

Université de Montréal

Contribution de la Glycoprotéine M dans la Sortie de HSV-1

par

ZHANG JIE

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)
en pathologie et biologie cellulaire
option biologie cellulaire

Juin, 2010

© Zhang Jie, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Contribution de la Glycoprotéine M dans la Sortie de HSV-1

Présentée par :
ZHANG JIE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Claude Labbé, président-rapporteur

Dr. Roger Lippé, directeur de recherche

Dr. Jacques Paiement, membre du jury

Dr. Louis Flamand, examinateur externe

Dr. Nikolaus Heveker, représentant du doyen

Résumé

Le Virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1) est un agent infectieux qui cause l'herpès chez une grande proportion de la population mondiale. L'herpès est généralement considéré comme une maladie bénigne dont la forme la plus commune est l'herpès labial (communément appelé « bouton de fièvre »), mais elle peut se révéler très sérieuse et causer la cécité et l'encéphalite, voir létale dans certain cas. Le virus persiste toute la vie dans le corps de son hôte. Jusqu'à présent, aucun traitement ne peut éliminer le virus et aucun vaccin n'a été prouvé efficace pour contrôler l'infection herpétique.

HSV-1 est un virus avec un génome d'ADN bicaténaire contenu dans une capsidie icosaédrale entourée d'une enveloppe lipidique. Treize glycoprotéines virales se trouvent dans cette enveloppe et sont connues ou supposées jouer des rôles distincts dans différentes étapes du cycle de réplication viral, incluant l'attachement, l'entrée, l'assemblage, et la propagation des virus. La glycoprotéine M (gM) qui figure parmi ces glycoprotéines d'enveloppe, est la seule glycoprotéine non essentielle mais est conservée dans toute la famille *herpesviridae*. Récemment, l'homologue de gM dans le Pseudorabies virus (PRV), un autre herpesvirus, a été impliqué dans la phase finale de l'assemblage (i.e. l'enveloppement cytoplasmique) au niveau du réseau *trans*-Golgi (TGN) en reconnaissant spécifiquement des protéines tégumentaires et d'autres glycoprotéines d'enveloppe ([1]). Toutefois, il a été proposé que cette hypothèse ne s'applique pas pour le HSV-1 ([2]). De plus, contrairement à la localisation au TGN dans les cellules transfectées, HSV-1 gM se localise dans la membrane nucléaire et sur les virions périnucléaires durant une infection.

L'objectif du projet présenté ici était d'éclaircir la relation de la localisation et la fonction de HSV-1 gM dans le contexte d'une infection. Dans les résultats rapportés ici, nous décrivons tout d'abord un mécanisme spécifique de ciblage nucléaire de HSV-1 gM. En phase précoce d'une infection, gM est ciblée à la membrane nucléaire d'une manière virus

dépendante. Cela se produit avant la réorganisation du TGN normalement induite par l'infection et avant que gM n'entre dans la voie de sécrétion. Ce ciblage nucléaire actif et spécifique de gM ne semble pas dépendre des plusieurs des partenaires d'interaction proposés dans la littérature. Ces données suggèrent que la forme nucléaire de gM pourrait avoir un nouveau rôle indépendant de l'enveloppement final dans le cytoplasme. Dans la deuxième partie du travail présenté ici, nous avons concentré nos efforts sur le rôle de gM dans l'assemblage du virus en phase tardive de l'infection et en identifiant un domaine critique de gM. Nos résultats mettent en valeur l'importance du domaine carboxyl-terminal cytoplasmique de gM dans le transport de gM du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi, dans l'enveloppement cytoplasmique et la propagation intercellulaire du virus. Ainsi, l'export du RE de gM a été complètement compromis dans les cellules transfectées exprimant un mutant de gM dépourvu de sa région C-terminale. La délétion la queue cytoplasmique de gM cause une réduction légère du titre viral et de la taille des plaques. L'analyse de ces mutants par microscopie électronique a démontré une accumulation des nucléocapsides sans enveloppe dans le cytoplasme par rapport aux virus de type sauvage. Étrangement, ce phénotype était apparent dans les cellules BHK mais absent dans les cellules 143B, suggérant que la fonction de gM dépende du type cellulaire. Finalement, le criblage de partenaires d'interaction du domaine C-terminal de gM identifiés par le système de double-hybride nous a permis de proposer plusieurs candidats susceptibles de réguler la fonction de gM dans la morphogénèse et la propagation de virus.

Mots-clés : Virus Herpès Simplex de type 1 (VHS-1 ou HSV-1), glycoprotéine M (gM), enveloppement cytoplasmique, membrane nucléaire, réseau *trans*-Golgien, domaine carboxyl-terminal cytoplasmique, système de double-hybride.

Abstract

Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) is an infectious agent causing herpes, which affects a large population worldwide. Herpes is generally considered a benign disease whose most common form is oral herpes (commonly called "cold sores"), but it can be very serious and cause herpetic blindness and encephalitis, and even be lethal in some cases. The virus can persist throughout life in the body of its host. So far, no treatment can eliminate the virus and no vaccine has proven effective in controlling herpes infections.

HSV-1 has a double-stranded DNA genome embedded in an icosahedral capsid surrounded by a lipid envelope. Thirteen viral glycoproteins are located in the envelope and are known or believed to play different roles in different stages of the viral replication cycle, including attachment, entry, assembly, and viral propagation. Among these envelope glycoproteins, glycoprotein M (gM) is the only nonessential glycoprotein but is conserved in all the *herpesviridae* family. Recently, the homologue of gM in Pseudorabies virus (PRV), another herpesvirus, has been implicated in the final phase of assembly (e.g. the cytoplasmic envelopment) at the *trans*-Golgi network (TGN) ([1]). However, it was suggested that this does not apply to HSV-1 ([2]). Moreover, unlike its TGN localization in transfected cells, HSV-1 gM localizes to the nuclear membrane and on the perinuclear virions during infection.

The objective of the project presented here was to clarify the relationship of the location and function of HSV-1 gM in the context of an infection. In the results reported here, we first describe a specific and active mechanism of nuclear targeting of HSV-1 gM. In early phase of infection, gM is targeted to the nuclear membrane in a virus dependent manner. This occurs before the known reorganization of the TGN induced by the virus and before gM enters the secretory pathway. This active and specific nuclear targeting of gM seemingly does not depend on the functional interaction partners proposed in the literature. These data suggest that nuclear gM could have a new role independent of that in the final envelopment in the cytoplasm. In the second part of the work presented here, we focused

our efforts on the role of gM in virus assembly in the late phase of infection and define an important functional domain within gM. Our results highlight the importance of the carboxyl-terminal domain of gM in the intracellular transport of gM from endoplasmic reticulum (ER) to Golgi apparatus, in the cytoplasmic envelopment of the capsids and the intercellular spread of the virus. Hence, gM ER export was completely compromised in transfected cells after deletion of its C-terminal tail. Deletion of the gM cytoplasmic tail in mutant viruses resulted in a slight reduction in viral titer and plaque size. The analysis of these mutants by electron microscopy showed an accumulation of nucleocapsids without envelope in the cytoplasm compared to wild-type virus. Interestingly, this phenotype is apparent in BHK cells but not in 143B cells, hinting that the importance of gM may be cell type specific. Finally, screening of interaction partners of C-terminal domain of gM identified by the two-hybrid system allowed us to propose several interesting candidates that may regulate the function of gM in the virus morphogenesis and propagation.

Keywords : herpes simplex virus type 1 (HSV-1), glycoprotein gM (gM), cytoplasmic envelopment, nuclear membrane, *trans*-Golgi network, carboxyl-terminal cytoplasmic domain, two-hybrid system.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux et des figures.....	ix
Liste des abréviations	xi
Dédicace	xiii
Remerciement	xiv
CHAPITRE I : Introduction	I
I. Généralités	2
1. Le Virus Herpès Simplex de type I et les maladies	2
1.1 Définition	2
1.2 Historique	2
1.3 Classification	3
1.4 Pathogénèse et manifestations cliniques.....	5
1.5 Traitement et prévention	6
2. Caractéristiques du virus herpès simplex de type I	8
2.1 Structure du virion	8
2.1.1 Le génome viral	8
2.1.2 La capside virale	11
2.1.3 Le tégment	11
2.1.4 L'enveloppe virale	12
2.2 Le cycle de réplication de l'infection lytique	13

2.2.1 L'entrée	13
2.2.2 Les évènements précoces de la réplication virale	14
2.2.3 La maturation	16
2.2.4 Sortie du TGN	23
2.3 Propagation du virus	23
2.4 Infection Latente	24
3. Que sait-on au sujet de gM?	26
3.1 gM dans l' <i>herpesviridae</i>	26
3.2 Propriétés structurelles et biochimiques de gM	26
3.2.1 Homologie	26
3.2.2 Structure et topologie	27
3.2.3 Synthèse et modifications post-traductionnelles.....	29
3.3 Les partenaires fonctionnels de gM	29
3.3.1 Le complexe gM/gN	29
3.3.2 Autres partenaires	30
3.4 Fonctions de HSV-1 gM.....	31
3.4.1 Rôle de gM dans l'enveloppement final	31
3.4.2 Rôle de gM dans la fusion membranaire et la propagation de cellule à cellule	32
3.4.3 Autres rôles potentiels de gM	33
II. Questions et objectives de recherche	34
CHAPITRE II: Résultats.....	36
Article I: Early, Active, and Specific Localization of Herpes Simplex Virus Type 1 gM to Nuclear Membranes	37
Abstract	39
Introduction	40

Materials and methods	42
Results	52
Discussion.....	71
Acknowledgement	75
References	76
Article II: Caractérisation du domaine carboxyl-terminal cytoplasmique de Virus	
Herpès Simplex de type 1 gM.....	88
Résumé	90
Introduction	91
Matériels et méthodes	97
Résultats	101
Discussion	119
CHAPITRE III: Discussion	125
I. Discussion	126
1. La spécificité et le mécanisme du ciblage nucléaire de gM	126
2. Rôle potentiel de gM dans le noyau	127
3. Rôle de gM dans l'enveloppement final et la propagation intercellulaire du virus	128
4. L'importance du domaine carboxyle-terminal de gM et son implication dans le cycle de réplication virale	129
II. Perspectives	132
1. Mécanisme du ciblage nucléaire de HSV-1 gM	132
2. Rôle de l'importin-alpha cellulaire sur la localisation nucléaire de HSV-1 gM	133
3. Rôle de HSV-1 gM dans le noyau	134
4. Rôle de la queue carboxyl-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM	135
5. Identification de nouveaux partenaires d'interaction de HSV-1 gM	135

III. Conclusion 138
IV. Bibliographie 139

Liste des tableaux et figures

Chapitre I Introduction

Table 1: Les virus herpès humains dans la famille de <i>Herpesviridae</i>	5
Figure 1: Structure du virion	10
Figure 2: Schéma représentant le génome de HSV-1	10
Figure 3: Schéma du modèle de dé-enveloppement et ré-enveloppement de la sortie de HSV-1	21
Figure 4: Schéma des interactions moléculaires lors de la formation du virion HSV-1 et/ou PRV	22
Figure 5: Schéma illustrant la topologie membranaire prédite de HSV-1 gM	28

Chapitre II Résultats

Article I

Figure 1: Construction and generation of recombinant virus	47
Figure 2: gM localizes primarily in punctate extensions and invaginations of nuclear membranes in infected cells	53
Figure 3: Nuclear membrane localization of gM occurs prior to the dispersion of the TGN	55
Figure 4: ER tag is functional	58
Figure 5: gM/CTL and gM/ER accumulate in the nucleus in infected cells	60
Figure 6: The early gM nuclear pool does not transit through the TGN	63
Figure 7: gM/ER does not alter the targeting of other viral glycoproteins	66
Figure 8: HSV-1 redistributes transfected gM to the nucleus	68
Figure 9: gM partners are not involved in gM nuclear localization	70

Article II

Table 1: Effet des partenaires viraux sur la localisation subcellulaire de gM	111
Table 2: Interaction entre gM et ses partenaires d'interaction virales dans le contexte d'une infection	116
Figure 1: Alignement des séquences de domaine cytoplasmique des homologues gM de membres des herpesvirus	96
Figure 2: Effet du domaine cytoplasmique C-terminal de gM sur sa localisation	102
Figure 3: Analyse de la cinétique de la croissance	105
Figure 4: Effet de la délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM sur la taille des plaques	106
Figure 5: Analyse par microscopie électronique	108
Figure 6: Effet des partenaires viraux sur la localisation subcellulaire de gM	112
Figure 7: Interaction entre gM et ses partenaires d'interaction virales potentiels dans le contexte d'une infection	116

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARN _m	acide ribonucléique messenger
ARN _i	acide ribonucléique d'interférence
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CMV	cytomégalovirus
CPE	cytopathic effets
EBV	Epstein-Barr Virus
ERGIC	Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment
EM	electron microscope
gM	glycoprotein M
GFP	green fluorescence protein
GST	glutathione-S-transferase
HSV-1	herpes simplex virus type 1
HSV-2	herpes simplex virus type 2
HVEM	herpesvirus entry mediator
ICP	infected cell product
KDa	kilodalton
KPNA ₄	karyopherin alpha 4
Kpb	kilo paire de bases
LAT	latency associated transcript
ND10	nuclear domain 10
NPC	nuclear pore complex
ONM	outer nuclear membrane
ODV	Occlusion derived virus

PBS	phosphate buffer saline
PRV	Pseudorabies Virus
RE	réticulum endoplasmique
R _L	repeated long
R _S	repeated short
INM	inner nuclear membrane
INM-SM	inner nuclear membrane sorting motif
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
TK	thymidine kinase
U _L	unique long
U _S	unique short
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VSV G	vesicular stomatitis virus glycoprotein

À mes parents

Remerciements

Par la présente, je tiens à remercier profondément Dr. Roger Lippé de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et de m'avoir transmis les qualités professionnelles requises pour être un scientifique intègre. Merci à toute l'équipe Lippé pour l'ambiance agréable de travail durant toutes mes études: Johanne, Ginette, Sophie, Gaudeline, Sandra, Constantina, Pascal, Camille, Senami, Yordanka. Merci à tous également de m'avoir fait découvrir la culture québécoise.

Un merci particulier pour mon ancien chef en France, Dr. Laurent Combettes et Dr. Guy Trans Van Nhieu, qui m'ont démontrée la beauté de la science, et m'ont initié à cette grande aventure pendant mes études de DEA tout en m'encourageant jusqu'à aujourd'hui

Enfin, je remercie pour leur soutien précieux, tous mes amis qui vivent partout dans le monde, à Montreal, à Paris, à Londres, aux Etats-Unis, en Chine. Je les remercie pour m'avoir accompagnée, aidée et encouragée durant mes séjours à l'étranger, éloignée de ma famille. Merci à Meijiang, Li pour leur soutien technique; Merci à Marie-line, Laëtitia, Frédéric pour leur aide quant à la rédaction de cette thèse; Merci à Lincoln, Jia, Mei, Jenny, Zhen, Grace, Andy, Danny, June, Yan, Ying, Antonio, Yun, Lei, Kevin. Je n'oublie jamais les bons moments que j'ai passés avec vous.

