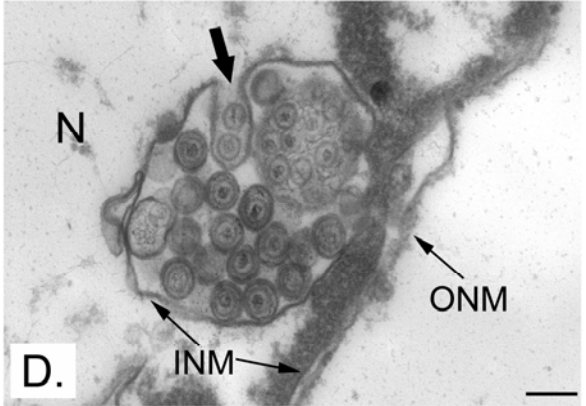
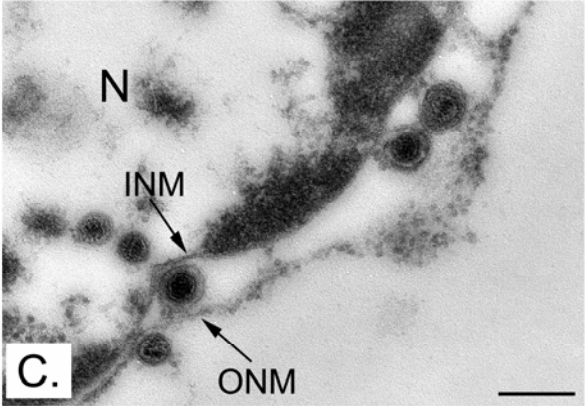
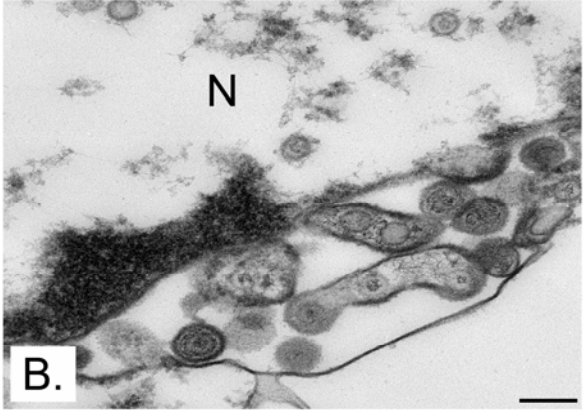
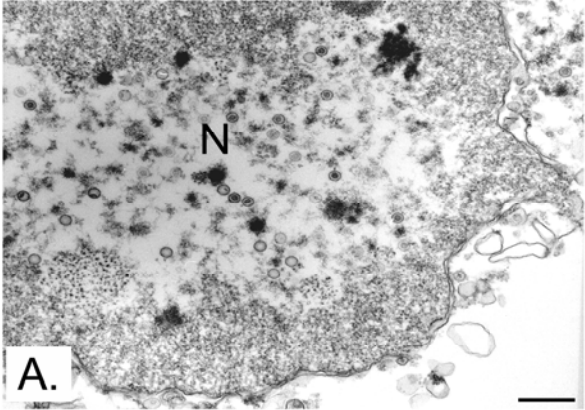


FIG. 7. Negative staining of capsids liberated during the *in vitro* assay. HSV-1 17+ infected nuclei were incubated for 6 h at 37°C with energy and (A) mock-treated or (B to E) infected cytosol. The capsids were then separated from the nuclei on spin columns, layered on copper grids, negatively stained, and examined by electron microscopy. Note that all capsids were unenveloped and most were mature. Some atypical capsids could also be seen (E). As a control for envelopment, panel F shows an extracellular virion mounted in Epon.





*Voir page précédente*

FIG. 8. Viral egress *in vitro*. Nuclei isolated from HeLa cells infected with HSV-1 17+ were analyzed by Epon embedding and electron microscopy. Capsids were present in the nuclei (A) and the perinuclear space (B and C). Capsids seemingly in the process of acquiring an envelope at the inner nuclear membrane (large black arrows in panels D to G) or interacting with the outer nuclear membrane (large gray arrows in panels G to H) were observed. Bars represent 500 nm in panel A and 200 nm in all other panels. N, nucleus; INM, inner nuclear membrane; ONM, outer nuclear membrane.

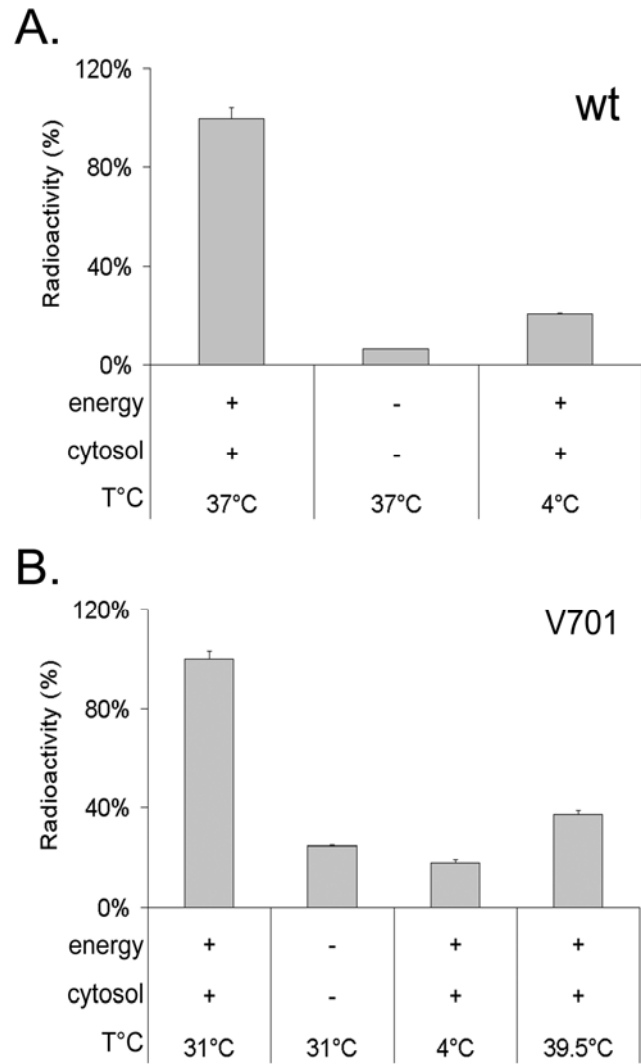


FIG. 9. The thermosensitive protease A V701 mutant behaves in the same way as the wild-type virus in the *in vitro* assay. Isolated nuclei containing radiolabeled (A) HSV-1 17+ or (B) V701 capsids were incubated for 6 h at the specified temperatures with 0 or 4 mg/ml of infected cytosol and with (+) or without (-) energy. Released capsids were separated from nuclei, and DNA was TCA precipitated and measured by liquid scintillation as described in the text. The permissive temperature for V701 is 31°C and the nonpermissive temperature 39.5°C.

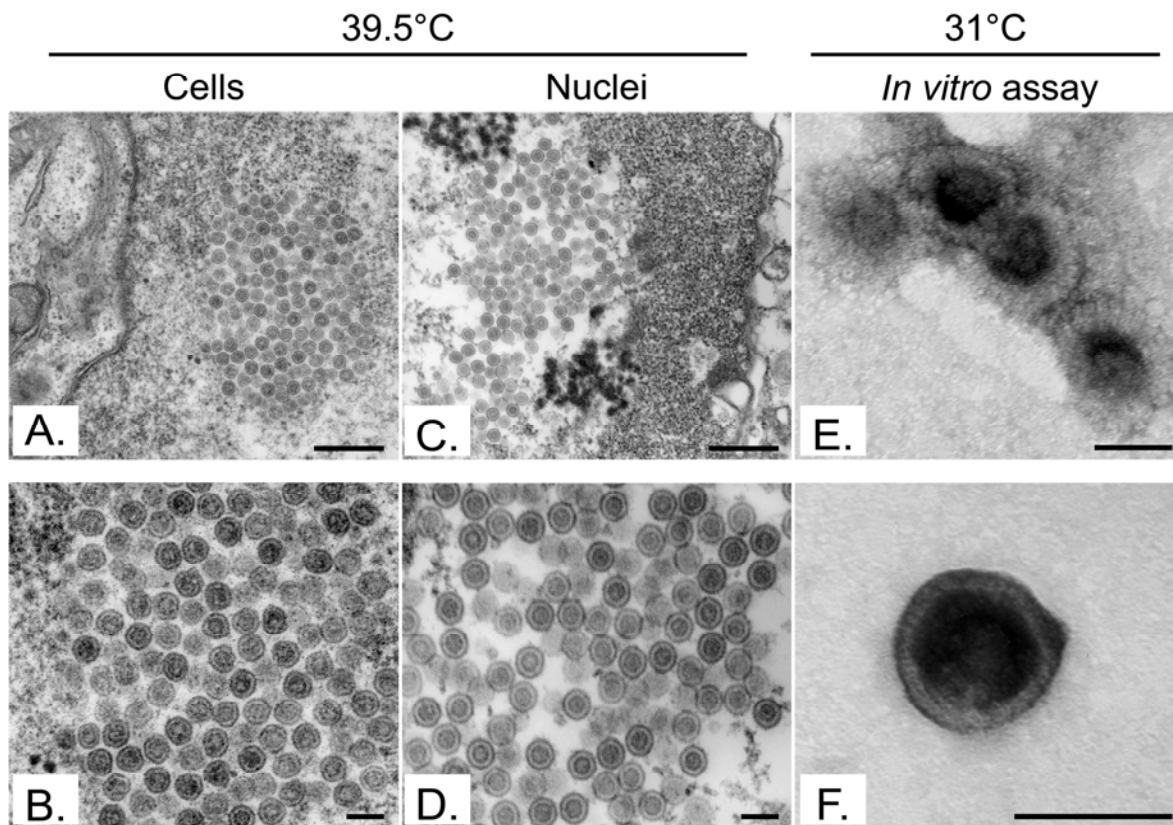


FIG. 10. Electron microscopy analysis of V701 capsids. Cells and nuclei infected with V701 at the nonpermissive temperature (39.5°C) were prepared for Epon embedding and electron microscopy. Immature capsids were abundant in the nuclei of whole cells (A and B) and in isolated nuclei (C and D). V701 capsids released *in vitro* at the permissive temperature (31°C) were analyzed by negative staining (E and F). They exclusively consisted of mature naked C capsids. Bars represent 500 nm (A and C), 150 nm (B and D), and 90 nm (E and F).

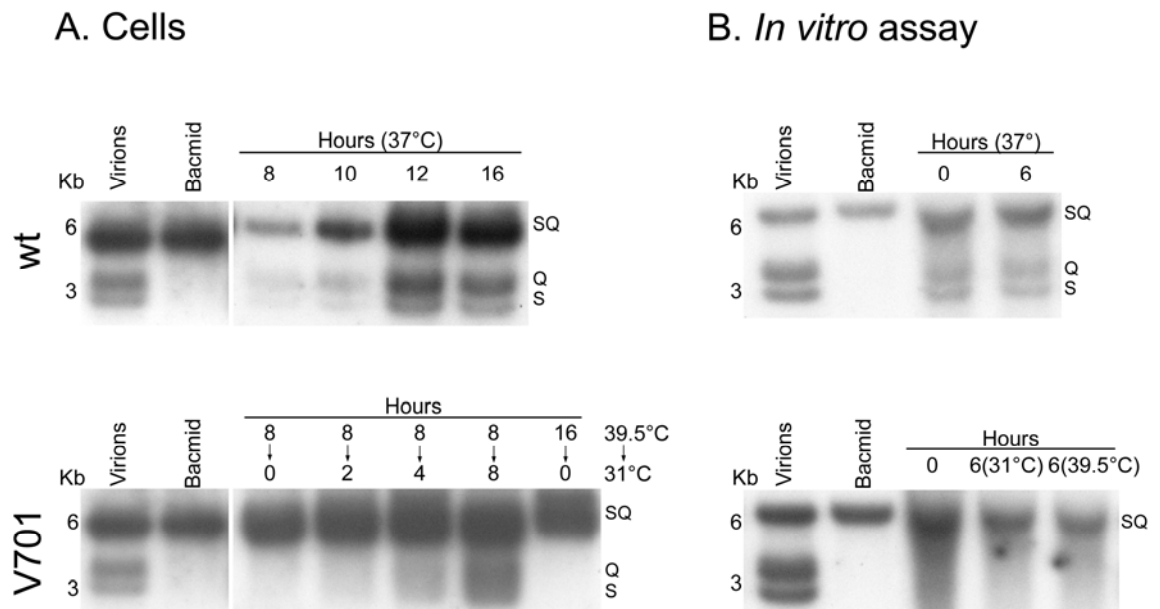


FIG. 11. SQ analysis of viral DNA released. DNA extracted from either (A) whole infected cells or (B) capsids released in the *in vitro* assay was digested with BamHI and analyzed by Southern blot hybridization with a probe recognizing the S, Q, and SQ BamHI fragments of the HSV-1 genome.

## Article II

Titre : Analysis of the early steps of tegumentation of  
HSV-1 capsids

Auteurs : G. Rémillard-Labrosse et R. Lippé

Publié dans : Article soumis J Virol, 2009-2010

### Contribution des auteurs

Gaudeline R. Labrosse\* : conception et réalisation des expériences, analyse des  
données, montage des figures et rédaction de l'article

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

\*premier auteur

## Mise en contexte (article II)

Les composantes responsables de la sortie du virus HSV-1 du noyau sont peu connues. Tel que décrit précédemment, plusieurs protéines virales ( $U_L31$ ,  $U_L34$  ainsi que les kinases virales  $U_S3$ ,  $U_L13$ ) interviennent au niveau de la membrane nucléaire interne pour rompre les lamines nucléaires afin de faciliter l'accès du virus à la membrane nucléaire et recruter certaines protéines virales à la membrane nucléaire [45, 239, 243, 261-264]. Toutefois, il reste beaucoup de joueurs clés à identifier afin d'avoir un portrait juste de la machinerie qui permet au virus de bourgeonner à la membrane nucléaire interne, puis de fusionner avec la membrane nucléaire interne. Dans le but de trouver des contributeurs importants pour la sortie nucléaire de HSV-1, le contenu protéique des capsides directement issues des noyaux via l'essai *in vitro* a été analysé. Cette analyse a permis d'identifier les protéines virales associées à cet intermédiaire de la maturation du virus. L'idée de base de cette étude vient du raisonnement suivant : si certaines protéines virales sont présentes sur les capsides à un stade précis du processus de transport, ces protéines ont peut-être un rôle à jouer au niveau de cette étape.

Dans les dernières années, les techniques de protéomique se sont beaucoup développées et il y a eu une émergence d'études appliquant l'approche protéomique aux virus. Ces analyses de protéomique ont servi notamment à identifier : la composition protéique des virions; la structure des protéines virales; les interactions virus-hôte et virus-virus ainsi que les changements du protéome cellulaire suite à une infection virale. Ces découvertes, en plus de permettre une meilleure compréhension de la pathogénèse des virus, ont contribué au développement de nouveaux traitements et vaccins antiviraux plus efficaces. Ces méthodes ont aussi permis d'apporter des précisions concernant le rôle de régulation de certaines protéines cellulaires et même de découvrir de nouveaux processus cellulaires [38, 236, 362-373].

Dans ce deuxième article, il sera donc question de l'analyse protéique des capsides HSV-1 fraîchement exportées du noyau. Cette étude en plus de fournir des indices sur les protéines virales impliquées dans le processus de sortie nucléaire du virus, permet la collecte de données concernant le processus viral de tégumentation. Tel que mentionné précédemment, le tégument viral est une couche intriquée de protéines virales qui se situent entre la capside recouvrant le génome viral et l'enveloppe lipidique virale. Ces protéines

virales effectuent une multitude de fonctions tout au long du cycle viral, dont le transport intracellulaire des capsides [41, 43, 44, 144, 148, 269, 272, 374]; la transactivation des gènes viraux [375, 376], la régulation de l'expression des protéines cellulaires [42, 377], le processus de latence [179, 186], l'évasion du système immunitaire [222, 378, 379], etc. Le tégment est ajouté séquentiellement sur les capsides virales, principalement aux deux sites d'enveloppement : le noyau et le TGN ainsi que dans le cytoplasme des cellules infectées [380-382]. Nos connaissances concernant le patron d'ajout des différents tégments sont plutôt vagues et l'analyse protéique des capsides relâchées durant l'essai *in vitro* offre une opportunité unique d'acquérir de nouvelles informations sur les étapes précoces de la tégmentation.



## Article

### Introduction

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) particles are composed of four layers, including an inner core containing the viral genome, a protein shell called the capsid, a multi-protein layer termed the tegument and an envelope derived from cellular membranes that contains viral glycoproteins. The most commonly accepted model of egress proposes that capsids are assembled in the nucleus, incorporate viral DNA, bud through the inner nuclear membrane and lose that first envelope by fusion with the outer nuclear membrane to be released unenveloped into the cytoplasm (13, 40, 46). The capsids are then re-enveloped at the trans Golgi network (TGN), where they acquire their mature envelope (17, 18, 21, 30, 46, 67, 68, 71, 72).

While the sites of capsid assembly and genome packaging are well established, the addition of the tegument onto the capsid has not been elucidated in detail. It is believed to occur sequentially during different steps of virus assembly in distinct cellular compartments, including the nucleus, the cytoplasm and the site of secondary envelopment (4, 18, 39, 40). This complexity is likely due to two factors. First, as many as 23 different teguments are present in mature extracellular virions, as revealed by a recent proteomics analysis (35). Second, the tegument is involved in many facets of the viral life cycle, including the migration of capsids on microtubules (25, 31, 61, 63, 74), the anchorage of the capsids to nuclear pores (49), the transactivation of viral genes (52), the modulation of host protein expression (20), viral latency (14) and the regulation of the immune response (25, 44). Many teguments also interact with each other and/or with viral glycoproteins and accumulate at the TGN, where they altogether delineate the final envelopment site (39).

The first interactions of capsids with the teguments take place in the nucleus. There, the UL31 tegument interacts with the membrane anchored UL34 protein, bind to the capsids and facilitates their nuclear egress (16, 28, 75). Both subunits of this UL31/UL34 complex are substrates for another nuclear tegument, the Us3 viral kinase (23, 27, 45, 51, 56, 58, 73). Interestingly, deletion mutants for UL31, UL34 and Us3 behave differently, with the first two arresting capsids in the nucleus (8, 55, 57, 70) while Us3 deletion causes the accumulation of perinuclear virions (27, 56, 70). Furthermore, all three proteins are

associated with nuclear capsids and perinuclear virions, but only Us3 is found on cytosolic capsids and mature extracellular milieu (19, 35, 50, 56, 62).

Other teguments may also interact with nuclear capsids, but this is controversial, in particular for the UL36 and UL37 teguments. Hence both proteins partially localize to the nucleus (1, 32, 38, 59). Immunoblot analyses of capsids purified from the nucleus detected both teguments in one study but only weakly or not at all in another study (66, 74). In addition, immuno-gold labeling failed to see UL36 on perinuclear capsids of the related pseudorabies virus (26, 41). Finally, while deletion of UL36 results in the accumulation of naked cytoplasmic capsids (2, 11), it has been reported that UL37 deletion mutants accumulate in the nucleus or the cytoplasm (10, 29). Similarly, the potential interaction of ICP0 and ICP4 with capsids, where in the cell this might occur and even the presence of these proteins in mature virions are disputed (12, 22, 35, 37, 60, 64, 76-78). Finally, deletion of the UL48 (VP16) tegument hinders nuclear capsid egress in some studies (10, 43), in apparent contradiction with others (15, 33). Whether any other teguments also interact with nuclear capsids is unknown.

It is thus at present unclear which components of the tegument are added to capsids prior to or during nuclear egress (hereby defined as primary tegument for the purpose of this study). It is equally unclear which teguments are added or removed later on in the cytosol or during the final envelopment of the capsids. Their identification would shed light on the complex issue of viral maturation from the nucleus to the cell surface. To address these issues, we made use of a recently described assay that reproduces *in vitro* the egress of HSV-1 capsids from infected nuclei (54). In this assay, capsid release can be studied in the presence or absence of the full set of cytosolic tegument components by adding either infected or mock infected cytosol. Any tegument associated with capsids produced in the absence of cytosolic tegument must be components of the primary tegument added during nuclear egress. Thus, this represents a unique system to clearly distinguish teguments added during or after nuclear egress. In this study, we assessed this sequential addition of the teguments by immunoblotting and mass spectrometry. As anticipated, the UL31 tegument as well as the UL34 and gD integral proteins were absent on cytoplasmic capsids. Interestingly, 8 primary teguments were likely present on capsids produced in the absence of cytosolic tegument. Further analysis of capsids produced in the presence of cytosolic

tegument revealed the potential addition of at least four new teguments and possible loss of one tegument. The data was also consistent with multiple rounds of addition for some of the teguments, hinting at a dynamic multi-step interaction between the capsids and the teguments. These results not only address the complex issue of sequential addition of the tegument, but may ultimately provide some insights into the mechanism of HSV-1 nuclear egress and the fate of capsids in the cytosol.

## **Materials and methods**

**Cells and viruses.** HeLa S3 cells, a HeLa strain adapted to culture in suspension, were grown in Joklik's modified Eagle's medium (JMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% fetal bovine serum (Medicorp) and 0.1 mM MEM nonessential amino acids. Wild-type HSV-1 17+ virus was provided by Beate Sodeik. Virus stocks were expanded on BHK cells and titrated on Vero cells as described previously (67)

**Antibodies.** Primary antibodies for Western blotting included: • UL6, • UL31 and • UL34 (J.D. Baines); • UL7 and • UL14 (Y. Nishiyama); • UL12 (S.K. Weller); NC5 • UL18, NC3 and NC4 • UL41 and DL6 • Us6 (R.J. Eisenberg and G.H.Cohen); • UL20 and • Us3 (B. Roizman), Mab 9-2 • VP24 (D. J. Tenney); • UL36 (B. Sodeik, A. Helenius); 780 • UL37 (F.J. Jenkins); ab 5283 • UL47 and AGV031 • UL49 (G. Elliot) and LP1 • UL48 (H. Browne). The remaining antibodies were commercially available, including • ICP0, • ICP4 and 11E2 • ICP8 (Abcam); • VP5 (East Coast Bio) and • tubulin (Santa Cruz). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (goat anti-mouse; goat anti-rabbit and donkey anti-chicken) were purchased from Jackson ImmunoResearch or Cedarlane.

**Isolation of nuclei.** Nuclei were isolated from HeLa S3 suspension cells as previously described (54). Briefly, HeLa S3 cells grown in suspension were infected with HSV-1 17+ at 37°C at a multiplicity of infection (MOI) of 3. When required, <sup>3</sup>H thymidine was added in the media to label the viral DNA. Eight hours post-infection, cells were pelleted and resuspended in RSB (10 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) for less than 10 minutes. Cells were then broken mechanically. Nuclei were collected and enriched on a discontinuous iodixanol gradient at 10,000 x g for 30 min. The nuclear fraction was collected, adjusted to 50% glycerol and 1 mM dithiothreitol and stored at -80°C.

**Preparation of cytosol.** Cytosol from either uninfected or HSV-1 infected HeLa cells were prepared as described before (54). For this, mock HeLa S3 cells or cells infected with HSV-1 17+ at a MOI=3 for 8 hpi were pelleted and resuspended in KEHM (50 mM KCl, 10 mM EGTA, 50 mM HEPES pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) supplemented with 1 mM dithiothreitol and a mixture of protease inhibitors (8.25 mM chymostatin, 1.05 μM leupeptin, 0.38 μM aprotinin, and 0.73 μM pepstatin A; Sigma-Aldrich). Cells were then broken and the cell lysates centrifuged at 267,000 x g for 30 min at 4°C. At that speed, both virions and unenveloped capsids are completely removed (54). The protein concentrations of these cytosols were determined with a Bradford assay and the cytosol stored at -80°C.

**In vitro assay.** Nuclei were incubated with nuclear buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol) for 6 hours at 37°C. Mock or infected cytosol, usually 1 mg/ml, and an energy-regenerating system (17.3 mM creatine phosphate, 87 μg/ml creatine kinase, 2.17 mM ATP; Roche) (34, 54) were added as indicated.

**Capsid purification.** Capsids released *in vitro* were separated from nuclei with a spin column mounted with a 0.45-μm cellulose acetate filter (Costar) and centrifuged at 825 x g for 10 min at 4°C. The capsids were recovered from the permeate, then diluted in TNE buffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA) containing 0.1% Triton X-100 and gently sonicated 10 x 1 second. The capsids were then concentrated using an Amicon centrifugal filter device (Millipore) prior to their loading onto a 4 ml Sephacryl S-500 HR gel filtration column (GE Healthcare). Multiple 200 μl fractions were collected. Fractions specifically containing capsids were determined by liquid scintillation (to detect the radiolabeled viral DNA) and Western blotting (against capsid proteins VP23, VP5 and the cytoplasmic component α tubulin). Fractions enriched in viral capsids were finally pooled and concentrated on a Microcon centrifugal filter device (Millipore) with a MWCO of 100,000. Extracellular virions were purified as followed. HeLa S3 cells were grown in suspension and infected with HSV-1 17+ wt at an MOI of 5. The extracellular milieu was collected at 24 hpi and centrifuged at 300 g for 10 min at 4°C to remove intact cells and treated with 50 μg/ml DNase I (Roche) for 30 min at 4°C. The supernatant was filtered on a 0.45 μm filter and centrifuged at 39,000 g for 60 min at 4°C in a Beckman SW28 rotor. The pellet containing extracellular virus was resuspended in MNT (30 mM MES, 100 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 7.4) and stored at -80°C.

**Electron microscopy.** The purity of the capsids was analyzed by negative staining. Succinctly, purified capsids were adsorbed on hexagonal 200-mesh copper grids coated with Formvar and carbon (Canemco and Marivac). The samples were contrasted with 2% uranyl acetate (Canemco and Marivac), washed in distilled water and dried on filter paper. The grids were observed with a Philips 300 transmission electron microscope.

**SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting.** After boiling the samples for 10 minutes, they were loaded on 10 or 15% acrylamide SDS-PAGE gels in protein sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol). Proteins were then transferred from the gels to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were immersed for 1 h in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 0.1% Tween 20) and subsequently incubated for 2 - 4 hours with primary antibodies diluted in blocking buffer. The blots were then washed and probed with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The detection was done with the Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) on Kodak BioMax Light film. When indicated, western blot signal were quantified using the software image J version 1.42q (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). When indicated, gels were instead stained with a 0.25% Coomassie 250 solution (Sigma) for 10 minutes, washed in destaining buffer (5% acetic acid / 50% methanol) 3 times for 15 minutes and scanned.

**Treatment of nuclei with trypsin.** One hundred micrograms of infected nuclei or infected cytosol were treated with or without 500  $\mu\text{l}$  (11500 BAEE units) of immobilized TPCCK trypsin (Pierce). Trypsin beads were thoroughly washed 3 times with digestion buffer before being added to the samples. Every samples (treated and untreated) were incubated in a digestion buffer consisting of 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8.0 for 2 hours at 37°C with robust shaking. The trypsin beads were then separated from the sample by a 1 minute centrifugation at 300 g. The supernatant was collected and treated for SDS-PAGE electrophoresis and further processed for Coomassie blue staining or Western blotting.

**Radiolabelling and liquid scintillation detection.** For radiolabeled preparations, a protocol adapted from the work of Church and Wilson was used (9) as previously reported (54).

**Mass spectrometry.** The identification of proteins by mass spectrometry was performed as previously described (34). Peak lists, generated with Distiller (version 2.0.0; Matrix

Science, London, UK), were searched with Mascote (version 2.1.04) and X!Tandem (version 2007.01.01; ) using a copy of the UniProt database (May 31<sup>st</sup>, 2009) limited to the HHV-1 and Homo sapiens taxonomies. Scaffold (version 2.05.02; Proteome Software, Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability as specified by the Protein Prophet algorithm (24). Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (47). Spectra assigned to peptides that constitute the only proteomics evidence for the presence of the protein were manually inspected.

## Results

***Adaptation of the in vitro nuclear egress assay.*** To identify the primary teguments added to HSV-1 capsids in the nucleus, we modified our recently published *in vitro* nuclear egress assay (54). The original assay relied on nuclei purified from <sup>3</sup>H thymidine labeled infected HeLa cells and quantification of viral egress by liquid scintillation. We previously demonstrated that the nuclei preserve their integrity in this assay (54). To probe the teguments present on those capsids, the latter had to be fairly pure and depleted of both the nuclei and the cytosol used in the assay. After several trials, we opted for the purification scheme shown in Figure 1. Briefly, following the incubation of the infected nuclei with cytosol and energy, the nuclei were removed with a 0.45  $\mu$ m filter. Capsid aggregates were broken up by a gentle sonication and the cytosol subsequently removed from the sample by gel filtration over a high porosity column with a broad resolution spectrum (20 kDa to 10 MDa). Note that the expected capsid mass is around 200 MDa (65, 79), whereas individual proteins and complexes typically can range from a few kilo Daltons to a few mega Daltons. The capsids were finally concentrated by centrifugation for easier loading of the samples on SDS-PAGE (see materials and methods).

To ascertain the efficacy of the purification protocol, fractions from the gel filtration column were first analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Figure 2 indicates that cytoplasmic proteins, exemplified by the tubulin marker, eluted from the column in the 2 to 5 ml fractions. As expected, <sup>3</sup>H thymidine labeled capsids released *in vitro* were found

between the 1 and 2 ml fractions, i.e. in the void volume of the column, as confirmed by Western blotting against the UL18 (VP23) (Fig 2) and VP5 (data not shown) capsid protein. Analysis of each purification step by Western blotting indicated the high abundance of VP5, VP23, gD and tubulin in the starting *in vitro* assay and the complete removal of gD and tubulin in the final samples (Fig. 3A), indicating the protocol was successful to purify the capsids. Since equivalent amount of samples were loaded in each well, the data revealed a significant enrichment of capsid proteins in the final purification step. Finally, we examined the purity of the capsids by EM negative staining and noted enriched capsids with some rare small debris (Fig. 3B). As before, all capsids were naked (54) and were therefore well suited to analyze their tegument content.