CHAPITRE I:

Introduction

I. GÉNÉRALITÉS

I. Le Virus Herpès Simplex de type 1 et les maladies

1.1 Définition

Le Virus Herpès Simplex (HSV), est un agent infectieux qui cause l'herpès. Il représente l'une des principales causes de la maladie virale chez l'homme, et se classe au deuxième rang suivi par les virus de la grippe et du rhume (par exemple, virus influenza, rhinovirus et coronavirus).

1.2 Historique

Le virus herpès, le HSV, est connu depuis au moins 2500 ans av. J.-C. (avant Jésus-Christ). Bien que la recherche et le traitement disponible se soient accélérés au cours des 25 dernières années, le fait est que le HSV est présent depuis 45 siècles. Notre première connaissance de HSV peut être attribuée à l'ancienne Grèce, qui a inventé l'expression "herpès". Hippocrate avait utilisé ce terme pour décrire des lésions qui semblent ramper à la surface de la peau ([3], [4]). D'autres descriptions de l'herpès sont apparues dans les 18^e et 19^e siècles. Le premier lien entre l'herpès et les organes génitaux a été publié par John Astruc, un médecin du roi de France Louis XIV, en 1736, quand les prostituées françaises étaient sous surveillance médicale. Néanmoins, il a fallu attendre 1893 pour que le dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal reconnaisse la transmission humaine de l'herpès simplex d'un individu à l'autre ([5]).

Au cours du XX^e siècle, la recherche de HSV se développe. Dans les années 1930, les réponses immunitaires de l'hôte à HSV ont été minutieusement examinées et la propriété de latence de HSV a été caractérisée ([6], [7], [8]). Dans les années 1940 et 1950, il a été constaté que le HSV infecte plusieurs organes du corps incluant le système nerveux central ([9]). Un grand développement a eu lieu entre 1952 et 1956 avec l'application de la

culture de tissus permettant d'isoler plusieurs membres de la famille virus herpès humaine ([10], [11], [12], [13], [14]). C'est Karl Schneweis qui a proposé l'existence de deux virus distincts, soit le HSV-1, affectant la région labiale et le HSV-2, principalement associé à des lésions génitales ([15]). D'autres maladies qui résultent d'infections herpétiques ont été définies et évaluées depuis.

La recherche moderne sur le HSV a été établie sur la base des découvertes dans les années 1960 et 1970, incluant la caractérisation de l'unique architecture en multicouches de la particule virale ([16], [17], [18]), du génome de HSV ([19], [20], [21], [22]), du grand nombre de protéines qui composent la particule virale ([23], [24]), et de la régulation d'expression des gènes viraux ([25], [26]). La recherche sur le HSV s'avère réellement efficace à partir de 1982 et produit une quantité considérable d'informations sur la fonction des gènes viraux et l'interaction entre les protéines virales et cellulaires, grâce à de nouvelles techniques moléculaires comme la digestion de restriction, le clonage d'ADN, le séquençage de l'ADN, la construction de nouveaux virus par l'ingénierie génétique.

1.3 Classification

Le virus herpès simplex de type 1 fait partie de la grande famille des virus herpès, les *Herpesviridae*, qui sont omniprésents chez les vertébrés dans la nature. Dans la mesure où la plupart des espèces animales produit au moins un virus herpès et peu de virus herpès infectent naturellement plus d'une espèce, il nous est permis de croire qu'il existe plus de 130 herpèsvirus. Cette famille est subdivisée en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. La classification est basée sur les propriétés biologiques des virus. Par exemple, les membres d'*Alphaherpesvirinae* dont fait partie le HSV infectent une gamme d'hôtes variables, se reproduisent et se propagent rapidement en culture, tuent les cellules infectées et sont capables d'établir des infections latentes principalement mais pas exclusivement dans les ganglions sensoriels. Contrairement à cela, la gamme d'hôtes des membres de *Betaherpesvirinae* et de *Gammaherpesvirinae* est plus limitée, leurs cycles reproductifs plus long, et sont latents dans les lymphocytes ou autres

tissus.

À ce jour, huit virus herpès humains ont été identifiés (Human Herpes Virus (HHV), Table 1) et classifiés dans les trois sous-familles, incluant le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1 ou HHV-1) et de type 2 (HSV-2 ou HHV-2); le virus varicella-zoster (VZV ou HHV-3) qui cause la varicelle et le zona; le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV-4), qui provoque la mononucléose infectieuse ainsi que le lymphome de Burkitt; le Cytomégalo virus (CMV ou HHV-5) qui provoque un syndrome mononucléosique, la rétinite; le roséolovirus (HHV-6A et HHV6B) qui provoque la roséole et le HHV-7 qui pourrait également être associé à la roséole, et finalement le virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8) qui provoque un lymphome. Les espèces hôtes des virus herpès s'étendent dans le monde animal incluant les autres mammifères (les animaux de la ferme, les primates), les oiseaux, et même les animaux poïkilothermes (les reptiles, les huitres, le poisson zébré). Dans la littérature scientifique on retrouve le virus pseudorabies (PRV), l'agent causal de la maladie d'Aujeszky chez les porcs, qui est étudié comme un modèle pour le processus de l'infection lytique et pour comprendre les mécanismes moléculaires de neurotropisme du virus herpès. Le virus herpès de bovin de type 1 (BHV-1), l'agent causal de la rhinotrachéite infectieuse chez bovin, est quant à lui souvent étudié pour élucider les mécanismes moléculaires de latence. D'autres virus herpès animaux mentionnés dans la présente étude comprennent le virus équine de type 1 et de type 4 (EHV-1 et 4) qui causent l'avortement et des désordres neurologiques ou respiratoires chez les chevaux, le virus de la laryngotrachéite (ILTV) qui cause les maladies respiratoires chez les poulets et le virus de la maladie de Marek (MDV) qui cause le désordre lymphoprolifératif chez les poulets.

Table 1

Human <i>herpesviridae</i>		
Subfamily	Name	Abbreviation
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpes Simplex Virus Type-1	HSV-1/HHV-1
	Herpes Simplex Virus Type-2	HSV-2/HHV-2
	Varicella-Zoster Virus	VZV/HHV-3
<i>Betaherpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	CMV/HHV-5
	Human Herpesvirus-6	HHV-6
	Human Herpesvirus-7	HHV-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Epstein-Barr Virus	EBV/HHV-4
	Kaposi's Sarcoma Associated Virus	KSHV/HHV-8

Adapté de Paul E. Boehmer et al., 2003 [27]

1.4 Pathogénèse et manifestations cliniques

Il existe une grande variabilité de la symptomatologie clinique de l'infection primaire de HSV-1. Beaucoup de personnes infectées ont peu, voire aucun symptôme visible. Les manifestations physiques les plus courantes se trouvent au niveau de la peau et des muqueuses: l'herpès labial (classiquement appelé bouton de fièvre ou feu sauvage), gingivostomatite herpétique (infection de la bouche); panaris herpétique (infection des mains), herpès génital (lésions génitales), et eczéma herpétique. Des troubles plus graves se produisent lorsque le virus infecte l'œil (conjonctivite, kératite herpétique), ou envahit le système neuronal central (encéphalite herpétique). Les patients ayant un système immunitaire immature ou supprimé comme les nouveau-nés, les receveurs de greffe, ou les sidéens sont sujets à de graves complications de l'infection de HSV-1, incluant 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. Les conséquences peuvent

être très importantes et voir létale dans certain cas. L'infection de HSV-1 a également été associée à plusieurs autres maladies. Bien que la cause exacte de la paralysie de Bell, un type de paralysie faciale, reste inconnue, il a été constaté que le virus HSV-1 a été détecté dans le nerf facial de plus de 60% des patients atteints de cette maladie et que ces patients sont plus sujets aux réactivations fréquentes de HSV-1, ce qui suggère que le virus pourrait être impliqué dans la pathogénèse de cette maladie ([28], [29]). Il a été aussi proposé que le virus HSV-1 soit un facteur important étiologique dans la maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative. Dans ce cas, l'ADN de HSV-1 est retrouvé dans les plaques de bêta-amyloïde qui caractérisent la maladie d'Alzheimer, et dans certaines conditions, HSV-1 semble être particulièrement dommageable pour le système nerveux et augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer ([30], [31], [32]). Puisque le virus HSV persiste de façon permanente chez l'hôte, il y a un risque élevé d'infections concomitantes par des pathogènes multiples, par exemple, le VIH (le virus de l'immunodéficience humaine). Ainsi, des résultats des travaux de recherche récents ont montré que la séropositivité pour le HSV peut augmenter le risque d'infection par le VIH chez les personnes VIH négatives. L'infectiosité des personnes co-infectées par le VIH et le HSV peut aussi augmenter pendant les périodes de réactivation du HSV ([33], [34], [35]).

1.5 Traitement et prévention

Le développement de vaccins pour prévenir l'infection par le virus herpès suscite l'intérêt des scientifiques depuis le milieu des années 1920. Les textes font état de plus de 60 vaccins prophylactiques et thérapeutiques de HSV jusque dans les années 2000. Malheureusement aucun vaccin n'a été prouvé efficace pour la prévention de telles infections. En absence de vaccins efficaces pour contrôler les infections herpétiques, les drogues antivirales sont à la base du traitement clinique depuis leur développement dans les années 1970. Actuellement, presque tous les médicaments anti-herpèsvirus cliniquement utiles sont des analogues nucléosidiques, tels que l'acyclovir, communément disponible sous forme de valacyclovir (Valtrex), et le famciclovir qui tous deux ciblent l'ADN

polymérase virale, inhibant ainsi la réplication virale ([36], [37]). Ces analogues de nucléosides sont en fait des « prodrogues » dont l'activité et la sélectivité est en grande partie due à leur phosphorylation par la thymidine kinase virale (TK). Ils sont ensuite convertis en triphosphates par les kinases cellulaires en vue de rivaliser avec les triphosphates désoxyribonucléotides (dNTPs) comme substrats pour l'ADN polymérase virale. L'incorporation des formes triphosphate de ces médicaments dans l'ADN viral stoppe l'élongation de l'ADN et inactive la polymérase à ADN. Outre la polymérase à ADN virale, des protéines qui fonctionnent au cours de plusieurs étapes de la réplication du virus herpès représentent des cibles utiles pour les nouveaux médicaments antiviraux. Ceux-ci incluent, par exemple, les glycoprotéines virales permettant l'attachement et l'entrée du virus ([38]), les produits de plusieurs gènes nécessaires à l'expression des gènes viraux ([21], [22], [23], [24]) et le complexe hélicase-primase au cours de la réplication d'ADN viral ([25], [26], [27]). L'efficacité clinique des inhibiteurs de protéase anti-VIH (en combinaison avec d'autres médicaments anti-VIH) a conduit par analogie à de nombreux efforts afin d'exploiter les protéines virales impliquées dans les dernières étapes (l'assemblage et la sortie) du cycle viral de HSV-1 comme nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs inhibiteurs prometteurs ont déjà été identifiés. Par exemple, le maribavir, un composé D-ribosylbenzimidazole, inhibe la protéine kinase UL97 d'un autre virus herpès, cytomégalovirus humain (HCMV), qui s'avère être importante pendant la réplication virale, l'encapsidation de l'ADN viral et la sortie nucléaire (passage des nucléocapsides du noyau vers le cytoplasme) ([39], [40], [41], [42]). Tous les médicaments thérapeutiques décrits ci-haut agissent au niveau de protéines virales, ce qui garantit leur sélectivité et limite leur toxicité. Cependant, ces antiviraux classiques sont actifs seulement contre une gamme étroite de virus et, plus important, exercent une pression sélective pour l'émergence spontanée de virus mutants résistants aux médicaments. La recherche de nouveaux agents antiherpétiques, s'oriente donc vers des cibles cellulaires essentielles à différentes étapes de son cycle viral. Pour les virus herpès, la première démonstration que les protéines cellulaires peuvent servir de cibles de médicaments antiviraux efficaces impliquait l'utilisation de l'inhibiteur de la kinase cycline-

dépendante (CDK) roscovitine, qui est efficace contre le HCMV ([43], [44], [45], [46]). Bien que certains soient convaincus du fait que ces médicaments seraient intrinsèquement cytotoxiques et produiraient des effets secondaires indésirables chez les patients, des essais en cours indiquent que la toxicité pourrait ne pas être un problème insurmontable *in vivo*.

Le but ultime du développement de médicaments anti-herpèsvirus devrait être de combattre la persistance du virus. Tous les médicaments sur le marché ciblent seulement les virus en réplication active et non ceux qui sont latents. Ils peuvent réduire la production virale et restreindre la transmission, ce qui permet d'atténuer la sévérité des symptômes, mais le risque de réactivation est toujours présent. Il est donc nécessaire d'identifier les protéines virales et cellulaires essentielles pour maintenir la latence, qui demeure assez nébuleux pour l'instant. Une nouvelle stratégie de découverte de médicaments sera donc nécessaire.

2. Caractéristiques du virus herpès simplex de type 1

2.1 Structure du virion

Le HSV-1 consiste en un noyau dense aux électrons contenant le génome d'ADN bicaténaire linéaire enfermé dans une capsidie icosaédrale. La capsidie est elle-même englobée par une couche de protéines amorphes, parfois asymétriques, désignées sous le terme générique de tégument, et ensuite par une enveloppe lipidique dérivée de la cellule hôte (Fig. 1). Récemment, la composition des particules de plusieurs membres de la famille de virus herpès a été analysée par spectrométrie de masse. Une multitude de protéines virales et plusieurs protéines cellulaires, aussi bien que des ARNs viraux et cellulaires ont été détectés dans les virions extracellulaires purifiés ([47], [48], [49], [50], [51], [52], [53]). Pour le HSV-1, 8 protéines associées à la capsidie, 13 glycoprotéines virales, 23 protéines de tégument potentielles et 49 protéines de la cellule hôte ont été identifiées ([54]).

2.1.1 Le génome viral

Le séquençage complet du génome viral de HSV-1 (souche 17+; numéro d'accèsion X14112) décrit le génome comme étant de 152 kbp ([55]). Ce génome consiste en deux segments liés de façon covalente, soit une séquence unique longue (U_L) et une séquence unique courte (U_S) qui sont toutes deux flanquées d'une paire de séquences répétées inversées (R_L : ab et $b'a'$; R_S : $a'c'$ et ca , respectivement) (Fig. 2). Les études en cours indiquent que le HSV-1 code pour au moins 74 gènes parmi lesquels 58 se trouvent dans le segment long, 13 dans le segment court et 3 gènes en deux copies dans les séquences répétées inversées ([56]). Cependant, certains chercheurs ont suggéré l'existence de gènes viraux supplémentaires, incluant $UL8.5$, $UL9.5$, $UL10.5$, $UL12.5$, $UL20.5$, $UL27.5$, $UL43.5$ et $US1.5$. HSV-1 possède aussi deux origines de réplication, $oriS$ (en deux copies) et $oriL$ (en une copie), qui se localisent dans les séquences répétées flanquant U_S et au milieu de la U_L , respectivement. Ces deux origines semblent être redondantes d'un point de vue fonctionnel, mais il est aussi possible qu'elles soient activées différemment en fonction du type cellulaire, i.e. les neurones durant la réactivation de latence vs. les cellules épithéliales durant l'infection lytique.

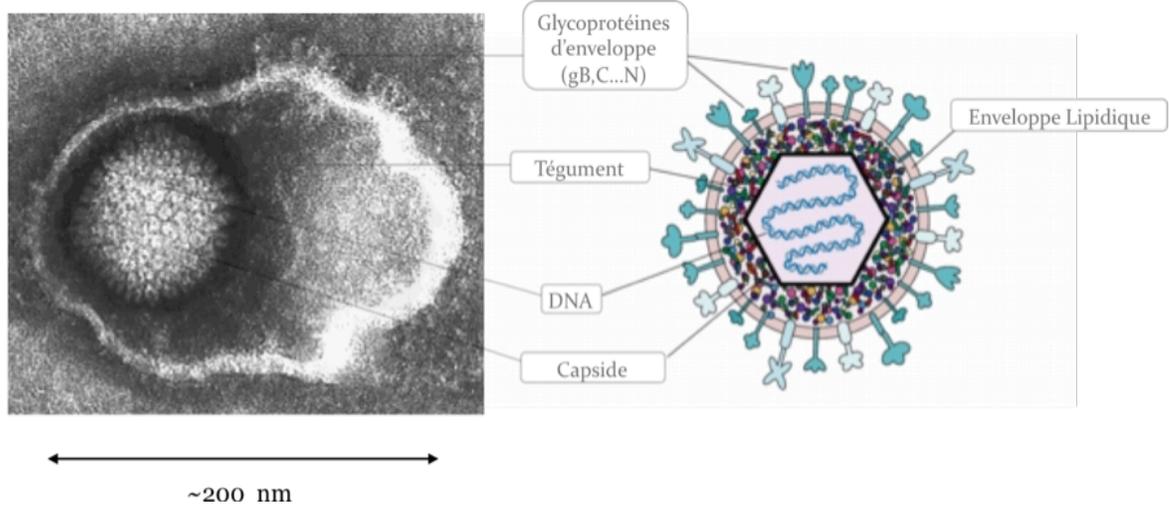


Fig. 1 Structure du virion (de Linda Stannard, Département de microbiologie médicale, Université de Cape Town)

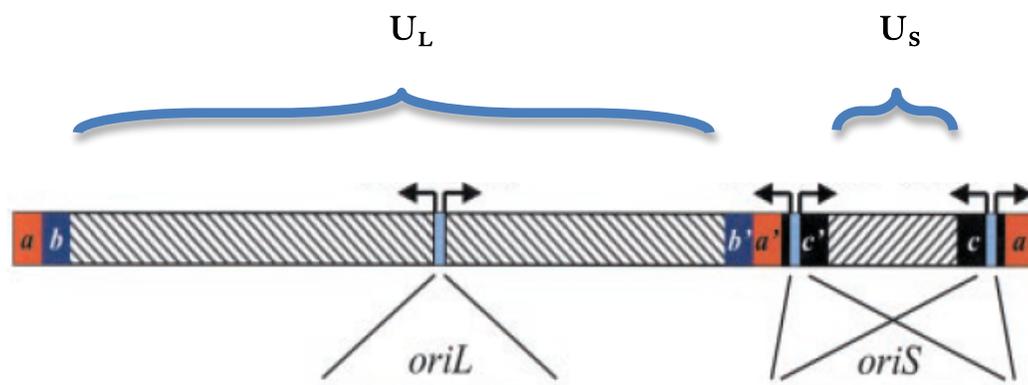


Fig. 2 Schéma représentant le génome de HSV-1 (adapté et modifié de Paul E. Boehmer et al. 2003 [27])

2.1.2 La capsid virale

La capsid virale de HSV-1 se compose de 162 capsomères disposées en icosaèdre, dont 150 hexons, chacun composés de six copies de la protéine majeure de la capsid VP5 (UL19), et 12 pentons, chacun contenant cinq copies de VP5 ([57], [58], [59]). Les pentons et hexons sont reliés entre eux par 320 triplex composés de deux exemplaires de VP23 (UL18) et une copie de VP19C (UL38) ([60]). Un des vertex de la coquille est composé de 12 copies de la protéine codée par le gène UL6 et sert de « portal » à travers lequel l'ADN génomique viral peut être incorporé ([57], [61]).

La coquille décrite ci-haut est pratiquement identique dans la capsid mature et immature. La capsid immature est appelée procapsid. Elle contient à l'intérieur de la coquille la protéine d'échafaudage VP22 (UL49), qui aide à l'assemblage de la capsid, et un petit nombre de molécules de protéase codée par UL26, qui est éventuellement autoclivée en VP24 et VP21 ([62], [63], [64], [65], [66]). Les procapsides sont plutôt sphériques et beaucoup moins stables à basse température, ce qui les rend plus difficile à isoler ([67], [68], [69]). À partir des cellules infectées, trois types de capsides stables, angulaires (capsides A, B et C) peuvent être isolés sur des gradients de densité ([24], [70], [71]). La capsid A manque à la fois de protéines d'échafaudage et d'ADN viral ([72]); la capsid B ne contient pas d'ADN viral mais plutôt les formes clivées de protéines d'échafaudage ([73], [74]); alors que la capsid C contient le génome viral et peut poursuivre sa maturation pour évoluer en virions infectieux ([71]). Certains chercheurs pensent que les trois formes de capsides sont dérivées de la procapsid immature, mais les capsides A et B sont plutôt un sous-produit de l'encapsidation sans maturation subséquente.

2.1.3 Le tégument

Le tégument du virion est une couche de protéines diverses située entre la capsid et l'enveloppe virale. L'analyse par cryo-microscopie électronique a montré que le tégument n'est pas ordonné, même si une petite quantité de la densité de ce tégument est observée près des pentons ([75], [76]). Une analyse protéomique récente des virions extracellulaires de

HSV-1 suggère que le tégument se compose principalement de 23 protéines virales (UL7, UL11, UL13, UL14, UL16, UL21, UL23, UL36, UL37, UL41, UL46, UL47, UL48, UL49, UL50, UL51, UL55, US2, US3, US10, RL1, RL2, ICP4). Des traces des protéines de la cellule hôte sont également présentes ([54]). De nombreuses études suggèrent que l'acquisition des protéines tégumentaires des nucléocapsides est séquentielle et peut se produire en différents sites dans la cellule hôte, ce qui implique un réseau complexe d'interactions capsid-tégument, tégument-tégument, et tégument-enveloppe ([77], [78], [79], [80], [81], [82], [83], [84], [85], [86], [87], [88]). Les protéines tégumentaires possèdent des fonctions clés tout au long du cycle viral de HSV-1. Ces fonctions incluent, mais ne sont pas limitées: au ciblage des composants viraux vers les sites de réplication, d'assemblage, de bourgeonnement ou d'enveloppement; le transport du virus via le recrutement de moteurs cellulaires et l'interaction avec différentes composantes du cytosquelette lors de l'entrée et de la sortie; la régulation de l'expression des gènes et des protéines viraux ou cellulaires, et l'assemblage des virions ([89], [85], [90], [91], [92], [93], [83], [77]).

2.1.4 L'enveloppe virale

L'enveloppe du virion mature est une membrane qui se compose d'une bicouche lipidique provenant d'un compartiment cellulaire et sur lequel sont hérissés des spicules, i.e. des glycoprotéines d'origines viraux. Pour HSV-1, l'enveloppe du virion mature est enrichie en sphingomyéline et en phosphatidylsérine qui est typique des membranes dérivées de l'appareil de Golgi (*trans*-Golgi, TGN et membrane plasmique), ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle le TGN est le compartiment cellulaire d'où vient l'enveloppe finale du virus HSV-1 ([94]). L'enveloppe du virion mature de HSV-1 contient 11 glycoprotéines viraux (désignées gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM,) et 2 protéines membranaires non glycosylées (UL20, UL49A ou gN) ([54]). Plusieurs autres protéines sont aussi présentes dans l'enveloppe virale dans les autres familles de virus herpès, i.e. UL43, UL45, UL56, US9 ([54]). Les glycoprotéines de l'enveloppe peuvent former des homodimères ou des hétérodimères tant via des liaisons covalentes que noncovalentes.

Trois familles de complexes de glycoprotéines immunologiquement distinctes, ont été décrites chez le HSV: gCI, représentée par un homodimère de gB liée par un pont disulfure; gCII, le complexe de gM/gN lié par des liaisons covalentes et/ou noncovalentes; et gCIII, qui consiste en un complexe de gH/gL lié par des liaisons covalentes et noncovalentes ([95]). En terme de fonction, les glycoprotéines de l'enveloppe peuvent également être divisées en deux catégories: les glycoprotéines non essentielles, qui sont dispensable pour la réplication productive, et les glycoprotéines essentielles, dont la présence est requise pour la réplication en culture cellulaire ([96]). Ces glycoprotéines de l'enveloppe jouent un rôle important dans plusieurs étapes du cycle viral pendant l'attachement du virus aux cellules et la pénétration du virus dans la cellule, la relâche nucléaire du virus ([97]), et la morphogénèse du virion ([98], [99], [2], [1]).

2.2 Le cycle de réplication de l'infection lytique

2.2.1 L'entrée

La première étape de l'infection est le passage de la capsid virale à travers la membrane plasmique de la cellule hôte, ce qui marque une étape cruciale dans la pathogénèse virale. Le virus enveloppé accompli généralement cette étape en catalysant une réaction de fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la surface de la cellule, entraînant ainsi la libération de la nucléocapsid virale dans le cytoplasme. Contrairement aux autres virus enveloppés qui utilisent une ou deux glycoprotéines de l'enveloppe pour effectuer cette entrée, l'HSV-1 requiert quatre glycoprotéines, soient gD, gB, gH, gL. Ces glycoprotéines sont nécessaires et suffisantes pour l'entrée. Toutefois, HSV-1 peut utiliser une porte d'entrée différente selon le type cellulaire qu'il infecte: 1) via la fusion directe entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique dans les cellules Véro, Hep2 et les cellules neuronales ([100], [101], [102]); 2) par endocytose classique, qui est pH-dépendante, dans les cellules épithéliales HeLa, CHO-K1 et les keratinocytes ([101], [103]); 3) ou par une endocytose alternative pH-indépendante dans les melanoma B78H1 ([104]). Malgré des mécanismes distincts, ils ont en commun l'attachement des virus à une membrane cellulaire

via une liaison avec un récepteur cellulaire et un processus de fusion. Le virus HSV-1 s'attache tout d'abord à la cellule hôte en interagissant avec les héparans sulfates de protéoglycan (HSPG) en surface cellulaire via la glycoprotéine d'enveloppe virale gB ou gC ([105], [106], [107]). Bien que cette étape soit importante pour l'efficacité de l'entrée, elle n'est pas essentielle du moins en culture ([108]). L'attachement du virus permet l'accumulation des virus à la surface cellulaire ainsi que la reconnaissance des ligands viraux avec leurs récepteurs cellulaires. Pour HSV-1, la glycoprotéine gD constitue le ligand viral. Elle interagit indépendamment avec un des récepteurs cellulaires de surface : la nectin-1 ([109]), le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM) ([110]) ou une forme spécifique d'héparan sulfate modifiée par des 3-O-sulfotransferase ([111]). Il a été suggéré que l'interaction de gD avec son récepteur puisse transmettre un signal à la machinerie de fusion, gB et l'hétéromère gH/gL, qui mène au changement de conformation dans ces protéines et finalement à la fusion membranaire ([112]). La compréhension du mécanisme précis de l'activation médiée par ces récepteurs et la fusion membranaire nécessite des investigations supplémentaires.

Après l'entrée dans la cellule hôte, les nucléocapsides désenveloppées mais contenant plusieurs des protéines tégmentaires se dirigent vers le noyau. Les protéines tégmentaires sont indispensables pour cibler les capsides vers le noyau via une interaction avec les microtubules ([113], [114], [115], [116], [117]). Après ce transport intracytoplasmique, les capsides s'accumulent à la membrane nucléaire et s'associent avec le complexe du pore nucléaire qui servira de passage pour l'insertion du matériel génétique viral dans le noyau. Au noyau, la transcription du génome viral, la réplication d'ADN viral de même que l'assemblage des capsides et l'encapsidation du génome viral peut alors avoir lieu ([118], [119], [120], [121], [122], [123]).

2.2.2 Les événements précoces de la réplication virale

Les événements clés de la réplication virale, qui se produit dans le noyau, commencent par la transcription du génome viral. L'ADN viral est transcrit par la

polymérase II d'ARN de la cellule hôte, mais avec la participation des facteurs viraux ([124], [125]). La synthèse des produits des gènes viraux (les ARN et les protéines) est régulée de façon coordonnée et ordonnée séquentiellement en cascade. Les protéines du virus HSV-1 sont organisées en trois classes, selon la régulation de leur expression. La première série de produits des gènes viraux se compose de cinq protéines connues comme des protéines alpha ou des protéines précoces-immédiates (ou IE pour « immediate early ») et incluent ICP₀, ICP₄, ICP₂₂, ICP₂₇, ICP₄₇. Leur transcription ne nécessite pas la synthèse *de novo* de protéines virales, puisqu'une protéine transactivatrice VP16 présente dans le tégument des virions qui entrent dans la cellule est responsable de l'initiation de la transcription ([126]). La présence des protéines alpha est toutefois requise pour la synthèse de la deuxième série de produits de gènes viraux connu sous le nom de bêta ou les protéines précoces (ou E pour « early »). La plupart des protéines bêta sont responsables du métabolisme de l'acide nucléique viral et de la réplication du virus. Par exemple, ICP8 est essentiel pour la réplication de l'ADN et UL23 code pour la kinase thymidine. L'initiation de la réplication du génome viral permet l'expression de la troisième classe de protéines, les protéines gamma ou tardives (ou L pour « late »), qui sont pour la plupart des composantes structurales du virion, incluant des protéines de la capsid, du tégument et les glycoprotéines de l'enveloppe. Elles sont regroupées dans deux groupes : les gamma-1 qui requièrent absolument la réplication d'ADN viral pour être exprimées, alors que les gamma-2 ne dépendent pas strictement de la réplication virale mais sont stimulées par celle-ci.