***UL36, UL37, ICP0 and possibly ICP4 are primary teguments.*** We had previously shown that HSV-1 capsids can be released *in vitro* from purified infected nuclei in the presence of uninfected cytosol. Since such cytosol is prepared from cells that were never in contact with any virus, it is completely free of viral teguments. Consequently, the only teguments present in the assay are those in the nuclei. We therefore reasoned that any tegument identified on capsids released *in vitro* upon their incubation with mock cytosol is added to the capsids prior to their release into the cytoplasm. Thus, this represented an ideal opportunity to identify the primary tegument. We proceeded with the experiments and analyzed the samples. Given the controversy surrounding the putative UL36, UL37, ICP0 and ICP4 viral proteins (see introduction), we evaluated their presence by Western blot. To our surprise, three of them were strongly enriched in the purified capsid fraction, including ICP0, UL36 and UL37 (Fig. 4). In contrast, ICP4 was not enriched but was readily and reproducibly detected in the same sample.

Although the data suggested that UL36, UL37, ICP0 and perhaps ICP4 were primary teguments, two alternative explanations could be invoked. The first one was the possible presence of cytosolic teguments in the nuclear preparation. The second possibility was that viral teguments could be on the external face of the nuclei and were added to the capsids immediately following their release. To address the first issue, we examined whether the nuclei preparations used in the assay were free of cytoplasmic viral proteins. To this end, stocks of nuclei were passed over a 0.45  $\mu\text{m}$  column to remove the nuclei (54) and both control nuclei and filtrate were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. As seen in

Figure 5A, capsid and tegument proteins were found in the total nuclei preparation, as expected, but none were found in the filtrate. This not only ruled out the possible contamination of our nuclear preparation with cytoplasmic teguments but also confirmed the integrity of the nuclei when filtered over the 0.45  $\mu\text{m}$  column. To rule out the second scenario, the nuclei were digested with trypsin to remove all proteins present on its exterior surface. If a significant amount of tegument was present on the outside of the nuclei, it should be digested under these conditions. To prevent the passive diffusion of the small protease (23.2 kDa) through the nuclear pores, trypsin bound to 1  $\mu\text{m}$  sepharose beads was used. As shown in Figure 5B, the enzyme efficiently digested the teguments found in infected cytosol, which indicated the trypsin was functional. In contrast, the trypsin had no discernible effect on the teguments when whole nuclei were treated with the enzyme (Fig. 5B), indicating that they were exclusively inside the nuclei. Altogether, these results once again argued in favor of UL36, UL37, ICP0 and likely ICP4 as components of the primary tegument.

***Complete identification of the primary tegument.*** Our previous results had suggested the presence of three to four primary teguments on HSV-1 capsids. To examine if other teguments might be present, we probed several of them by Western blot using an array of previously characterized antibodies (see Materials and Methods). As controls, the UL31 tegument as well as the UL34, UL20 and gD integral proteins were analyzed, which were all undetected on the purified capsids produced in the presence of uninfected cytosol (Fig. 6). Moreover, UL31 and UL34 were, as expected, also absent on mature extracellular virions. Analysis of other viral proteins identified three additional primary teguments on the capsids, namely UL29 (ICP8), UL41 (VHS) and Us3 (Fig 6). Trace amounts of UL7, UL14 and UL47 (VP13/14) were also found, but due to their very low abundance, it wasn't clear if they were true components of the primary tegument. In contrast, UL49 (VP22) and surprisingly UL48 were undetected (Fig. 6). This second approach raised the putative primary teguments to at least seven proteins. Since equal amounts of extracellular virions and capsids produced *in vitro* in the presence of cytosol were loaded (i.e. normalized for VP5), we could visually compare the relative amounts of teguments. It was apparent that many of the proteins were more abundant on mature virions. Interestingly, ICP0, UL36, UL37 and Us3 were all significantly increased in mature virions, suggesting these proteins



were added in multiple rounds (i.e. in the nucleus and again later on). We could not however rule out an inefficient *in vitro* tegumentation process. Conversely, some teguments seemed to be less abundant in mature virions, including ICP4, ICP8 and UL41. Finally, both UL37 and Us3 differed in the mature virions compared to the cytoplasmic capsids. In the first case, an upper UL37 140 kDa band virtually disappeared in mature virions and was entirely replaced by a lower UL37 120 kDa immune reactive protein (Fig. 6). For Us3, while a 50 kDa band was stable in both samples, a novel 45.5 kDa band was specific to the extracellular virions. These findings argued for a dynamic interaction between the capsids and the teguments and the possible processing of some teguments.

Given the high purity of the capsids produced *in vitro*, we next adopted a proteomics approach to extend our study to all teguments. Following its resolution by SDS-PAGE, excision of the proteins and tryptic digestion, the samples were injected in a tandem mass spectrometer and the resulting peptides identified. The data confirmed the presence of the capsid components (VP23, VP5, UL26, VP26 and VP19c) as well as the ICP0, ICP4 and ICP8 tegument found by Western blotting. In addition, UL42 peptides were positively identified (Table 1). Seven perfectly matching distinct peptides also corresponded to UL36 but did not reach the minimal threshold used in these experiments and were therefore excluded from Table 1. In contrast, UL36, UL37, UL41 and Us3 were undetected by mass spectrometry. Note this doesn't imply they were necessarily absent since mass spectrometry only detects a fraction of all available peptides. Altogether, these results extended the putative list of primary teguments present on capsids released from the nucleus to at least eight viral proteins.

***Analysis of secondary tegument.*** So far, our energies were focused on capsids produced in the presence of uninfected cytosol, hence defining the primary tegument. However, it is of utmost interest to determine whether additional teguments are added to the capsids once they reached the cytoplasm and/or once they are re-enveloped at the TGN. Fortunately, the *in vitro* assay can address this point by assaying the tegument content of capsids produced in the presence of infected cytosol (i.e. containing a full set of teguments). The *in vitro* assay does not contain any organelles other than nuclei (54), including the TGN (data not shown), so this excludes all TGN bound tegument. It is thus possible to probe the sequential addition of the tegument in the nucleus, the cytoplasm and by deduction during re-envelopment. Infected nuclei were thus incubated *in vitro* in the presence of HSV- 1

infected cytosol, the released capsids purified as above and analyzed by Western blotting and mass spectrometry. As anticipated, most primary teguments were once found again in these samples (Table 1). While no additional viral protein were detected by Western blotting (data not shown), four new teguments were found by mass spectrometry, including UL12, UL14, UL39 and UL51 (Table 1). These are consequently candidate teguments that would be added to the capsids in the cytoplasm of infected cells. Oddly, UL29 was seemingly absent and was possibly lost during that step. Note that singly unique peptides were detected for UL2, UL23, UL29, UL40 and UL47 but were all below the predefined threshold. Considering that mature virions contain several additional teguments (35), it may be some were undetected in this study. However, an attractive alternative is they are added to the capsids further downstream at the site of re envelopment.

## Discussion

The tegument is among the least understood of the herpesvirus components and the subject of intense scrutiny. It is generally agreed upon that in the initial stages of egress, the nuclear capsids interact with Us3 and UL31 (16, 19, 56). While Us3 remains capsid associated in mature virions, UL31 subsists on perinuclear virions but is shed by the capsids as they enter the cytoplasm (27, 35, 56). However, the coating of the capsids with other teguments in the nucleus is unclear. A number of laboratories have addressed the issue by immuno-EM, deletion mutants and by immunofluorescence (see introduction). We took advantage of a unique *in vitro* assay that reconstitutes HSV-1 nuclear egress to address this topic. The assay proved instrumental since it could theoretically distinguish the primary tegument, i.e. those added prior or during nuclear capsid egress, from the teguments added later on. This was due to the absence of viral proteins in the uninfected cytosol, the absence of cytoplasmic teguments in the nuclear preparations (Fig. 5), the integrity of the nuclei as well as the lack of virus and organelles including the TGN in the infected cytosol (54). The absence of UL31, UL34, gD, UL20 and tubulin (Fig. 6) and the enrichment of putative teguments in the final viral preparations (Fig. 4) were all evidences the assay performed as expected.

While mass spectrometry misses some proteins given its dependence on relative abundance and the properties of individual proteins, some teguments may have escaped detection due to the salt conditions used to purify the capsids (see materials and methods). However, this insured the relatively high stringency needed to avoid picking up sticky proteins. Minimal salt concentrations might also be needed to reduce non specific interactions and limit aggregation. Thus, our study may actually underestimate the number of teguments interacting with the capsids.

The present study confirmed the presence of Us3 on the capsids but also UL36, UL37 and ICP0. Additional potential primary tegument (ICP8, UL41, UL42) were also identified (Fig. 6 and Table 1). ICP4 is also a likely primary tegument, since readily detected on the purified capsids (Fig. 4 & 6 and Table 1). This is particularly conceivable considering that this protein only localizes to the nucleus and is absent in the cytoplasm (Fig. 5B and (22)). Furthermore, ICP4 is also incorporated into mature extracellular virions in our hands (35). Its apparent lack of enrichment upon purification (Fig. 4) may simply reflect some protein aggregation and/or the incorporation onto capsids of a small percentage of the total ICP4. In contrast, the presence of UL48 on capsids as they emerge from the nucleus is more difficult to assess. On one hand, its presence would make sense given it may be needed for nuclear egress (43) and is found on mature extracellular virions (35). On the other hand, unlike UL36, it was not detected on the capsids by the more sensitive Western blotting technique. Finally, as the infected nuclei were prepared at 8 hpi, they may have limited amount of the late UL48 protein. Its presence on cytoplasmic capsids is therefore uncertain in this study.

Though one can never absolutely rule out low level contaminants, the presence of the primary teguments identified in this study is consistent with various laboratories that reported many of these molecules in the nucleus or onto nuclear capsids and/or perinuclear virion (1, 3, 5-7, 32, 35, 36, 38, 42, 53, 59). The identification of UL36 as potential primary tegument in this study contrasts with its absence on intranuclear capsids and perinuclear virions as reported by others (26, 41). Since negative signals may conceal detection issues, the contradiction may however only be apparent. Moreover, these components have all been detected in mature extracellular virions (12, 35, 60, 77, 78). Finally, the presence of UL36 as primary tegument makes good sense, since the protein may well transport the capsid onto the cytoskeleton during egress and presumably brings the capsids to the site of

re-envelopment (31, 61, 63, 74). Since UL37 binds to UL36 (26, 69), it is not surprising that may it also come along.

The addition of the primary teguments to the capsids in the early phase of egress raises two key questions, namely their precise site of addition and their roles. At present, it is not clear where exactly these teguments are added, since we monitored capsids released into cytosol. However, these teguments must have been added to nuclear capsids, since they were only present in the nucleus (Fig. 5). Furthermore, addition of any teguments onto already enveloped perinuclear capsids is not possible and they would be lost upon de-envelopment. This leaves open the questions as to their incorporation onto A, B and C capsids and their sequence of addition, in particular with respect to UL31. A systematic analysis of nuclear capsids is needed to better define our knowledge of the teguments along the nuclear egress process. Regarding the putative role of the primary teguments, several plausible options come to mind. First, some of the primary tegument may be involved in the actual nuclear egress process, i.e. the passage through the two nuclear envelopes. Second, the tegument may act one step ahead by transporting and/or targeting the capsids to the site of egress in the nucleus. Third, though unlikely at this point, they may be involved in some unknown facet of capsid assembly. Forth, they may serve as scaffold for the addition of other secondary teguments in the cytoplasm. Fifth, they may be required to transport the capsids to the TGN along the cytoskeleton. Sixth, some primary teguments may serve as a homing or docking signal to target the capsids to the site of final envelopment by physically interacting with the TGN. Finally, some teguments may simply be required for the next round of infection.

Four teguments (UL12, UL14, UL39 and UL51) were only detected on capsids produced in the presence of infected cytosol and therefore candidates as cytosolic teguments added before the capsids encounter their final site of re-envelopment (Fig. 6, Table 1). Two of them (UL12 and UL39) were undetected in mature virions in an earlier proteomics study (35). Similarly, ICP8 and UL42, present on capsids as they left the nucleus into mock cytosol (Table 1), were previously undetected in mature virions. Oddly, all are molecules implicated in viral DNA replication. Whether these are passively incorporated into the capsids or whether they still play a role after nuclear egress is open to debate. Though we cannot rule out they were below detection levels in our previous study

or mere contaminants in this study, an exciting scenario would be if some of the teguments are shed from the capsids as they egress. Interestingly, tegument shedding is not unheard of since UL31 is known to be removed during the passage of the capsids from the nucleus to the cytoplasm (27, 56). The reduced amounts of ICP4 and UL41 (VHS) on mature virions compared to capsids produced in the presence of mock cytosol (Fig. 6) further support the concept of tegument shedding during egress.

Another interesting aspect is the possible maturation of some teguments during egress. Hence mature extracellular virions and capsids produced *in vitro* differed in their UL37 and Us3 protein patterns (Fig. 6). This is consistent with a recent report documenting the maturation of the tegument at the morphological level (48). Finally, it should be pointed out that addition of a tegument to the capsid in the nucleus or cytoplasm doesn't need to be exclusive since multiple rounds of additions are possible. This is supported by the more abundant presence of several teguments in mature extracellular virions than on the capsids released *in vitro* (for example ICP0, UL36, UL37; Fig. 6; Tables 1). Altogether, this suggests a very dynamic interaction between capsids and teguments.

Despite the addition of several teguments prior to capsid re-envelopment, at least 14-15 other viral teguments are missing (ICP34.5, UL7, UL11, UL13, UL16, UL21, UL23, UL46, UL47, UL49, UL50, UL55, Us2, Us10 and perhaps UL48) in comparison to mature virions (35). It may of course be that the process of tegumentation is less efficient *in vitro* than in infected cells. Once again, the failure to detect them by mass spectrometry cannot be ruled out. In this respect, it should be pointed out that the *in vitro* assay was scaled up 2000 times over our original report (54) and would be difficult to augment further. However, it is tempting to speculate that the majority of these teguments are simply added to the capsids further downstream at the site of re-envelopment. The presence of several teguments at the TGN (39) argues in favor of such scenario.

The current study underlines the complexity of the tegumentation process. As in any approach, the ones employed in this study also have technical limitations but these novel data should provide an excellent basis for future research and lively discussions. Hence, several viral proteins were identified as potential components of the primary tegument added to nuclear capsids. The results also suggest that several teguments are acquired once the capsids reach the cytoplasm or only during re-envelopment. Finally, the loss of UL31 and other teguments during egress, the repeated addition of some teguments and possible

maturation of UL37 and Us3 underline the dynamic nature of the interactions between the capsids and the tegument. This hints at a multi-steps tegumentation process that occurs prior to nuclear egress, during nuclear egress, in the cytoplasm and during the re-envelopment stage. Future research will undoubtedly better define this complex tegumentation process.

### **Acknowledgements**

We wish to thank J.D. Baines, J.C. Brown, H. Browne, G.H. Cohen, Richard Courtney G. Elliot, R.J. Eisenberg; A. Helenius, F.J. Jenkins, Y. Nishiyama, B. Roizman, R.J. Roller, B. Sodeik, D.J. Tenney and S.K. Weller for the generous gift of precious antibodies. We also thank the Proteomics platform team from the Genome Quebec Innovation center in McGill University for help with mass spectrometry data. We are also indebted to all lab members, Kerstin Radtke and Sylvie Laboissière for critical reading of the manuscript. This research was funded by funds from the Canadian Institutes for Health Research to RL (MOP 49547 and MOP 82921).

### **References**

1. **Abaitua, F., and P. O'Hare.** 2008. Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. *J Virol* **82**:5234-44.
2. **Abaitua, F., R. Souto, H. Browne, T. Daikoku, and P. O'Hare.** 2009. Characterisation of the HSV-1 tegument protein VP1-2 during infection with the HSV temperature sensitive mutant, tsB7. *J Gen Virol*.
3. **Alvisi, G., S. Avanzi, D. Musiani, D. Camozzi, V. Leoni, J. D. Ly-Huynh, and A. Ripalti.** 2008. Nuclear import of HSV-1 DNA polymerase processivity factor UL42 is mediated by a C-terminally located bipartite nuclear localization signal. *Biochemistry* **47**:13764-77.

4. **Baines, J. D., C. E. Hsieh, E. Wills, C. Mannella, and M. Marko.** 2007. Electron tomography of nascent herpes simplex virus virions. *J Virol* **81**:2726-35.
5. **Baines, J. D., R. J. Jacob, L. Simmerman, and B. Roizman.** 1995. The herpes simplex virus 1 UL11 proteins are associated with cytoplasmic and nuclear membranes and with nuclear bodies of infected cells. *J Virol* **69**:825-33.
6. **Bucks, M. A., K. J. O'Regan, M. A. Murphy, J. W. Wills, and R. J. Courtney.** 2007. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology* **361**:316-24.
7. **Catez, F., M. Erard, N. Schaerer-Uthurralt, K. Kindbeiter, J. J. Madjar, and J. J. Diaz.** 2002. Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**:1126-39
8. **Chang, Y. E., C. Van Sant, P. W. Krug, A. E. Sears, and B. Roizman.** 1997. The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J Virol* **71**:8307-15
9. **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.
10. **Desai, P., G. L. Sexton, J. M. McCaffery, and S. Person.** 2001. A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *J Virol* **75**:10259-71.
11. **Desai, P. J.** 2000. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* **74**:11608-18.
12. **Elliott, G., W. Hafezi, A. Whiteley, and E. Bernard.** 2005. Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *J Virol* **79**:9735-45.
13. **Enquist, L. W., P. J. Husak, B. W. Banfield, and G. A. Smith.** 1999. Infection and spread of alpha herpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* **51**:237- 347.
14. **Everett, R. D.** 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**:761-70.
15. **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.

16. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* **76**:364-78.
17. **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.
18. **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.
19. **Granzow, H., B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2004. The Pseudorabies Virus US3 Protein Is a Component of Primary and of Mature Virions. *J Virol* **78**:1314-23.
20. **Hagglund, R., and B. Roizman.** 2004. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *J Virol* **78**:2169-78.
21. **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.
22. **Kalamvoki, M., J. Qu, and B. Roizman.** 2008. Translocation and colocalization of ICP4 and ICP0 in cells infected with herpes simplex virus 1 mutants lacking glycoprotein E, glycoprotein I, or the virion host shutoff product of the UL41 gene. *J Virol* **82**:1701-13.
23. **Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, H. Kodaira, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi.** 2005. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol* **79**:9325-31.
24. **Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold.** 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**:5383-92.
25. **Kelly, B. J., C. Fraefel, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.*
26. **Klupp, B. G., W. Fuchs, H. Granzow, R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter.** 2002. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol* **76**:3065-71.



27. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* **82**:2363-71.
28. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2000. Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* **74**:10063-73.
29. **Klupp, B. G., H. Granzow, E. Mundt, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Pseudorabies virus ul37 gene product is involved in secondary envelopment. *J Virol* **75**:8927-36.
30. **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.
31. **Lee, G. E., J. W. Murray, A. W. Wolkoff, and D. W. Wilson.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro. *J Virol* **80**:4264-75.
32. **Lee, J. I., G. W. Luxton, and G. A. Smith.** 2006. Identification of an essential domain in the herpesvirus VP1/2 tegument protein: the carboxy terminus directs incorporation into capsid assemblons. *J Virol* **80**:12086-94.
33. **Leege, T., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2009. Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*.
34. **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.
35. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**:8605-18.
36. **MacLean, C. A., F. J. Rixon, and H. S. Marsden.** 1987. The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells [published erratum appears in *J Gen Virol* 1988 Mar;69(Pt 3):763]. *J Gen Virol* **68**:1921-37.
37. **McLauchlan, J., C. Addison, M. C. Craigie, and F. J. Rixon.** 1992. Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology* **190**:682-8.
38. **McNabb, D. S., and R. J. Courtney.** 1992. Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology* **190**:221-32.

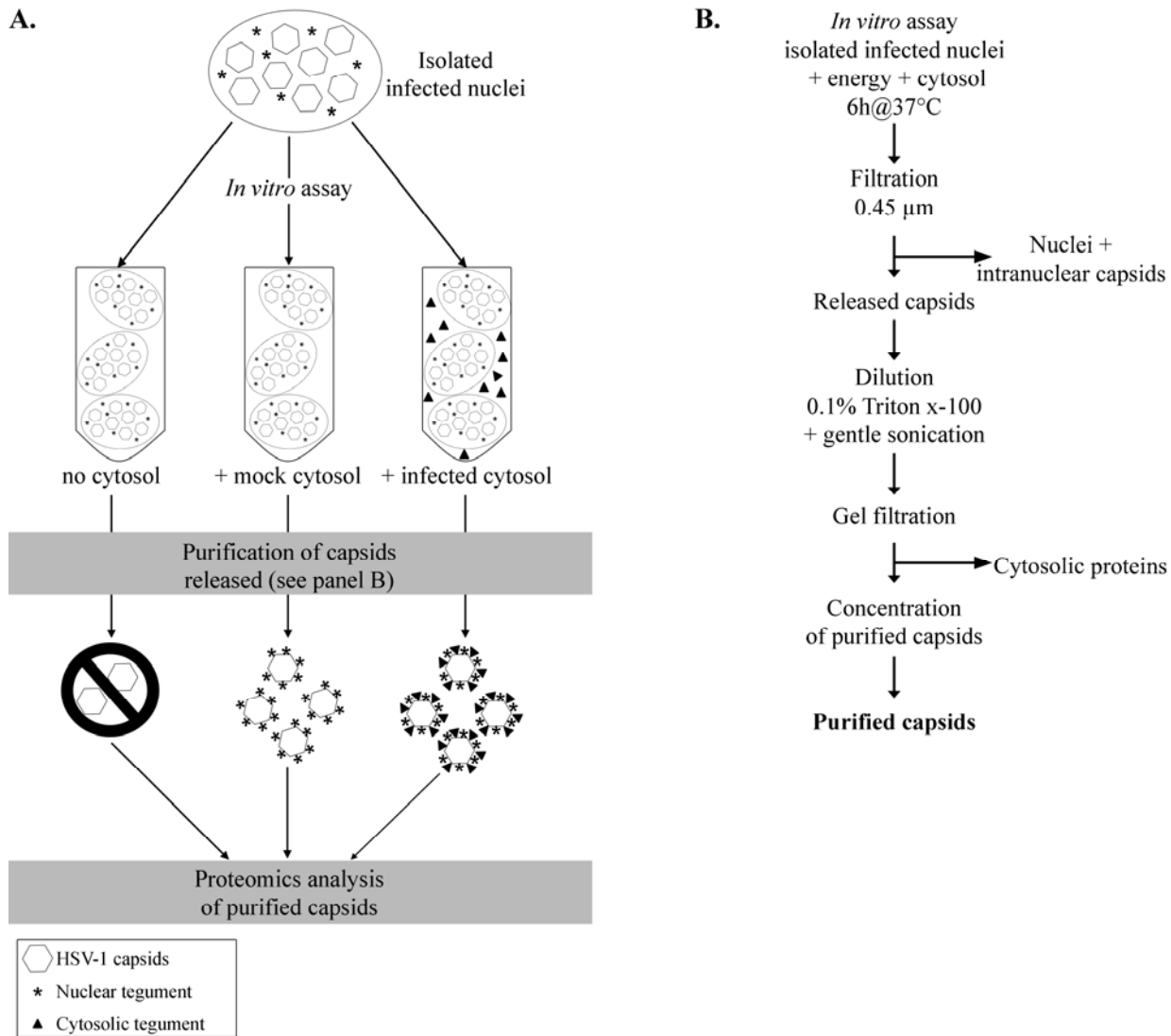
39. **Mettenleiter, T. C.** 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* **113**:163-9.
40. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res.*
41. **Mohl, B. S., S. Bottcher, H. Granzow, J. Kuhn, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2009. Intracellular Localization of the Pseudorabies Virus Large Tegument Protein pUL36. *J Virol.*
42. **Morrison, E. E., A. J. Stevenson, Y. F. Wang, and D. M. Meredith.** 1998. Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J Gen Virol* **79**:2517-28.
43. **Mossman, K. L., R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley.** 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* **74**:6287-99.
44. **Mossman, K. L., and J. R. Smiley.** 2002. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol* **76**:1995-8.
45. **Mou, F., E. Wills, and J. D. Baines.** 2009. Phosphorylation of the U L 31 protein of herpes simplex virus 1 by the U S 3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* **83**:5181-91.
46. **Nagel, C. H., K. Dohner, M. Fathollahy, T. Strive, E. M. Borst, M. Messerle, and B. Sodeik.** 2008. Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J Virol* **82**:3109-24.
47. **Nesvizhskii, A. I., A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold.** 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **75**:4646-58.
48. **Newcomb, W. W., and J. C. Brown.** 2009. Time-dependent transformation of the herpesvirus tegument. *J Virol* **83**:8082-9.
49. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
50. **Padula, M. E., M. L. Sydnor, and D. W. Wilson.** 2009. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol* **83**:4757-65.

51. **Purves, F. C., D. Spector, and B. Roizman.** 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J Virol* **65**:5757-64.
52. **Rajcani, J., V. Andrea, and R. Ingeborg.** 2004. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* **28**:293-310.
53. **Read, G. S., and M. Patterson.** 2007. Packaging of the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: two forms of the Vhs polypeptide are associated with intranuclear B and C capsids, but only one is associated with enveloped virions. *J Virol* **81**:1148-61.
54. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
55. **Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller.** 2001. U(l)31 and u(l)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**:8803-17.
56. **Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**:8939-52.
57. **Roller, R. J., Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, and D. DeSalvo.** 2000. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**:117-29.
58. **Ryckman, B. J., and R. J. Roller.** 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J Virol* **78**:399-412.
59. **Schmitz, J. B., A. G. Albright, P. R. Kinchington, and F. J. Jenkins.** 1995. The UL37 protein of herpes simplex virus type 1 is associated with the tegument of purified virions. *Virology* **206**:1055-65.
60. **Sedlackova, L., and S. A. Rice.** 2008. Herpes simplex virus type 1 immediate early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions. *J Virol* **82**:268-77.

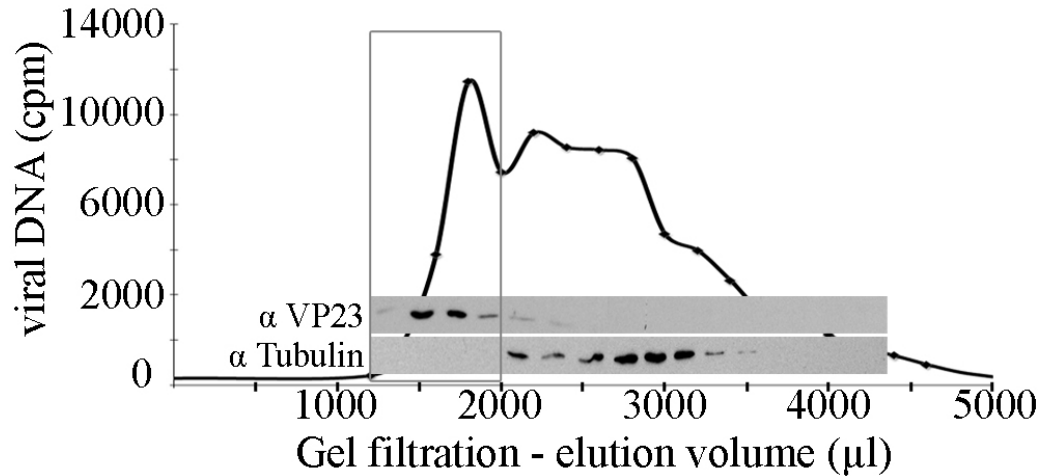
61. **Shanda, S. K., and D. W. Wilson.** 2008. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. *J Virol* **82**:7388-94.
62. **Shiba, C., T. Daikoku, F. Goshima, H. Takakuwa, Y. Yamauchi, O. Koiwai, and Y. Nishiyama.** 2000. The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *J Gen Virol* **81**:2397-405.
63. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
64. **Szilagyi, J. F., and C. Cunningham.** 1991. Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J Gen Virol* **72**:661- 8.
65. **Tang, L., and J. E. Johnson.** 2002. Structural biology of viruses by the combination of electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry* **41**:11517-24.
66. **Trus, B. L., W. W. Newcomb, N. Cheng, G. Cardone, L. Marekov, F. L. Homa, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2007. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell* **26**:479-89.
67. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
68. **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.
69. **Vittone, V., E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2005. Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* **79**:9566-71.
70. **Wagenaar, F., J. M. Pol, B. Peeters, A. L. Gielkens, N. de Wind, and T. G. Kimman.** 1995. The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J Gen Virol* **76**:1851-9.
71. **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.

72. **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.
73. **Wisner, T. W., C. C. Wright, A. Kato, Y. Kawaguchi, F. Mou, J. D. Baines, R. J. Roller, and D. C. Johnson.** 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* **83**:3115-26.
74. **Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-37.
75. **Yamauchi, Y., C. Shiba, F. Goshima, A. Nawa, T. Murata, and Y. Nishiyama.** 2001. Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J Gen Virol* **82**:1423-8.
76. **Yang, T. Y., and R. J. Courtney.** 1995. Influence of the host cell on the association of ICP4 and ICP0 with herpes simplex virus type 1. *Virology* **211**:209-17.
77. **Yao, F., and R. J. Courtney.** 1992. Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **66**:2709-16.
78. **Yao, F., and R. J. Courtney.** 1989. A major transcriptional regulatory protein (ICP4) of herpes simplex virus type 1 is associated with purified virions. *J Virol* **63**:3338-44.
79. **Zhou, Z. H., M. Dougherty, J. Jakana, J. He, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 2000. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* **288**:877-80.

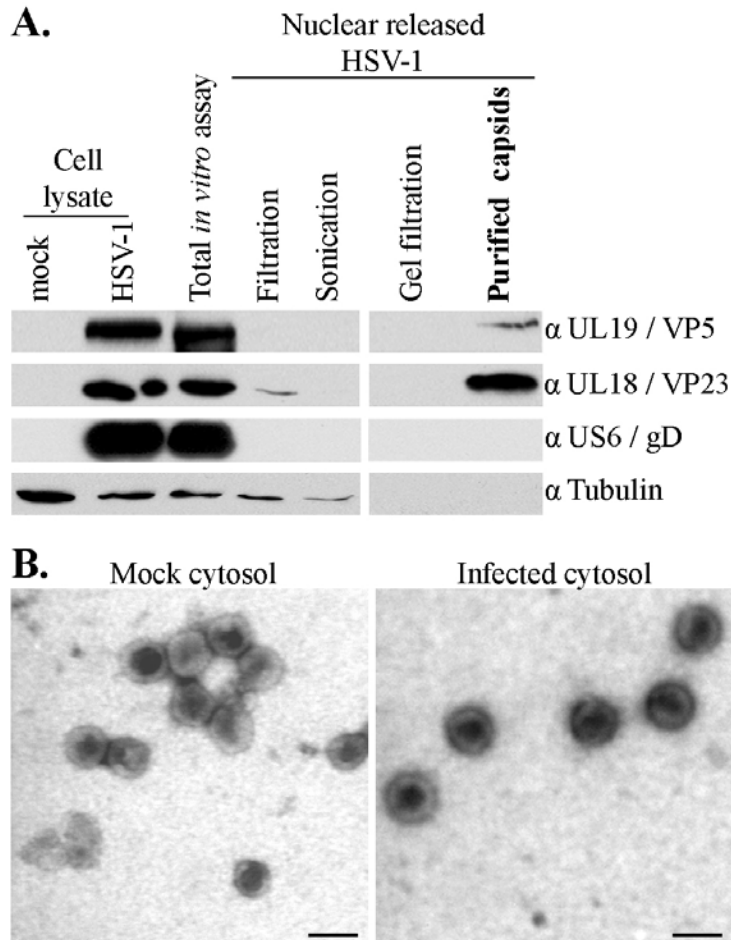
## Figures Article II



**Fig. 1. Purification protocol.** A) Schematic illustration of the *in vitro* assay and expected results. In this scheme, infected nuclei were incubated *in vitro* in the presence of energy, nuclear buffer and one of three conditions (no cytosol, cytosol derived from uninfected cells (mock cytosol) or cytosol prepared from HSV-1 infected cells (infected cytosol)). Note that in the absence of cytosol, only very few capsids should be produced. B) Depiction of the protocol used to purify HSV-1 capsids released in the *in vitro* assay. See Materials and methods section for details.

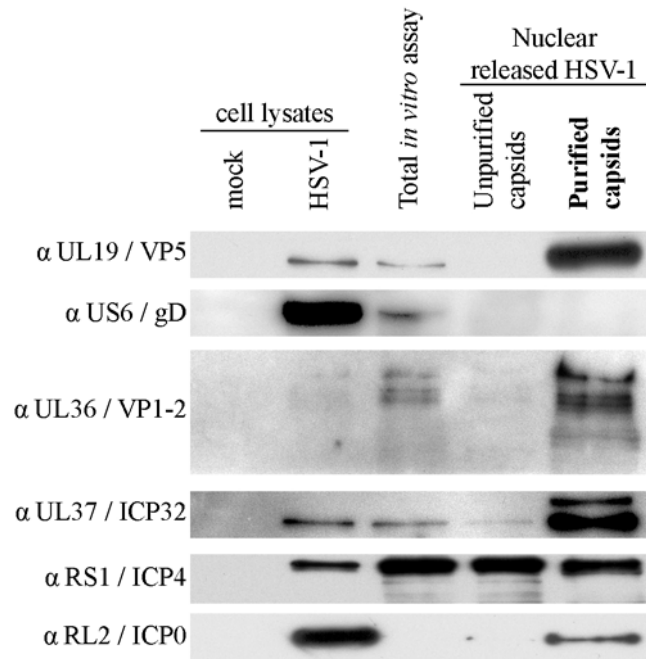


**Fig. 2. Determination of the fractions enriched in capsids following gel filtration.** HSV-1 DNA was radiolabeled with  $^3\text{H}$  thymidine in infected cells and the nuclei isolated as detailed in Materials and methods. After their incubation *in vitro* and preliminary steps of purification, the capsids released were purified by gel filtration and fractions collected. An equivalent volume from each fraction was analyzed for its radioactivity level to detect viral DNA and probed by Western blot against the capsid protein VP23 and against tubulin, a host protein. The box denotes fractions enriched in viral DNA and capsid proteins, which were subsequently pooled and concentrated before proceeding to further analysis.

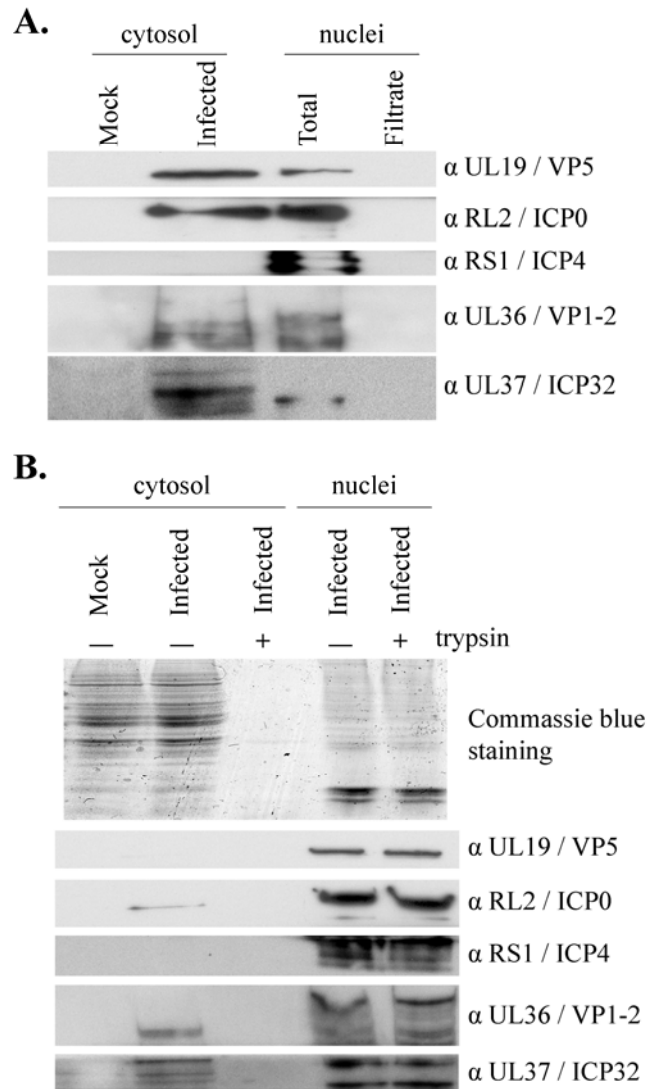


**Fig. 3. Purity of *in vitro* released HSV-1 capsids.** **A)** Two micrograms from each step of the purification method (see Fig. 1B) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting to biochemically assess the purity of the samples. The purified capsids were enriched in capsid proteins (VP5 and VP23) and devoid of gD, a glycoprotein associated with the viral envelope. Tubulin, a cellular component, was also absent from the final enriched material. **B)** Purified capsids were subsequently visualized by negative staining and EM to visually evaluate purity. Note the absence of contaminants. Left panel = capsids released from nuclei incubated in mock cytosol. Right panel = capsids released from nuclei incubated in infected cytosol. Scale bar = 100 nm.



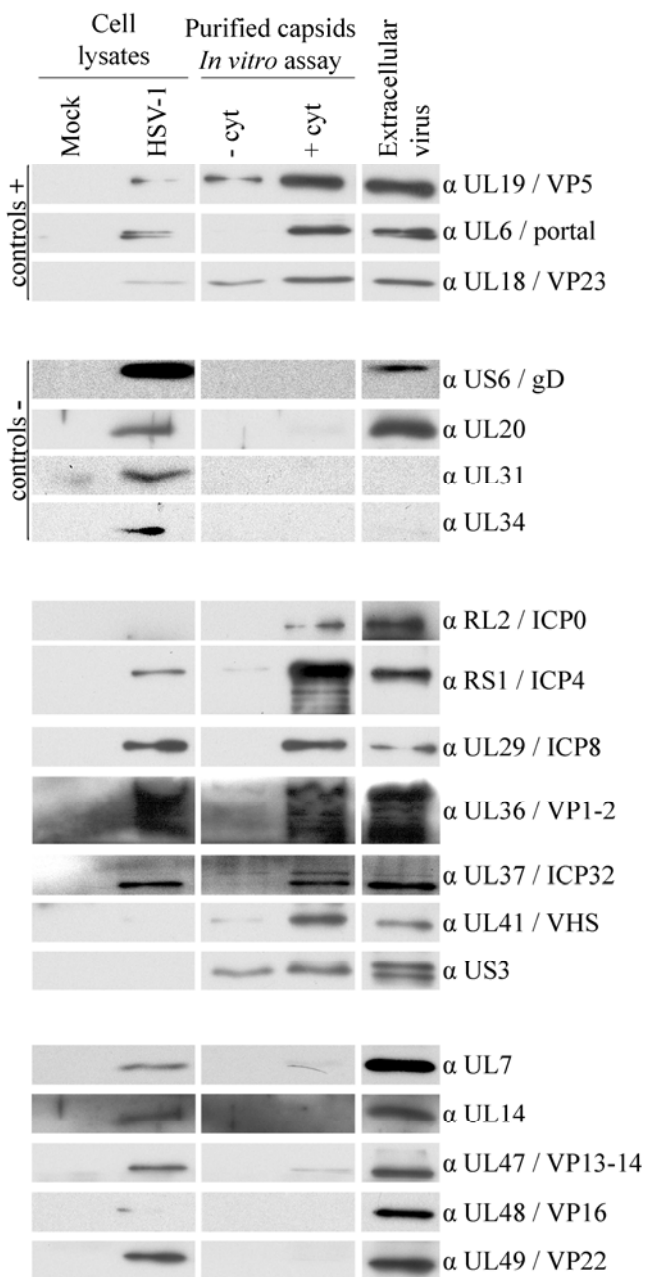


**Fig. 4. Western blot analysis of purified capsids released by infected nuclei incubated with mock cytosol.** HSV-1 17+ wt infected nuclei were incubated for 6 h at 37°C with energy and uninfected cytosol. The capsids were then purified as in Fig. 1. Five micrograms of mock or HSV-1 infected cell lysates (antibody controls) and 10  $\mu$ g of total *in vitro* assay or purified capsids were loaded and analyzed by Western blotting, as indicated to the left of each panel. The results revealed that UL36, UL37, ICP0 and ICP4 were detected on the purified capsids.



*Voir page précédente*

**Fig. 5. Absence of cytosolic tegument in nuclear preparations.** **A)** Five micrograms of nuclei used in the *in vitro* assay were filtered on a 0.45  $\mu\text{m}$  column to gently remove the nuclei. All of the resulting filtrate was resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Controls included 5  $\mu\text{g}$  of untreated nuclei and 20  $\mu\text{g}$  of mock or infected cytosol (antibody controls). No evidence for UL19, ICP0, ICP4, UL36 and UL37 was found for any of these proteins in the nuclear filtrate. **B)** To demonstrate that viral teguments were not attached to the external face of the nuclei, 100  $\mu\text{g}$  of nuclei were digested with sepharose bound trypsin. As control for the enzyme activity, 100  $\mu\text{g}$  of infected cytosol was also digested with the same amount of enzyme. The samples were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining (upper panel) or Western blotting with various antibodies (lower panels).



*Voir page précédente*

**Fig. 6: Western blot analysis of primary teguments.** HSV-1 17+ wt infected nuclei were incubated for 6 h at 37°C with energy with (mock cytosol) or without cytosol (no cytosol) Following their purification as in Fig. 1, the capsids were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Equal volumes of the samples were loaded for capsids produced with or without cytosol. As control, extracellular virions were also loaded (normalized to have the same amount of VP5 as capsids produced in the presence of cytosol) to evaluate the relative quantities of the teguments. As above, mock treated or HSV-1 infected total cell lysates served as antibody controls. Controls +: Viral capsid proteins expected in the purified capsids. Controls -: Viral proteins that should be absent from the purified capsids.

Table 1 : Viral content of HSV-1 capsids identified by mass spectrometry

Protein group		MW (Da)*	Nuclear released HSV-1					
			Infected nuclei + <b>mock</b> cytosol			Infected nuclei + <b>infected</b> cytosol		
			total spectra	unique peptides	% coverage	total spectra	unique peptides	% coverage
<b>Capsid</b>								
UL18	VP23	34270	32	11	44	34	11	48
UL19	VP5	149100	143	40	44	138	41	44
UL26	VP21 / VP24	66470	5	4	11	15	7	17
UL35	VP26	12100	4	2	32	9	3	33
UL38	VP19c	50260	5	5	15	13	11	36
<b>Tegument</b>								
RL2	ICP0	78450	3	3	10	6	6	14
RS1	ICP4	132800	16	12	13	50	24	30
UL12	deoxyribonuclease	54410	-	-	-	3	2	5
UL14		23460	-	-	-	2	2	21
UL29	ICP8	122100	2	2	3	-	-	-
UL37	ICP32	120600	-	-	-	3	3	4
UL39	ICP6		-	-	-	59	29	34
UL42	DNA polymerase	51160	2	2	5	5	4	14
UL51		25470	-	-	-	3	3	22

\* as predicted by uniprot.org

### Article III<sup>a</sup>

**Titre:** Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane.

**Auteurs:** G. Rémillard-Labrosse, C. Mihai, J. Duron, G. Guay et R. Lippé.

**Publié dans:** Traffic, 2009. 10(8): p. 1074-83.

#### Contribution des auteurs

Gaudeline R. Labrosse\* : conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Constantina Mihai \*: initialisation du projet, conception et réalisation des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

Johanne Duron : réalisation des techniques liées à la production de virus et la titration du virus (essais de plaques)

Ginette Guay : réalisation des techniques liées à la microscopie électronique

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

\*premiers auteurs à contribution équivalente dans la réalisation de cet article.

<sup>a</sup> Les articles III et IV seront présentés ensemble puisqu'ils portent sur des résultats communs et que l'article IV est un addenda de l'article III.

## **Article IV**

**Titre:** Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN.

**Auteurs:** G. Rémillard-Labrosse et R. Lippé

**Publié dans:** Addenda article. Communicative & Integrative Biology, september/october 2009. 2 (5).

### **Contribution des auteurs**

Gaudeline R. Labrosse\* : conception ainsi que schématisation du modèle et rédaction de l'article

Roger Lippé : conception ainsi que schématisation du modèle et rédaction de l'article

\*premier auteur



## **Mise en contexte (articles III et IV)**

L'article I a démontré une sortie nucléaire de HSV-1 qui répond au modèle de transport de dé-enveloppement/ré-enveloppement. Ce qui implique que le virus sort du noyau et voyage dans la cellule par une voie de transport non conventionnelle n'impliquant pas la voie classique de biosynthèse ni l'exportation via les pores nucléaires. Le virus arrive donc au site d'enveloppement secondaire, le TGN, par une voie de transport non conventionnelle. Dans le but de déterminer le mode de transport, classique ou non, utilisé par le virus pour quitter le site de ré-enveloppement, le transport du virus entre le TGN et la membrane plasmique a aussi été étudié. Ce projet a été réalisé en collaboration avec Constantina Mihai, une étudiante à la maîtrise dans le laboratoire.

La protéine kinase D (PKD aussi appelée PKC $\mu$ ) est un pilier central du transport post-TGN des petits cargos via son implication dans la formation de vésicules dérivées de la membrane du TGN [383-386]. La prémisse des articles III et IV présentés dans cette thèse était basée sur la comparaison entre le mécanisme classique connu de transport des petits cargos, par exemple les protéines sécrétées, qui voyagent entre le TGN et la membrane plasmique via un mécanisme impliquant la protéine cellulaire PKD et le transport post-TGN de cargos plus gros, tels que le virus HSV-1, dont très peu de détails sont connus. En plus d'évaluer si le virus HSV-1 utilise une voie de transport conventionnelle impliquant PKD pour quitter le TGN en opposition avec son mode de transport non-conventionnel pour y arriver, ces recherches avaient pour but de déterminer si la protéine cellulaire PKD est aussi impliquée dans le transport de gros cargos vers la surface cellulaire.

La présentation du projet dans l'article III paru dans la revue « Traffic » a attiré l'attention de l'éditeur en chef du nouveau journal « Integrative and communicative biology » qui s'est dit intéressé à publier un addenda à cet article. L'addenda publié (article IV) a permis d'approfondir nos résultats et de dépeindre le TGN comme étant non seulement une station de tri et de ciblage des protéines de sécrétion, mais également comme étant un point de rencontre entre de nombreuses voies conventionnelles et non conventionnelles de transport intracellulaire.

## Article III

### Introduction

The biosynthetic pathway is the route that transmembrane and secreted proteins typically employ. Following their synthesis in the ER, these proteins are packaged in COPII vesicles, travel through the Golgi apparatus and eventually reach the TGN (1). The TGN then plays a central sorting role by retaining proteins there or dispatching them to different intracellular compartments, the cell surface or the extracellular milieu. GPI anchored proteins are an exception to this general rule as they bypass the Golgi/TGN and directly travel from the ER to the plasma membrane (2, 3). Other notable exceptions are large particles reaching several hundred nanometers, such as procollagen, chylomicrons and virions (4, 5). Hence, both procollagen and chylomicrons circumvent the classical COPII coated vesicles to reach the Golgi (6-8). Similarly, the large 125 nm HSV-1 capsids, which are assembled in the nucleus, first bud across the inner nuclear membrane and then fuse with the outer nuclear envelope to be released unenveloped in the cytoplasm (5-9). These capsids directly reach the TGN, where they acquire an envelope to form mature 200-300 nm virions (10, 11). Interestingly, procollagen, chylomicrons and HSV-1 virions all transit through the TGN during their egress. However, these large entities leave this compartment by a completely unknown mechanism.

The trafficking of small cargos from the TGN to the cell surface has been elucidated in relative details. Though the serine-threonine protein kinase D (PKD) is found at multiple subcellular locations, including the cytosol, nucleus, mitochondria, plasma membrane and TGN (12), it is a key player in this latter compartment. There, PKD is recruited from the cytosol and requires an interaction with diacyl glycerol (DAG), a lipid critical to PKD function at the TGN (13). Mechanistically, PKD mediates the fission of carriers filled with small cargos such as individual proteins and oligomers that are leaving the TGN (14, 15). In humans, three different isoforms (PKD1, 2 and 3) differentially regulate the transport of proteins destined for the basolateral plasma membrane (14-17). Similarly, PKD specifically modulates basolateral cargos in polarized cells (17-19).

In spite of the well conserved biosynthetic pathway across species, alternative ways to leave the TGN have been documented (20). In this context, it was unclear whether the large particles described above use the PKD mediated cellular machinery or a novel route to escape the TGN. This is not trivial as most viruses, including HSV-1, typically shut down host protein synthesis (21) and may well perturb intracellular transport. Thus given the unusual transport pathways employed by large cargo to reach the TGN, we sought to examine if they use the conventional transport machinery further downstream. Using HSV-1 as a model, the egress of the virus from the TGN to the plasma membrane was monitored using a synchronized infection protocol (11). The data surprisingly revealed the contribution of PKD in HSV-1 virion egress out of the TGN, hence highlighting the dependence of HSV-1 on the conventional cellular transport machinery downstream of the TGN, in sharp contrast to its preceding steps of transport. Given the massive size of HSV-1 virions, this substantially broadens the range of cargo this classical transport machinery can accommodate. In view of the apical release of HSV-1 in neurons, it also raises the possibility that PKD may not uniquely be devoted to basolateral sorting. Finally, the data defines the molecular basis of egress of one of the several viruses transiting in the TGN, which includes Herpes-, Rota-, Corona-, Bunya-, Flavi- and Poxviruses (22, 23).

## Results

**Block of viral egress by DAG inhibitors.** To specifically study HSV-1 egress from the TGN to the plasma membrane, we relied on a previously established protocol to accumulate the virus at the TGN using a 20°C thermal block before releasing it for its final transport step (11). In this protocol, viral egress is synchronized using a mutant of the viral protease U<sub>L</sub>26, a protein required for DNA encapsidation and capsid maturation (11, 24). Thermosensitive U<sub>L</sub>26 viral mutants such as V701 (25) accumulate immature viral capsids in the nucleus at the non permissive temperature of 39.5°C, are reversibly arrested at the TGN at 20°C and release mature extracellular virus at 31°C (11, 24). Since reagents such as fumonisin B1 (FB-1), L-cycloserine (L-CS) and propranolol all prevent DAG synthesis and hence PKD recruitment to the TGN (13, 26), they represented an obvious opportunity to

probe the implication of PKD in HSV-1 egress. For these experiments, 143B cells were chosen for their relative ability to resist virally induced Golgi and TGN disruption (11, 27). When tested in these cells, FB-1, L-CS and propranolol all strongly perturbed PKD mediated transport of the VSV G tsO45 biosynthetic marker to the cell surface (inhibition of 72%, 70% and 67% for FB-1, L-CS and propranolol respectively; data not shown). This indicated the pharmacological reagents worked as anticipated and were effective in the 143B cell line.

To address the role of PKD in HSV-1 egress, the impact of DAG synthesis inhibitors on extracellular viral release was first quantified by plaque assay. V701 infected 143B cells were thus synchronized with a 7 hour pre-incubation at 39.5°C, followed with a chase in the presence of cycloheximide for a tight wave of viral egress. Control infections typically yielded  $1-2 \times 10^5$  total plaque forming units (pfu) when chased for 30 hours at 31°C (fig. 1A). In contrast, the extracellular viral yield was reduced by 99% when chased at 20°C, consistent with previous results (11). This 20°C block was reversible and rescued to 60-65% of normal levels when followed by a chase of 24 hours at 31°C. When FB-1, L-CS or propranolol was added during the 20°C block and the subsequent 24 hour chase at 31°C, hardly any virus escaped the cells (5.7% for FB-1, 8.0% for L-CS and 8.2% for propranolol). Importantly, the drugs did not have any cytotoxic effect under the conditions used (95% cell survival, normal morphology and proliferation). Moreover, they did not alter intracellular HSV-1 viral yields, indicating replication and assembly was normal (data not shown). Collectively, the inhibition of HSV-1 egress by three independent inhibitors of DAG synthesis pointed at a role for DAG and hinted for the implication of PKD during HSV-1 egress.

**DAG inhibitors act downstream of nuclear egress.** Given the presence of PKD in multiple subcellular compartments (12), FB-1, L-CS and propranolol could consequently block viral transport at any stage during egress. Viral exit was therefore evaluated using a recently established *in vitro* nuclear egress assay based on the release of HSV-1 capsids from isolated infected nuclei in the presence of cytosol and energy (9). In this assay, the

viral genome is preloaded with  $^3\text{H}$  thymidine during the initial infection and HSV-1 egress of fully assembled capsids is quantified by scintillation counting. Figure 1B shows that the basal level of nuclear egress (normalized to 100%) was not altered by any of the inhibitors, indicating that the block of viral egress occurred further downstream.

**DAG inhibitors trap HSV-1 in the TGN and are rescued by DAG analog.** Given the reduced HSV-1 yield in the extracellular medium and its normal transport across the two nuclear membranes in the presence of the DAG synthesis inhibitors (fig. 1), V701 infected 143B cells treated with the drugs were examined by immunofluorescence to determine where the virus might be trapped. Not surprisingly, HSV-1 strongly associated with the TGN at 20°C (fig. 2). As expected, this block was fully reversible when followed by a chase at 31°C. Interestingly, the virus remained TGN associated in the presence of FB-1, L-CS or propranolol during the 31°C chase. To insure these phenotypes were truly attributable to DAG and not some side effects, viral egress was monitored in the presence of exogenous DOG (1,2-dioctanoyl-sn-glycerol), a cell permeable DAG analog (13; 28-30). The results showed that all three drugs were completely rescued by DOG (fig. 2G-I). Quantification of the data revealed a dose dependent effect, with viral egress restored from basal levels (20°C or with drugs) up to 92-99% of the untreated control, confirming the drugs mediated their effect through DAG. Thus, HSV-1 seemingly left the TGN by a PKD regulated host transport route.

**Kinase dead PKD hampers HSV-1 egress.** The inhibition of HSV-1 egress by inhibitors of DAG synthesis argued in favour of PKD involvement in the transport of the virus. Given the multiple roles of DAG, it was necessary to examine this more specifically. One particularly useful tool is the PKD K618N point mutant, which is an inactive PKD1 isoform that causes cargo retention in the TGN and induces long TGN46 positive tubules at the TGN, particularly at low temperatures (14, 15). This mutant is dominant over other isoforms and inhibits cargo transport in HeLa cells, which express both PKD2 and PKD3 but not PKD1 (14, 15, 31). The impact of this kinase dead PKD1 mutant on the extracellular release of the virus was thus quantified by plaque assay. Since it is not possible to accurately monitor viral release when a mix of transfected and untransfected

cells co-exists, we resorted to a stable HeLa cell line that constitutively expresses PKD K618N (HeLa GF17) (14). Consequently, both HeLa and HeLa GF17 cells were infected with V701 and incubated 6 hours at 39. 5°C. The virus was subsequently chased to the TGN for 2 hours at 20°C and released for 2 hours at 31°C. As a control, a 4 hour chase at 31°C was performed, which showed the virus had sufficient time to reach the extracellular medium and was produced in equal amounts in both cell lines (fig. 3A), indicating the mutant kinase did not alter overall viral production. The data also reiterated the efficiency of the 20°C block to hamper viral egress, which was fully restored in HeLa cells when subsequently incubated at 31°C. In contrast, only some viruses managed to reach the extracellular milieu of HeLa GF17 cells when shifted back to the permissive temperature after a 20°C block, compared to control HeLa cells (average reduction of 60. 6% ± 2. 7). These results indicated the kinase dead PKD1 mutant significantly slowed down the release of HSV-1 virions from the TGN.

To confirm the above findings and determine where the mutant PKD might interfere with viral egress, PKD transfected cells were examined by immunofluorescence. 143B cells were transfected for 48 hours with either GST tagged wild type (wt) or kinase dead PKD, subsequently infected with HSV-1 and incubated 7 hours at 39. 5°C to synchronize the infection. They were then chased at either the restrictive 20°C temperature (i. e. as a control for TGN retention) or at the permissive temperature of 31°C. The samples were fixed and stained for the TGN with the TGN46 antibody or for PKD using a GST polyclonal antibody. To specifically detect fully assembled mature capsids, the conformation dependent 8F5 antibody, directed against the assembled major capsid protein VP5, was used (32). As anticipated, viral capsids were predominantly detected at the TGN at 20°C in most infected cells (fig. 3B, panels a-d, i-l), reaffirming the many reports pointing to the passage of the virus at the TGN (5, 10, 11, 33). Interestingly, long TGN46 positive tubules were occasionally visible at 20°C in wt PKD transfected cells. Image quantification indicated tubules were present in 20% of all wt PKD transfected/infected cells (n=168), most of which contained co-localizing viruses (70% of tubule positive cells). When incubated at 31°C, the bulk of the virus reached the periphery of wt PKD transfected cells

(fig. 3B, panels e-h). At this permissive temperature, only 7% (n=236) of all wt PKD1 transfected/HSV infected cells still exhibited long tubules, confirming the tendency of the PKD induced tubules to resorb at temperatures above 25°C (14). However, despite the relatively rare tubules remaining at 31°C, viral capsids were detected in all tubule positive cells, hinting the virus travelled within wt PKD positive tubules.

When examining the impact of the kinase dead PKD1 (fig. 3B panels i-p), the frequency of the tubules increased significantly (34%; n=281) over that seen with the wt PKD at 20°C. Moreover, they persisted at 31°C (47%; n=240). At 31°C, the number of cells with viral capsids co-localizing with tubules increased from 7% (wt PKD) to 28% (mutant PKD), i. e. a 4 fold increase. Thus, the virus could clearly be found in PKD positive tubules whenever present. This strongly suggested PKD modulates viral egress at the TGN.

**PKD specific siRNA inhibit viral egress.** To independently confirm the role of PKD in HSV-1 egress, a RNA interference approach was used. To the end, PKD expression in 143B cells was first examined at both the mRNA and protein levels to evaluate which PKD isoform is expressed. To distinguish the three isoforms, we used commercial antibodies that readily detected exogenous PKD in 143B cells transfected with GST-PKD1, 2 or 3 constructs as positive controls (fig. 4A panels a-c). Interestingly, only endogenous PKD3 was detected in 143B cells, with no detectable levels of PKD1 or PKD2 by either immunofluorescence or Western blotting. As published elsewhere (12), PKD3 was expressed throughout the cells, including the TGN, nucleus/nucleolus, cell surface and cytosol (fig. 4A panel f). Furthermore, RT-PCR analyses with either total RNA or mRNA extracts confirmed the sole presence of PKD3 and the absence of PKD1 and 2 (data not shown). Thus, 143B cells exclusively express PKD3.

The unique expression of PKD3 in 143B cells greatly simplified the next experiments, as no functional redundancy between the PKD isoforms was possible. siRNA targeting PKD3 were thus tested for their ability to block PKD3 expression. Control experiments revealed the strong penetrance of siRNA duplexes in 143B cells (85.7% of

cells positive for the fluorescent siGLO siRNA). PKD1, PKD2 and PKD3 siRNA duplexes were likewise highly proficient at down regulating their respective isoform (fig. 4B). Moreover, PKD3 siRNA efficiently inhibited endogenous PKD3 protein expression as early as 24 hours post transfection, while siRNA against PKD1, PKD2 or the commercial "On-Target" negative control had no major impact on PKD3 expression (fig. 4C). Note that down regulation of PKD3 by RNA interference did not result in compensatory PKD1 or PKD2 expression, which remained undetectable by Western blot and RT-PCR (data not shown). It was thus possible to efficiently and specifically prevent PKD3 expression in 143B cells with siRNA.

To evaluate if PKD3 inhibition affects HSV-1 transport from the TGN to the cell surface, 143B cells were transfected for 24 hours with various siRNA and subsequently infected with V701 for 7 hours at 39.5°C. The virus was then chased at 31°C for 9 hours and viral egress monitored by immunofluorescence using the mature capsid specific 8F5 antibody. Staining of endogenous PKD3 with isoform specific antibodies confirmed its down regulation (data not shown). Under these conditions, the virus readily reached the cell surface in the absence of siRNA, in presence of control On-Target siRNA or when exposed to PKD1 or PKD2 siRNA (fig. 5). In contrast, PKD3 specific RNAi strongly perturbed HSV-1 egress to the cell surface (fig. 5 panel f), typically trapping the bulk of the virus in a juxtannuclear compartment that significantly overlapped with the TGN. Quantitative analysis of the results indicated the number of cells with capsids at the TGN was 18%  $\pm$  10 at 37°C without siRNA (n=682), 42%  $\pm$  13 at 20°C (n=450) and 39%  $\pm$  7 at 37°C in the presence of PKD3 siRNA (n=928). Perturbation of viral egress at either 20°C or with PKD3 specific siRNA was statistically different from control infected cells grown at 37°C (p=0.005 and p=0.002 respectively). In contrast, there were no statistical difference between the 20°C block known to accumulate the virus at the TGN (11) and PKD3 RNAi (p=0.291). These results were in full agreement with our previous observations and confirmed the implication of PKD in viral egress.