Lorsque les protéines bêta s'expriment, plusieurs entre elles sont recrutées sur le génome d'ADN parental dans des sites spécialisés localisés près des domaines nucléaires ND10 dans le noyau de la cellule hôte, où est initiée la synthèse d'ADN ([127], [128]). Au fur et à mesure que la synthèse progresse, les molécules d'ADN nouvellement synthétisées et les facteurs de réplication s'accumulent en une structure nommée compartiment de réplication ([129]). Le génome viral est répliqué sous le modèle de « cercle roulant » qui produit une longue chaîne de concatémères du génome viral. Cette chaîne sera par la suite

clivée en unité unique et incorporée dans la capsidite lors de l'encapsidation ([130]). Sept protéines virales sont requises pour la réplication de l'ADN viral: la protéine initiatrice UL9; la protéine liant l'ADN linéaire simple brin, UL29; le complexe hélicase-primase composé des protéines UL5, UL8 et UL52 ainsi que l'ADN polymérase viral formée de UL30 et UL42 ([131]).

Le processus de l'assemblage de la capsidite chez le virus herpès s'apparente au processus utilisé par des bactériophages à génome d'ADN bicaténaire, ce qui laisse croire à un ancêtre commun pour ces deux microorganismes. En effet, dans les deux cas, il y a tout d'abord l'association de protéines de la capsidite avec des protéines d'échafaudage, entraînant la formation de procapsidites sphériques immatures ([67], [132]). La maturation de ces procapsidites implique simultanément la protéolyse de l'échafaud par sa protéase associée, l'expulsion des produits d'échafaudage de la capsidite, le clivage de l'ADN génomique en unité unique, et l'emballage de l'ADN génomique dans la capsidite. Les événements ci-dessus sont accompagnés morphologiquement d'une angularisation de la capsidite en configuration icosaédrique stable ([70]). *In vivo*, la protéolyse de l'échafaud par sa protéase semble être le facteur clef dans l'initiation du processus de maturation des capsidites. Pour HSV-1, sept protéines virales sont impliquées dans le clivage et l'encapsidation du génome : le portal UL6; le complexe de terminase (nucléase site-spécifique) UL15 et UL28, ainsi que UL17, UL25, UL32, UL33 qui sont requises pour l'encapsidation ([133], [134], [135], [136], [137], [138], [139], [140], [141], [142], [143], [144]). Les nucléocapsidites fraîchement synthétisées sont ensuite prêtes à sortir du noyau dans le but de poursuivre l'infection.

2.2.3 La maturation

Les prochaines étapes du cycle de réplication de HSV-1 consistent en la sortie des nouvelles capsidites du noyau, l'acquisition du tégument et d'une enveloppe et enfin la relâche de virions matures de la cellule hôte. Les mécanismes exacts restent nébuleux pour le moment et soulèvent plusieurs débats intéressants. Trois modèles de mécanisme s'opposent pour tenter d'expliquer le processus de sortie, désignés respectivement comme «modèle de

dé-enveloppement et ré-enveloppement» ([145] et Fig. 3); «modèle luminal» ([146], [147]); et « modèle des pores élargis » ([148]).

Un processus du bourgeonnement des capsides intranucléaires au travers la membrane nucléaire interne (INM) s'applique aux deux premiers modèles. Après l'assemblage, les nucléocapsides dispersées dans le noyau s'orientent vers et prennent contact avec la INM avant le bourgeonnement. Le mouvement intranucléaire des capsides dépend des filaments d'actine nucléaire qui est induits par l'infection de HSV-1 ([149]). Pour que les capsides puissent accéder à la membrane interne, ce qui est normalement empêché par le réseau de lamines nucléaires, une kinase cellulaire, la protéine kinase C est recrutée par le complexe de deux protéines virales, UL31 et UL34 ([150], [151]). Elle est impliquée, avec une kinase virale Us3 ([152]), dans la phosphorylation des lamines A/C et/ou B. Il en résulte une dissolution locale du réseau laminaire, ce qui permet ainsi un contact étroit entre les nucléocapsides et la membrane nucléaire interne. Il a été suggéré que le complexe UL31/UL34 soit non seulement nécessaire mais aussi suffisant pour le bourgeonnement. L'expression de ces deux protéines dans des cellules transfectées cause la formation de vésicules dans la membrane nucléaire interne qui ressemble par microscopie électronique à l'enveloppe primaire ([153]). Ces deux protéines peuvent ainsi remodeler directement la conformation des lamines nucléaires et l'architecture d'enveloppe nucléaire sans l'implication de kinase ([152], [154], [155]). Du côté des nucléocapsides, cependant, aucune protéine ne s'est avérée de manière concluante responsable de médier le contact du complexe UL31/34 à la INM. Dans les deux premier modèles, «modèle de dé-enveloppement et ré-enveloppement» et «modèle luminal», les nucléocapsides bourgeonnées au travers de la membrane nucléaire interne, acquièrent une enveloppe et génèrent ainsi des particules virales enveloppées dans l'espace périnucléaire (i.e. l'espace entre les membranes nucléaires interne et externe).

Dans le modèle de «dé-enveloppement et ré-enveloppement», les particules virales enveloppés dans l'espace périnucléaire (nommés virions primaires) se débarrassent de leur enveloppe primaire en fusionnant avec la membrane nucléaire externe pour se retrouver

sans enveloppe dans le cytoplasme. Ces nucléocapsides nues acquièrent leurs téguments et ensuite leurs enveloppes finales au niveau du site d'enveloppement final, le TGN (*Trans-Golgi network*). Dans le «modèle luminal», les virions périnucléaires entrent dans le compartiment luminal du réticulum endoplasmique, qui est en continuité avec l'espace périnucléaire, et sont transportées le long de la voie classique de sécrétion des protéines en gardant l'enveloppe acquise à la membrane nucléaire interne ([146], [156], [157]). Dans ce second modèle, toutes les composantes du virion mature doivent faire partie du virion périnucléaire, et vice versa toutes les composantes du virion périnucléaire doivent être retenues dans le virion mature. Ce n'est clairement pas le cas pour la UL31 et UL34 qui n'ont été détectées que dans les virions périnucléaires ([158]). De plus, certaines des composantes majeures du tégument du virion mature, i.e. UL47, UL49 ou possiblement UL48, sont absentes sur les virions périnucléaires ([159], [160], [161]). En outre, dans une étude récente, la délétion simultanée des glycoprotéines gB et gH, qui sont des composantes de base de la machinerie de fusion lors de l'entrée, perturbe la sortie nucléaire du virus et cause l'accumulation de virions périnucléaires, ce qui éclaireit quelque peu la base moléculaire du mécanisme de fusion entre l'enveloppe primaire et la membrane nucléaire externe ([97]). Il est intéressant de noter que le mécanisme et la régulation moléculaire des deux processus de fusion au niveau de la membrane plasmique et de la membrane nucléaire semble être différents l'un de l'autre, malgré le fait qu'ils impliquent tous les deux les même glycoprotéines fusogéniques ([162], [163], [164]).

Plus récemment, un troisième modèle s'est ajouté, le « modèle des pores élargis » qui suggère que les pores nucléaires sont dilatés durant l'infection pour atteindre une taille capable d'accommoder le passage passif des nucléocapsides vers le cytoplasme ([148], [165], [166]). Ce modèle exclut le bourgeonnement entre les capsides intranucléaires et la membrane nucléaire interne. Toutefois, d'autres études ont démontré que les pores nucléaires ne semblent pas être touchés dans leur morphologie ([167]), et conservent leur fonction de « gating » ([168]) jusqu'à la fin de l'infection. De plus, les changements dans le réseau des pores nucléaires, qui se produisent très tard dans l'infection, ne sont pas une

condition préalable à la sortie des capsides intranucléaires de HSV-1 ([169]). Par conséquent, il semble que les évidences biochimiques, génétiques et morphologiques supportent le modèle de déenveloppement/réenveloppement.

Nous ne savons pas clairement comment les capsides cytoplasmiques sont dirigées vers le site d'enveloppement final. Il a été montré que le tégument interne UL36 est requis pour la mobilité des capsides le long des microtubules *in vitro* ([115]) et *in vivo* ([116]), alors que UL37, qui interagit avec UL36, augmente cette mobilité ([170], [116]). Néanmoins, aucune interaction directe entre UL36 et des protéines motrices cellulaires associées aux microtubules n'a été identifiée jusqu'ici ([171]). Plusieurs autres protéines virales ont été identifiées comme interagissant avec les composantes des moteurs kinésine, mais aucune ne s'est montrée cruciale pour le transport de capside jusqu'à présent ([171], [172]).

Il semblerait que l'enveloppement final ait lieu au TGN ([173], [174], [175], [176]). Quoi qu'il en soit, le compartiment ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) et les endosomes ont aussi été proposés comme sites alternatifs de l'enveloppement ([177], [178], [179], [176]).

Il a déjà été proposé qu'un réseau complexe d'interactions protéine-protéine avec une redondance importante favorise la tégumentation et l'enveloppement du virus herpès ([180], [181], [167], [182], [183], [184], [185], [186], [91], [187], [188], [87]). Certaines protéines tégumentaires s'ajoutent à la capside soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme, ce qui incluant possiblement UL36 et UL37 («tégument interne»). D'autres protéines tégumentaires s'accumulent au site d'enveloppement, via l'interaction avec le domaine cytoplasmique de la protéine d'enveloppe virale («tégument externe»). Ces protéines s'incorporent dans les virions lors de l'enveloppement, ce qui inclue entre autre les protéines associées à la membrane, UL11 et UL49. Pour sa part, UL11 se lie au TGN via une chaîne lipidique myristoyl et palmitoyl. UL11 interagit elle-même avec deux autres protéines tégumentaires UL16 et UL21 ([189], [88], [190]). Quant à elle, UL49 interagit physiquement avec les queues cytoplasmiques des glycoprotéines gE et gM. Elle se lie aussi avec la protéine tégumentaire UL48 qui, à son tour, interagit avec la queue cytoplasmique

de gH ([80]) et gD ([78]). Il a été proposée que UL48 joue un rôle central pour relier le tégument interne et externe ([191], [192]). La délétion de certaines protéines du réseau des protéines de tégument/enveloppe a des effets minimes sur la maturation des virions, alors que l'élimination de plusieurs d'entre elles, par exemple UL36 ([193]), UL37 ([194]) ou UL48 ([191]), compromet sérieusement la tégumentation et l'enveloppement final des virions. Il en résulte alors d'énormes accumulations intracytoplasmiques de capsides non enveloppées. Dans certains cas, la délétion simultanée de deux ou trois protéines est nécessaire pour avoir des effets décrits ci-haut, par exemple, UL11/gM ([98], [99]) et gD/gE/gI ([2]), ce qui suggère une redondance des interactions et des fonctions des composantes structurales virales.

Le modèle de Ré-enveloppement de la sortie de HSV-1

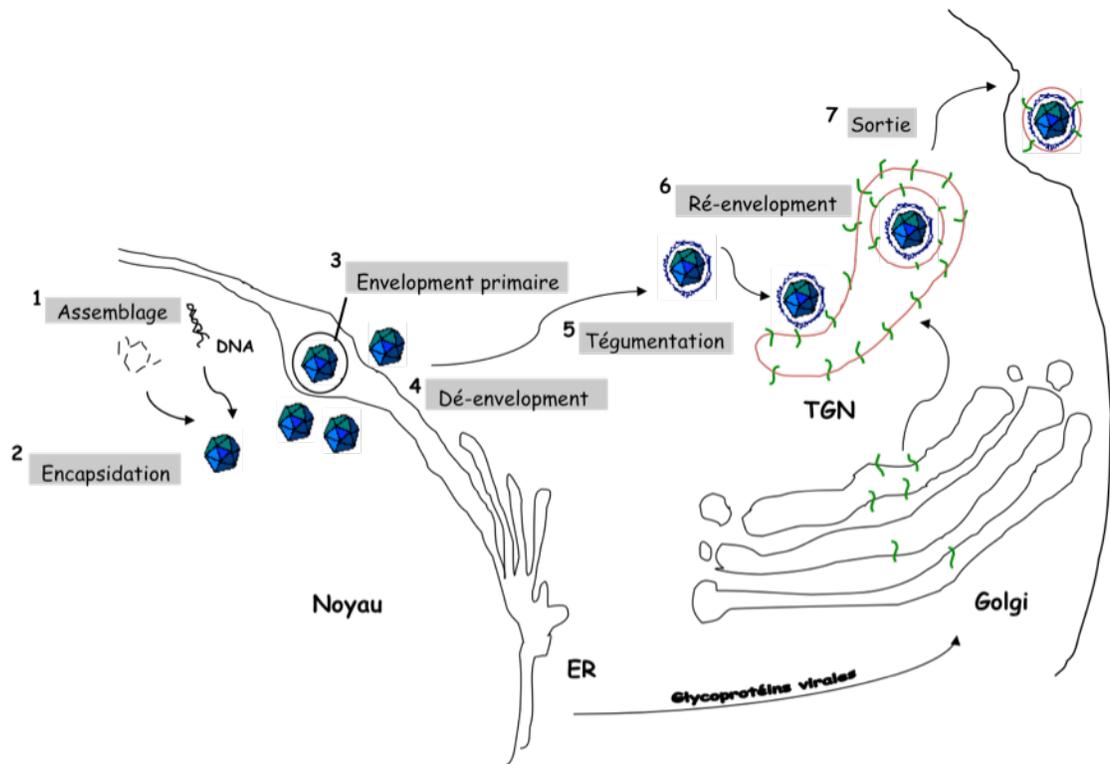


Fig. 3 Schéma du modèle de dé-enveloppement et ré-enveloppement de la sortie de HSV-1

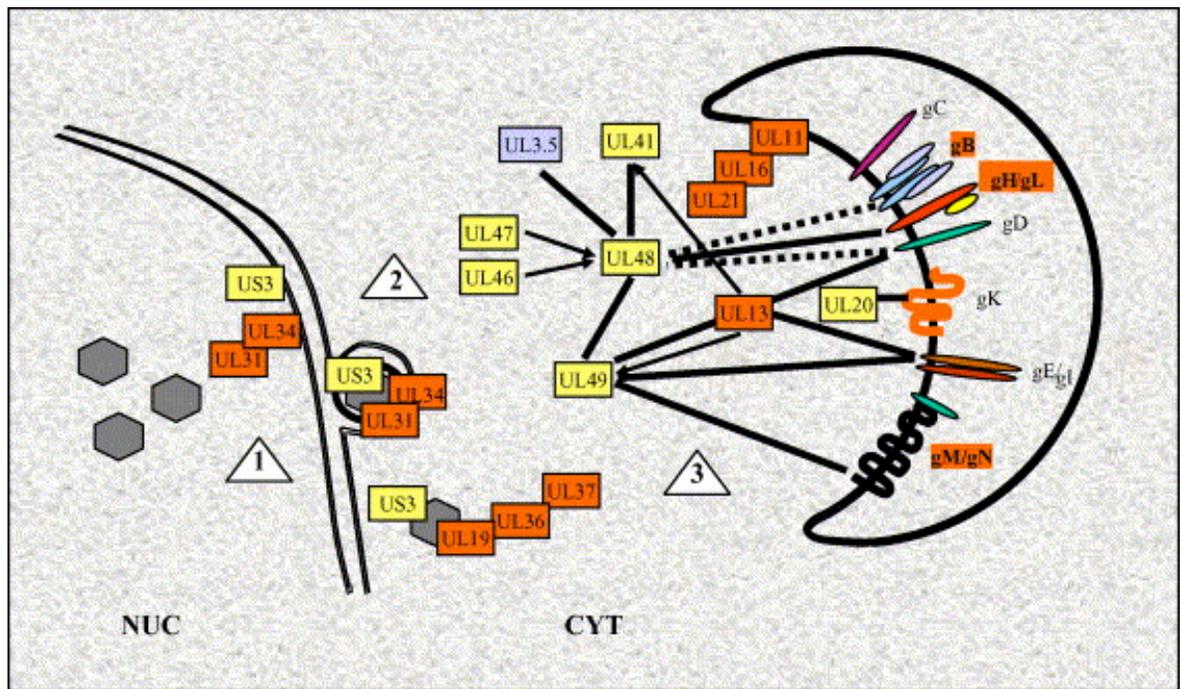


Fig. 4 Schéma des interactions moléculaires lors de la formation du virion HSV-1 et/ou PRV. (Adaptée de Mettenleiter TC. 2006 [182])

2.2.4 Sortie du TGN

La sortie des virions enveloppés hors de la cellule hôte implique leur transport dans des vésicules contenant les virions enveloppés du site d'enveloppement final à la membrane plasmique. La relâche subséquente des virus dans le milieu extracellulaire a lieu par fusion de ces vésicules avec la surface de la cellule, sans provoquer la lyse complète de celle-ci. Très peu de détails sont connus en ce qui concerne la base moléculaire de ce processus. Des équipes ont proposé que les protéines virales UL20 et gK jouent un rôle dans ce processus. Leur rôle précis, cependant, demeure toujours obscur et il a été suggéré que UL20 et gK jouent un rôle avant ou pendant l'enveloppement plutôt que durant la relâche du virus à la membrane plasmique ([195], [196]). Par contre, les études récentes dans notre laboratoire ont révélées que le HSV-1 emprunte une voie de transport conventionnelle impliquant une protéine cellulaire, la protéine kinase D pour quitter le site d'enveloppement, le TGN, et atteindre la membrane plasmique ([197]). Cependant, le mécanisme moléculaire de la sortie des particules virales au niveau de la membrane plasmique reste toujours nébuleux.