To probe the nature of the RNAi block in greater detail, the samples were processed for EM. In uninfected 143B cells, the Golgi/TGN displayed a typical morphology with



multiple stacks and an intricate system of tubules, cisternae and vesicles/vacuoles adjacent to the trans Golgi (fig. 6 panel a). Upon infection for 12 hours at 37°C, many viruses could be seen at the cell surface and throughout the cell (fig. 6 panel b). By contrast, few virions reached the surface when blocked at 20°C as previously documented (fig. 6 panel c) (11). Similarly, PKD3 specific RNAi also reduced surface levels of the virus (fig. 6 panel d). While closer examination at the TGN revealed several capsids in the process of envelopment at 20°C (fig. 6 panel e), enveloped capsids were rather trapped inside the TGN associated vesicles/vacuoles in the presence of PKD3 siRNA (fig. 6 panel f). EM measurements confirmed the latter capsids were indeed enveloped ( $187.6 \pm 50.3$  nm), compared to control naked nuclear capsids ( $99.3 \pm 10.6$  nm) or perinuclear/extracellular enveloped virions ( $167.9 \pm 27.9$  nm). Given the strong propensity of the virus to disrupt the TGN, even in the relatively resistant 143B cells (11), viral egress was quantified by immunofluorescence on coverslips present in the exact same dishes as for the EM experiments. By this technique, the TGN is much easier to unambiguously identify and allows much higher and significant counts that would otherwise be technically very challenging by EM. This analysis revealed that only in 24.3% of the cells (n=682) did viruses escaping the nuclei co-localized with the TGN after a 12 hour chase at 37°C. In contrast, capsids were confined to the TGN in twice as many cells in the presence of RNAi against PKD3 (45.3%; n=928). This is similar to control cells incubated at 20°C for the same length of time (58.3%; n=450). These results once again corroborated all previous data and indicated the virus transited through the TGN and accumulated to a greater extent in that compartment when PKD activity was perturbed.

## Discussion

PKD plays a key role in the transport of small cargo from the TGN to the cell surface (14, 15). Given that HSV-1 capsids transit through the TGN during their egress (5, 10, 11, 33), it was of interest to examine if PKD is involved in their transport. Using a synchronized infection protocol that reversibly accumulates the virus at the TGN (11), the results show it is indeed the case. This was demonstrated with three independent inhibitors of DAG synthesis, none of which had an impact on viral intracellular viral yields but which all strongly prevented HSV-1 egress (fig. 1-2). This block was rescued by an exogenous

DAG analog and was not due to the cytotoxicity of the drugs. In addition, the block occurred downstream of the nucleus, since it had no impact on the release of capsids from the nucleus to the cytoplasm (fig. 1B), and trapped nearly all virions at the TGN (fig. 2). While these drugs were only suggestive of PKD involvement, the PKD K618N mutant also strongly reduced viral yields and accumulated the virus at the TGN (fig. 3). Finally, siRNA against PKD3 (fig. 4) significantly down regulated HSV-1 egress and once again captured the virus at the TGN (fig. 5-6), ruling out that the over expression of PKD K618N prevented viral egress by simply mopping up all DAG from the cell. Since the infection protocol focused on the TGN to cell surface transport of the virus, the data clearly show a direct role for PKD in this step. The residual viral egress observed upon RNAi treatment and/or the use of mutant PKD is consistent with that seen for VSV G above 25°C (14) and probably reflects the participation of a parallel or compensatory mechanism to escape the TGN. Thus other factors likely regulate HSV-1 egress at the TGN in addition to PKD. Similarly, the impact of the PKD1 kinase dead mutant on HSV-1 egress in 143B cells, which only express PKD3, hints at a partial complementarity among the different PKD isoforms (34-35). Furthermore, the implication of PKD in HSV-1 egress is significant since detected in two independent cell types. Altogether, the results show very compelling evidence that PKD participates in HSV-1 egress from the TGN to the cell surface.

PKD has been associated with the fission of tubules at the TGN (15). The presence of HSV-1 virions in such PKD K618N induced tubules is consistent with this role (fig. 3B). In addition, numerous enveloped virions were found in TGN associated vesicles/vacuoles by EM in RNAi treated cells, indicating they could enter that compartment but not exit it. Oddly, the previously reported long tubules upon PKD depletion (15) were not observed by EM (fig. 6). It is unclear whether this discrepancy is due to the overwhelming size of the virus compared to the typical host cargo and/or the rare PKD induced tubules at higher temperatures. Nonetheless, the retention of the virus at the TGN is consistent with the known function of PKD in cargo release. Interestingly, the accumulation of naked capsids in the process of re-envelopment at 20°C but the presence of enveloped virions upon PKD3 RNAi treatment (fig. 6) suggests a distinct step may be affected.

The present data cannot formally exclude the presence of HSV-1 in endosomes in addition to the TGN. As previously reported, a subpopulation of the virus does localize with endosomal markers but this remains marginal compared to the TGN (10, 11). Moreover, late in infection, endosomal and TGN markers tend to partially overlap due to the reorganization of the cell by the virus (Turcotte and Lippé, unpublished observations). Hence, both present and past data clearly favour the envelopment of viral capsids at the TGN ((11) and fig. 5, 6). This leaves open the mechanism by which viral entry into the TGN takes place. This process is somewhat reminiscent of multivesicular body formation, which is regulated by the ESCRT machinery (36). Interestingly, vps4, a component of the ESCRT apparatus (37, 38), has been reported to be essential for HSV-1 final envelopment (39, 40), but not for the related human cytomegalovirus (41). However, HSV-1 unlikely enters multivesicular bodies, as neither we nor others have so far seen any HSV particles in this very characteristic compartment. Instead, the virus may redirect ESCRT components elsewhere in the cell as is the case for HIV (42-46). It would thus be interesting to examine if the ESCRT complexes play a role in viral entry into the TGN.

It is clear from the present data that PKD not only promotes the transport of individual proteins but also of large structures as massive as HSV-1 virions. These are 200-300 nm wide enveloped complexes composed of over three thousands individual proteins for a total mass in the 100 million Dalton range (47). It would now be of interest to determine whether PKD also regulates the transport of other large cargo such as procollagen, chylomicrons and additional viruses. This is likely the case as procollagen accumulates in PKD and VSV G positive tubular carriers (48) while chylomicrons transit in the Golgi before being secreted (49). However, a functional requirement for PKD has yet to be confirmed for these molecules. Conceptually, the incorporation of large cargos in PKD derived transport carriers may be possible owing to the heterogeneity and large size of the tubules (50), in contrast with the small uniform 60-70 nm COPII vesicles found earlier in the biosynthetic pathway (4, 51). This highlights the TGN as a meeting point where conventional and unconventional pathways can meet. A more dynamic view of HSV-1

transport from the TGN is needed to determine if it travels within the same transport carriers as other cargos or if the virus monopolizes this machinery to travel in solo.

Cargo incorporated in clathrin coated vesicles at the TGN are typically destined for endosomes (52), while COPI coated vesicles deliver their content back to the Golgi stacks and ER (53). In contrast, PKD regulates protein transport to the basolateral surface (17-19), in apparent contradiction with the release of HSV-1 along the axonal, i. e. apical, membrane of neurons (54). Unless this polarity is not preserved in all neurons, our results suggest PKD may mediate apical membrane targeting of some cargo. Key questions are whether PKD also regulates axonal transport of HSV-1 or whether it only modulates basolateral transport in these cells. It may also be that some of the three known PKD isoforms (17, 34) specifically regulate apical transport of certain cargos.

## Materials and Methods

**Cells and viruses.** HeLa, HeLa GF17 constitutively expressing PKD1 K618N (kindly provided by Vivek Malhotra), BHK, 143B TK<sup>-</sup>, and Vero cells were grown in DMEM, 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and, for HeLa GF17, 500 µg/ml G418. The HSV-1 V701 *ts80-1C2* mutant, provided by Bruce Register and Jules A. Shafer and wt HSV-1 17<sup>+</sup>, obtained from Beate Sodeik, were propagated on BHK cells and titrated on Vero cells.

**Infections.** 143B cells were mock treated or infected with HSV-1 V701 at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 7 hours at 39.5°C to arrest the virus in the nucleus (11, 24), then at 20°C for 6 hours in the presence of 20 µg/ml cycloheximide to accumulate the virus at the TGN (11) and finally at 31°C for 6 hours to examine TGN to plasma membrane transport. When indicated the 31°C chase was performed in the presence of 25 µg/ml FB-1 (Sigma Aldrich), 1.5 mM L-CS (Sigma Aldrich), 50 µM propranolol (Calbiochem) and/or 3, 6, or 12 µM of s-glycerol 1,2-dioctanoate (DOG; Sigma Aldrich – also called 1,2-Dicapryloyl-sn-glycerol, D- $\alpha,\beta$ -Dicaprylin or diC8). The samples were treated for immunofluorescence or analyzed by plaque assays.

**Inhibition of VSV G transport.** 143B cells grown on glass coverslips were transfected with GFP VSV G ts045 (obtained from Patrick Keller) using Lipofectamine 2000. Following an initial incubation of 4 hours in transfection medium, the cells were incubated for 20 hours at 39.5°C, then switched to 20°C for 2 hours in CO<sub>2</sub>-independent medium and 20 µg/ml cycloheximide to allow the egress of VSV G ts045 to the TGN (11). VSV G was then chased for 6 hours to the cell surface at 31°C in the presence or absence of 25 µg/ml FB-1, 1.5 mM L-CS or 50 µM propranolol. Cells were then fixed, permeabilized and analyzed by immunofluorescence. To quantify VSV G transport, cells positive for VSV G at the plasma membrane were manually counted and compared to all transfected cells irrespective of VSV G localization (n varied between 118 and 260 cells).

**Transfection with GST-tagged PKD constructs.** 143B cells were transfected for 24 hours with pME-Py-GST vectors coding for wt PKD1, 2 or 3 or with the K618N PKD1 mutant (generously provided by Vivek Malhotra) using Lipofectamine 2000. They were then mock treated or infected with V701 as above and incubated an additional 7 hours at 39.5°C to accumulate the virus in the nucleus. The cells were fixed and permeabilized immediately or after an additional incubation of 8 hours at 31°C or 6 hours at 20°C. The samples were finally examined by immunofluorescence as detailed below.

**Immunofluorescence.** Samples were fixed in 3% paraformaldehyde for 30 min at 4°C, washed with PBS, neutralized with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS and permeabilized with 0.1% TritonX-100. They were probed with antibodies against TGN46 (Serotec), ICP5 (total VP5, i. e. mature and immature capsids; Virusys), 8F5 (reacts specifically with mature capsids ((32); kindly provided by Jay Brown), GST (Amersham) and/or PKD1 (Santa Cruz), PKD2 (Upstate Cell Signalling) and PKD3 (Bethyl Laboratories). Alexa 350, 488, or 568 secondary antibodies were used as appropriate (Molecular Probes). Finally, 0.1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma) was used to stain nuclei. Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide-field fluorescence microscope (Zeiss) equipped with filters and a Retiga 1300 Camera (Q Imaging). The images were acquired with Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging), then processed and assembled with Photoshop 6.0 (Adobe). To quantify the co-localization of the virus within PKD induced tubules (fig. 3B), multiple random photos were acquired and cells manually counted. The data express the number of infected/transfected cells that have tubules and the proportion of these cells

that have viruses within tubules (n=123 to 429 cells per condition). To quantify viral egress (fig. 5), the proportion of infected cells with viruses that reached the TGN but not the cell periphery or plasma membrane was manually scored (n=450 to 928 cells).

**Nuclear egress assay.** The impact of DAG synthesis inhibitors on HSV-1 egress was measured with a recently developed nuclear egress assay (9). Succinctly, HeLa cells were infected with wt HSV-1 at 37°C for 8 hours at a MOI of 3 and radiolabelled with 25 µCi/ml of <sup>3</sup>H thymidine (PerkinElmer). Cells were then harvested and the nuclei isolated. These HSV-1 containing nuclei were incubated 6 hours at 37°C in duplicates with cytosol, an energy-regenerating system and nuclear buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol). When indicated, 25 µg/ml of FB-1, 1.5 mM L-CS or 50 µM propranolol were added to the assay. Capsid release was quantified by liquid scintillation on an LKB Beta rack 1211 counter.

**Extracellular release of HSV-1.** Cells were infected with V701 at a MOI of 5 and incubated at 39.5°C for 6-7 hours, then incubated 0 to 6 hours at 20°C and chased at 31°C up to 30 hours (see figure legends). The extracellular virus was collected, concentrated at 39,000g, resuspended in MNT (30 mM morpholine ethanesulfonic acid, 100 mM NaCl and 20 mM Tris pH 7.4) and titrated on Vero cells by plaque assays.

**Reverse transcriptase PCR.** RNA was extracted from 143B cells with a PolyATtract System 1000 or SV Total RNA kit (Promega) as per manufacturer's instructions. Reverse transcription and PCR amplification was performed with isoform specific PKD primers and an AccessQuick RT-PCR kit as per manufacturer's instructions (Promega).

**siRNA transfection.** 143B cells were transfected for 24 hours with 20 nM siGLO Green transfection indicator or 100 nM PKD1, PKD2, PKD3 or "On-Target" negative control siRNA (Dharmacon) using Lipofectamine. For Western blot analyses, cells were either harvested immediately, mock infected or infected with HSV-1 V701 at a MOI of 5 for 7h at 39.5°C followed by a chase of 9h at 31°C. When indicated, the cells were harvested 24h, 48h and 72h post-transfection. For EM, samples were treated as detailed below.

**Western Blotting.** 143B cells mock treated or transfected with pME-Py-GST PKD1, 2 or 3 were harvested at 24 hours, washed in PBS, counted and analysed by Western blotting using the above PKD1, PKD2 and PKD3 specific antibodies. An anti gamma actin antibody was used as loading control (Chemicon).

**Electron microscopy.** PKD3 siRNA transfected and untransfected 143B were infected with wt HSV-1 17<sup>+</sup> at a MOI of 10 and incubated for either 12 hours at 37°C or for 6 hours at 37° followed by additional 6 hours at 20°C. Cells were fixed with 2. 5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0. 1 M pH 7. 2-7. 4) for 1 hour at room temperature and post-fixed 1 hour in 1% osmium tetroxide/0. 1M sodium cacodylate. They were then contrasted for 1 hour at 4°C with 2% aqueous uranyl-acetate, gradually dehydrated in alcohol, embedded in Epon 812 and ultra-thin sectioned with a ultracut's Reichert ultramicrotome. Seventy five nanometer sections were analyzed with a Phillips 300 transmission electron microscope. In each condition, coverslips were added to the same dishes and used to quantify viral egress by immunofluorescence. Capsid localization was analyzed from fifteen random 100X fields from 3 independent experiments.

### **Acknowledgments**

We wish to thank Joël Lanoix, Vivek Malhotra and Carine Bossard for excellent suggestions and critical reading of this manuscript. We are also indebted to Bruce Register, Jules Shafer, Beate Sodeik, Patrick Keller, Vivek Malhotra and Jay Brown for generously providing reagents. This work was funded by the Canadian Institutes for Health Research and an equipment grant from the Canadian Foundation for Innovation. RL was the recipient of a CIHR scholarship.

### **References**

1. Rodriguez-Boulan E, Musch A. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* 2005;1744(3):455-464.

2. Muniz M, Riezman H. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *Embo J* 2000;19(1):10-15.
3. Muniz M, Morsomme P, Riezman H. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 2001;104(2):313-320.
4. Fromme JC, Schekman R. COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Curr Opin Cell Biol* 2005;17(4):345-352.
5. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 2004;106(2):167-180.
6. Stephens DJ, Pepperkok R. Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 6):1149-1160.
7. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 2):415-427.
8. Starkuviene V, Pepperkok R. Differential Requirements for ts-O45-G and Procollagen Biosynthetic Transport. *Traffic* 2007;8(8):1035-1051.
9. Remillard-Labrosse G, Guay G, Lippe R. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress *in vitro*. *J Virol* 2006;80(19):9741-9753.
10. Harley CA, Dasgupta A, Wilson DW. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J Virol* 2001;75(3):1236-1251.
11. Turcotte S, Letellier J, Lippe R. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 2005;79(14):8847-8860.



12. Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* 2005;280(14):13205-13208.
13. Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 2002;295(5553):325-328.
14. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 2001;104(3):409-420.
15. Bossard C, Bresson D, Polishchuk RS, Malhotra V. Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol* 2007;179(6):1123-1131.
16. Sanchez-Ruiloba L, Cabrera-Poch N, Rodriguez-Martinez M, Lopez-Menendez C, Jean-Mairet RM, Higuero AM, Iglesias T. Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J Biol Chem* 2006;281(27):18888-18900.
17. Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V. Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 2004;6(2):106-112.
18. Bisbal M, Conde C, Donoso M, Bollati F, Sesma J, Quiroga S, Diaz Anel A, Malhotra V, Marzolo MP, Caceres A. Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *J Neurosci* 2008;28(37):9297-9308.
19. Yin DM, Huang YH, Zhu YB, Wang Y. Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci* 2008;28(35):8832-8843.
20. Kinseth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF, Malhotra V. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell* 2007;130(3):524-534.

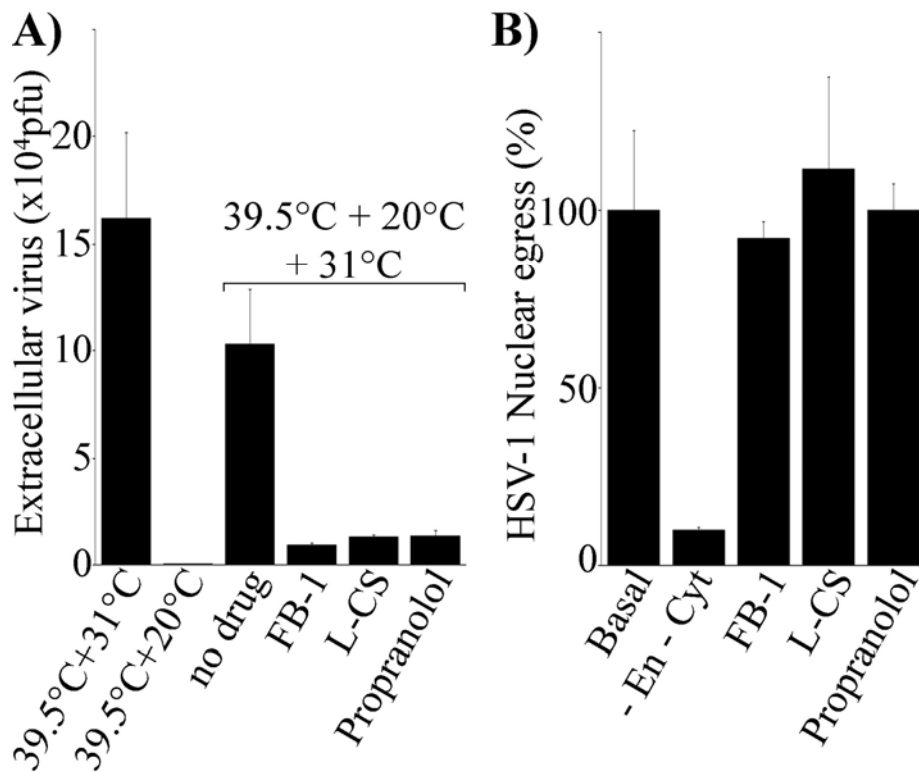
21. Matis J, Kudelova M. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virol* 2001;45(5-6):269-277.
22. Griffiths G, Rottier P. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* 1992;3(5):367-381.
23. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 2008;319(5871):1834-1837.
24. Church GA, Wilson DW. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol* 1997;71(5):3603-3612.
25. Register RB, Shafer JA. A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1. *J Virol Methods* 1996;57(2):181-193.
26. van Ooij C, Kalman L, van I, Nishijima M, Hanada K, Mostov K, Engel JN. Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 2000;2(6):627-637.
27. Campadelli G, Brandimarti R, Di Lazzaro C, Ward PL, Roizman B, Torrisi MR. 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* 1993;90(7):2798-2802.
28. Fernandez-Ulibarri I, Vilella M, Lazaro-Dieguez F, Sarri E, Martinez SE, Jimenez N, Claro E, Merida I, Burger KN, Egea G. Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol Biol Cell* 2007;18(9):3250-3263.
29. Davis RJ, Ganong BR, Bell RM, Czech MP. Structural requirements for diacylglycerols to mimic tumor-promoting phobol diester action on the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1985;260(9):5315-5322.

30. Davis RJ, Ganong BR, Bell RM, Czech MP. sn-1,2-Dioctanoylglycerol. A cell-permeable diacylglycerol that mimics phorbol diester action on the epidermal growth factor receptor and mitogenesis. *J Biol Chem* 1985;260(3):1562-1566.
31. Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKC $\epsilon$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 1994;269(8):6140-6148.
32. Trus BL, Newcomb WW, Booy FP, Brown JC, Steven AC. Distinct monoclonal antibodies separately label the hexons or the pentons of herpes simplex virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(23):11508-11512.
33. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 1999;51:237-347.
34. Hausser A, Storz P, Martens S, Link G, Toker A, Pfizenmaier K. Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase III $\beta$  at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 2005;7(9):880-886.
35. Maier D, Nagel AC, Gloc H, Hausser A, Kugler SJ, Wech I, Preiss A. Protein Kinase D regulates several aspects of development in *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol* 2007;7:74.
36. Williams RL, Urbe S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(5):355-368.
37. Babst M, Sato TK, Banta LM, Emr SD. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J* 1997;16(8):1820-1831.
38. Davies BA, Azmi IF, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 ATPase activity by ESCRT-III. *Biochem Soc Trans* 2009;37(Pt 1):143-145.
39. Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Gottlinger H, Campadelli-Fiume G, Palu G, Parolin C. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol* 2007;81(20):11468-11478.

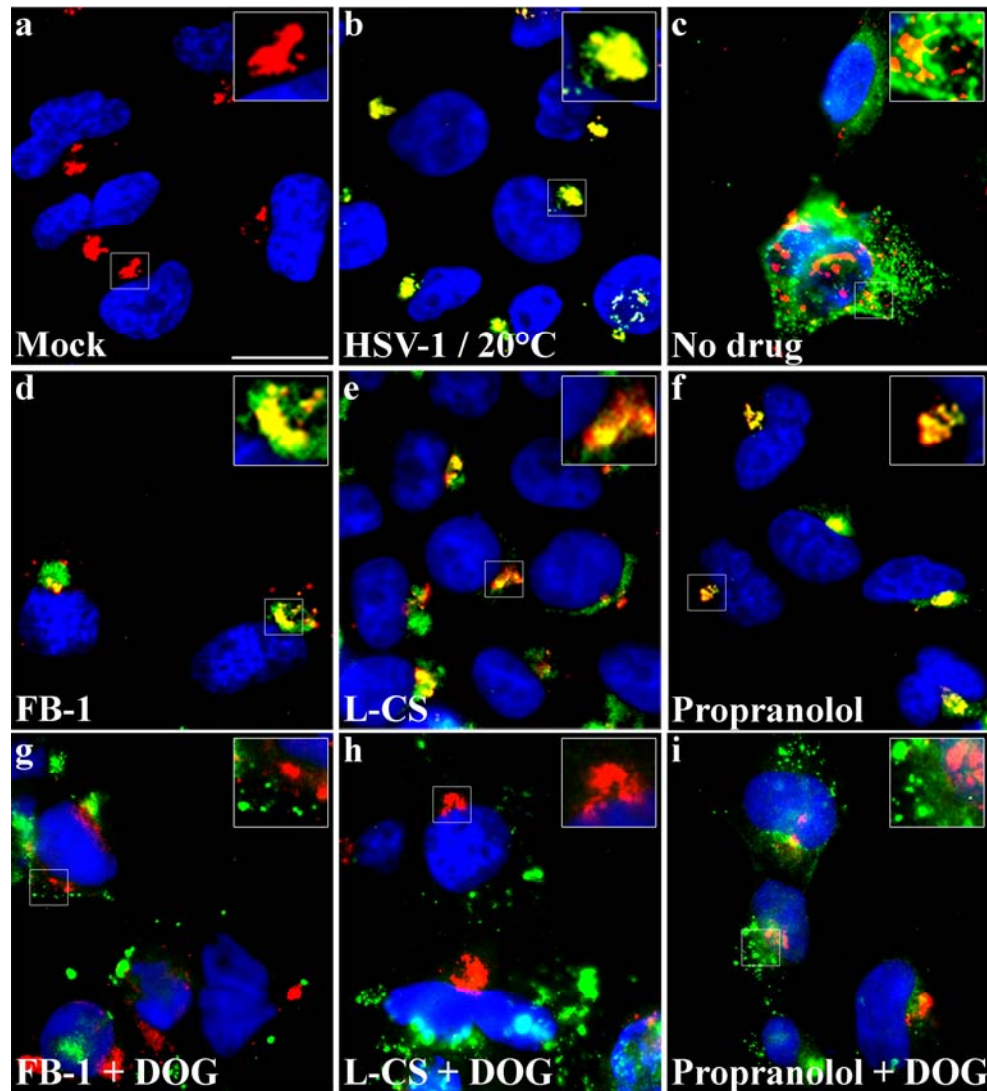
40. Crump CM, Yates C, Minson T. Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *J Virol* 2007;81(14):7380-7387.
41. Fraile-Ramos A, Pelchen-Matthews A, Risco C, Rejas MT, Emery VC, Hassan-Walker AF, Esteban M, Marsh M. The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment. *Cell Microbiol* 2007;9(12):2955-2967.
42. Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen EA. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J Virol* 2007;81(14):7476-7490.
43. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998;251(1):1-15.
44. Nydegger S, Foti M, Derdowski A, Spearman P, Thali M. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 2003;4(12):902-910.
45. Ono A, Freed EO. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 2004;78(3):1552-1563.
46. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, Mothes W. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 2003;4(11):785-801.
47. Baines J, Duffy C. Nucleocapsid Assembly and Envelopment of Herpes Simplex Virus. In: Sandri-Goldin RM, editor. *Alpha Herpesviruses*. Norfolk: Caister Academic Press; 2006. p. 175-204.
48. Polishchuk EV, Di Pentima A, Luini A, Polishchuk RS. Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol Biol Cell* 2003;14(11):4470-4485.

49. Sabesin SM, Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J Lipid Res* 1977;18(4):496-511.
50. Polishchuk RS, Polishchuk EV, Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, Mironov AA. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol* 2000;148(1):45-58.
51. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994;77(6):895-907.
52. Robinson MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(4):538-544.
53. Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* 2003;20(3):197-207.
54. Dotti CG, Parton RG, Simons K. Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature* 1991;349(6305):158-161.

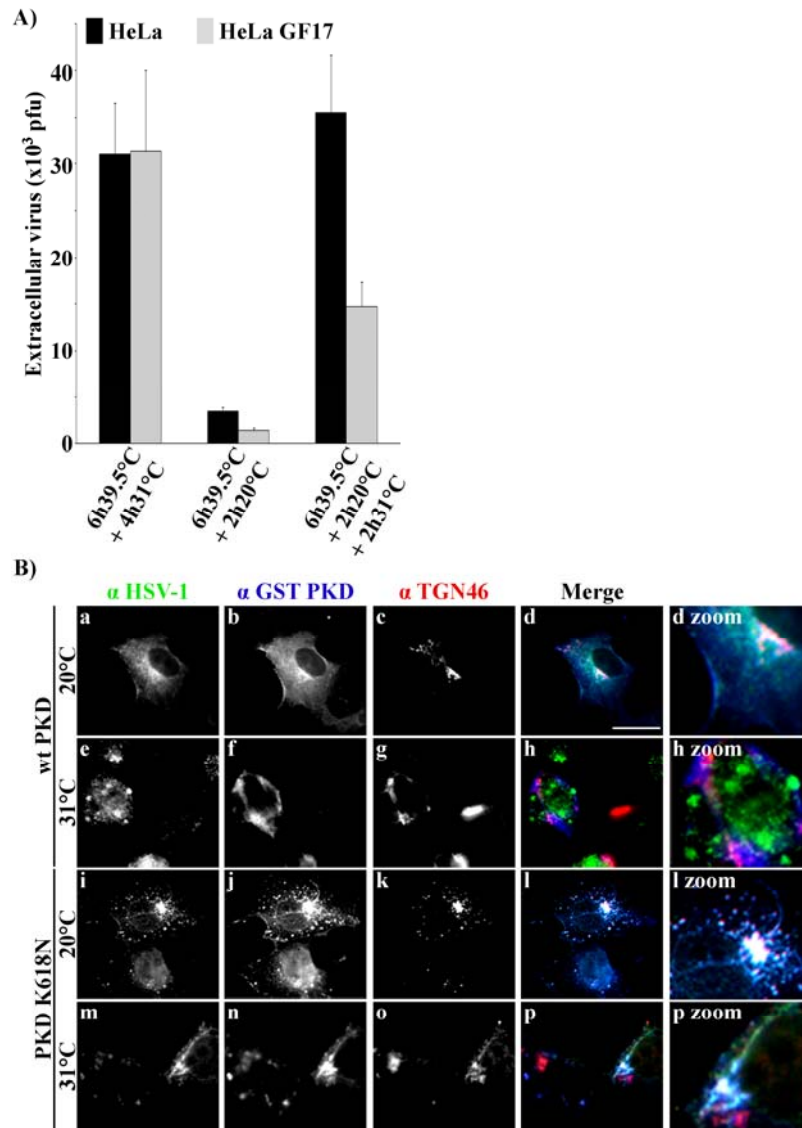
## Figures – Article III



**Fig. 1: Viral egress is hampered by DAG inhibitors downstream of the nucleus. A)** 143B cells were infected with V701 at a MOI of 5 and incubated 7h at 39.5°C + 30h at 31°C (1<sup>st</sup> bar), 7h 39.5°C + 6h at 20°C (2<sup>nd</sup> bar) or 7h at 39.5°C + 6h at 20°C + 24 h at 31°C (bars 3-6). Where indicated, 25 µg/ml FB-1, 1.5 mM L-CS or 50 µM propranolol was added during both the 20°C and 31°C incubations. Viral release was titrated on Vero cells by plaque assays. The data represent 3 different experiments (each done in duplicates) and the standard deviation of the means. **B)** HeLa nuclei infected with wt HSV-1 were incubated *in vitro* with cytosol, energy and the above drugs for 6 hours and capsid release quantified by liquid scintillation (see Materials and Methods). Viral egress was normalized to 100% for the counts obtained without drugs (Basal). The negative control was the viral release in the absence of energy and cytosol (- En, -Cyt). The errors bars depict the standard deviation of the mean (2 experiments each done in duplicates).



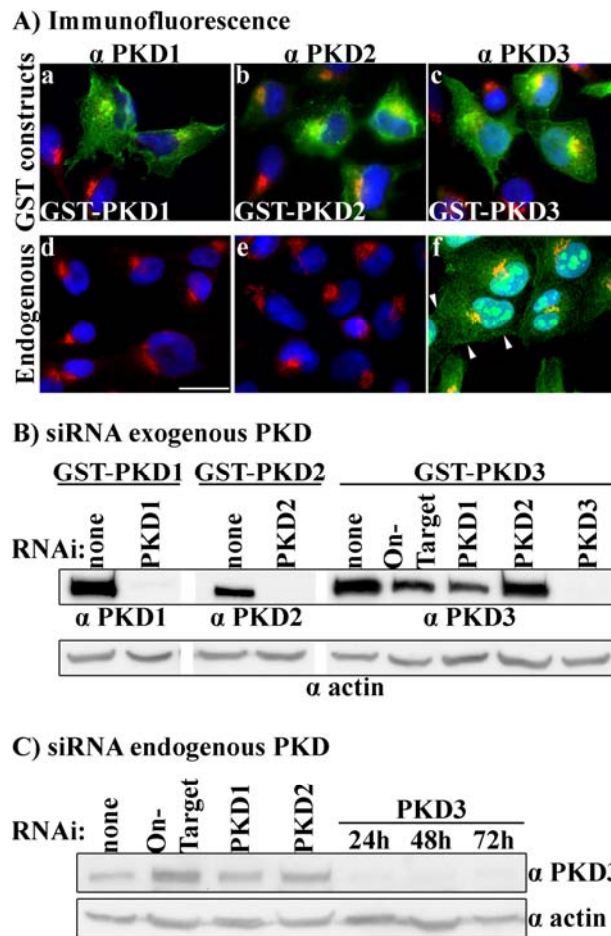
**Fig. 2:** *DAG inhibitors trap HSV-1 in the TGN and are rescued by a DAG analog.* Mock treated (panel a) or 143B cells infected with V701 at a MOI of 5 (panels b-i) were incubated for 7 hours at 39.5°C then 6 hours at 20°C. They were either fixed immediately (panel b) or after an additional chase of 6 hours at 31°C in the absence (panel c) or presence of FB-1 (panel d), L-CS (panel e) or propranolol (panel f) as above. For panels g-i, the cells were treated as in panels d-f but in the additional presence of 12  $\mu$ M of DOG (a cell permeable DAG analog) during the 31°C incubation. The cells were finally stained with Hoechst (nuclei in blue), TGN46 (TGN in red) or ICP5 (total capsids in green).



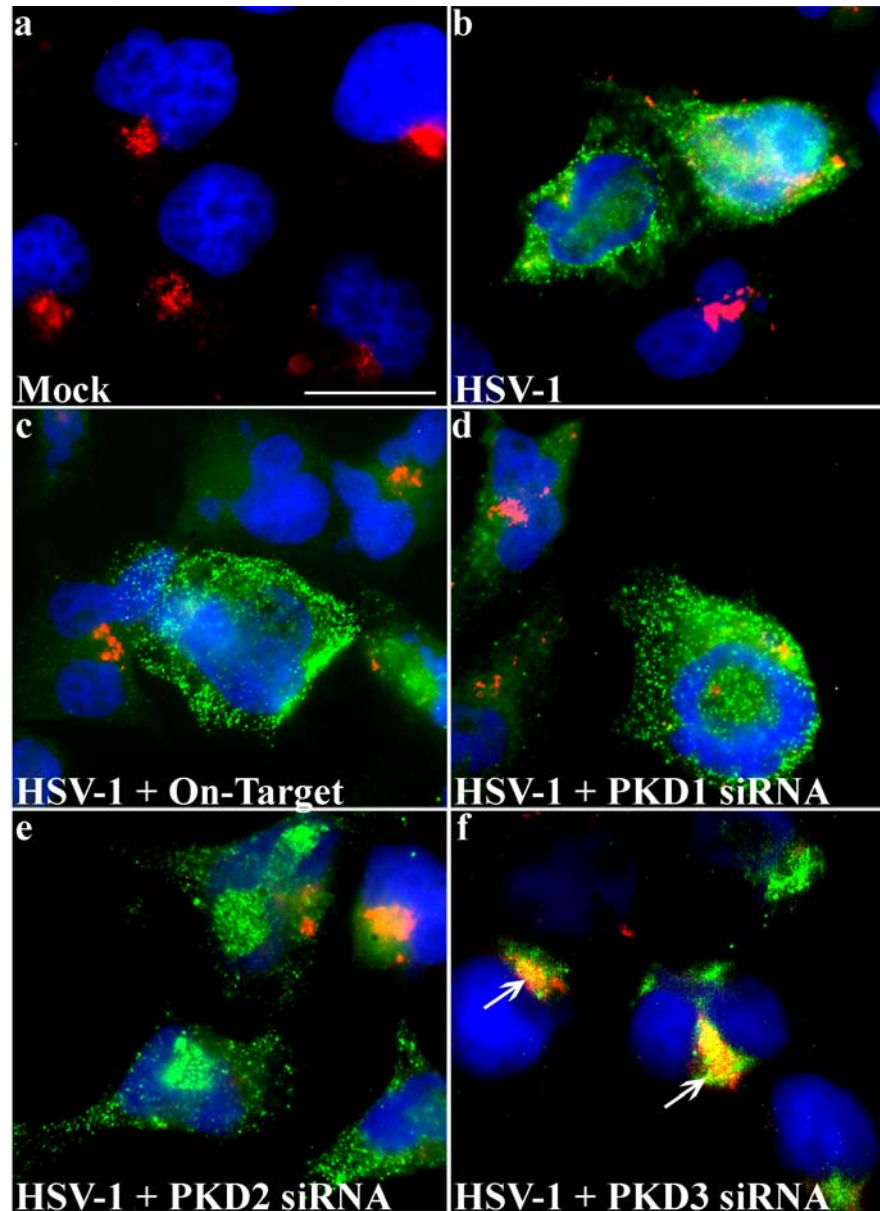


*Voir page précédente*

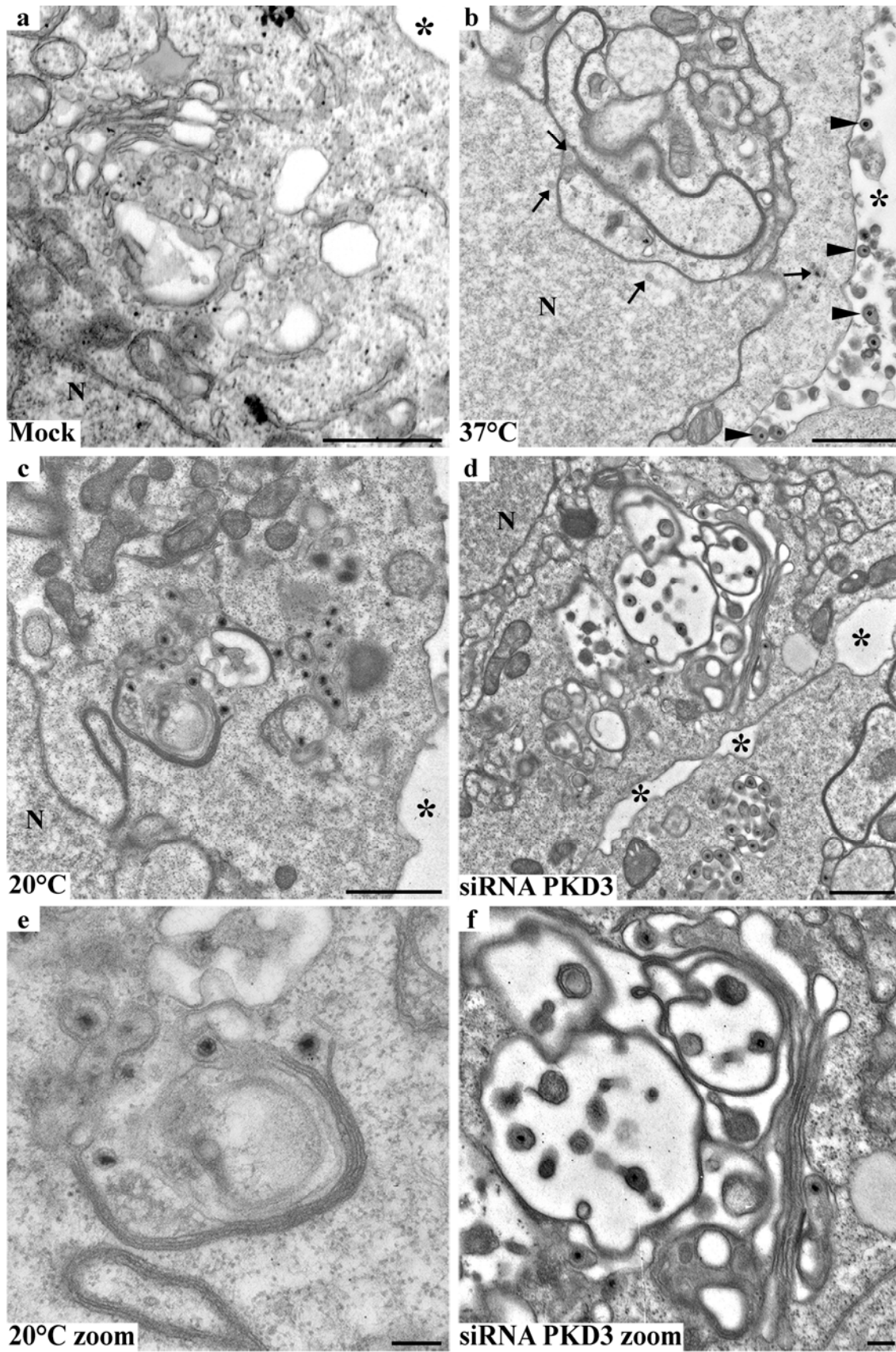
**Fig. 3: Kinase dead PKD mutant prevents HSV-1 egress and causes viral accumulation at the TGN.** **A)** HeLa and HeLa GF17 cells were infected with V701 at a MOI of 5. They were incubated 6 hours at 39.5°C, then 4 hours at 31°C (total viral release), 2 hours at 20°C (TGN block) or 2 hours at 20°C with a subsequent chase of 2 hours at 31°C (recovery). Viral release was measured by plaque assays. The data represents a typical experiment performed in duplicates. **B)** 143B cells were transfected with GST tagged wt PKD or kinase dead PKD1 (PKD K618N) for 24-48 hours at 37°C. Following the transfection, the cells were infected with V701 at an MOI of 5 for 7 hours at 39.5°C. They were then shifted to 20°C for 6 hours (panels a-d, i-l) or 31°C for 9 hours (panels e-h, m-p) before fixation. All samples were labelled with TGN46 (red), 8F5 (mature capsids in green) and an antibody against GST (blue).



**Fig. 4: Inhibition of PKD protein expression by siRNA.** PKD endogenous expression in 143B cells was analyzed by immunofluorescence and Western blotting using PKD specific antibodies. In all cases, controls included 143B cells transfected for 24 hours with GST tagged PKD1, 2 or 3 to insure that all reagents worked well. **A)** Immunofluorescence with anti PKD1, 2, 3 antibodies as indicated above the panels. Note the presence of PKD3 at the TGN (red), nucleus (blue), cell surface (arrowheads) and diffuse cytoplasmic staining. **B)** 143B cells were co-transfected for 48 hours with GST tagged PKD 1, 2 or 3 in the presence or absence of siRNA as indicated. Forty micrograms of total protein were analyzed by Western blotting with PKD specific antibodies or actin as a loading control (indicated below each blot). **C)** The endogenous levels of PKD3 were examined in the presence or absence of various siRNA. The controls (mock transfected, On-Target, PKD1 and PKD2 siRNA) were analyzed 48 hours post transfection while cells transfected with PKD3 siRNA were evaluated 24, 48 or 72 hours post transfection.



**Fig. 5: *PKD3* siRNA traps *HSV-1* at the TGN.** 143B cells were transfected with lipofectamine alone (panels a, b), control siRNA (panels c-e) or *PKD3* siRNA (panel f). Twenty four hours post transfection, cells were either mock treated (panel a) or infected with V701 (panels b-f) and further incubated 7 hours at 39.5°C, then 9 hours at 31°C. The samples were fixed and stained with TGN46 (red), 8F5 (mature HSV-1 capsids in green) and Hoechst (nucleus in blue). Arrows in panel f indicate co-localization between the virus and the TGN.



*Voir page précédente*

**Fig. 6: Presence of enveloped virions at the TGN upon PKD knock down.**

143B cells were untransfected (panels a-c, e) or transfected with PKD3 siRNA (panels d, f) for 24 hours. Cells were then either mock treated (panel a) or infected with wt HSV-1 17<sup>+</sup> (panels b-f) and further incubated 12 hours at 37°C (panels a, b, d, f) or 6 hours at 37°C then 6 hours at 20°C (panels c, e). Virus localization was analyzed by epon embedding and electron microscopy. The virions could reach the extracellular space at 37°C (panel b), while they were confined at or near the TGN at 20°C (panels c, e) or when treated with siRNA (panels d, f). Panels e and f are enlarged views of panels c and d respectively. Bars are 1  $\mu$ m (panels a-d) and 200  $\mu$ m (panels e-f). Symbols are N (nucleus), arrows (intracellular virions), arrowheads (extracellular virions) and \* (extracellular milieu).

## Article IV

### Text

Newly synthesized transmembrane and secreted proteins typically travel via the classical biosynthetic pathway from the ER to the Golgi apparatus and the TGN.<sup>1</sup> They are then segregated at the TGN or sorted to multiple different targets (extracellular environment, intracellular organelles, cell surface).<sup>2,3</sup> Proteins destined for the cell surface and extracellular milieu are often packaged in transport carriers regulated by the serine-threonine protein kinase D (PKD).<sup>4,5</sup> At the TGN, PKD mediates the fission of carriers packed with small cargo. This activity requires diacyl glycerol (DAG), which recruits PKD from the cytosol to the TGN.<sup>6</sup> The biosynthetic route is not applicable to all cargo, since small COPII vesicles that carry proteins from the ER towards the Golgi apparatus cannot accommodate large cargo such as chylomicrons, procollagen and viral capsids.<sup>7</sup> Although, these outsized cargos use unconventional pathways to travel through the cell, they all reach the TGN. Given these unconventional route to get to the TGN, it was of interest to study the way they escape this organelle to reach their final destination. Moreover, it was unclear whether they employed the PKD mediated cellular machinery or an alternative path to escape the TGN.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) are double stranded DNA enveloped viruses. The assembly of new capsids takes place in the nucleus of the host cell. The large 125 nm capsids then pass through the double nuclear membranes by unique sequential budding and fusion processes,<sup>8</sup> which releases unenveloped capsids in the cytosol. These capsids then travel along the cytoskeleton and reach the TGN, where they acquire their final envelope.<sup>9,10</sup> From the TGN, they journey to the plasma membrane via an unknown pathway. Given their unconventional route of transport to the TGN, we probed the role of the conventional PKD mediated transport machinery on viral egress downstream of that compartment. In the study described in this addendum,<sup>11</sup> the egress of HSV-1 from the TGN to the plasma membrane was monitored using a synchronized infection protocol, in which HSV-1 capsids are accumulated at the TGN and then released to the cell exterior. Under these conditions,

HSV-1 egress is strongly affected by three different DAG inhibitors, which all prevent the recruitment of PKD to the TGN and thus impede the fission of carriers travelling from the TGN to the plasma membrane.<sup>6, 12</sup> Moreover, immunofluorescence studies revealed the entrapment of the virus at the TGN, supporting the contribution of DAG and PKD in the release of HSV-1 from the TGN. To directly address the role of PKD in HSV-1 transport, we used two additional and more specific methods, namely an inactive mutant of the protein (PKD K618N)<sup>4,13</sup> and siRNA directed against PKD. Both systems confirmed the implication of PKD by strongly reducing the egress of the virus. Once again, virions could be visualized in inactivated PKD induced tubules. All together the results demonstrated the dependence of HSV-1 virions on the PKD-regulated cellular pathway to transit from the TGN to the plasma membrane, i. e. the same path as for small cargo. This is in sharp contrast of anterior steps of intracellular transport of the virus.

The use of the classical PKD pathway by HSV-1 to exit the TGN, but its unusual route to arrive at the TGN underlines the TGN as a hub, where conventional and unconventional pathways carrying various cargos meet (fig. 1). This applies not only to HSV-1 but likely also extends to other large cargo such as procollagen and chylomicrons. Both molecules also bypass the COPII vesicles to reach the Golgi apparatus or TGN before reaching their final destination.<sup>14,15</sup> Though unproven at this point, they probably depend on PKD for the last leg of their journey. For instance, procollagen has been shown to co-localize with the small VSV G cargo.<sup>16</sup> Other large cargo such as several viruses that replicate and assemble in the cytoplasm also travel through the TGN before being released at the cell surface. These include Rota-, Corona-, Bunya-, Flavi- and Poxviruses.<sup>17,18</sup> Several unconventional and unrelated pathways thus meet at the TGN and merge with the conventional transport apparatus. The additional passage in the TGN of some molecules endocytosed at the cell surface before being recycled to the plasma membrane<sup>19</sup> further highlights the importance of the TGN as a meeting hub for several pathways.

The use of PKD by small, large and viral cargo raises interesting issues. For instance, it is not clear if these various cargos share the post-TGN transport machinery or compete for it (Fig. 1). This is particular relevant for viruses, as they often hijack host cell

systems for their privileged use.<sup>20,21</sup> These different cargos might also travel in parallel in distinct transport carriers. If so, what dictates their specific incorporation in the PKD generated carriers. What are the specific sorting signals? Particular coat adaptors, certain lipids, modulators and members of the Rab and ARF families of small GTPases might also be implicated.<sup>22-26</sup> Would components be shared between these various cargos? Given the complexity of the intracellular machinery, cross-talk between the different pathways downstream of the TGN is indispensable.<sup>27,28</sup> As new paths transiting through the TGN are elucidated for multiple types of cargos, this cross-talking is becoming more and more complex and will need additional investigations to describe it. As PKD impairment didn't completely shut down virus egress in our studies, this hints that other components, cellular or viral, are implicated in HSV-1 post-TGN transport. Finally, HSV-1 could encode novel modulators of the cellular transport mechanisms or alternatively mimic existing host molecules<sup>29,30</sup> to emulate cellular pathways.

A final issue is the enduring debate regarding the site of final envelopment of HSV-1 capsids in neuronal cells. The pathogenesis of alphaherpesviruses is characterized by neuronal spread. Several studies suggest the envelopment of the virus at the cell body and transport of fully mature enveloped virions down the axon. Others studies rather propose the axonal transport of naked capsids and the acquisition of an envelope at the cone.<sup>31,32</sup> Although our study showed a clear involvement of host cell PKD in TGN to plasma membrane transport in epithelial cells, it remains to be proven whether this is also the case in neurons. If so, it could argue in favour of a re-envelopment in the neuron body, where TGN and PKD are usually present, as opposed to a more distant envelopment in the axon end. However, it has been shown that PKD is only needed in dendritic transport for small cargo,<sup>33</sup> not in axonal transport. This could mean an alternative and unique pathway of HSV-1 post-TGN transport in neuronal cells. It is also conceivable that the PKD multiple isoforms (three in humans<sup>4,13</sup>) assume different functions in different cell types.



## Acknowledgments

This research was funded by the Canadian Institutes of Health Research and an equipment grant from the Canadian Foundation for Innovation.

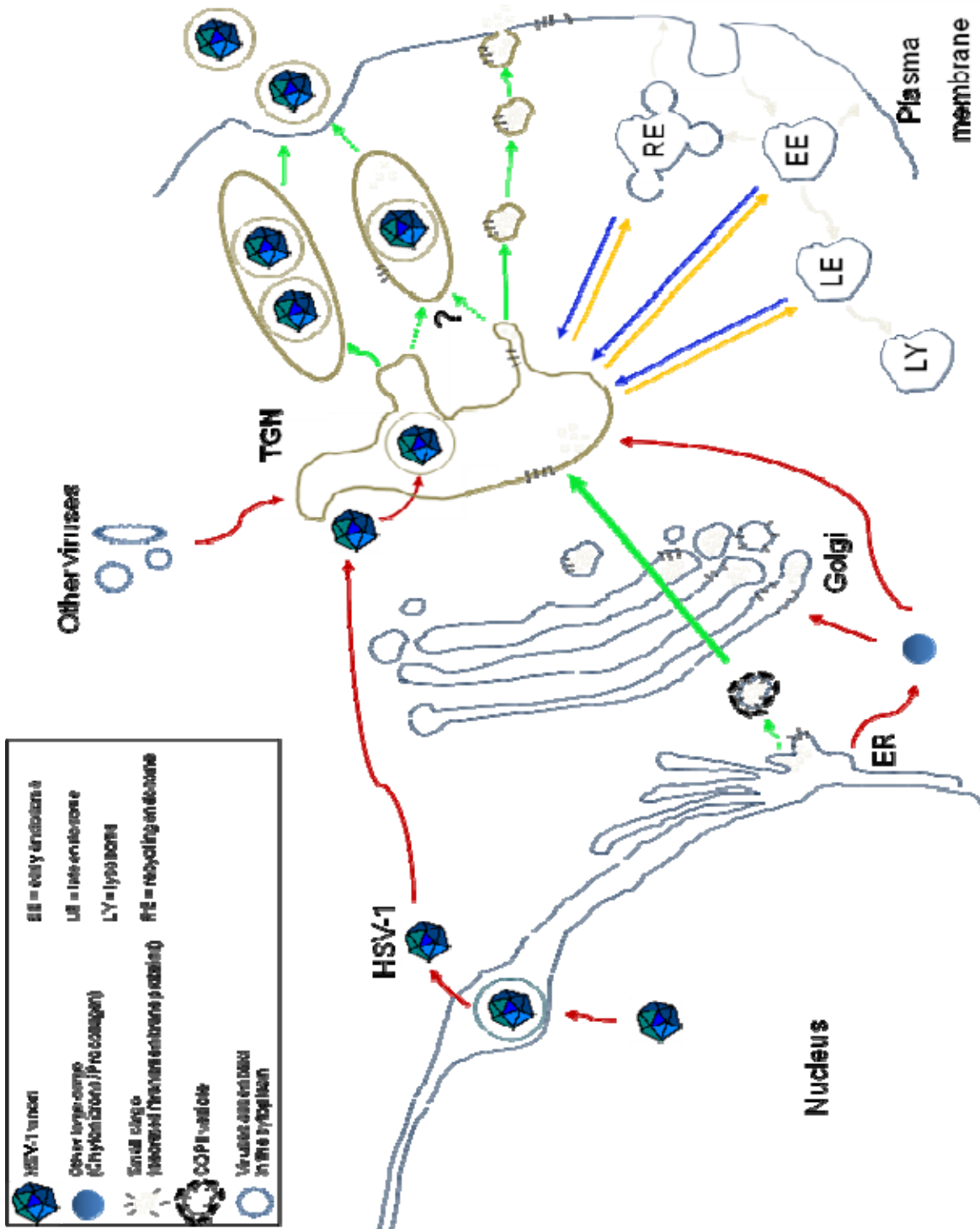
## References

1. Rodriguez-Boulan E, Musch A. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1744:455-64.
2. Muniz M, Morsomme P, Riezman H. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 2001; 104:313-20.
3. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:273-84.
4. Bossard C, Bresson D, Polishchuk RS, Malhotra V. Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol* 2007; 179:1123-31.
5. Ghanekar Y, Lowe M. Protein kinase D: activation for Golgi carrier formation. *Trends Cell Biol* 2005; 15:511-4.
6. Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 2002; 295:325-8.
7. Fromme JC, Schekman R. COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:345-52.
8. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:423-9.
9. Turcotte S, Letellier J, Lippe R. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 2005; 79:8847-60.
10. Harley CA, Dasgupta A, Wilson DW. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J Virol* 2001; 75:1236-51.
11. Rémillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G, Lippé R. Protein kinase D dependent trafficking of the large HSV-1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic* 2009.

12. van Ooij C, Kalman L, van I, Nishijima M, Hanada K, Mostov K, Engel JN. Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 2000; 2:627-37.
13. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 2001; 104:409-20.
14. Sabesin SM, Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J Lipid Res* 1977; 18:496-511.
15. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; 118:1341-53.
16. Polishchuk EV, Di Pentima A, Luini A, Polishchuk RS. Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol Biol Cell* 2003; 14:4470-85.
17. Hambleton S, Gershon MD, Gershon AA. The role of the trans-Golgi network in varicella zoster virus biology. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:3047-56.
18. Griffiths G, Rottier P. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* 1992; 3:367-81.
19. van Meel E, Klumperman J. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:253-66.
20. Lehmann-Che J, Saib A. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. *AIDS Rev* 2004; 6:199-207.
21. Ross EM. Cellular signalling. Viral hijack of receptors. *Nature* 1990; 344:707-8.
22. Kreis TE, Pepperkok R. Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:533-7.
23. Gu F, Crump CM, Thomas G. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:1067-84.
24. Gleeson PA, Lock JG, Luke MR, Stow JL. Domains of the TGN: coats, tethers and G proteins. *Traffic* 2004; 5:315-26.
25. Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Musch A. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:233-47.
26. Chavrier P, Goud B. The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:466-75.

27. Haynes LP, Thomas GM, Burgoyne RD. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J Biol Chem* 2005; 280:6047-54.
28. Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 2002; 12:193-200.
29. Boomker JM, van Luyn MJ, The TH, de Leij LF, Harmsen MC. US28 actions in HCMV infection: lessons from a versatile hijacker. *Rev Med Virol* 2005; 15:269-82.
30. Kawaguchi Y, Kato K. Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev Med Virol* 2003; 13:331-40.
31. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* 2008; 18:35-51.
32. Tomishima MJ, Smith GA, Enquist LW. Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons. *Traffic* 2001; 2:429-36.
33. Bisbal M, Conde C, Donoso M, Bollati F, Sesma J, Quiroga S, Diaz Anel A, Malhotra V, Marzolo MP, Caceres A. Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *J Neurosci* 2008; 28:9297-308.

Figure – Article IV



*Voir page précédente*

**Figure 1.** The TGN is a meeting point where conventional and unconventional routes of intracellular transport merge. To illustrate this point, the classical biosynthetic pathway from the ER to the cell surface is depicted with **green arrows**. Alternative transport routes by which various large cargos such as HSV-1, chylomicrons, procollagen and some viruses that assemble in the cytoplasm reach the TGN are indicated by **red arrows**. In addition, the TGN is not only a merging point for molecules newly synthesized but also for proteins recycled from other compartments along the endo-lysosomal system (shown with **blue arrows**). At the TGN, large and small cargo merge and are sorted towards the cell surface (**green arrows**) and various endosomal compartments (**yellow arrows**). **Dotted green arrows** illustrate the uncertainty as to whether large cargo, in particular viruses, share the PKD mediated pathway with smaller cargo or whether they monopolizes it.

## Discussion

### Contribution à l'avancement des connaissances

L'article portant sur la reconstitution *in vitro* de la sortie nucléaire de HSV-1 (article I) démontre que l'essai *in vitro* développé durant ce projet constitue un modèle expérimental pluripotent. C'est la première fois qu'un essai *in vitro* reproduisant spécifiquement l'étape de transport du virus HSV-1 hors du noyau est mis sur pied et validé. L'essai constitue une opportunité unique d'étudier la sortie nucléaire du virus HSV-1 au niveau moléculaire. De plus, cet article a été choisi par les éditeurs de la revue « Journal of Virology » parmi le top 10 des publications ayant un intérêt particulier dans le volume 80, numéro 19 du journal en octobre 2006 [387].

Les résultats présentés dans l'article I ont permis d'apporter des preuves qui soutiennent le modèle de dé-enveloppement / ré-enveloppement de façon catégorique. Ces preuves incluent la relâche exclusive de capsides sans enveloppe à l'extérieur du noyau, de même que la présence de plusieurs capsides enveloppées dans l'espace périnucléaire et plusieurs exemples d'interactions de ces capsides avec l'une ou l'autre des membranes nucléaires, via l'initiation de processus de fusion ou de bourgeonnement. En comparant la sortie du virus de noyaux isolés avec la sortie nucléaire dans les cellules entières, les observations de l'article démontrent aussi que le système *in vitro* reproduit fidèlement la sortie du virus *in vivo*. Ces démonstrations via le modèle unique de l'essai *in vitro* rejoignent la liste des autres publications qui appuient aussi le modèle des deux enveloppements [80, 95, 244, 388, 389]. Il n'y a pas eu d'évidence de pores élargis de façon active durant l'essai *in vitro*, ce qui avait aussi été observé par une autre équipe à l'aide de cellules entières [157]. Ces observations laissent supposer que le modèle des pores élargis ne représente pas un mode actif de sortie nucléaire des virus herpès. L'utilisation du modèle de dé-enveloppement / ré-enveloppement suscite également l'intérêt au niveau de la biologie cellulaire, puisqu'il suppose un mode de sortie hors du noyau non classique qui n'emprunte pas la voie conventionnelle luminale de transport et qui n'utilise pas non plus l'exportation via les pores nucléaires.

L'essai *in vitro* fournit une possibilité unique d'accumuler un intermédiaire rare du processus de maturation du virus HSV-1 : des capsides nouvellement assemblées et fraîchement relâchées par le noyau. Avec l'infection de cellules entières, il est difficile de retracer avec certitude cette forme du virus dans le cytoplasme des cellules infectées qui contient une multitude de virus à des stades de maturation différents. Dans l'article I, la présence ou non d'une enveloppe, de même que la présence de matériel génétique chez les capsides relâchées dans l'essai *in vitro* ont été analysées par observation et quantifiées via la microscopie électronique. Toutefois, plusieurs autres caractéristiques du virus relâché dans l'essai *in vitro* peuvent être étudiées : la vitesse de transport, la stabilité des capsides, le contenu protéique (viral et cellulaire), etc. En plus, il est possible d'incuber les noyaux infectés dans un cytosol non infecté (mock), ce qui permet d'analyser les capsides relâchées dans un contexte où il n'y a pas de contact avec des protéines cytoplasmiques virales. C'est dans cette optique d'analyse plus approfondie que le deuxième article choisi pour cette thèse a été élaboré.