2.3 Propagation du virus

Les étapes initiales de l'infection virale sont généralement décrits comme la liaison de virions libres avec des cellules permissives suivie par l'entrée et la réplication. Bien que cette route de l'infection est sans doute important, de nombreux virus enveloppées, y compris le HSV-1, peuvent également se propager efficacement par passage direct d'une cellule à l'autre sans diffusion dans l'environnement extracellulaire. La propagation virale de cellule à cellule facilite non-seulement la transmission virale rapide, mais peut également favoriser l'évasion immunitaire ainsi influencer les maladies.

Durant le processus de la propagation intercellulaire, les virions nouvellement assemblés sont dirigés vers des domaines spécialisés de la surface cellulaire, i.e. les jonctions des cellules épithéliales ou les synapses des cellules neuronales. Les virions enveloppés libérés dans les espaces étroits entrent dans les cellules adjacentes par un processus similaire à l'entrée des particules virales extracellulaires, ce qui implique les mêmes effecteurs.

Toutefois, à l'exception des ces glycoprotéines, le complexe hétéromère des glycoprotéine gE/gL est également impliqué ([198], [199]).

2.4 Infection Latente

In vivo, outre l'infection lytique, il existe une autre phase d'infection particulière chez le virus herpès, l'infection latente. La capacité du virus herpès à persister toute la vie chez ses hôtes naturels est l'un des aspects les plus intellectuellement stimulants de la biologie du virus herpès. Chez le HSV, suivant la propagation dans le tissu au site primaire de l'infection, les cellules épithéliales de la muqueuse buccale, les virus pénètrent par fusion dans les neurones sensoriels aux extrémités des axones et les nucléocapsides se déplacent par transport rétrograde axonal vers le corps cellulaire des neurones du ganglion de Gasser où la persistance s'établi. Dans un état latent, le génome viral existe sous forme d'épisomes circulaires qui ne possèdent pas de fragments terminaux, et ainsi n'est pas capable de se répliquer ([200], [201], [202], [203]). De plus, l'expression des gènes viraux lytiques est également réprimée durant l'infection latente due à l'association des promoteurs de gènes lytiques viraux avec des formes hétérochromatines des histones ([204]). Malgré la répression de la réplication et de l'expression des gènes viraux lytiques, il y a une maintenance de transcription. L'unité de transcription du gène LAT (Transcrits Associés à la Latence) qui se trouve dans la région répétitive inversée flanquant la séquence U_L, produit plusieurs espèces d'ARN par épissage, collectivement dénommés les LATs ([205], [206], [207]). Ces ARN ne sont pas traduits en protéines ([208], [209]). Le virus latent conserve la capacité de se reproduire et de provoquer des maladies lors de la réactivation. Le niveaux de transcription LAT baisse ([210]) et les transcrits des gènes lytiques s'accumulent ([211], [212], [213]). Le virus commence à passer de l'état latent à l'état lytique. Les virus infectieux ainsi assemblés sont menés par transport antérograde axonal aux tissus périphériques, généralement des cellules près de l'emplacement de l'infection initiale. En fonction de plusieurs facteurs, y compris le statut immunitaire de l'hôte, la réactivation peut être asymptomatique ou entraîner une lésion récurrente, dont la gravité peut varier

considérablement. La réactivation peut être provoquée par divers stimuli locaux, tels que des blessures aux tissus innervés par les neurones abritant des virus latents, ou par des stimuli systémiques (par exemple, le stress physique ou émotionnel, l'hyperthermie, l'exposition à la lumière UV, la menstruation, le déséquilibre hormonal, l'immunosuppression).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de l'établissement, la maintenance et la réactivation de l'infection latente des neurones sensoriels par le HSV. Il est probable que plusieurs de ces mécanismes se combinent pour conduire à l'infection latente : 1) Répression de l'expression des gènes viraux lytiques par des facteurs de la cellule hôte ([214], [215]); 2) Le manque de facteurs dans la cellule hôte. Ainsi, plusieurs études ont soulevé l'idée que les neurones sensoriels manquent de facteurs essentiels pour l'expression des gènes α de HSV, par exemple les facteurs de transcription ([216], [217], [218]); 3) L'inhibition de l'expression des gènes viraux lytiques par des fonctions virales. Bien qu'aucun gène viral ne soit absolument essentiel pour l'infection latente, certaines études ont montré que les LATs conduisent à une répression de l'expression des gènes au cours de l'infection lytique ([219]) et de l'infection latente ([220]) dans les ganglions de Gasser murin; 4) L'inhibition de la réplication virale par la réponse immunitaire. Il a été rapporté que des cellules T CD8⁺ ou IFN- γ peuvent bloquer l'expression des gènes viraux et la réplication conduisant à la réactivation dans les ganglions ([221], [222], [223]).

Un autre aspect de l'infection latente concerne le transport du virus dans les cellules neuronales. Certain équipes ont proposé ([224]) que pendant le transport antérograde axonal de HSV-1 (sortie du virus) lors de la réactivation, les nucléocapsides et les glycoprotéines de l'enveloppe sont transportées séparément, et que la formation du virion et la sortie se produisent le long l'axone dans les varicosités ([225], [226]), au niveau des synapses ou des cônes de croissance terminale, ce qui représente le « modèle séparé » de transport axonal ([227], [228], [229], [230]). Par contre, chez un autre membre des alphaherpèsvirus, PRV, le virus est assemblé et enveloppé au niveau du corps du neurone,

et voyage ensuite le long de l'axone dans des vésicules de transport, ce qui correspond au « modèle marié » ([231], [232], [233]). Clairement, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les différences putatives dans les phénotypes respectifs des deux alphaherpèsvirus.

3. Que sait-on au sujet de gM?

3.1 La glycoprotéine gM dans l'*herpesviridae*

L'enveloppe de virus herpès contient de multiples glycoprotéines qui sont présumées comme jouant divers rôles dans l'attachement, l'entrée, l'assemblage, la sortie et la propagation des virus. Certaines de ces glycoprotéines semblent spécifiques à chacun des membres ou sous-familles de virus herpès, ce qui reflète probablement des adaptations spécialisées. Par exemple, gC, gD, gE, gG, gI, gK sont trouvées seulement dans la sous-famille *alphaherpesvirinae*. Toutefois, d'autres glycoprotéines virales sont conservées dans toute la famille d'*herpesviridae*, reflétant une origine évolutive commune et suggérant une fonction particulièrement importante dans la biologie du virus. Cinq glycoprotéines, gB, gH, gL, gM and gN sont conservées dans toutes les sous-familles herpèsvirales. Parmi ces glycoprotéines, gM est unique parce qu'elle est non essentielle pour la réplication virale en culture cellulaire pour la plupart des membres d'*alphaherpesvirus*, incluant HSV-1, PRV, BHV-1, EHV-1, ILTV et VZV ([234], [235], [236], [237], [238], [239]). Toutefois, des études récentes démontrent que gM est essentielle pour la réplication de l'*alphaherpesvirus* MDV ([240]), du virus herpès le plus complexe, i.e. le *betaherpesvirus* HCMV ([241]) et du *gammaherpesvirus* EBV ([242]). Par conséquent, différents virus herpès semblent avoir des exigences différentes pour gM au cours de leur réplication virale.

3.2 Propriétés structurales et biochimiques de gM

3.2.1 Homologie

La protéine gM a été identifiée pour la première fois dans le HCMV en tant que

composante structurelle de l'enveloppe du virion ([243]). Jusqu'ici, des homologues de gM ont été identifiés dans tous les virus herpès analysés. Parmi ces virus herpès analysés, HSV-1 gM présente des homologies allant de 20% (EHV-2) à 80% (HSV-2).

3.2.2 Structure et topologie

La glycoprotéine gM d'HSV-1 est codée par le gène UL10, et se compose de 473 acides aminés. L'analyse de gM démontre que bien que la similitude globale entre les homologues de virus herpès soit faible, celles-ci ont plusieurs caractéristiques communes: i) une courte région hydrophile d'environ 20 acides aminés à leurs extrémités amino-terminales; ii) l'absence de signal clivable au N-terminal; iii) huit domaines transmembranaires potentiels; iv) un terminus carboxyl hydrophile et hautement chargé dont la longueur varie entre 18 aa (HHV6) et 134 aa (HSV-1); v) deux sites potentiels de N-glycosylation et vi) les substitutions conservatrices se trouvent en grande partie dans les régions hydrophobiques de la protéine, alors que les régions des amino- et carboxyl-terminus sont considérées assez variables. En résumé, ces caractéristiques suggèrent que gM est une glycoprotéine transmembranaire de type III avec possiblement des queues N- et C- terminales cytoplasmiques. Cette hypothèse a été confirmée par les expériences *in vitro* ([244])

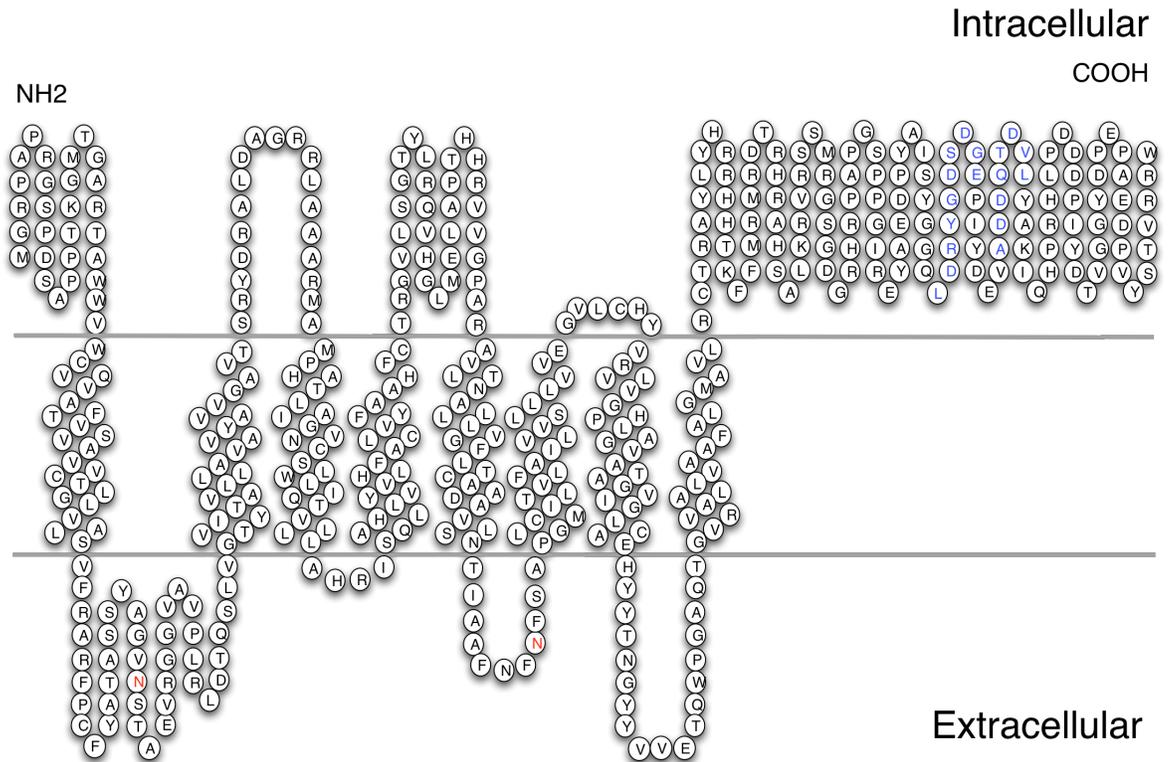


Fig.5 Schéma illustrant la topologie membranaire prédite de gM (SOSUI transmembrane topology prediction server). Les acides aminés en rouge correspondent aux sites potentiels de N-glycosylation; les acides aminés en bleu correspondent aux clusters acides.

3.2.3 Synthèse et modifications post-traductionnelles

Conformément à son caractère hydrophobe, gM a tendance à précipiter lorsque on la chauffe à 95°C en présence de dodécyl sulfate de sodium ([245], [246], [235], [237]). Il est donc commun et essentiel de préparer gM pour analyse par SDS-PAGE par chauffage à 56°C pour éviter qu'elle ne se trouve exclusivement coincée dans les puits. Dans ces conditions, HSV-1 gM est exprimée comme un précurseur de 47 kDa mais migre à des poids multiples en raison de modifications post-traductionnelles (N-glycosylation), soit à 50 kDa sous sa forme immature (forme « high mannose »), ou sous forme mature à 53–63 kDa ([245]). Bien que gM soit formellement classée comme une protéine tardive, son produit de transcription et de traduction peuvent être détectés dès 2 hpi (heures post-infection) i.e. bien avant la réplication de l'ADN qui se produit vers 5-6 heures ([247], [248], [249]).

3.3. Les partenaires fonctionnels de gM

3.3.1 Le complexe gM/gN

Les protéines virales interagissent souvent les unes avec les autres et forment ainsi des unités fonctionnelles. Dans le cas des glycoprotéines de l'enveloppe, quatre complexes ont été identifiés: un complexe homodimérique de gB lié par des ponts disulfures; un complexe hétérodimérique gE/gI lié de façon noncovalente; gH/gL un autre complexe hétérodimérique lié de façon noncovalente ou par des ponts disulfures et le quatrième complexe récemment découvert est gM/gN. La glycoprotéine gN est une protéine membranaire de type I qui est O-glycosylée dans PRV, EBV et HCMV. Chez HSV-1, BHV-1, VZV, elle n'est pas glycosylée et désignée UL49A ([238], [250], [251]). Des études précédentes ont suggéré que gN n'est pas essentielle pour la réplication *in vitro* des *alpha*herpesvirus ([252], [253], [254], [255], [237]). L'interaction physique entre la gM et la gN a été décrite pour le PRV, BHV-1, EBV, MDV, HCMV, HHV8 et ILTV ([252], [255], [256], [240], [241], [257], [258]). Ceci suggère que ce complexe est conservé dans les alpha-, beta-, and gammaherpesvirus, quoique cela n'ait pas encore été démontré expérimentalement pour HSV-1. Le complexe gM/gN a été détecté dans les cellules

infectées ainsi que les virions extracellulaires ([252], [255], [256], [240], [241], [257], [258]). La formation de ce complexe est requise pour la stabilité et la modification traductionnelle réciproques de ces deux protéines ([252], [256], [257], [258], [259], [260]). En outre, la suppression de PRV gM conduit à l'absence de gN dans l'enveloppe des virions matures extracellulaire ([252]). Il a donc été proposé que la gM et la gN forment un complexe au RE, ce qui permet leur transport commun au compartiment de l'assemblage post-RE où elles sont incorporées dans les virions ([252], [241], [259]). Dans le HCMV, le complexe gM/gN se forme via un pont disulfure qui se forme entre le résidu cystéine C₄₄ de gM et C₉₀ dans gN et une liaison noncovalente entre l'extrémité amino-terminale de gM et l'ectodomaine de gN. Le lien noncovalent joue un rôle clé dans la formation et le transport intracellulaire du complexe ([259]).

3.3.2 Autres partenaires

La protéine gM interagit avec plusieurs autres protéines virales. Cette propriété implique son domaine carboxyl-terminal. Par exemple, dans le contexte d'une transfection, elle redirige les glycoprotéines gD, gH, gL de la membrane plasmique vers le TGN via les vésicules de recouverts de clathrine, impliquant possiblement un signal d'endocytose présent sur gM. Néanmoins, on ignore pour le moment si cette interaction est directe ou nécessite d'autres protéines intermédiaires ([261]). Un autre partenaire d'interaction est la protéine tégumentaire UL49 (à ne pas confondre avec UL49A ou gN), qui elle-même interagit avec gE ([262]). Plus récemment, il a été suggéré que la localisation nucléaire de gM à la phase tardive de l'infection dépend en partie de UL31 et UL34 ([263]). Dernièrement, des études de double hybride dans la levure en utilisant la pleine longueur de gM comme appât ont révélé plusieurs autres protéines virales ([188], [91], [264]). Ces diverses interactions contribuent très probablement à réguler les fonctions de la gM.

3.4 Fonctions de HSV-1 gM

Malgré le fait que gM n'est pas essentielle à la réplication virale *in vitro*, on peut tout de même détecter l'impact de cette protéine dans la plupart des cas. Ainsi, la délétion du gène UL10 (qui code pour gM) de HSV-1, PrV, BHV-1 ou EHV entraîne une réduction des titres viral de 10 à 100x, une réduction de la taille des plaques et un retard dans la cinétique de pénétration du virus, par rapport aux virus de type sauvage ([234], [235], [236], [237]). [235]). De même, une atténuation *in vivo* a également été notée après l'infection des animaux par des mutants dépourvus de gM ([265], [266], [267]). En outre, contrairement à la fonction nonessentielle de gM dans ces *alpha*herpèsvirus, les homologues de gM dans MDV, HCMV, EBV, MHV-68 ([240], [241], [242], [268]) sont essentiels pour la réplication. Ensemble, ces données font valoir que gM a presque certainement un rôle dans une ou plusieurs étapes du cycle infectieux de HSV-1 (entrée, morphogénèse, relâche des virus infectieuse, propagation de cellule à cellule ...).

3.4.1 Rôle de gM dans l'enveloppement final

Des chercheurs ont récemment suggéré un rôle possible de gM dans l'enveloppement final du virus, mais ce phénotype est clairement visible uniquement en combinaison avec la suppression de multiples glycoprotéines nonessentiels. Par exemple, un triple mutant de délétion gM⁻/gE⁻/gI⁻ de PrV ou EHV-1 ([1], [269]) accumule des nucléocapsides nonenveloppées dans le cytoplasme. Ce phénotype est restauré par l'expression de gM ou gE *in trans*, suggérant des effets synergiques ([1], [270]). Il est intéressant de noter qu'un phénotype similaire a été décrit pour des doubles mutants de PrV et HSV-1 dans lesquels les gènes codant pour gM et la protéine tégumentaire UL11 ont été supprimés ([98], [99]). Les études suivantes montrent que les domaines cytoplasmiques des glycoprotéines PRV gE et gM interagissent avec la protéine tégumentaire UL49 et ainsi favorisent son incorporation dans les virions ([262]). Ceci a amené les chercheurs à émettre l'hypothèse selon laquelle gM est impliquée dans le ciblage de nucléocapsides tégumentés vers le site de bourgeonnement pour l'enveloppement final, et que sa fonction peut être

redondante et n'être caractérisée que lorsque plus d'une unité fonctionnelle sont délétées. Une étude antérieure complique toutefois la situation. Contrairement aux résultats avec PRV, un mutant de HSV-1 dépourvu de gM et gE n'est pas compromis au stade tardif de la maturation du virion ([271]). En revanche, il a été suggéré qu'une autre glycoprotéine, gD, en coopération avec gE soit impliquée dans ce processus ([2]), menant à la conclusion que différents herpesvirus peuvent avoir des exigences différentes pour les glycoprotéines durant leur morphogénèse.

3.4.2 Rôle de gM dans la fusion membranaire et la propagation de cellule à cellule

Il a déjà été démontré que l'expression des glycoprotéines essentielles de l'enveloppe de HSV-1, i.e. gB, gD, gH, et gL, est nécessaire et suffisante pour induire la fusion membranaire dans les systèmes de culture cellulaire ([272]). Fait intéressant, gM ou le complexe de gM/gN empêchent la fusion membranaire médiée par ces glycoprotéines dans un contexte d'une transfection ([273]). La glycoprotéine gM de PRV a des caractéristiques un peu différentes. Elle est capable d'inhiber la fusion des membranes en l'absence de gN, alors que gM de HSV-1, HHV-8, l'EHV-1 et ILTV ont tous besoin de la présence de leurs partenaire gN ou homologues respectifs ([273], [257]). L'activité inhibitrice de gM sur la fusion membranaire semble avoir une faible spécificité, puisque PRV gM inhibe aussi la fusion membranaire induite par la protéine F de virus respiratoire syncytial bovin (BRSV). De plus, les complexes gM/gN d'HSV-1 et d'HHV-8 inhibent aussi la fusion membranaire induite par la protéine Env de virus leucémie murine Moloney (MoMLV) ([273], [257]). Par ailleurs, l'expression de la protéine F de BRSV par des virions BoHV-1 recombinants n'a pas conduit à la formation de syncytia, sauf si le gène de gM a été perturbé dans ce virus ([236]). Finalement, Crump *et al.* ([261]) ont présenté des preuves indiquant que gM pourrait inhiber la fusion en réduisant la présence des glycoprotéines fusogéniques gD, gH et gL à la surface cellulaire. Les auteurs ont ensuite argumenté que gM/gN pourrait être impliqué dans la localisation correcte des glycoprotéines d'enveloppe virale aux sites de

l'enveloppement final, permettant ainsi l'assemblage et la sortie du virus pendant une infection.

Il est à noter que le phénomène d'inhibition de la fusion par gM/gN dans les essais de transfection ne semble pas représenter une capacité d'inhibition de fusion cellulaire par ce même complexe lors de l'infection. La propagation du virus d'une cellule infectée à une cellule non infectée met en cause la fusion limitée des cellules infectées et noninfectées (i.e. la formation de syncytium), dont l'efficacité peut être mesurée par la taille des plaques. La délétion de gM conduit, par contre, à une diminution de la taille des plaques et de la fusion cellulaire dans tous les membres de virus herpès analysés jusqu'ici ([234], [235], [236], [237], [267], [274]), ce qui soutient l'hypothèse selon laquelle la gM favorise la propagation du virus de cellule à cellule.

3.4.3 Autres rôles potentiels de gM

Dans certains membres de virus herpès, la pénétration du virus mutant gM⁻ a été retardé, ce qui attribue à gM un rôle durant l'entrée ([235], [236], [237]). Deuxièmement, il a été démontré que les virus mutants EBV qui n'expriment pas gN ni gM accumulent en grande partie leur capsides au sein de la chromatine dans les noyaux ([242]). Il reste à confirmer si ce phénotype implique un rôle de gM/N dans la relâche nucléaire du virus. Finalement, BHV gN inhibe la translocation des peptides antigéniques en modifiant la conformation de TAP (un transporteur essentiel à la présentation d'antigènes dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) puis en induisant sa dégradation. La protéine gM pourrait donc réguler négativement cette inhibition en formant le complexe avec gN ([260]).

II QUESTIONS ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Parce que l'infection est rarement mortelle et souvent latent, le virus herpès simplex de type 1 est capable de transmettre facilement chez l'homme ainsi affecter une large portion de la population dans le monde entier et qu'on estime que plus de 70-80% des séropositifs ([275], [276], [277]). Cette haute prévalence, la gravité des symptômes et la présence de comorbidités potentiellement causées par HSV-1 exigent que nous approfondissions nos connaissances de la biologie fondamentale du virus et trouvions des moyens pour lutter contre lui. Notre laboratoire a concentré ses efforts sur les dernières étapes du cycle de réplication virale, soit la maturation et la sortie de HSV-1, qui attire l'attention intensive de nombreux chercheurs depuis 40 ans, mais qui reste un casse-tête en grande partie non résolu. Ces étapes sont cruciales pour la production des virions infectieux ainsi que leur capacité de produire des maladies. Puisqu'une infection initiale *in vivo* n'implique souvent qu'un MOI (multiplicity of infection) très faible, l'efficacité de la sortie du virion en pleine maturité et l'infection de nouvelles cellules est obligatoire pour la pathogenèse. Dans une cellule, l'assemblage du virus implique un processus dans lequel une multitude de macromolécules distinctes sont transportées, souvent par différentes voies, jusqu'à un point dans la cellule où elles sont assemblées en un virion mature qui par la suite sort de la cellule. Pour ce faire, le virus a développé diverses stratégies qui exploitent le processus endogène de la cellule hôte, particulièrement la machinerie de transport intracellulaire. Par conséquent, l'élucidation de ce mécanisme permettrait non seulement d'identifier la cible potentielle de nouvelles drogues antivirales, mais également de souligner le transport intracellulaire dans les termes de la biologie cellulaire.

Une attention spéciale a été portée à une des glycoprotéines de l'enveloppe, gM et son rôle dans la maturation et la sortie du virus. La raison qui motive l'intérêt d'étudier davantage cette protéine est basée sur plusieurs constatations : premièrement, gM est conservée dans toute la famille de *Herpesviridae*, ce qui suggère un rôle essentiel.

Deuxièmement, le site intracellulaire où la phase finale de l'assemblage (i.e. l'enveloppement final) se déroule est le plus souvent défini par l'accumulation des glycoprotéines virales à un endroit précis le long de la voie de sécrétion de la cellule. Cela implique également qu'il existe une reconnaissance spécifique des glycoprotéines de l'enveloppe virale par les nucléocapsides cytoplasmiques pour qu'un processus de bourgeonnement se produise. Ainsi, les interactions entre les protéines virales sont elles-mêmes au cœur du processus d'assemblage. Un tel rôle dans l'enveloppement final a récemment été assigné à PRV gM ([98], [1], [269], [270]), et une protéine tégumentaire UL49 a également été trouvée interagir avec gM ([262]). Cependant, dans le HSV-1, les autres glycoprotéines remplissent probablement le rôle de gM dans l'enveloppement final ([2], [271]). De plus, il a récemment été rapporté que contrairement à la localisation au TGN dans les cellules transfectées ([261]), HSV-1 gM est localisée aux enveloppes nucléaires et sur des virions périnucléaires pendant une infection ([278]). La redistribution concomitante au noyau des marqueurs du Golgi et TGN avec gM, suggère un mécanisme selon lequel gM pourrait être passivement relocalisée dans le noyau ([278]) suite à la perturbation virale du TGN ([279], [280], [281], [92], [176]). Toutefois, la modulation de la localisation nucléaire de gM par UL31 et UL34 ([263]) suggère un mécanisme plus actif. Ces données invitent à mettre en question l'implication de gM dans l'enveloppement final compte tenu de son absence au site d'enveloppement et suggèrent un rôle potentiel de gM dans le noyau.

L'objectif principal de ce projet était d'établir un lien entre les événements controversés décrits ci-dessus en éclaircissant la relation de la localisation et la fonction de HSV-1 gM dans le contexte d'une infection. L'objectif secondaire était d'élucider la spécificité et le mécanisme du ciblage nucléaire de HSV-1 gM. Ultiment, le dernier objectif d'importance était d'éclaircir le rôle de gM dans l'enveloppement final durant l'infection, et d'identifier le(s) déterminant(s) pour la localisation et la fonction de HSV-1 gM. Dans ce dernier cas, nous avons concentré nos efforts sur le domaine fonctionnel de gM, plus précisément, le domaine carboxyl-terminal de gM et son rôle dans la localisation de gM et la maturation de HSV-1.

CHAPITRE II:

Résultats

Article I

Titre : Early, Active, and Specific Localization of Herpes Simplex Virus Type 1 gM to Nuclear Membranes

Auteur : Jie Zhang,¹ Claus-Henning Nagel,² Beate Sodeik,² et Roger Lippé¹

Publié dans : J Virol, 2009 Dec; 83(24): 12984-97.

Contribution des auteurs :

Jie Zhang*:	Conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article
Claus-Henning Nagel :	Réalisation des expériences de construction de BAC/HSV
Beate Sodeik :	Révision de l'article
Roger Lippe :	Creation et supervision du projet, conception des expériences, analyse des données et readction de l'article

* premier auteur

Early, Active, and Specific Localization of Herpes Simplex Virus Type 1 gM to Nuclear Membranes

Jie Zhang,¹ Claus-Henning Nagel,² Beate Sodeik,² and Roger Lippé^{1*}

1. Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, Canada,

2. Institute of Virology, Hannover Medical School, D-30625 Hannover, Germany

* Corresponding author: Dr. Roger Lippé

Received 9 June 2009/Accepted 25 September 2009, published ahead of print on 7 October 2009.