L'article II a permis d'éclaircir le processus de tégumentation, c'est-à-dire d'identifier les premiers téguments ajoutés sur les capsides HSV-1 tout juste relâchées par le noyau de la cellule hôte. Pour la première fois, l'essai *in vitro* fournit une opportunité unique d'examiner les capsides aussitôt qu'elles sont relâchées par le noyau. Les résultats présentés démontrent l'ajout des protéines virales tégumentaires U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37, ICP0, ICP4, ICP8, U<sub>L</sub>41, U<sub>L</sub>42 et U<sub>S</sub>3 sur les capsides relâchées dans un milieu extranucléaire dépourvu de protéines virales, c'est à dire en incubant les noyaux isolés de cellules infectées dans du cytosol provenant de cellules non infectées. Il s'agit donc d'un examen plus détaillé du processus de tégumentation qui permet de définir de nouveaux téguments primaires. Ces données fournissent des pistes concernant des facteurs viraux qui pourraient potentiellement être impliqués dans le processus de transport de HSV-1 hors du noyau.

Dans la littérature, il y a une controverse touchant le site d'ajout de certaines protéines virales, de même que leur présence dans les virions extracellulaires. Par exemple, la présence des protéines U<sub>L</sub>36 et U<sub>L</sub>37 dans le noyau et sur les capsides nucléaires a déjà été documenté [390-392]. Toutefois, il n'y a pas une approbation générale et certaines équipes n'ont pas détecté ces protéines sur les capsides nucléaires [34, 393]. De plus, la présence des protéines virales ICP0 et ICP4 dans les particules virales extracellulaires et

leur association avec la capsid ne fait pas non plus l'unanimité. Bien que certaines équipes prétendent que les protéines ICP0 et ICP4 sont des composantes des virions HSV-1 matures [38, 394-397], d'autres laboratoires défendent la non-incorporation de ces protéines dans les particules virales [398, 399]. Les résultats exposés dans l'article II apportent de nouvelles preuves pour clarifier les débats en cours en permettant de confirmer la présence des protéines U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37, R<sub>L</sub>2 (ICP0) et R<sub>S</sub>1 (ICP4) dans les particules virales extracellulaires. Nos résultats suggèrent même que leur association à la capsid est effectuée au niveau du noyau de la cellule hôte.

Les observations développées dans les articles III et IV démontrent que la protéine kinase D est spécifiquement impliquée dans la sortie du virus HSV-1 du TGN. Les résultats présentés ici ont permis de mettre en évidence une nouvelle interaction entre le virus HSV-1 et la cellule hôte. En effet, dans l'article III, il a été démontré pour la première fois que le virus HSV-1 nécessite l'intervention de la protéine cellulaire PKD, afin de pouvoir quitter le TGN et atteindre la membrane plasmique. Il s'agit aussi du premier indice moléculaire concernant le transport du virus entre le TGN et la surface cellulaire. Donc, contrairement aux étapes de transport non conventionnelles du virus vers le TGN, le virus utilise une voie de transport conventionnelle pour s'évader du TGN et rejoindre la membrane plasmique. Les résultats appuient également le TGN comme étant un site de passage du virus HSV-1.

Cette découverte a également révélé la possibilité pour les gros cargos, tels que les particules virales HSV-1 d'emprunter la même voie de transport que les cargos plus petits, pour les déplacements en aval du TGN. Les données présentées ont mis en lumière le fait que les vésicules dérivées de la membrane du TGN et générées par la fission orchestrée par PKD permettent le transport de cargos de tailles diversifiées.

Les articles III et IV illustrent bien la coopération de deux axes principaux de recherches de cette thèse, soit la biologie cellulaire et la virologie. Les résultats exposés ont permis : 1) d'approfondir les connaissances concernant le virus HSV-1 en identifiant une nouvelle relation hôte-virus; 2) de fournir des informations surprenantes concernant la diversité des cargos des vésicules issues du TGN et 3) de renforcer l'image du TGN comme



étant un point de rencontre de routes intracellulaires multiples à l'instar d'un terminal d'aéroport.

## **Travaux futurs**

### **Implication de l'actine nucléaire dans la sortie nucléaire de HSV-1**

L'essai *in vitro* possède un grand potentiel notamment par la possibilité de tester une panoplie de réactifs et de drogues agissant sur différentes molécules. Le but de cette analyse étant de déterminer si les différentes molécules ciblées par ces réactifs ont un rôle à jouer sur la sortie nucléaire du virus HSV-1. L'essai *in vitro* démontre que la relâche de virus HSV-1 du noyau peut se produire en présence de cytosol provenant de cellules non infectées et donc dépourvu de protéines virales. Cette observation suggère que des protéines cellulaires pourraient jouer un rôle important pour cette étape de maturation du virus.

Tout d'abord, l'étude de l'implication du cytosquelette au niveau de la sortie nucléaire du virus HSV-1 pourrait s'avérer très intéressante. Tel que discuté précédemment (voir la section intitulée « Interactions entre le virus HSV-1 et le cytosquelette »), le virus s'associe à plusieurs protéines du cytosquelette et du nucléosquelette durant chaque étape de sa maturation. Au niveau du noyau, l'infection par le virus HSV-1 induit la formation de filaments d'actine intranucléaire [247]. L'actine nucléaire a une multitude de fonctions dont la transcription, le transport et l'épissage des ARNs, le transport intranucléaire et le maintien de la structure du noyau [400]. Les filaments d'actine nucléaire seraient utilisés par le virus pour le déplacement des capsides à l'intérieur du noyau [247, 260]. De plus, pour amorcer le processus de sortie nucléaire le virus doit modifier les lamines nucléaires qui sont des filaments intermédiaires du nucléosquelette [44, 240, 257]. Dans l'article I, l'objectif était de mieux caractériser le transport du virus hors du noyau. Dans le but de poursuivre cet objectif, des études ultérieures devraient donc s'intéresser à l'implication des composantes du nucléosquelette au niveau de la machinerie de sortie de HSV-1 hors du noyau.

Pour tenter de clarifier le rôle du nucléosquelette, plusieurs drogues agissant au niveau des composantes du cytosquelette pourraient être testées sur la sortie du virus en utilisant l'essai *in vitro*. Par exemple, pour étudier l'implication de l'actine dans la relâche nucléaire de HSV-1, la latrunculine A et la cytochalasine D qui dépolymérisent l'actine [401, 402] et le J7473 qui cause au contraire la stabilisation des microfilaments pourraient être utilisées [403]. Au niveau des microtubules, le nocodazole qui dégrade les microtubules et le paclitaxel qui les stabilise, pourraient servir à analyser l'impact des microtubules sur la sortie du virus hors du noyau [404-407]. La relâche virale serait alors caractérisée suivant l'ajout des ces réactifs à l'essai *in vitro* et des modifications dans la quantité de virus libérés par le noyau pourraient indiquer une implication potentielle des protéines cytosquelettiques ciblées.

L'immuno-marquage, en microscopie électronique ou en microscopie par fluorescence, pourrait également s'avérer fort utile pour visualiser les associations entre le virus et les composantes du nucléosquelette. Les noyaux infectés pourraient être incubés avec ou sans drogues perturbatrices du nucléosquelette, puis isolés selon les techniques décrites dans l'article I et ensuite analysés par microscopie pour visualiser l'impact des drogues sur la localisation du virus dans le noyau. De plus, ces techniques pourraient mettre en évidence les changements du nucléosquelette suite à l'infection. Ces changements peuvent être des indices pour identifier les composantes requises pour la sortie nucléaire du virus.

Dans la littérature, différentes techniques de protéomique (immuno-buvardage, spectrométrie de masse, etc.) ont été utilisées pour détailler les protéines cellulaires associées aux particules virales extracellulaires [38, 277, 278, 280, 408]. Ces techniques pourraient également être utilisées sur les capsides relâchées dans l'essai *in vitro* pour identifier les éléments du nucléo- et du cytosquelette associés au virus immédiatement après sa sortie du noyau et ainsi définir des candidats potentiels impliqués dans la machinerie de sortie nucléaire de HSV-1.

## **Implication du cholestérol dans la sortie nucléaire de HSV-1**

Une autre composante cellulaire intéressante pour son rôle potentiel dans la sortie nucléaire de HSV-1 est le cholestérol. Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui est présent dans les membranes cellulaires et notamment au niveau de la membrane nucléaire. Le cholestérol est distribué de façon asymétrique dans les membranes nucléaires, il est retrouvé dans la membrane nucléaire externe et non dans la membrane nucléaire interne [409, 410]. Le cholestérol se retrouve également dans le noyau, associé à la chromatine où il jouerait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire ainsi qu'un rôle pour ancrer l'ADN durant sa duplication [411]. Il a été démontré que le cholestérol est important au niveau de l'entrée dans la cellule du virus PRV (virus de la pseudorange), un membre de la famille des virus herpès alpha affectant les porcs. Une séquestration du cholestérol au niveau de la membrane plasmique, déstabilise l'organisation lipidique de la membrane et inhibe l'entrée du virus dans la cellule hôte [412]. La composition lipidique particulière des deux membranes nucléaires permet de les distinguer l'une de l'autre et elle les différencie également des autres membranes lipidiques de la cellule. Les lipides cellulaires sont impliqués à différentes étapes du cycle viral et certaines protéines de HSV-1 s'associent au cholestérol [413-417]. Ces observations soutiennent le développement de l'analyse du rôle des lipides nucléaires dans la sortie du virus HSV-1 hors du noyau.

Pour vérifier le rôle du cholestérol dans la sortie nucléaire de HSV-1, il serait possible d'ajouter des substances séquestrant le cholestérol, comme la filipine ou la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MBCD), puis d'en vérifier les effets sur la relâche du virus par le noyau. L'utilisation de noyaux isolés de l'essai *in vitro* permettrait de cibler spécifiquement le noyau et d'éviter que les effets observés, s'il y a lieu, ne soient pas directement liés à l'effet des drogues sur la membrane nucléaire. Il faut toutefois être prudent avec l'utilisation de telles drogues, car ces substances peuvent avoir des effets autres que celles affectant le cholestérol. Pour défendre un rôle putatif du cholestérol dans la sortie nucléaire de HSV-1, du cholestérol exogène soluble pourrait être ajouté aux noyaux isolés et ensuite les conséquences de l'augmentation du cholestérol sur la sortie du virus serait analysées grâce à l'essai *in vitro*. Le cholestérol présent dans les membranes nucléaires, avant et après une infection par HSV-1, pourrait être visualisé (par microscopie) et quantifié pour évaluer si le

virus induit un recrutement de cholestérol vers le noyau ou si le cholestérol est relocalisé aux sites de sortie nucléaire du virus.

### **Implication de facteurs viraux dans la sortie nucléaire de HSV-1**

Les possibilités offertes par l'essai *in vitro* sont nombreuses et plusieurs réactifs peuvent être testés dans le but de découvrir des facteurs cellulaires importants pour la sortie du virus HSV-1 du noyau. L'essai peut aussi servir à détecter les protéines virales engagées dans le processus de transport à travers le noyau. Pour ce faire, il serait possible d'utiliser différents mutants viraux, pour lesquels des protéines virales ont été mutées et de voir l'implication de cette délétion sur la relâche nucléaire de HSV-1. Les virus mutants pourraient être utilisés de deux façons : pour infecter des cellules et ensuite en isoler les noyaux et voir l'impact sur la sortie du virus ou encore utiliser ces virus mutants pour produire du cytosol infecté et en mesurer les conséquences sur le transport du virus. Ces deux méthodes fourniraient un moyen de discriminer entre les éléments viraux intranucléaires et ceux extranucléaires (ou cytoplasmiques) impliqués dans la sortie nucléaire de HSV-1. Dans le cas du bloc de la sortie nucléaire du virus, le complément de la protéine déléetée par l'ajout de la même protéine sous forme recombinante devrait permettre de récupérer un transport adéquat des capsides et de confirmer l'implication de cette protéine dans la relâche nucléaire de HSV-1.

### **Analyse par fractionnement du cytosol**

Une autre méthode intéressante serait de fractionner le cytosol provenant de cellules infectées, par exemple en utilisant un système de chromatographie liquide et d'analyser l'impact de chaque fraction sur la libération du virus dans l'essai *in vitro*. Il faudrait ensuite analyser le contenu protéique de chaque fraction ayant stimulé ou inhibé le transport du virus afin de découvrir les molécules impliquées dans la sortie de HSV-1 du noyau. Cette méthode pourrait aussi servir à détecter des protéines cellulaires impliquées dans le processus de sortie nucléaire de HSV-1. De plus, une étude comparative entre le cytosol provenant de cellules infectées et celui de cellules non infectées pourrait amener des découvertes intéressantes concernant : 1) les molécules impliquées dans la sortie du virus

du noyau et 2) l'effet de l'infection sur le contenu protéique du cytosol (enrichissement ou déclin de certaines protéines).

### **Utilisation de plusieurs souches virales et de plusieurs types cellulaires**

La comparaison de plusieurs souches virales du virus HSV-1, de même que la comparaison de capsides provenant de noyaux isolés de différents types cellulaires seraient utiles puisque la composition protéique des particules virales peut varier d'un type cellulaire à un autre [418]. Lors de l'analyse de spectrométrie de masse de l'article II, les cellules HeLa utilisées sont des cellules épithéliales, il serait donc enrichissant de comparer le protéome de capsides provenant de cellules de type neuronal, l'autre cible du virus HSV-1. Toutefois, il est à noter que la comparaison du protéome des virions HSV-1 extracellulaires produits par deux lignées cellulaires distinctes n'a pas donné de différence notable [38]. D'autre part, l'homologie de la séquence en acides aminés entre plusieurs souches du virus HSV-1 a été évaluée à plus de 90% [38] ce qui permet d'utiliser une même banque de données pour étudier les différences dans la composition protéique de diverses souches virales.

### **Rôle du tégment primaire pour la sortie nucléaire de HSV-1**

L'initiation des recherches de l'article II est venue de la volonté d'identifier des joueurs clés importants dans le transport nucléaire du virus HSV-1. Avec ce projet certaines protéines virales ont été identifiées comme étant associées aux capsides libérées par le noyau, mais leur implication dans ce processus de même que leur rôle respectif n'a pas encore été examiné. Ces paramètres pourraient être étudiés notamment en utilisant différents mutants de délétion de ces protéines et en observant leurs effets sur le processus de sortie du noyau de HSV-1.

Le rôle de la protéine  $U_S3$  dans la sortie du virus HSV-1 hors du noyau est en partie connu. La kinase virale  $U_S3$  agit sur diverses protéines virales et cellulaires pour rompre l'association entre l'émerine et les lamines nucléaires [239, 246, 263, 419]. Cette intervention qui cause une détérioration et relocalisation des lamines, est essentielle pour que le virus puisse atteindre la membrane nucléaire interne. Toutefois, il serait intéressant de vérifier l'implication de la protéine  $U_S3$  à d'autres étapes de la sortie nucléaire de HSV-1.  $U_{L36}$  et  $U_{L37}$  ont déjà été impliqués dans le transport du virus à différentes étapes

de sa maturation [43, 47, 392]. Leur présence sur les capsides relâchées dans l'essai *in vitro* pourrait être expliquée par un processus de transport similaire requis dans la sortie du virus hors du noyau. Les protéines virales ICP0, ICP4, ICP8 et U<sub>L</sub>42 ont toutes des fonctions qui se déroulent dans le noyau des cellules hôtes [420-424]. Leur incorporation dans les capsides dans le noyau n'est peut-être pas reliée à leur participation à la machinerie de transport du virus hors du noyau, mais plutôt à des interactions avec par exemple l'ADN viral qui a été incorporé dans les capsides. Pour ce qui est de la protéine U<sub>L</sub>41 (VHS), une autre équipe avait déjà démontré l'association d'une forme spécifique (59.5KDa) de la protéine avec le virus HSV-1 au niveau du noyau [425]. Même si la portion N-terminale de la protéine VHS cible les sites nucléaires d'assemblage des capsides [42], aucun indice ne laisse croire à l'implication directe de cette endoribonucléase virale dans le processus de sortie nucléaire de HSV-1. Il reste donc plusieurs interrogations à résoudre pour relier, s'il y a lieu, les protéines tégmentaires identifiées dans l'article II et leur implication active dans les mécanismes utilisés par HSV-1 pour sortir du noyau. En second lieu, si ces protéines ne sont pas impliquées dans la sortie du virus, il sera intéressant de déterminer pourquoi elles sont associées au virus à cette étape précise de maturation.

### **Caractérisation de l'association des tégments**

L'association entre la capsidite et les protéines tégmentaires pourrait être caractérisée. C'est-à-dire qu'il serait intéressant de savoir si cette association est transitoire ou si elle persiste jusqu'à l'acquisition de l'enveloppe finale du virus. Également, une étude plus approfondie permettrait de savoir si les protéines ajoutées sur les capsides nouvellement relâchées par le noyau sont aussi ajoutées à la particule virale à d'autres endroits dans la cellule. Dans ce cas, il y aurait donc plusieurs lieux d'addition pour une même protéine, ce qui pourrait suggérer qu'une protéine joue un (ou plusieurs) rôle(s) à différents sites dans la cellule. À l'opposé, une protéine pourrait être présente sur les capsides tout juste sorties du noyau et ensuite être retirée de la capsidite. Il serait aussi intéressant de définir l'interactome entre ces différentes protéines virales. Quelles sont les interactions tégment-tégment ou encore entre le tégment et la capsidite virale?

## **Comparaison du protéome des différents intermédiaires de HSV-1**

La composition protéique de différents intermédiaires du virus HSV-1 (virus entrant dans la cellule, virus associé au pore nucléaire, capsides intranucléaires, virus périnucléaire, capside relâchée par le noyau, virus associé au TGN, virus enveloppé post-TGN, virion extracellulaire, etc.) pourrait être comparée afin d'avoir un patron global de la constitution protéique du virus pour tout son processus de maturation.

## **Identification des protéines cellulaires associées aux capsides HSV-1 relâchées par le noyau**

L'analyse par spectrométrie de masse a également fourni une longue liste de protéines cellulaires (plus de 400) présentes dans les échantillons de capsides libérées durant l'essai *in vitro*. Cette piste initiale pourrait être utile pour identifier les facteurs cellulaires impliqués dans le processus de sortie nucléaire du virus HSV-1. Certaines de ces protéines ont déjà été choisies pour un nouveau projet en cours dans le laboratoire qui évalue l'impact de l'inhibition de leur expression sur la maturation du virus. Ce bloc est effectué en utilisant des ARNs d'interférence destinés à stopper l'expression de ces protéines cellulaires. Dans le cas où l'interférence aura un effet d'inhibition sur la relâche virale, le mécanisme du blocage sera étudié plus en détail et l'impact au niveau notamment de la sortie nucléaire du virus pourra être évalué.

## **Impact de la polarité cellulaire sur le rôle de PKD dans le transport de HSV-1**

Les expériences réalisées dans le cadre de l'article III ont été faites sur des cellules de type 143 B, qui sont des cellules humaines dérivées d'un ostéosarcome et non polarisées en culture cellulaire. Étant donné que la protéine kinase D est impliquée dans une relâche polarisée des vésicules à partir du TGN [426-428], il serait intéressant d'examiner l'impact de la polarité sur la relâche de HSV-1 et sa dépendance à la protéine kinase D. Certaines cellules cultivées en laboratoire peuvent être choisies pour leur capacité de maintenir leur polarité en culture (e.g. : cellules ARPE-19) ou bien la polarité d'autres lignées cellulaires peut être stimulée par différentes techniques telles que des microenvironnements rigoureusement contrôlés à l'aide de support perméable et de stimulations via des signaux

externes tels que des gradients de molécules de signalisation (*e. g.* : des chémoattractants), la lumière, l'application de forces mécaniques ou même de champs électriques [429]. De plus, l'implication de PKD vis-à-vis du transport du virus HSV-1 aurait aussi pu être analysée dans les cellules neuronales, qui sont aussi polarisées et susceptibles à l'infection par HSV-1. Le rôle de PKD dans le transport neuronal de HSV-1 pourrait apporter des faits nouveaux dans le débat incessant concernant le transport axonal du virus.

### **Analyse des différents isoformes de PKD**

La protéine PKD existe dans les cellules sous plusieurs formes. Chez l'humain, trois isoformes sont connus : PKD-1; PKD-2 et PKD3. Diverses fonctions ou même localisation dans la cellule ont déjà été attribuées à chacun des isoformes [430, 431]. Dans les cellules 143B, seulement un isoforme est retrouvé, ce qui a permis de simplifier l'analyse des résultats dans l'article III. Toutefois, puisque le patron d'expression des isoformes varie énormément d'une lignée cellulaire à une autre, il serait intéressant d'étudier la dynamique (*i.e.* redondance ou complémentarité) existant entre les trois isoformes, dans divers types cellulaires ainsi que les impacts des différents isoformes sur le transport du virus HSV-1.

### **Enrichissement de la transfection des ARNsi**

Un système qui permet de sélectionner uniquement les cellules avec la transfection adéquate de l'ARN d'interférence pourrait être développé. Alors que les ARNs d'interférence peuvent être directement appliqués aux cellules à transfecter sous forme d'ARN double brin dans les cellules, la transfection d'ARNsi peut aussi impliquer l'utilisation de vecteurs tels que des vecteurs plasmidiques, des vecteurs viraux (adénovirus, rétrovirus) ou encore des vecteurs oncorétroviraux [432-435]. L'utilisation de plasmides pour transfecter des ARNsi ouvre la porte à une méthode de sélection utile pour combiner la transfection et l'infection. Il s'agit de coordonner une transfection avec un plasmide incluant la séquence d'ARNsi désirée ainsi qu'une séquence complémentaire pour un gène viral essentiel à la réplication virale à une infection avec une souche virale mutante pour ce même gène viral. Donc le virus, pourra se multiplier uniquement dans les cellules qui auront été efficacement transfectées et donc qui expriment l'ARNsi voulu. Avec ce système, l'efficacité de transfection est grandement réduite à cause de l'utilisation du



plasmide comme vecteur de transfection, mais la spécificité est beaucoup plus grande, car uniquement les cellules transfectées peuvent être infectées.

Les ARNsi peuvent avoir des effets collatéraux qui touchent plusieurs cibles non désirées, ces effets nuisibles appelés « off-target » peuvent mener à des conclusions erronées [436]. Pour s'assurer que les effets observés sont réellement dus au blocage du gène d'intérêt, il est possible d'effectuer une expérience de « récupération ». Il faut réintroduire la protéine d'intérêt, par exemple PKD, en transfectant de nouveau les cellules avec l'ARNm visé par le système d'interférence. Toutefois, le gène transfecté doit être résistant au système des ARNsi. Cette résistance peut être supportée par une mutation silencieuse dans un codon situé dans le domaine de liaison à l'ARN d'interférence [437]. Il suffit ensuite d'observer si les effets du blocage causé par les ARNsi sont renversés par l'ajout de la protéine ciblée.

### **Propriétés de l'interaction HSV-1 / PKD**

Du point de vue virologique, suite à la découverte de l'emploi de la protéine cellulaire PKD par le virus HSV-1, il serait intéressant de mieux détailler cette interaction virus-hôte. Parmi les modes d'action suggérés, il y a : 1) un détournement ou « highjacking » de PKD par le virus pour utilisation strictement limitée au transport du virus ; 2) une coopération illimitée dans laquelle PKD continue de jouer toutes ses fonctions physiologiques en plus de servir au virus ou alors 3) une collaboration limitée et spécifique dans laquelle le virus restreint la fonction de PKD et permet uniquement certaines activités de la protéine PKD autres que celles directement liées au transport viral.

### **Rôle de PKD dans le transport des gros cargos**

Du point de vue de la biologie cellulaire, l'implication de PKD dans le transport de gros cargos suscite de nombreuses interrogations qui pourront servir de point de départ à de nombreux projets. Par exemple, il serait fascinant d'examiner si la formation de vésicules dépendante de PKD est aussi utilisée par d'autres cargos de grande taille (autres virus, chylomicrons, procollagène, etc.). Puisque les résultats présentés ici suggèrent l'emploi des vésicules générées par PKD par une variété de cargos, la question se pose à savoir si ces

multiples chargements co-utilisent les vésicules ou s'il y a une spécificité de vésicules selon le contenu qu'elles transportent. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en visualisant par microscopie électronique (MÉ) le contenu des vésicules en utilisant des techniques d'immuno-marquage pour identifier les petits cargos. L'immunofluorescence par microscopie photonique ou encore par vidéo-microscopie pourrait aussi s'avérer utile pour déterminer s'il y a colocalisation de divers cargos (par exemple le virus HSV-1 et une protéine VSV-G) dans une même vésicule.

## Conclusion

Cette thèse aura permis d'en connaître un peu plus sur le virus HSV-1 en détaillant brièvement ce qu'est le virus HSV-1 et en justifiant l'intérêt de poursuivre les recherches sur ce virus : sa haute séroprévalence à l'échelle mondiale ; une transmission aisée et sournoise attribuée à des hôtes souvent asymptomatiques ; une persistance permanente de l'infection grâce à la propriété de latence du virus et une carence en thérapie virucide efficace ; la possibilité de symptômes sérieux chez les personnes infectées (cécité, encéphalite, paralysie de Bell, maladie d'Alzheimer, aggravation des symptômes causés par d'autres infections virales, tels que le VIH, lors de coinfection) ; de même que les caractéristiques propres au virus HSV-1 qui en font un bon modèle expérimental pour approfondir les connaissances en virologie ainsi qu'en biologie cellulaire.

La présentation des résultats dans quatre articles développés dans le cadre des ces études de doctorat aura permis : 1) de développer un modèle empirique unique et pluripotent (l'essai *in vitro* mimiquant la sortie du virus HSV-1 du noyau de la cellule hôte infectée) ; 2) d'apporter des preuves solides appuyant le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement pour expliquer le transport du virus HSV-1 dans la cellule ; 3) de définir les étapes précoces de la tégumentation de HSV-1 en démontrant l'association des protéines virales U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37, ICP0, ICP4, ICP8, U<sub>L</sub>41 et U<sub>S</sub>3 dès la sortie nucléaire des capsides ; 4) d'établir pour la première fois le rôle de la protéine PKD dans le transport en aval du TGN du virus HSV-1 ; 5) de démontrer la diversité du rôle du TGN comme étant une station d'arrivée et de départ de plusieurs voies de transport intracellulaire.

Les quatre articles exposés auront également généré de multiples concepts pour des expérimentations futures notamment : l'identification de facteurs (viraux et cellulaires) ayant un rôle significatif dans le mécanisme de sortie nucléaire du virus; une caractérisation du rôle des téguments primaires au niveau de la sortie nucléaire du virus; une idée plus précise du rôle des protéines virales en déterminant le protéome des intermédiaires du virus HSV-1 représentant chacune des étapes du cycle viral; une définition bonifiée des interactions virus/hôte en étudiant le rôle des protéines cellulaires identifiées par spectrométrie de masse; une investigation plus poussée du rôle de la protéine PKD dans le transport de gros cargos autres que HSV-1; etc.

Les résultats présentés dans cette thèse de même que la recherche et l'évolution fulgurante des technologies en biologie cellulaire et moléculaire des dernières années ont permis d'accumuler des éclaircissements importants pour une meilleure compréhension du cycle viral du virus HSV-1. Ces recherches auront également permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents impliqués dans les différentes étapes de maturation des virus. Toutefois, plusieurs morceaux de casse-tête sont manquants et la recherche concernant le virus HSV-1 doit poursuivre la cueillette d'informations essentielles qui pourra permettre la découverte de nouveaux médicaments antiviraux capables d'éliminer définitivement le virus [284, 294, 438, 439], le développement d'un vaccin antiherpétique sécuritaire et efficace [440, 441] de même que la construction de vecteurs dérivés de HSV et servant de traitements par thérapie génique contre certaines pathologies systémiques [442-448].

## Bibliographie

1. Hamilton, R., *The herpes book*. J. P. Tarcher ed. 1980, Los Angeles: St-Martin Press. 206 p.
2. Cartwright, F.F. and M.D. Biddiss, *Disease and History*, ed. Crowell. 1972. 247 p.
3. Garzetti, A., *From Tiberius to the Antonines. A history of the roman empire AD 14-192*. Part I: The Julio-Claudian dynasty / I-Tiberius, ed. M.a.C. LTD. 1974, London: Taylor & Francis. 861 p.
4. Rosenbaum, J., *Histoire de la syphilis dans l'antiquité*. , ed. N.J. Gregoir. 1847, Bruxelles. 344 p.
5. Shakespeare, W., *Romeo and Juliet*. Acte 1 scène IV. 1597-1599.
6. Stanberry, L.R., *Understanding Herpes*, ed. U.P.o. Mississippi. 1998, Jackson. 116 p.
7. Evans, A.S. and R.A. Kaslow, *Viral infections of humans: epidemiology and control, 4th edition*, ed. Springer. 1997. 1078 p.
8. Nandi, S., et al., *Bovine herpes virus infections in cattle*. Anim Health Res Rev, 2009. **10**(1): p. 85-98.
9. Pomeranz, L.E., A.E. Reynolds, and C.J. Hengartner, *Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine*. Microbiol Mol Biol Rev, 2005. **69**(3): p. 462-500.
10. Pusterla, N., et al., *Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: a review of recent developments*. Vet J, 2009. **180**(3): p. 279-89.
11. Sakulwira, K., et al., *Orangutan herpesvirus*. J Med Primatol, 2004. **33**(1): p. 25-9.
12. Sauvage, C., et al., *Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR*. Virus Res, 2009. **142**(1-2): p. 181-7.
13. Burgos, J.S., et al., *Zebrafish as a new model for herpes simplex virus type 1 infection*. Zebrafish, 2008. **5**(4): p. 323-33.
14. Davison, A.J., et al., *The order Herpesvirales*. Arch Virol, 2009. **154**(1): p. 171-7.
15. Fatahzadeh, M. and R.A. Schwartz, *Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management*. J Am Acad Dermatol, 2007. **57**(5): p. 737-63; quiz 764-6.
16. Arduino, P.G. and S.R. Porter, *Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(2): p. 107-21.
17. Fatahzadeh, M. and R.A. Schwartz, *Human herpes simplex labialis*. Clin Exp Dermatol, 2007. **32**(6): p. 625-30.
18. Swearingen, J.A. and S.K. Ailor, *Herpes simplex virus: it's more than a cold sore*. Mo Med, 2007. **104**(2): p. 144-8.
19. Jensen, H.L., *Herpes simplex virus type 1 morphogenesis and virus-cell interactions: significance of cytoskeleton and methodological aspects*. APMIS Suppl, 2006(119): p. 7-55.