Journal of Virology, 2009 Dec; 83(24): 12984-97.

ABSTRACT

Thirteen different glycoproteins are incorporated into mature herpes simplex virus type 1 (HSV-1) virions. Five of them play important roles during entry, while others intervene during egress of the virus. Although HSV-1 gM is not essential in cell culture, its deletion reduces viral yields and promotes syncytium formation. Furthermore, gM is conserved among herpesviruses, is essential for several of them, and can redirect the gD and gH/gL viral glycoproteins from the cell surface to the *trans*-Golgi network, where gM presumably modulates final capsid envelopment. Late in infection, gM reaches the nuclear envelope and decorates perinuclear virions. This process seemingly requires UL31 and UL34 and occurs when several markers of the *trans*-Golgi network have relocated to the nucleus. However, the precise mechanism of gM nuclear targeting is unclear. We now report that gM is quickly and specifically targeted to nuclear membranes in a virus-dependent manner. This occurs prior to the HSV-1-induced reorganization of the *trans*-Golgi network and before gM enters the secretory pathway. The presence of a high-mannose glycosylation pattern on gM further corroborated these findings. While gM was targeted to the inner nuclear membrane early in infection, its partners gD, gH, gN, VP22, UL31, and UL34 did not colocalize with gM. These data suggest that nuclear gM fulfills an early nuclear function that is independent of its known interaction partners and its function in viral egress.

INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) virions are composed of a DNA core, an icosahedral capsid, a tegument layer, and an envelope containing 13 different glycoproteins (52). These glycoproteins are involved in various aspects of the viral life cycle, including entry, egress, and acquisition of the final envelope. Hence, gB, gC, gD, and the gH/gL complex mediate attachment and fusion of the virus at the cell surface (70). Following new protein expression, these proteins, along with gM, are eventually localized in the nuclear envelope (7, 15, 24, 35, 46, 79, 84). While it has been suggested that some of the viral glycoproteins mediate the passage of the viral capsids through the nuclear membranes, others have argued that this process is independent of these proteins (24, 39, 48, 93). Late during the viral life cycle, gB, gD, gK, UL20, and the gE/gI, gH/gL, and gM/gN complexes anchor the progeny capsids to the *trans*-Golgi network (TGN) via partially redundant interactions with components of the tegument (29, 47, 56, 57). The presence of the viral glycoproteins at the TGN, the presumed site of final envelopment (30-33, 41, 68, 69, 85, 89-91), ensures their incorporation into mature virions and proper viral egress. The viral glycoproteins are thus important players in the biology of herpesviruses. The UL10 gene codes for a glycoprotein of 473 amino acids referred to as gM. This N-glycosylated viral glycoprotein, which is predicted to contain eight transmembrane domains (18), is expressed as a precursor of 47 kDa, modified with highmannose-type oligosaccharides to yield a 50-kDa molecule, and finally processed into a 53- to 63-kDa mature protein (6).

Though formally classified as a late protein, its transcript can be detected as early as 2 h postinfection (p.i.) and before DNA replication takes place (72, 80). HSV-1 gM is not essential in cell culture but is conserved throughout the herpesvirus family (58), arguing for a significant role during the viral life cycle. Consistently, its deletion reduces viral titers by 10- to 100-fold in various herpesviruses, including HSV-1 (5, 21, 27, 42, 48). Interestingly, a synergistic reduction of viral yields occurs when gM is depleted in combination with UL11

or gE/gI in the related pseudorabies virus (PRV), a swine herpesvirus, but surprisingly not for HSV-1 (9, 10, 43, 48). The accumulation of unenveloped, tegumented capsids in the cytosol in these mutants indicates that gM may play a role during secondary envelopment of the virus. Furthermore, gM prevents syncytium formation mediated by gB, gD, and gH/gL (40, 44, 86) and has also been reported to have a role during PRV cell entry (21). Thus, gM seems to have multiple roles during the viral life cycle. The HSV-1 gM glycoprotein functionally interacts with multiple viral proteins. For instance, gM redirects gD and gH/gL to the TGN in transfected cells (17). This is due to the presence of a classical endocytic signal at its carboxyl terminus, which recycles gM from the plasma membrane and promotes its accumulation at the TGN late in infection as well as in transfected cells (17). Another interacting partner is the tegument protein VP22, encoded by UL49, itself interacting with the gE/gI viral glycoproteins (26, 81). The gM proteins of several herpesviruses also associate with gN (2, 36, 44, 45, 50, 54, 55, 73, 94), but this has not yet been experimentally demonstrated for HSV-1 gM. Finally, the nuclear localization of gM late during infection is partly dependent on UL31 and UL34 (92). These various interactions most likely contribute to and modulate gM functions.

HSV-1 gM is localized at the plasma membrane, at the TGN, and on mature extracellular virions (6, 17, 52). It has also recently been reported at nuclear envelopes and on perinuclear virions (7), suggesting gM may regulate the nuclear egress of capsids, though one study suggests gM is not involved in this process (48). The concomitant retrieval to the nucleus of TGN and Golgi markers, along with gM, suggests a mechanism whereby gM might be passively relocalized to the nucleus (7) upon viral disruption of the TGN (3, 4, 13, 20, 85). However, the modulation of the nuclear localization of gM by UL31 and UL34 (92) suggests a more active mechanism. Unfortunately, the functional relevance and mechanism of targeting gM to the nucleus have remained elusive so far.

To further characterize HSV-1 gM, we probed its nuclear targeting. We found that the protein was detected on nuclear membrane invaginations and speckles early in infection

at a time when other HSV-1 glycoproteins (i.e., gB, gD, and gH) were not detectable in that compartment. Experiments to evaluate the mechanism of gM targeting indicated it was not passively recycled from the TGN but rather actively and specifically targeted to the nucleus. Thus, the vast majority of gM was localized to the nucleus at 4 to 6 h p.i., at a time when gB, gD, and gH had accumulated at an intact TGN and were undetectable on nuclear membranes. Analysis of gM nuclear targeting revealed that it did not enter the secretory pathway early during infection and therefore could not be retrieved to the nucleus from the TGN, the Golgi apparatus, or the endoplasmic reticulum (ER) Golgi intermediate compartment (ERGIC). The presence of a high-mannose, immature glycosylation pattern on gM at these early infection times was consistent with its localization on nuclear membranes. Altogether, it suggests gM most likely did not make it past the ER during the early phase of the infection. This phenotype requires the expression of at least one other viral protein, as transfection of gM alone does not result in gM localization to the nuclear compartment. However, none of its known interacting partners (gD, gH, gN, VP22, UL31, or UL34) colocalized with gM at 4 h.p.i. Furthermore, the previously reported interaction between gM, gD, and gH/gL (17) did not occur on nuclear membranes at early time points. These findings highlight an early, active, and specific gM nuclear targeting that relies on a novel targeting mechanism that does not depend on the reorganization of the TGN late in infection or on the gM functional partners characterized so far.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. BHK, Vero, and 143B tk⁻ cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Medicorp), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 37°C in 5% CO₂. For 143B tk⁻ cells, 15 µg/ml 5-bromo-2 deoxyuridine

(Sigma-Aldrich) was added to the medium, except prior to infection. Wild-type HSV-1 strain 17⁺ and mutant viruses (see below) were all propagated on BHK cells, and their titers were determined by plaque assay on Vero cells.

Constructs. The ER retention (KKSL) and control (KKSLAL) trafficking signals were introduced into the gM of the previously described HSV-1 bacterial artificial chromosome (BAC) clone pHSV-1(17⁺)bluelox, which contains almost the entire genome of HSV-1 strain 17⁺, lacZ, and a eukaryotic Cre recombinase expression cassette but lacks the gene UL23, which codes for the viral thymidine kinase, and OriL (61). The BAC genes and the eukaryotic Cre recombinase expression cassette are flanked by LoxP sites (61). pHSV-1(17⁺)bluelox was maintained in the Escherichia coli strain DH10B under chloramphenicol selection. For mutagenesis, a selection and counterselection cassette was generated by PCR amplification of pRpsLneo (Gene Bridges, Germany) using the primers acgacccccgagccccgagggacccccgtgtacagcaccgtccgcccgtggggcctggatgatggcgggatcg (forward primer) and ccaaaacaatgttctgttacggtegcaacgctgtcgttttaaaaaacctcagaagaactcgtcaagaaggcg (reverse primer), which included sequences homologous to adjacent regions of the HSV-1 UL10 stop codon (underlined), as well as to the pRpsLneo plasmid (Fig. 1A). This RpsLneo cassette was electroporated into DH10B bacteria containing pHSV-1(17⁺)bluelox and pKD46, a plasmid encoding the Red recombinase (60, 97). Red expression was induced with 1% (wt/vol) L-arabinose at 37°C for 1 h, and recombinant BACs were selected for kanamycin resistance. In the second step, the RpsLneo cassette was replaced with a second PCR product that amplified the same end region of gM and that contained a KKSL or KKSLAL tag (indicated in uppercase boldface letters), as well as diagnostic restriction sites (EcoRV in both constructions and NheI for the KKSLAL construct; the restriction sites are underlined). The primers used for this second PCR were acgacccccgagccccgagggacccccgtgtacagcaccgtccgcccgtgtacaccgatatcgatategaaatgaaccgtctg

ggTAAGAAGTCCCTGtagctgtttggttccgtttaataaac (KKSL forward primer),
 ccaaaacaatggtctgttacggtegcacgcggtgctgttttaaaaaacc (KKSL reverse primer),
 acgaccccgagcccgccgaggaccccggtgtacagcaccgctccgcttggtacaccgatategaaatgaaccgtetgggtA
 AGAAGTCGCTAGCACTAtagctgtttggttccgtttaataaac (KKSLAL forward primer),
 and ccaaaacaatggtctgttacggtegcacgcggtgctgttttaaaaaacc (KKSLAL reverse primer).

After selection for the loss of streptomycin sensitivity (i.e., removing the *RpsL* gene), the pHSV-1(17⁺)bluelox clones were analyzed for the correct insertion by PCR, restriction analysis, and sequencing. The BACs containing tagged versions of gM were named HSVBAC-gM/ER and HSVBAC-gM/CTL. BAC DNA was prepared from 500-ml overnight *E. coli* cultures using the NucleoBond BAC100 kit (Machery & Nagel, Duren, Germany) and were used to transfect 143B cells (MBS mammalian transfection kit). Once significant cytopathic effects had developed, the cells were collected and freeze-thawed three times, and the resulting lysates were used to generate viral stocks. These mutant viruses were named HSV-gM/ER and HSV-gM/CTL, respectively. Note that these viruses also contained one loxP site and lacZ for the expression of beta-galactosidase.

To evaluate the quality of the mutagenesis, the engineered viruses were analyzed by various means. First, the insert was amplified by PCR, using wild-type HSV-1, HSV-gM/ER, and HSV-gM/CTL viral DNAs as templates, and analyzed on an agarose gel. As expected, the wild-type virus produced a 334-nucleotide fragment, while the two mutants ran slightly more slowly, consistent with the additional presence of the ER and control tags (Fig. 1B). Second, the abovementioned PCR products were digested with *NheI* or *EcoRV*. The control wild-type PCR sequence did not contain any *NheI* and *EcoRV* restriction sites and therefore yielded the same 334-nucleotide fragment as when it was not digested (Fig. 1C, gM/WT). In contrast, the gM/CTL PCR fragment was cleaved once by *NheI* or once by *EcoRV*, as expected, to give two bands. Moreover, the gM/ER PCR fragment was predicted to contain an *EcoRV* restriction site but no *NheI* restriction site, as observed experimentally (Fig. 1C). Finally, sequencing of the gM region of the viruses

confirmed their correct mutagenesis (data not shown). The presence of the ER and control targeting sequences had no impact on HSV-1 growth in noncomplementing cells and consequently had no effect on viral entry, replication, assembly, or egress (Fig. 1D).

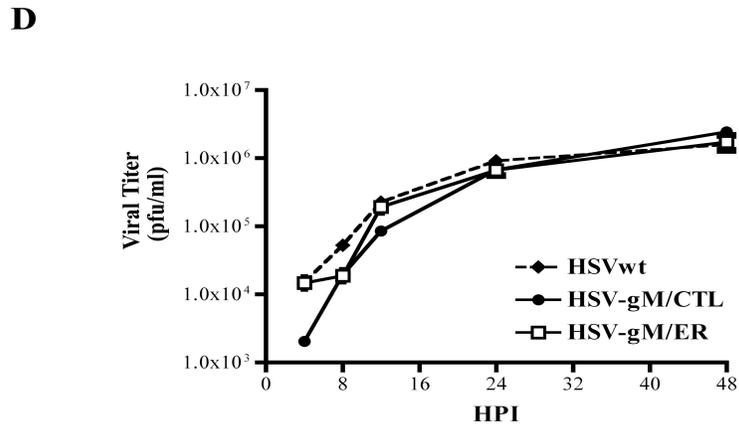
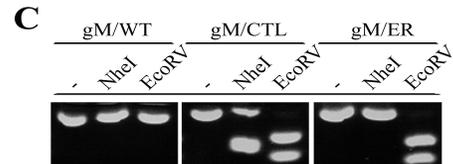
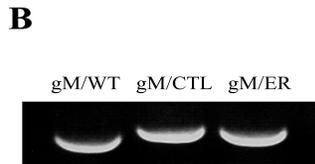
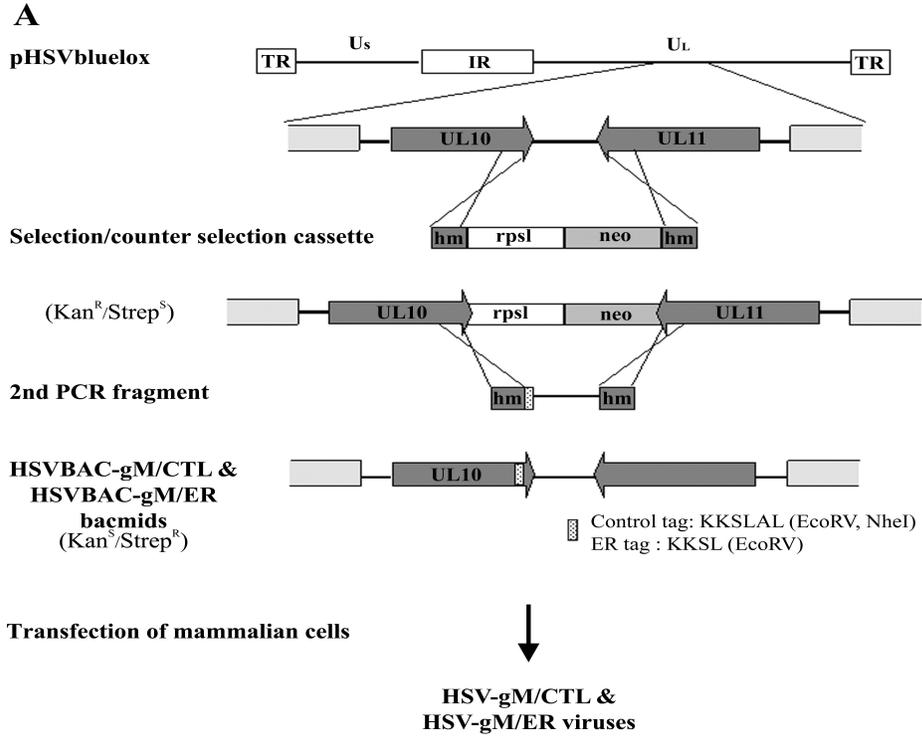