20. McGeoch, D.J., et al., *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol, 1988. **69**(Pt 7): p. 1531-74.
21. Weller, S.K., et al., *Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(5): p. 930-42.
22. Stow, N.D. and E.C. McMonagle, *Characterization of the TRS/IRS origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1*. Virology, 1983. **130**(2): p. 427-38.
23. Polvino-Bodnar, M., P.K. Orberg, and P.A. Schaffer, *Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice*. J Virol, 1987. **61**(11): p. 3528-35.
24. Igarashi, K., et al., *Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2123-32.
25. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 347-84.
26. Bowman, B.R., et al., *Structure of the herpesvirus major capsid protein*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 757-65.
27. Wingfield, P.T., et al., *Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 8955-61.
28. Cardone, G., et al., *Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography*. Virology, 2007. **361**(2): p. 426-34.
29. Newcomb, W.W., et al., *The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10923-32.
30. Cheng, N., et al., *Handedness of the herpes simplex virus capsid and procapsid*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7855-9.
31. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation*. J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 432-46.
32. Steven, A.C., et al., *Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(2): p. 227-36.
33. Sherman, G. and S.L. Bachenheimer, *Characterization of intranuclear capsids made by ts morphogenic mutants of HSV-1*. Virology, 1988. **163**(2): p. 471-80.
34. Trus, B.L., et al., *Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 479-89.
35. Homa, F.L. and J.C. Brown, *Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus*. Rev Med Virol, 1997. **7**(2): p. 107-122.
36. Roos, W.H., et al., *Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9673-8.
37. Perdue, M.L., et al., *Biochemical studies of the maturation of herpesvirus nucleocapsid species*. Virology, 1976. **74**(1): p. 194-208.
38. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
39. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Res, 2009.
40. Schlegel, E.F. and J.A. Blaho, *A conserved carboxy-terminal domain in the major tegument structural protein VP22 facilitates virion packaging of a chimeric protein*

- during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virology*, 2009. **387**(2): p. 449-58.
41. Yamauchi, Y., et al., *The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 is required for efficient nuclear transport of the alpha transinducing factor VP16 and viral capsids*. *J Virol*, 2008. **82**(3): p. 1094-106.
  42. Mukhopadhyay, A., G.E. Lee, and D.W. Wilson, *The amino terminus of the herpes simplex virus 1 protein Vhs mediates membrane association and tegument incorporation*. *J Virol*, 2006. **80**(20): p. 10117-27.
  43. Shanda, S.K. and D.W. Wilson, *UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules*. *J Virol*, 2008. **82**(15): p. 7388-94.
  44. Ye, G.J., et al., *The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane*. *J Virol*, 2000. **74**(3): p. 1355-63.
  45. Kato, A., et al., *Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31*. *J Virol*, 2006. **80**(3): p. 1476-86.
  46. Sanfilippo, C.M. and J.A. Blaho, *ICP0 gene expression is a herpes simplex virus type 1 apoptotic trigger*. *J Virol*, 2006. **80**(14): p. 6810-21.
  47. Roberts, A.P., et al., *Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1*. *J Virol*, 2009. **83**(1): p. 105-16.
  48. Murphy, M.A., et al., *The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids*. *Virology*, 2008. **376**(2): p. 279-89.
  49. Mou, F., E. Wills, and J.D. Baines, *Phosphorylation of the UL31 protein of herpes simplex virus 1 by the US3 encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids*. *J Virol*, 2009. **83**(10): p. 5181-91.
  50. Sagou, K., et al., *Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis*. *J Virol*, 2009. **83**(11): p. 5773-83.
  51. Morimoto, T., et al., *Differences in the Regulatory and Functional Effects of the Us3 Protein Kinase Activities of Herpes Simplex Virus 1 and 2*. *J Virol*, 2009.
  52. Tanaka, M., et al., *The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of UL41 and ICP0*. *Virology*, 2005. **341**(2): p. 301-12.
  53. Cook, W.J., et al., *Regulation of neighboring gene expression by the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene*. *Virology*, 1996. **218**(1): p. 193-203.
  54. Schlieker, C., et al., *A deubiquitinating activity is conserved in the large tegument protein of the herpesviridae*. *J Virol*, 2005. **79**(24): p. 15582-5.
  55. Kattenhorn, L.M., et al., *A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae*. *Mol Cell*, 2005. **19**(4): p. 547-57.
  56. Everett, R.D., M.L. Parsy, and A. Orr, *Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes*. *J Virol*, 2009. **83**(10): p. 4963-77.

57. Bergman, A.C., P.O. Nyman, and G. Larsson, *Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1*. FEBS Lett, 1998. **441**(2): p. 327-30.
58. Stylianou, J., et al., *Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5204-18.
59. Lee, J.H., et al., *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1*. Virology, 2008. **378**(2): p. 347-54.
60. Desai, P., et al., *Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11354-61.
61. O'Regan, K.J., et al., *A conserved region of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 facilitates interaction with the cytoplasmic tail of glycoprotein E (gE)*. Virology, 2007. **358**(1): p. 192-200.
62. Meckes, D.G., Jr. and J.W. Wills, *Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 13028-36.
63. Coller, K.E., et al., *The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 11790-7.
64. Diefenbach, R.J., et al., *Transport and egress of herpes simplex virus in neurons*. Rev Med Virol, 2008. **18**(1): p. 35-51.
65. Darlington, R.W. and L.H.d. Moss, *Herpesvirus envelopment*. J Virol, 1968. **2**(1): p. 48-55.
66. Sanchez, V., E. Sztul, and W.J. Britt, *Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3842-51.
67. Roffman, E., et al., *Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 6308-13.
68. Nozawa, N., et al., *Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly*. Exp Cell Res, 2004. **299**(2): p. 486-97.
69. Calistri, A., et al., *Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies*. J Virol, 2007. **81**(20): p. 11468-78.
70. Crump, C.M., C. Yates, and T. Minson, *Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7380-7.
71. Harley, C.A., A. Dasgupta, and D.W. Wilson, *Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1236-1251.
72. Fraile-Ramos, A., et al., *Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes*. Traffic, 2002. **3**(3): p. 218-32.
73. Brunetti, C.R., et al., *Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3330-9.
74. Foster, T.P., V.N. Chouljenko, and K.G. Kousoulas, *Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6310-23.

75. Gershon, A.A., et al., *Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6372-90.
76. Komuro, M., M. Tajima, and K. Kato, *Transformation of Golgi membrane into the envelope of herpes simplex virus in rat anterior pituitary cells*. Eur J Cell Biol, 1989. **50**(2): p. 398-406.
77. Sugimoto, K., et al., *Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5198-211.
78. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
79. Farnsworth, A. and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-cell spread*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3167-79.
80. van Genderen, I.L., et al., *The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei*. Virology, 1994. **200**(2): p. 831-6.
81. Seymour, Stanton, and Block, *Disinfection, sterilization, and preservation*. 5th edition ed. Viral inactivation (Deforest and Klain 1963), ed. L.W. Wilkins. 2001, Philadelphia: Lea & Febiger. 1481 p.
82. Aghaie, A., et al., *Inactivation of virus in intravenous immunoglobulin G using solvent/detergent treatment and pasteurization*. Hum Antibodies, 2008. **17**(3-4): p. 79-84.
83. Mikloska, Z. and A.L. Cunningham, *Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes*. J Gen Virol, 1998. **79**(Pt 2): p. 353-61.
84. Johnson, R.M., et al., *A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I*. J Immunol, 1992. **148**(4): p. 983-8.
85. Forrester, A.J., et al., *Induction of protective immunity with antibody to herpes simplex virus type 1 glycoprotein H (gH) and analysis of the immune response to gH expressed in recombinant vaccinia virus*. J Gen Virol, 1991. **72**(Pt 2): p. 369-75.
86. Browne, H., V. Baxter, and T. Minson, *Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol, 1993. **74**(Pt 12): p. 2813-7.
87. Spear, P.G., *Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry*. Cell Microbiol, 2004. **6**(5): p. 401-10.
88. Reske, A., et al., *Understanding HSV-1 entry glycoproteins*. Rev Med Virol, 2007. **17**(3): p. 205-15.
89. Heldwein, E.E. and C. Krummenacher, *Entry of herpesviruses into mammalian cells*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1653-68.
90. Wisner, T.W., et al., *Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3115-26.



91. Wright, C.C., et al., *Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB*. J Virol, 2009.
92. Baines, J.D., et al., *Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 800-12.
93. Wittels, M. and P.G. Spear, *Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway*. Virus Res, 1991. **18**(2-3): p. 271-90.
94. Koyama, A.H. and T. Uchida, *The mode of entry of herpes simplex virus type 1 into Vero cells*. Microbiol Immunol, 1987. **31**(2): p. 123-30.
95. Lycke, E., et al., *Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study*. Arch Virol, 1988. **101**(1-2): p. 87-104.
96. Nicola, A.V., A.M. McEvoy, and S.E. Straus, *Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5324-32.
97. Nicola, A.V., et al., *Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7609-16.
98. Milne, R.S., et al., *Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6655-63.
99. Laquerre, S., et al., *Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 6119-30.
100. Herold, B.C., et al., *Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B*. J Gen Virol, 1994. **75**(Pt 6): p. 1211-22.
101. Shieh, M.T., et al., *Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans*. J Cell Biol, 1992. **116**(5): p. 1273-81.
102. Herold, B.C., et al., *Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1090-8.
103. Geraghty, R.J., et al., *Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1618-20.
104. Montgomery, R.I., et al., *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-36.
105. Shukla, D., et al., *A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry*. Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
106. Turner, A., et al., *Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 873-5.
107. Pertel, P.E., et al., *Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gB, gD, and gH-gL Requires a gD Receptor but Not Necessarily Heparan Sulfate*. Virology, 2001. **279**(1): p. 313-324.
108. Muggeridge, M.I., *Characterization of cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus 2 glycoproteins gB, gD, gH and gL in transfected cells*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 8): p. 2017-27.

109. Alwine, J.C., W.L. Steinhart, and C.W. Hill, *Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells*. Virology, 1974. **60**(1): p. 302-7.
110. Batterson, W. and B. Roizman, *Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes*. J Virol, 1983. **46**(2): p. 371-7.
111. Whitley, R.J., *Herpes Simplex Viruses*. 2 ed. Virology, ed. B.N. Fields and D.M. Knipe. Vol. 2. 1990, New York: Raven Press. 2336.
112. Pizer, L.I., et al., *Regulation of transcription in vitro from herpes simplex virus genes*. J Virol, 1986. **60**(3): p. 950-9.
113. Leopardi, R., N. Michael, and B. Roizman, *Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 3042-8.
114. Smiley, J.R., M.M. Elgadi, and H.A. Saffran, *Herpes simplex virus vhs protein*. Methods Enzymol, 2001. **342**: p. 440-51.
115. Elgadi, M.M., C.E. Hayes, and J.R. Smiley, *The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7153-64.
116. Sandri-Goldin, R.M., *The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 5241-56.
117. Durand, L.O., et al., *The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6757-62.
118. Advani, S.J., et al., *The disappearance of cyclins A and B and the increase in activity of the G(2)/M-phase cellular kinase cdc2 in herpes simplex virus 1- infected cells require expression of the alpha22/U(S)1.5 and U(L)13 viral genes*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 8-15.
119. Advani, S.J., R.R. Weichselbaum, and B. Roizman, *E2F proteins are posttranslationally modified concomitantly with a reduction in nuclear binding activity in cells infected with herpes simplex virus 1*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 7842-50.
120. Wysocka, J. and W. Herr, *The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 294-304.
121. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. Virus Res, 2006. **117**(1): p. 90-104.
122. Baines, J.D. and S.K. Weller, *Cleavage and packaging of herpes simplex virus 1 DNA*. Vira genome packaging machines: genetics, structures and mechanism., ed. C.E. Catalano. 2005: Landes Biosciences.
123. Mesyanzhinov, V.V., *Bacteriophage T4: structure, assembly, and initiation infection studied in three dimensions*. Adv Virus Res, 2004. **63**: p. 287-352.
124. Hendrix, R.W., *Bacteriophage HK97: assembly of the capsid and evolutionary connections*. Adv Virus Res, 2005. **64**: p. 1-14.
125. Newcomb, W.W., et al., *Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6059-63.

126. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4239-50.
127. Beard, P.M. and J.D. Baines, *The DNA cleavage and packaging protein encoded by the UL33 gene of herpes simplex virus 1 associates with capsids*. Virology, 2004. **324**(2): p. 475-82.
128. Beard, P.M., N.S. Taus, and J.D. Baines, *DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 4785-91.
129. Higgs, M.R., V.G. Preston, and N.D. Stow, *The UL15 protein of herpes simplex virus type 1 is necessary for the localization of the UL28 and UL33 proteins to viral DNA replication centres*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 7): p. 1709-15.
130. Yang, K., E. Wills, and J.D. Baines, *The putative leucine zipper of the UL6-encoded portal protein of herpes simplex virus 1 is necessary for interaction with pUL15 and pUL28 and their association with capsids*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4557-64.
131. Yang, K. and J.D. Baines, *Proline and tyrosine residues in scaffold proteins of herpes simplex virus 1 critical to the interaction with portal protein and its incorporation into capsids*. J Virol, 2009.
132. Beilstein, F., M.R. Higgs, and N.D. Stow, *Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL33*. J Virol, 2009.
133. Fuchs, W., et al., *Characterization of pseudorabies virus (PrV) cleavage-encapsidation proteins and functional complementation of PrV pUL32 by the homologous protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3930-43.
134. Cockrell, S.K., et al., *Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 47-57.
135. Wills, E., L. Scholtes, and J.D. Baines, *Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10894-9.
136. Thurlow, J.K., et al., *Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2118-26.
137. Lamberti, C. and S.K. Weller, *The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2463-73.
138. Chang, Y.E., A.P. Poon, and B. Roizman, *Properties of the protein encoded by the UL32 open reading frame of herpes simplex virus 1*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3938-46.
139. Jacobson, J.G., et al., *Linker insertion mutations in the herpes simplex virus type 1 UL28 gene: effects on UL28 interaction with UL15 and UL33 and identification of a second-site mutation in the UL15 gene that suppresses a lethal UL28 mutation*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12312-23.
140. Yang, K. and J.D. Baines, *The putative terminase subunit of herpes simplex virus 1 encoded by UL28 is necessary and sufficient to mediate interaction between pUL15 and pUL33*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5733-9.
141. Luxton, G.W., et al., *Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5832-7.

142. Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius, *Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus*. J Cell Biol, 1997. **136**(5): p. 1007-21.
143. Granzow, H., B.G. Klupp, and T.C. Mettenleiter, *Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 3200-5.
144. Wolfstein, A., et al., *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-37.
145. Luxton, G.W., et al., *The Pseudorabies Virus VP1/2 Tegument Protein Is Required for Intracellular Capsid Transport*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 201-9.
146. Mohl, B.S., et al., *Intracellular Localization of the Pseudorabies Virus Large Tegument Protein pUL36*. J Virol, 2009.
147. Batterson, W., D. Furlong, and B. Roizman, *Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle*. J Virol, 1983. **45**(1): p. 397-407.
148. Ojala, P.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4922-31.
149. Copeland, A.M., W.W. Newcomb, and J.C. Brown, *Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1660-8.
150. Padeloup, D., et al., *Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6610-23.
151. Shahin, V., et al., *The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 1): p. 23-30.
152. Newcomb, W.W., F.P. Booy, and J.C. Brown, *Uncoating the herpes simplex virus genome*. J Mol Biol, 2007. **370**(4): p. 633-42.
153. Kuhn, J., et al., *Partial functional complementation of a pseudorabies virus UL25 deletion mutant by herpes simplex virus type 1 pUL25 indicates overlapping functions of alphaherpesvirus pUL25 proteins*. J Virol, 2008. **82**(12): p. 5725-34.
154. Jovasevic, V., L. Liang, and B. Roizman, *Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for the release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus*. J Virol, 2008.
155. Newcomb, W.W., et al., *Polarized DNA Ejection from the Herpesvirus Capsid*. J Mol Biol, 2009.
156. Stackpole, C.W., *Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature*. J Virol, 1969. **4**(1): p. 75-93.
157. Mettenleiter, T.C., T. Minson, and P. Wild, *Egress of alphaherpesviruses*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1610-2.
158. Skepper, J.N., et al., *Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5697-702.
159. Wild, P., et al., *Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 1071-83.

160. Leuzinger, H., et al., *Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 13047-59.
161. Enquist, L.W., et al., *Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system*. Vet Microbiol, 2002. **86**(1-2): p. 5-16.
162. LaVail, J.H., et al., *Axonal transport and sorting of herpes simplex virus components in a mature mouse visual system*. J Virol, 2003. **77**(11): p. 6117-26.
163. LaVail, J.H., et al., *Viral regulation of the long distance axonal transport of herpes simplex virus nucleocapsid*. Neuroscience, 2007. **146**(3): p. 974-85.
164. Miranda-Saksena, M., et al., *In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9934-51.
165. Saksena, M.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3592-606.
166. Snyder, A., T.W. Wisner, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11165-77.
167. Tomishima, M.J. and L.W. Enquist, *In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8310-7.
168. Miranda-Saksena, M., et al., *Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3187-99.
169. Antinone, S.E. and G.A. Smith, *Two modes of herpesvirus trafficking in neurons: membrane acquisition directs motion*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11235-40.
170. Ch'ng, T.H. and L.W. Enquist, *Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 10875-89.
171. Coller, K.E. and G.A. Smith, *Two viral kinases are required for sustained long distance axon transport of a neuroinvasive herpesvirus*. Traffic, 2008. **9**(9): p. 1458-70.
172. Del Rio, T., et al., *Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3903-19.
173. Feierbach, B., et al., *In vitro analysis of transneuronal spread of an alphaherpesvirus infection in peripheral nervous system neurons*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 6846-57.
174. Melancon, J.M., P.A. Fulmer, and K.G. Kousoulas, *The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment*. Virol J, 2007. **4**: p. 120.
175. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
176. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
177. Enquist, L.W., et al., *Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system*. Adv Virus Res, 1999. **51**: p. 237-347.
178. Lachmann, R., *Herpes simplex virus latency*. Expert Rev Mol Med, 2003. **5**(29): p. 1-14.

179. Efsthathiou, S. and C.M. Preston, *Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency*. *Virus Res*, 2005. **111**(2): p. 108-19.
180. Steiner, I., P.G. Kennedy, and A.R. Pachner, *The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster*. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(11): p. 1015-28.
181. Mador, N., et al., *Expression and splicing of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 in neuronal and non-neuronal cell lines*. *J Biochem*, 1995. **117**(6): p. 1288-97.
182. Mellerick, D.M. and N.W. Fraser, *Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state*. *Virology*, 1987. **158**(2): p. 265-75.
183. Arthur, J.L., et al., *Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro*. *J Virol*, 2001. **75**(8): p. 3885-95.
184. Kubat, N.J., et al., *The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12508-18.
185. Efsthathiou, S., et al., *Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans*. *J Virol*, 1986. **57**(2): p. 446-55.
186. Thompson, R.L., C.M. Preston, and N.M. Sawtell, *De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(3): p. e1000352.
187. LaBoissiere, S., S. Walker, and P. O'Hare, *Concerted activity of host cell factor subregions in promoting stable VP16 complex assembly and preventing interference by the acidic activation domain*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(12): p. 7108-18.
188. Kristie, T.M., J.L. Vogel, and A.E. Sears, *Nuclear localization of the CI factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1229-33.
189. Wagner, E.K., et al., *Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons*. *J Virol*, 1988. **62**(4): p. 1194-202.
190. Goldenberg, D., et al., *Tissue specific distribution of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts on polyribosomes during latent infection*. *J Neurovirol*, 1998. **4**(4): p. 426-32.
191. Goldenberg, D., et al., *The abundant latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 are bound to polyribosomes in cultured neuronal cells and during latent infection in mouse trigeminal ganglia*. *J Virol*, 1997. **71**(4): p. 2897-904.
192. Thompson, R.L. and N.M. Sawtell, *HSV latency-associated transcript and neuronal apoptosis*. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1651.
193. Mador, N., et al., *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line*. *J Virol*, 1998. **72**(6): p. 5067-75.
194. Farrell, M.J., A.T. Dobson, and L.T. Feldman, *Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 790-4.

195. Cai, W. and P.A. Schaffer, *A cellular function can enhance gene expression and plating efficiency of a mutant defective in the gene for ICP0, a transactivating protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4078-90.
196. Loiacono, C.M., N.S. Taus, and W.J. Mitchell, *The herpes simplex virus type 1 ICP0 promoter is activated by viral reactivation stimuli in trigeminal ganglia neurons of transgenic mice*. J Neurovirol, 2003. **9**(3): p. 336-45.
197. Jordan, R., J. Pepe, and P.A. Schaffer, *Characterization of a nerve growth factor-inducible cellular activity that enhances herpes simplex virus type 1 gene expression and replication of an ICP0 null mutant in cells of neural lineage*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5373-82.
198. Yang, W.C., et al., *General and specific alterations in programming of global viral gene expression during infection by VP16 activation-deficient mutants of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 12758-74.
199. van Leeuwen, H., et al., *Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2501-10.
200. McGeoch, D.J., et al., *Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses*. J Mol Biol, 1995. **247**(3): p. 443-58.
201. Kurt-Jones, E.A., et al., *Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1315-20.
202. Finberg, R.W., D.M. Knipe, and E.A. Kurt-Jones, *Herpes simplex virus and toll-like receptors*. Viral Immunol, 2005. **18**(3): p. 457-65.
203. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
204. Torseth, J.W. and T.C. Merigan, *Significance of local gamma interferon in recurrent herpes simplex infection*. J Infect Dis, 1986. **153**(5): p. 979-84.
205. Mikloska, Z. and A.L. Cunningham, *Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 2): p. 353-61.
206. Koelle, D.M., et al., *Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1500-8.
207. Pasieka, T.J., R.F. Woolson, and C. Grose, *Viral induced fusion and syncytium formation: measurement by the Kolmogorov-Smirnov statistical test*. J Virol Methods, 2003. **111**(2): p. 157-61.
208. Pertel, P.E. and P.G. Spear, *Modified entry and syncytium formation by herpes simplex virus type 1 mutants selected for resistance to heparin inhibition*. Virology, 1996. **226**(1): p. 22-33.
209. Davis-Poynter, N., et al., *Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7586-90.
210. Bond, V.C., S. Person, and S.C. Warner, *The isolation and characterization of mutants of herpes simplex virus type 1 that induce cell fusion*. J Gen Virol, 1982. **61**(Pt 2): p. 245-54.
211. Jin, H., et al., *The gamma 1 34.5 protein of herpes simplex virus 1 is required to interfere with dendritic cell maturation during productive infection*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4984-94.

212. Cunningham, A.L., F. Carbone, and T.B. Geijtenbeek, *Langerhans cells and viral immunity*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2377-85.
213. Novak, N. and W.M. Peng, *Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 405-10.
214. Shen, W., et al., *Two small RNAs encoded within the first 1.5 kb of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) can inhibit productive infection, and cooperate to inhibit apoptosis*. J Virol, 2009.
215. Han, J.Y., et al., *Cell type-specific induction and inhibition of apoptosis by Herpes Simplex virus type 2 ICP10*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2765-9.
216. Aubert, M., et al., *The antiapoptotic herpes simplex virus glycoprotein J localizes to multiple cellular organelles and induces reactive oxygen species formation*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 617-29.
217. Benetti, L. and B. Roizman, *In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10242-8.
218. Pasiaka, T.J., et al., *Herpes simplex virus virion host shutoff attenuates establishment of the antiviral state*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5527-35.
219. Eisemann, J., et al., *Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway*. Immunobiology, 2007. **212**(9-10): p. 877-86.
220. Leib, D.A., *Counteraction of interferon-induced antiviral responses by herpes simplex viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **269**: p. 171-85.
221. Lubinski, J., T. Nagashunmugam, and H.M. Friedman, *Viral interference with antibody and complement*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(3): p. 329-37.
222. Aisenbrey, C., et al., *Structure and dynamics of membrane-associated ICP47, a viral inhibitor of the MHC I antigen-processing machinery*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30365-72.
223. Oosten, L.E., et al., *TAP-inhibiting proteins US6, ICP47 and UL49.5 differentially affect minor and major histocompatibility antigen-specific recognition by cytotoxic T lymphocytes*. Int Immunol, 2007. **19**(9): p. 1115-22.
224. Lubinski, J., et al., *In vivo role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1637-46.
225. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
226. Hofemeister, H. and P. O'Hare, *Nuclear pore composition and gating in herpes simplex virus-infected cells*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8392-9.
227. Corcoran, J.A., W.L. Hsu, and J.R. Smiley, *Herpes simplex virus ICP27 is required for virus-induced stabilization of the ARE-containing IEX-1 mRNA encoded by the human IER3 gene*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9720-9.
228. Parkinson, J., S.P. Lees-Miller, and R.D. Everett, *Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 650-7.
229. Everett, R.D., et al., *The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6581-91.



230. Chelbi-Alix, M.K. and H. de The, *Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins*. *Oncogene*, 1999. **18**(4): p. 935-41.
231. Boutell, C., S. Sadis, and R.D. Everett, *Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro*. *J Virol*, 2002. **76**(2): p. 841-50.
232. Beard, P., et al., *Herpes simplex virus immediate early infected-cell polypeptide 4 binds to DNA and promotes transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(11): p. 4016-20.
233. Nguyen-Huynh, A.T. and P.A. Schaffer, *Cellular transcription factors enhance herpes simplex virus type 1 oriS-dependent DNA replication*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 3635-45.
234. Smith, C.A., et al., *ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB*. *J Virol*, 1993. **67**(8): p. 4676-87.
235. Rice, S.A., et al., *Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program*. *J Virol*, 1995. **69**(9): p. 5550-9.
236. Antrobus, R., et al., *Proteomic analysis of cells in the early stages of herpes simplex virus type-1 infection reveals widespread changes in the host cell proteome*. *Proteomics*, 2009. **9**(15): p. 3913-3927.
237. Lindberg, A. and J.P. Kreivi, *Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27*. *Virology*, 2002. **294**(1): p. 189-98.
238. Bryant, H.E., et al., *Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step*. *J Virol*, 2001. **75**(9): p. 4376-85.
239. Mou, F., T. Forest, and J.D. Baines, *US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells*. *J Virol*, 2007. **81**(12): p. 6459-70.
240. Bjerke, S.L. and R.J. Roller, *Roles for herpes simplex virus type 1 U(L)34 and U(S)3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress*. *Virology*, 2006. **347**(2): p. 261-76.
241. Martin, T.E., et al., *Redistribution of nuclear ribonucleoprotein antigens during herpes simplex virus infection*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(5): p. 2069-82.
242. Wadd, S., et al., *The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(41): p. 28991-8.
243. Cano-Monreal, G.L., et al., *Herpes simplex virus 2 UL13 protein kinase disrupts nuclear lamins*. *Virology*, 2009.
244. Dienes, H.P., et al., *Microtubules and intermediate filaments of herpes simplex virus infected cells*. *Arch Virol*, 1987. **94**(1-2): p. 15-28.
245. Lee, G.E., et al., *Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro*. *J Virol*, 2006. **80**(9): p. 4264-75.
246. Morris, J.B., H. Hofmeister, and P. O'Hare, *Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein*. *J Virol*, 2007. **81**(9): p. 4429-37.

247. Feierbach, B., et al., *Alpha-Herpesvirus Infection Induces the Formation of Nuclear Actin Filaments*. PLoS Pathog, 2006. **2**(8).
248. Koshizuka, T., Y. Kawaguchi, and Y. Nishiyama, *Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 3): p. 527-33.
249. Van Minnebruggen, G., et al., *Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 9074-80.
250. Rosenthal, K.S., D. Roess, and B.G. Barisas, *Herpes simplex virus type 1 penetration initiates mobilization of cell surface proteins*. Biochim Biophys Acta, 1988. **942**(1): p. 38-44.
251. Hoppe, S., et al., *Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 12): p. 3483-94.
252. Rosenthal, K.S., R. Perez, and C. Hodnichak, *Inhibition of herpes simplex virus type 1 penetration by cytochalasins B and D*. J Gen Virol, 1985. **66** ( Pt 7): p. 1601-5.
253. Falke, D., *Herpes simplex virus and the cytoskeleton*. Trends Microbiol, 1997. **5**(8): p. 306.
254. Sodeik, B., *Mechanisms of viral transport in the cytoplasm*. Trends Microbiol, 2000. **8**(10): p. 465-72.
255. Avitabile, E., et al., *Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7472-82.
256. Ward, P.L., et al., *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, 1998. **241**(2): p. 189-99.
257. Simpson-Holley, M., et al., *Herpes simplex virus 1 UL31 and UL34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5591-600.
258. Reynolds, A.E., et al., *Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8939-52.
259. Martinez-Moreno, M., et al., *Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique*. FEBS Lett, 2003. **544**(1-3): p. 262-7.
260. Forest, T., S. Barnard, and J.D. Baines, *Active intranuclear movement of herpesvirus capsids*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 429-31.
261. Wills, E., F. Mou, and J.D. Baines, *The UL31 and UL34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4800-9.
262. Simpson-Holley, M., et al., *Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12840-51.
263. Leach, N., et al., *Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10792-803.

264. Park, R. and J.D. Baines, *Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 494-504.
265. Mabit, H., et al., *Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9962-71.
266. Kreitzer, G., et al., *Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 125-7.
267. Martin, A., et al., *Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 4961-70.
268. Kotsakis, A., et al., *Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8697-711.
269. Elliott, G. and P. O'Hare, *Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6448-55.
270. Elliott, G. and P. O'Hare, *Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein*. Cell, 1997. **88**(2): p. 223-33.
271. Benboudjema, L., et al., *Association of the herpes simplex virus type 1 Us11 gene product with the cellular kinesin light-chain-related protein PAT1 results in the redistribution of both polypeptides*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9192-203.
272. Diefenbach, R.J., et al., *Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3282-91.
273. Dohner, K., C.H. Nagel, and B. Sodeik, *Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins*. Trends Microbiol, 2005. **13**(7): p. 320-7.
274. Snyder, A., K. Polcicova, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10613-24.
275. Grunewald, K., et al., *Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography*. Science, 2003. **302**(5649): p. 1396-8.
276. Johannsen, E., et al., *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16286-91.
277. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
278. Kattenhorn, L.M., et al., *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11187-97.
279. Wong, M.L. and C.H. Chen, *Evidence for the internal location of actin in the pseudorabies virion*. Virus Res, 1998. **56**(2): p. 191-7.
280. Zhu, F.X., et al., *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 800-11.
281. Howard, M., et al., *Regional distribution of antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 in men and women in Ontario, Canada*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 84-9.
282. Stock, C., et al., *Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations*. Eur J Epidemiol, 2001. **17**(9): p. 885-90.

283. Looker, K.J. and G.P. Garnett, *A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2*. Sex Transm Infect, 2005. **81**(2): p. 103-7.
284. Wilson, S.S., E. Fakioglu, and B.C. Herold, *Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(5): p. 559-68.
285. Roberts, C., *Genital herpes in young adults: changing sexual behaviours, epidemiology and management*. Herpes, 2005. **12**(1): p. 10-4.
286. Lafferty, W.E., et al., *Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention*. J Infect Dis, 2000. **181**(4): p. 1454-7.
287. Kameyama, T., et al., *Shedding of herpes simplex virus type 1 into saliva*. J Oral Pathol, 1988. **17**(9-10): p. 478-81.
288. Birmanns, B., I. Reibstein, and I. Steiner, *Characterization of an in vivo reactivation model of herpes simplex virus from mice trigeminal ganglia*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 11): p. 2487-91.
289. Shulman, J.D., *Recurrent herpes labialis in US children and youth*. Community Dent Oral Epidemiol, 2004. **32**(6): p. 402-9.
290. Naesens, L. and E. De Clercq, *Recent developments in herpesvirus therapy*. Herpes, 2001. **8**(1): p. 12-6.
291. Crute, J.J., et al., *Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 386-91.
292. Kleymann, G., et al., *New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 392-8.
293. Pope, L.E., et al., *The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process*. Antiviral Res, 1998. **40**(1-2): p. 85-94.
294. Billaud, G., D. Thouvenot, and F. Morfin, *Drug targets in herpes simplex and Epstein Barr Virus infections*. Infect Disord Drug Targets, 2009. **9**(2): p. 117-25.
295. Lolis, M.S., et al., *Drug-resistant herpes simplex virus in HIV infected patients*. Acta Dermatovenerol Croat, 2008. **16**(4): p. 204-8.
296. Greco, A., et al., *S-adenosyl methionine decarboxylase activity is required for the outcome of herpes simplex virus type 1 infection and represents a new potential therapeutic target*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1128-30.
297. Labetoulle, M., et al., *Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(9): p. 2600-6.
298. Liesegang, T.J., *Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance*. Cornea, 2001. **20**(1): p. 1-13.
299. Toma, H.S., et al., *Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease*. Semin Ophthalmol, 2008. **23**(4): p. 249-73.
300. McGhee, C.N., S. Dean, and H. Danesh-Meyer, *Locally administered ocular corticosteroids: benefits and risks*. Drug Saf, 2002. **25**(1): p. 33-55.
301. Carnahan, M.C. and D.A. Goldstein, *Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids*. Curr Opin Ophthalmol, 2000. **11**(6): p. 478-83.
302. Whitley, R.J., et al., *Herpes simplex encephalitis. Clinical Assessment*. JAMA, 1982. **247**(3): p. 317-20.
303. Baringer, J.R., *Herpes simplex infections of the nervous system*. Neurol Clin, 2008. **26**(3): p. 657-74, viii.

304. Murakami, S., et al., *Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle*. Ann Intern Med, 1996. **124**(1 Pt 1): p. 27-30.
305. Furuta, Y., et al., *Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy*. J Med Virol, 1998. **54**(3): p. 162-6.
306. *Société Alzheimer Canada - <http://www.alzheimer.ca/>*. 2009.
307. Itzhaki, R.F. and M.A. Wozniak, *Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within*. J Alzheimers Dis, 2008. **13**(4): p. 393-405.
308. Hilla, J.M., et al., *HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling*. NeuroReport, 2009. **20**(16): p. 1500-1505.
309. Maccioni, R.B., et al., *The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1153**: p. 240-6.
310. Kriesel, J.D., et al., *Neuronal reactivation of herpes simplex virus may involve interleukin-6*. J Neurovirol, 1997. **3**(6): p. 441-8.
311. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. JAMA, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
312. Rubinsztein, D.C. and D.F. Easton, *Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. a meta-analysis*. Dement Geriatr Cogn Disord, 1999. **10**(3): p. 199-209.
313. WR, L., et al., *Alzheimer's disease, herpes virus in brain, apolipoprotein E4 and herpes labialis*. Alzheimer's Reports, 1998. **1**: p. p.173-178.
314. Itzhaki, R. and M. Wozniak, *Susceptibility to herpes simplex labialis conferred by the gene encoding apolipoprotein E*. J Infect Dis, 2008. **198**(4): p. 624-5; author reply 625-6.
315. Carter, C.J., *Interactions between the products of the Herpes simplex genome and Alzheimer's disease susceptibility genes: relevance to pathological-signalling cascades*. Neurochem Int, 2008. **52**(6): p. 920-34.
316. Mori, I., et al., *Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease*. J Med Virol, 2004. **73**(4): p. 605-11.
317. Itzhaki, R., *Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease*. Herpes, 2004. **11 Suppl 2**: p. 77A-82A.
318. Cribbs, D.H., et al., *Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide*. Biochemistry, 2000. **39**(20): p. 5988-94.
319. Goedert, M., M.G. Spillantini, and R.A. Crowther, *Tau proteins and neurofibrillary degeneration*. Brain Pathol, 1991. **1**(4): p. 279-86.
320. Iqbal, K., et al., *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1739**(2-3): p. 198-210.
321. Benetti, L. and B. Roizman, *Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9411-6.
322. Mertz, K.J., et al., *Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1795-8.
323. Schacker, T., *The role of HSV in the transmission and progression of HIV*. Herpes, 2001. **8**(2): p. 46-9.
324. Schacker, T., et al., *Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men*. JAMA, 1998. **280**(1): p. 61-6.

325. Ghosh, S., M.J. Selby, and B.M. Peterlin, *Synergism between Tat and VP16 in trans-activation of HIV-1 LTR*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 610-9.
326. Wildeman, A.G., *Regulation of SV40 early gene expression*. Biochem Cell Biol, 1988. **66**(6): p. 567-77.
327. Das, G.C., S.K. Niyogi, and N.P. Salzman, *SV40 promoters and their regulation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1985. **32**: p. 217-36.
328. McKnight, S.L., et al., *Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: identification of an upstream control region*. Cell, 1981. **25**(2): p. 385-98.
329. Jang, S.K., et al., *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2636-43.
330. Pelletier, J. and N. Sonenberg, *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*. Nature, 1988. **334**(6180): p. 320-5.
331. Goncalves, M.A. and A.A. de Vries, *Adenovirus: from foe to friend*. Rev Med Virol, 2006. **16**(3): p. 167-86.
332. Ziff, E.B., *Splicing in adenovirus and other animal viruses*. Int Rev Cytol, 1985. **93**: p. 327-58.
333. Ziff, E.B., *Transcription and RNA processing by the DNA tumour viruses*. Nature, 1980. **287**(5782): p. 491-9.
334. S.J., F., et al., *principles of virology: Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses*. second edition ed. table 1.1 bacteriophages landmarks in molecular biology, ed. A. Press. 2003, Washington D.C. 918 p.
335. Pennazio, S. and P. Roggero, *Tobacco mosaic virus RNA as genetic determinant: genesis of a discovery*. Riv Biol, 2000. **93**(3): p. 431-55.
336. Bagheri, S. and M. Kashani-Sabet, *Ribozymes in the age of molecular therapeutics*. Curr Mol Med, 2004. **4**(5): p. 489-506.
337. Baltimore, D., *Discovery of the reverse transcriptase*. FASEB J, 1995. **9**(15): p. 1660-3.
338. Kates, J. and J. Beeson, *Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid*. J Mol Biol, 1970. **50**(1): p. 19-33.
339. Lutz, C.S., *Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation*. ACS Chem Biol, 2008. **3**(10): p. 609-17.
340. Cantor, H. and E.A. Boyse, *Development and function of subclasses of T cells*. J Reticuloendothel Soc, 1975. **17**(2): p. 115-8.
341. Cantor, H. and E.A. Boyse, *Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen*. J Exp Med, 1975. **141**(6): p. 1376-89.
342. Cantor, H. and E.A. Boyse, *Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity*. J Exp Med, 1975. **141**(6): p. 1390-9.
343. English, L., M. Chemali, and M. Desjardins, *Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection*. Autophagy, 2009. **5**(7).

344. Carlton, J.G. and J. Martin-Serrano, *Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1908-12.
345. Clague, M.J. and S. Urbe, *Hrs function: viruses provide the clue*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(12): p. 603-6.
346. Hurley, J.H. and S.D. Emr, *The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 277-98.
347. Braakman, I. and E. van Anken, *Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum*. Traffic, 2000. **1**(7): p. 533-9.
348. Heinlein, M., *The spread of tobacco mosaic virus infection: insights into the cellular mechanism of RNA transport*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 58-82.
349. (ASPC), B.d.l.s.d.l. Agence de la santé publique du Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds80f-fra.php> 2001 juin [cited].
350. Campadelli-Fiume, G. and B. Roizman, *The egress of herpesviruses from cells: the unanswered questions*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6716-7; author replies 6717-9.
351. Ericsson, M., et al., *In vitro reconstitution of an intermediate assembly stage of vaccinia virus*. Virology, 1997. **235**(2): p. 218-27.
352. Datta, S.A. and A. Rein, *Preparation of recombinant HIV-1 gag protein and assembly of virus-like particles in vitro*. Methods Mol Biol, 2009. **485**: p. 197-208.
353. Hara, Y., et al., *In vitro propagation of rabies virus in mouse dorsal root ganglia cells*. Jpn J Vet Res, 2009. **56**(4): p. 181-8.
354. Lopez, C., et al., *In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus*. Arch Virol, 2009. **154**(4): p. 695-8.
355. Newman, M., et al., *Testing an Electrostatic Interaction Hypothesis of Hepatitis B Virus Capsid Stability Using an In Vitro Capsid Disassembly/Reassembly System*. J Virol, 2009.
356. Pogany, J., et al., *In vitro assembly of the Tomato bushy stunt virus replicase requires the host Heat shock protein 70*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19956-61.
357. Bartz, R., C. Benzing, and O. Ullrich, *Reconstitution of transport to recycling endosomes in vitro*. Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 480-90.
358. Cook, N.R. and H.W. Davidson, *In vitro assays of vesicular transport*. Traffic, 2001. **2**(1): p. 19-25.
359. Matsuzono, Y. and Y. Fujiki, *In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 36-42.
360. Allan, B.B. and W.E. Balch, *In vitro analysis of endoplasmic-reticulum-to-golgi transport in mammalian cells*. Curr Protoc Cell Biol, 2001. **Chapter 11**: p. Unit11 3.
361. Wu, X., et al., *In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va*. FEBS Lett, 2006. **580**(25): p. 5863-8.
362. Padula, M.E., M.L. Sydnor, and D.W. Wilson, *Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4757-65.
363. Dry, I., et al., *Proteomic analysis of pathogenic and attenuated Alcelaphine herpesvirus-1*. J Virol, 2008: p. eprint on 19 March 2008, doi:10.1128/JVI.00094-08.

364. Sun, J., et al., *Proteomic alteration of PK-15 cells after infection by classical swine fever virus*. J Proteome Res, 2008. **7**(12): p. 5263-9.
365. Suberbielle, E., et al., *Proteomic analysis reveals selective impediment of neuronal remodeling upon Borna disease virus infection*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12265-79.
366. Tong, A., et al., *Proteomic analysis of cellular protein alterations using a hepatitis B virus-producing cellular model*. Proteomics, 2008. **8**(10): p. 2012-23.
367. Maxwell, K.L. and L. Frappier, *Viral proteomics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(2): p. 398-411.
368. Viswanathan, K. and K. Fruh, *Viral proteomics: global evaluation of viruses and their interaction with the host*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(6): p. 815-29.
369. O'Connor, C.M. and D.H. Kedes, *Mass spectrometric analyses of purified rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1574-83.
370. Liu, H.C., E.J. Soderblom, and M.B. Goshe, *A mass spectrometry-based proteomic approach to study Marek's Disease Virus gene expression*. J Virol Methods, 2006. **135**(1): p. 66-75.
371. Chertova, E., et al., *Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 9039-52.
372. Xie, X., L. Xu, and F. Yang, *Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10615-23.
373. Bernhard, O.K., R.J. Diefenbach, and A.L. Cunningham, *New insights into viral structure and virus-cell interactions through proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2005. **2**(4): p. 577-88.
374. Loomis, J.S., R.J. Courtney, and J.W. Wills, *Packaging determinants in the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10534-41.
375. Ellison, K.S., et al., *Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4120-31.
376. Rajcani, J. and V. Durmanova, *Early expression of herpes simplex virus (HSV) proteins and reactivation of latent infection*. Folia Microbiol (Praha), 2000. **45**(1): p. 7-28.
377. Matis, J. and M. Kudelova, *Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses*. Acta Virol, 2001. **45**(5-6): p. 269-77.
378. Sloan, D.D., et al., *Inhibition of TCR signaling by herpes simplex virus*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1825-33.
379. Aubert, M., E.M. Krantz, and K.R. Jerome, *Herpes simplex virus genes Us3, Us5, and Us12 differentially regulate cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity*. Viral Immunol, 2006. **19**(3): p. 391-408.
380. Mettenleiter, T.C., *Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle*. Vet Microbiol, 2006. **113**(3-4): p. 163-9.
381. Granzow, H., et al., *Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3675-84.
382. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.



383. Bossard, C., et al., *Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1123-31.
384. Van Lint, J., et al., *Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(4): p. 193-200.
385. Baron, C.L. and V. Malhotra, *Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane*. Science, 2002. **295**(5553): p. 325-8.
386. Liljedahl, M., et al., *Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network*. Cell, 2001. **104**(3): p. 409-20.
387. Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe, *Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9741-53., *Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors J. Virol.*, 2006 october. **80**: p. 9347-9348.
388. Campadelli-Fiume, G., et al., *Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1589-95.
389. Whealy, M.E., et al., *Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1066-81.
390. McNabb, D.S. and R.J. Courtney, *Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7581-4.
391. Abaitua, F. and P. O'Hare, *Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5234-44.
392. Bucks, M.A., et al., *Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids*. Virology, 2007. **361**(2): p. 316-24.
393. Klupp, B.G., et al., *Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein*. J Virol, 2002. **76**(6): p. 3065-71.
394. Elliott, G., et al., *Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9735-45.
395. Sedlackova, L. and S.A. Rice, *Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 268-77.
396. Yao, F. and R.J. Courtney, *Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2709-16.
397. Yao, F. and R.J. Courtney, *A major transcriptional regulatory protein (ICP4) of herpes simplex virus type 1 is associated with purified virions*. J Virol, 1989. **63**(8): p. 3338-44.
398. Kalamvoki, M., J. Qu, and B. Roizman, *Translocation and colocalization of ICP4 and ICP0 in cells infected with herpes simplex virus 1 mutants lacking glycoprotein E, glycoprotein I, or the virion host shutoff product of the UL41 gene*. J Virol, 2008. **82**(4): p. 1701-13.
399. McLauchlan, J., et al., *Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1*. Virology, 1992. **190**(2): p. 682-8.
400. Hofmann, W.A., *Cell and molecular biology of nuclear actin*. Int Rev Cell Mol Biol, 2009. **273**: p. 219-63.
401. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1473-8.

402. Yarmola, E.G., et al., *Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28120-7.
403. Holzinger, A., *Jasplakinolide. An actin-specific reagent that promotes actin polymerization*. Methods Mol Biol, 2001. **161**: p. 109-20.
404. Turner, J.R. and A.M. Tartakoff, *The response of the Golgi complex to microtubule alterations: the roles of metabolic energy and membrane traffic in Golgi complex organization*. J Cell Biol, 1989. **109**(5): p. 2081-8.
405. Horwitz, S.B., et al., *Taxol: a new probe for studying the structure and function of microtubules*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1982. **46 Pt 1**: p. 219-26.
406. Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz, *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. Nature, 1979. **277**(5698): p. 665-7.
407. Schiff, P.B. and S.B. Horwitz, *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1561-5.
408. Britt, W.J. and S. Boppana, *Human cytomegalovirus virion proteins*. Hum Immunol, 2004. **65**(5): p. 395-402.
409. Kim, J. and Y. Okada, *Asymmetric distribution and temperature-dependent clustering of filipin-sterol complexes in the nuclear membrane of Ehrlich ascites tumor cells*. Eur J Cell Biol, 1983. **29**(2): p. 244-52.
410. Alroy, J., et al., *Heterogeneous distribution of filipin-sterol complexes in nuclear membranes*. Biochim Biophys Acta, 1981. **649**(2): p. 239-43.
411. Albi, E. and M.P. Viola Magni, *The role of intranuclear lipids*. Biol Cell, 2004. **96**(8): p. 657-67.
412. Desplanques, A.S., et al., *Plasma membrane cholesterol is required for efficient pseudorabies virus entry*. Virology, 2008. **376**(2): p. 339-45.
413. Favoreel, H.W., T.C. Mettenleiter, and H.J. Nauwynck, *Copatching and lipid raft association of different viral glycoproteins expressed on the surfaces of pseudorabies virus-infected cells*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5279-87.
414. Bender, F.C., et al., *Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9542-52.
415. Koshizuka, T., et al., *Herpes simplex virus protein UL11 but not UL51 is associated with lipid rafts*. Virus Genes, 2007. **35**(3): p. 571-5.
416. Campadelli-Fiume, G., et al., *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, 1993. **90**(7): p. 2798-802.
417. Compton, T. and R.J. Courtney, *Effect of herpes simplex virus type 1 on cellular pools of oligosaccharide-lipid*. Virology, 1985. **147**(1): p. 1-8.
418. Yang, T.Y. and R.J. Courtney, *Influence of the host cell on the association of ICP4 and ICP0 with herpes simplex virus type 1*. Virology, 1995. **211**(1): p. 209-17.
419. Mou, F., et al., *Effects of lamin A/C, lamin B1, and viral US3 kinase activity on viral infectivity, virion egress, and the targeting of herpes simplex virus UL34 encoded protein to the inner nuclear membrane*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 8094-104.
420. Everett, R.D., *ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection*. Bioessays, 2000. **22**(8): p. 761-70.

421. DeLuca, N.A., A.M. McCarthy, and P.A. Schaffer, *Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4*. J Virol, 1985. **56**(2): p. 558-70.
422. Reuven, N.B. and S.K. Weller, *Herpes simplex virus type 1 single-strand DNA binding protein ICP8 enhances the nuclease activity of the UL12 alkaline nuclease by increasing its processivity*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9356-8.
423. Makhov, A.M., et al., *The bipolar filaments formed by herpes simplex virus type 1 SSB/recombination protein (ICP8) suggest a mechanism for DNA annealing*. J Mol Biol, 2009. **386**(2): p. 273-9.
424. Alvisi, G., et al., *Nuclear import of HSV-1 DNA polymerase processivity factor UL42 is mediated by a C-terminally located bipartite nuclear localization signal*. Biochemistry, 2008. **47**(52): p. 13764-77.
425. Read, G.S. and M. Patterson, *Packaging of the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: two forms of the Vhs polypeptide are associated with intranuclear B and C capsids, but only one is associated with enveloped virions*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1148-61.
426. Yin, D.M., et al., *Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus*. J Neurosci, 2008. **28**(35): p. 8832-43.
427. Bisbal, M., et al., *Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons*. J Neurosci, 2008. **28**(37): p. 9297-308.
428. Yeaman, C., et al., *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 106-12.
429. Shaw, A.J., *Epithelial cell culture: a practical approach*, ed. O.U. Press. Vol. Volume 166 of Practical approach series. 1996. 218 p.
430. Rykx, A., et al., *Protein kinase D: a family affair*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 81-6.
431. Rey, O., et al., *The nuclear import of protein kinase D3 requires its catalytic activity*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 5149-57.
432. Ameziane, N., M. Bogard, and J. Lamoril, *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Chapitre 24: ARN interférence (p.589-608), ed. E. Masson. 2005. 705 p.
433. Grimm, D., *Small silencing RNAs: state-of-the-art*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 672-703.
434. Grimm, D. and M.A. Kay, *RNAi and gene therapy: a mutual attraction*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 473-81.
435. Rossi, J.J., *Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(4): p. 313-7.
436. Rao, D.D., et al., *siRNA vs. shRNA: similarities and differences*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 746-59.
437. *Whither RNAi?* Nat Cell Biol, 2003. **5**(6): p. 489-90.
438. Opstelten, W., A.K. Neven, and J. Eekhof, *Treatment and prevention of herpes labialis*. Can Fam Physician, 2008. **54**(12): p. 1683-7.
439. De Clercq, E., *Emerging antiviral drugs*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(3): p. 393-416.
440. Dasgupta, G., et al., *New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(8): p. 1023-35.
441. Rupp, R. and D.I. Bernstein, *The potential impact of a prophylactic herpes simplex vaccine*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(1): p. 41-52.

442. Glorioso, J.C. and D.J. Fink, *Herpes vector-mediated gene transfer in the treatment of chronic pain*. *Mol Ther*, 2009. **17**(1): p. 13-8.
443. Bouard, D., D. Alazard-Dany, and F.L. Cosset, *Viral vectors: from virology to transgene expression*. *Br J Pharmacol*, 2009. **157**(2): p. 153-65.
444. Marconi, P., et al., *HSV as a vector in vaccine development and gene therapy*. *Hum Vaccin*, 2008. **4**(2): p. 91-105.
445. Todo, T., *Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2060-4.
446. Mandel, R.J., C. Burger, and R.O. Snyder, *Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production*. *Exp Neurol*, 2008. **209**(1): p. 58-71.
447. Kohno, S.I., et al., *Oncolytic virotherapy with an HSV amplicon vector expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using the replication-competent HSV type 1 mutant HF10 as a helper virus*. *Cancer Gene Ther*, 2007. **14**(11): p. 918-26.
448. Kimata, H., et al., *Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2006. **13**(8): p. 1078-84.

## Annexe

Table 1: protéines virales codées par le virus HSV-1

Gène	Nom(s) de la protéine	Classe	MW (KDa)	Localisation dans les virions extracellulaires *réf Loret et al. JVI 2008	ID Uniprot/ Swiss prot	Équivalent chez d'autres virus herpès		
						HCMV	EBV	VZV
RL1	ICP34.5	L	27,5	tégument	P36313	UL117	BHLF1	
RL2	ICP0, Vmw110, IE2, ubiquitin E3 ligase	IE	78,5	tégument	P08393	UL116	BHRF1	ORF61
RS1	ICP4, Vmw 175, IE3, $\alpha$ 4	IE	132,8	tégument	P08392	UL119	EBNA-2	ORF62
UL1	gL	L	24,9	enveloppe	P10185	UL115	BKRF2	ORF60
UL2	uracil-DNA glycosylase	E	36,3	absent	P10186	UL114	BKRF3	ORF59
UL3	nuclear protein UL3	L	25,6	absent	P10187			ORF58
UL4	nuclear protein UL4	L	21,5	absent	P10188	UL111A	BKRF4	ORF56
UL5	helicase-primase helicase subunit	E	98,7	absent	P10189	UL105	BBLF4	ORF55
UL6	portal	E	74	capside	P10190	UL104	BBRF1	ORF54
UL7		?	33	tégument	P10191	UL103	BBRF2	ORF53
UL8	helicase-primase subunit	E	79,9	absent	P10192	UL102	BBLF2 / 3	ORF52
UL9	DNA replication origin-binding helicase	E	94,2	absent	P10193			ORF51
UL10	gM	L	51,4	enveloppe	P04288	UL100	BBRF3	ORF50
UL11	myristylated tegument protein	L	10,5	tégument / enveloppe (?)	P04289	UL99	BBLF1	ORF49
UL12	deoxyribonuclease	E	67,5	absent	P04294	UL98	BGLF5	ORF48
UL12.5			?	?'	?	?	?	?
UL13	tegument serine/threonine protein kinase	L	57,2	tégument	P04290	UL97	BGLF4	ORF47
UL14		L	23,9	tégument	P04291	UL95	BGLF3	ORF46
UL15	DNA packaging terminase subunit 1	L	80,9	capside	P04295	UL89	BGRF1 /BDRF1	ORF42 /45
UL16		L	40,4	tégument	P10200	UL94	BGLF2	ORF44
UL17	DNA packaging tegument protein UL17	L	74,6	capside	P10201	UL93	BGLF1	ORF43
UL18	capsid triplex subunit 2/Vp23	L	34,2	capside	P10202	UL85	BDLF1	ORF41

## II

UL19	VP5, ICP5, major capsid protein	L	149	capside	P06491	UL86	BcLF1	ORF40
UL20		L	24,2	enveloppe	P10204	UL87	BcRF1	ORF39
UL21		L	57,6	tégument	P10205	UL88	BTRF1	ORF38
UL22	gH	L	90,4	enveloppe	P06477	UL75	BXLF2	ORF37
UL23	TK	E	41	tégument	P03176		BXLF1	ORF36
UL24	nuclear protein UL24	L	29,5	?’	P10208	UL76	BXRF1	ORF35
UL25	DNA packaging tegument protein UL25	L	62,7	capside	P10209	UL77	BVRF1	ORF34
UL26	VP21 et VP24	L	66,5 (VP21 ≈ 42 VP24 ≈ 25)	capside (VP24 absent (VP21)	P10210	UL80	BVFR2	ORF33
UL26. 5	VP22a, ICP35	L	33,8	absent	B9VQF4	UL80. 5	BdRF1	ORF33 . 5
UL27	gB, VP7	L	100,3	enveloppe	P10211	UL55	BALF4	ORF31
UL28	ICP18. 5 / DNA packaging terminase subunit 2	L	85,6	capside	P10212	UL56	BALF3	ORF30
UL29	ICP8 / single-stranded DNA-binding protein	E	128,4	?’	P04296	UL57	BALF2	ORF29
UL30	DNA polymerase catalytic subunit	E	136,4	?’	P04293	UL54	BALF5	ORF28
UL31	nuclear egress lamina protein	L	34	tégument	P10215	UL53	BFLF2	ORF27
UL32	DNA packaging protein UL32	L	64	?’	P10216	UL52	BFLF1	ORF26
UL33	DNA packaging protein UL33	?	14,4	capside	P10217	UL51	BFRF1A	ORF25
UL34	nuclear egress membrane protein	L	29,8	enveloppe	P10218	UL50	BFRF1	ORF24
UL35	VP26, small capsid protein	L	12,1	capside	P10219	UL48A	BFRF3	ORF23
UL36	ICP 1/2, VP1/2 large tegument protein	L	336	tégument	P10220	UL48	BPLF1	ORF22
UL37	ICP32	E	120,6	tégument	P10221	UL47	BOLF1	ORF21
UL38	VP19C / capsid triplex subunit 1	L	50,3	capside	P32888	UL46	BORF1	ORF20
UL39	ICP6 / ribonucleotide reductase subunit 1	E	124,1	?’	P08543	UL45	BORF2	ORF19

UL40	ribonucleotide reductase subunit 2	E	38	?’	P10224		BaFR1	ORF18
UL41	vhs	L	55	tégument	P10225			ORF17
UL42	DNA polymerase processivity subunit	E	51,2	?’	P10226	UL44	BMRF1	ORF16
UL43		E	44,9	enveloppe ( ?’)	P1027		BZLF2	ORF15
UL44	gC, VP8	L	55	enveloppe	P10228		EBNA-3C	ORF14
UL45		L	18,2	enveloppe	P10229		EBNA-3C	ORF13
UL46	VP11/12	L	78,2	tégument	P10230		EBNA-3A	ORF12
UL47	VP13/14	L	73,8	tégument	P10231		BLFF1	ORF11
UL48	VP16, $\alpha$ -TIF, Vmw65	L	54,3	tégument	P06492		BLLF2	ORF10
UL49	VP22, Vmw40	L	32,3	tégument	P10233	UL74	BLRF2	ORF9
UL49.5	gN	L	9,2	enveloppe	O09800	UL73	BLRF1	ORF9A
UL50	deoxyuridine triphosphatase	E	39,1	tégument ( ?’)	P10234	UL72	BLLF3	ORF8
UL51		L	25,5	tégument	P10235	UL71	BSRF1	ORF7
UL52	helicase-primase primase subunit	E	114,4	?’	P10236	UL70	BSLF1	ORF6
UL53	gK	L	37,6	enveloppe	P68331			ORF5
UL54	ICP27, Vmw63, IE1	IE	52,3	?’	P10238	UL69	BSLF2/BMLF1	ORF4
UL55	nuclear protein UL55	?	20,5	tégument ( ?’)	P10239		BALF1	ORF3
UL56		?	21,2	enveloppe	P10240	UL41A	LMP-1	ORF0
US1	ICP22, Vmw68, IR4, $\alpha$ 22, IE-68	IE	46,5	?’	P04485	UL120	BWRF1	ORF63
US2		L	32,5	tégument	P06485	UL121	LP	
US3	serine/threonine protein kinase US3	E	52,8	tégument	P04413	UL122	BCRF1	ORF66
US4	gG	L	25,2	enveloppe	P06484	UL123	BNRF1	
US5	gJ	?	9,6	absent	P06480	UL124	LMP-2A. B	
US6	gD	L	43,3	enveloppe	Q69091	UL128		
US7	gI	L	41,4	enveloppe	P06487	UL130		ORF67
US8	gE	L	59,3	enveloppe	P04488	UL131A		ORF68
US8.5		E ou L	15,9	enveloppe ( ?’)	O09802	UL132		
US9		L	10	enveloppe	P06481	UL148		ORF65
US10		L	34,1	tégument	P06486	UL147A		ORF64
US11		L	17,8	tégument	P04487	UL147		
US12	ICP47/ICP 47.5/IE5 /Vmw12/ $\alpha$ 47/ TAP transporter inhibitor	IE	9,8	?’	P03170	UL146		

Veillez noter que le symbole ?’ signifie que jusqu’à maintenant la localisation ou la présence de ces protéines dans les virions extracellulaires est incertaine .