Fig.1 Construction and generation of recombinant virus. (A) Schematic diagram of the selection and counterselection approach to introduce gM/KKSL (ER retention signal) or gM/KKSLAL (inactive signal) into the viral genome of HSV-1 strain 17⁺ present in the pHSV1(17⁺)blueox bacmid. Shown at the top is the viral genome map with the unique long (UL) and unique short (US) regions, the internal repeats (IR), and the terminal repeats (TR) and the enlargement of the UL₁₀ (gM) and UL₁₁ gene regions. The mutagenesis involved the synthesis by PCR of a selection and counterselection cassette encoding a selectable (neo; light-gray box) and a counterselectable (RpsL; white box) marker flanked by HSV-1 sequences (dark-gray box). Following the insertion of this cassette into the pHSV1(17⁺)blueox backbone by homologous recombination, a second PCR fragment covering the end region of the tagged gM and containing the control or ER retention tag was amplified from pHSV1(17⁺)blueox and used to subsequently remove the selection cassette, once again by homologous recombination. The stippled box represents the tag sequences into which restriction sites were introduced for diagnostic purposes. hm, homologous sequences; RpsL, streptomycin sensitivity gene; neo, kanamycin resistance gene. (B and C) The recombinant BACs (HSVBAC-gM/CTL and HSVBAC-gM/ER) were finally transfected into 143B cells to reconstitute recombinant viruses. Analyses of these viruses by PCR (B) and restriction enzyme digestion (C) were performed to verify the mutagenesis (see the text for details). (D) A single-step growth kinetics assay of wild-type HSV (HSVwt), HSV-gM/CTL, and HSV-gM/ER was performed. 143B cells were infected at an MOI of 5, and the supernatant was harvested at the indicated time and concentrated by centrifugation. The yields of released infectious virus were then determined by plaque assays on Vero cells. All values are the means of three independent experiments, and the small error bars depict the standard deviations of the means.

For transient expression, we also constructed gM/ER and gM/CTL expression plasmids. To this end, the gM coding sequence was amplified from the abovementioned HSVBAC-gM/ER or HSVBAC-gM/CTL template and subcloned into the pEGFP-C3 mammalian expression vector (Clontech). The resulting constructs, pEGFP-gM/ER and pEGFP-gM/CTL, were sequenced to confirm the presence of the insert and the desired tags.

Single-step growth curve. 143B tk- cells grown in six-well plates were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 3 with wild-type HSV-1, HSV-gM/CTL, or HSV-gM/ER and overlaid with standard medium. At various times, culture supernatants were harvested, and the released virions were concentrated for 1 h at 39,000 x g, resuspended in MNT buffer (30 mM MES [morpholineethanesulfonic acid], 100 mM NaCl, and 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), and snap-frozen in liquid nitrogen. All samples were assayed for infectious virus by titration on Vero cells.

HSV-1 infection. 143B tk- cells were grown overnight on glass coverslips. The cells were mock treated or infected with wild-type HSV-1 at an MOI of 2 to 5 for 1 h at 37°C for absorption and then grown in standard medium at 37°C for the times indicated. Two hours later, the medium was supplemented with 20 µg/ml taxol (Sigma), which stabilizes microtubules and limits the dispersal of the Golgi apparatus/TGN stacks by the infection without any effect on viral egress or host protein secretion (4, 77, 88). When indicated, the cells were then either shifted to 15°C or 20°C in standard medium containing 20 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) to ensure a single pulse of viral assembly (14, 85). All samples were treated for immunofluorescence microscopy as described below.

Dual transfection and HSV-1 infection. 143B tk- cells grown in 24-well plates were transfected with 0.8 µg/well pEGFP-gM/ER or pEGFP-gM/CTL using Lipofectamine

2000 (Invitrogen). Twenty-four hours later, the cells were either immediately fixed and permeabilized for immunofluorescence microscopy or further infected to analyze the subcellular localization of green fluorescent protein (GFP)-labeled gM expressed from the transfected plasmid in the context of an HSV-1 infection. For the latter, the transfected cells were either infected with wild-type HSV-1 or mock treated as described above. At various times following infection, the cells were fixed and permeabilized for immunolabeling as detailed below.

Immunofluorescence microscopy. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and washed with PBS, and any remaining fixative was inactivated with 50 mM NH₄Cl in PBS. The cells were permeabilized using 0.1% Triton X-100 for 4 min, and nonspecific protein binding sites were blocked with 10% fetal bovine serum. The specimens were labeled for 1 h at room temperature or overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 10% fetal bovine serum, washed, and incubated with secondary antibodies. The samples were mounted on glass slides in Mowiol containing 0.1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. For confocal microscopy, the nuclei were stained with Topro-3 (Invitrogen). The following antibodies were used: PAS980 polyclonal anti-gM (courtesy of Lynn Enquist), TGN46 (Serotec), Calnexin (Stressgen), G1/93 anti-ERGIC53 (from Hans-Peter Hauri), Golgin97 (Molecular Probes), p230 (BD Transduction Laboratories), monoclonal antibody (MAb) 414 anti-nuclear pore complex (NPC) proteins (Covance Research Products), ICP5 anti-VP5 (Cedarlane), ID3 anti-gD (from Gary Cohen and Rosalyn Eisenberg), LP11 anti-gH (from Helena Brown), MAb 15betaB2 anti-gB (from David C. Johnson), anti-ICP4 and anti-ICP0 (Abcam), AGV031 anti-VP22 (from Gillian Elliott), UL31 (from Joel Baines), and UL34 (two different antibodies, one from Richard Roller and the second from Susanne Bailer [M. Ott and S. Bailer, unpublished data]). All secondary antibodies (Alexa 350, 488, and 568) were from Molecular Probes. Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide-

field fluorescence microscope (Zeiss) equipped with filters and a Retiga 1300 camera (Q Imaging). The images were acquired and analyzed with Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging). They were processed and assembled with Photoshop 6.0 (Adobe). Confocal microscopy was performed with a DM IRBE inverted microscope (Leica) equipped with a Leica SP1 spectrometer and argon (488-nm), argon-krypton (568-nm), and helium-neon (647-nm) lasers. The confocal sections were acquired using 100x objectives and were reconstructed and processed with LCS Lite software.

Analysis of gM glycosylation. HeLa cells grown in suspension were infected with wild-type HSV-1 strain 17+ or mock infected for 6 to 8 h at 37°C, pelleted, washed, resuspended in RSB buffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.4, 5 mM MgCl₂), and broken mechanically, and the nuclei were harvested as previously described (67). For cell lysates, total-membrane preparations, and extracellular virions, 143B or HeLa cells grown on 100-mm petri dishes were infected with wild-type HSV-1 strain 17+ for 16 to 24 h at 37°C. Virions from the supernatants were harvested and concentrated by centrifugation for 1 h at 77,000 x g and then resuspended in 100 µl lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1%NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, and a cocktail of protease inhibitors). Cell lysates were prepared from the same dishes by scraping the cells in 1 ml of ice-cold PBS containing protease inhibitors and breaking them with three quick cycles of freezing and thawing. The total-membrane fractions were derived by fractionation of the above-mentioned cell lysates by centrifugation at 112,000 x g for 1 h and resuspension of the membrane pellets in 200 µl lysis buffer. These samples were denatured in denaturing buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% mercaptoethanol) and digested for 1 h at 37°C with 500 U of endoglycosidase H (endo H) (New England Biolabs) according to the manufacturer's recommendations. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and probed with the PAS980 polyclonal antibody. The detection was performed with a Super Signal

West Pico chemiluminescence kit (Pierce) and Kodak BioMax light film. Quantitative analysis of the data was performed with Image J version 1.42q using the analyze tool to determine the integrated densities (i.e., the area of the band multiplied by its darkness). For each glycoprotein, 100% represented the total amount of protein. The amount of the endo H-resistant form was expressed relative to that total.

Quantification of the subcellular localization of viral glycoproteins. Where indicated, the localization of various glycoproteins labeled by immunofluorescence was quantified in cells arrested at 15°C or kept at 37°C as a control. Such cells were also labeled with Hoechst stain to detect nuclei and with antibodies directed against the ERGIC53 protein as a marker for the ERGIC. Ten random microscopy fields were scored for the number of cells exhibiting glycoproteins in either the nuclear or the ERGIC compartment (n = 34 to 147 per condition). A glycoprotein was considered nuclear only when it was not detected in any subcellular compartment except the nucleus. The data are presented as the proportion of cells relative to the total number of cells, which was set to 100%.

RT-PCR. The relative levels of the mRNA transcripts for HSV-1 gM and gN were independently determined by reverse transcription (RT)-PCR assay. Total RNA was extracted from HSV-1- or mock-infected cells at 0, 2, 4, 7, 10, and 12 h.p.i. using an SV total-RNA isolation kit (Promega). gM and gN were specifically amplified with an AccessQuick RT-PCR kit (Promega), which generates reversetranscribed cDNA with the following primers: gagccttggtgggcacttatg (gM forward primer), gtgatctgcagcaaccaaga (gM reverse primer), taatacacagcccategag (gN forward primer), and ggctgtgtttgttcttget (gN reverse primer).

RESULTS

HSV-1 gM is localized on nuclear membranes and intranuclear invaginations. HSV-1 gM has previously been reported in nuclear membranes and on perinuclear virions late during infection (7). To determine when gM was targeted to the nucleus, we determined its subcellular localization at different times. For this purpose, 143B cells were chosen for their ability to resist quite well the cytopathic effects induced by HSV-1 (13, 85). The nuclear membranes were labeled with an antibody directed against several proteins of the NPC (19). In 143B cells infected at an MOI of 2, gM was expressed as early as 4 h p.i. and was distributed in a punctuated pattern throughout the entire nucleus (Fig. 2). At 13 h p.i., gM was also abundant on the nuclear rims. Given the numerous predicted transmembrane domains in gM (18), its localization in nuclear speckles was unexpected. The transmembrane nature of gM was confirmed, since it was found in a total-membrane fraction prepared from cells infected at 24 h p.i. (data not shown). Upon closer examination, it became evident that the speckles were often labeled with the NPC marker and hence delineated intranuclear tubules and invaginations (Fig. 2, X-Z and Y-Z). gM was thus predominantly, if not exclusively, on nuclear membranes as early as 4 h p.i. This phenomenon was not restricted to 143B cells and was also noted in the unrelated HeLa cell line (data not shown).

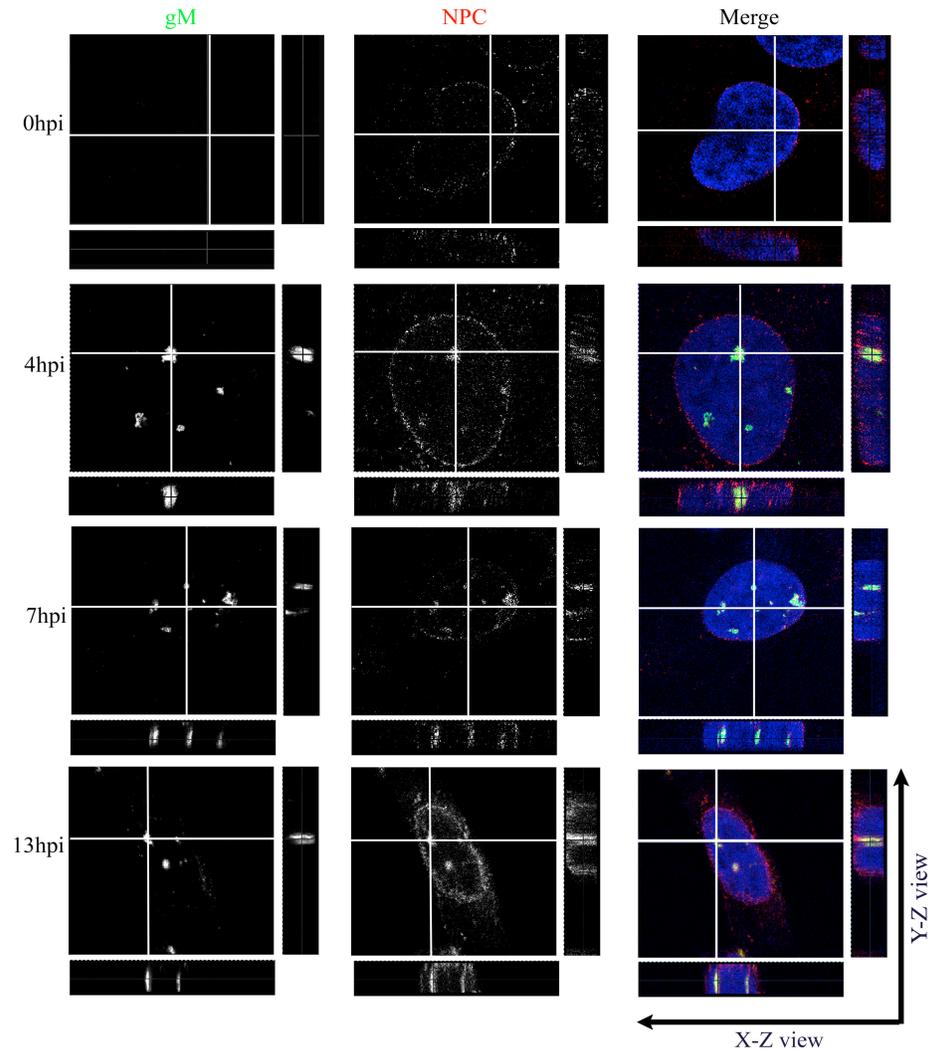


Fig.2 gM localizes primarily in punctate extensions and invaginations of nuclear membranes in infected cells. 143B cells were infected with wild-type HSV-1 strain 17₁ at an MOI of 2. At the indicated time points, the cells were fixed and stained for gM (green), the NPC using MAb 414 (red), and the nucleus using Topro-3 (blue). The cells were then examined by laser scanning confocal microscopy. The individual color channels were scanned sequentially with only the fluorescence-stimulating laser powered on. Orthogonal slices in the X-Z and Y-Z planes were constructed in which the gray lines represent the cutting positions for the analysis.

gM reaches the nucleus well before the TGN is disrupted by the virus. Several scenarios could be envisaged to explain the presence of gM on nuclear membranes. In the first model, gM would first be delivered to the TGN and then passively retrieved to the nucleus via a nonspecific redistribution of TGN proteins to the nucleus. This seemed a plausible idea, given that HSV-1 profoundly alters the intracellular architecture by remodeling the actin cytoskeleton, microtubules, Golgi apparatus, TGN, and mitochondria (1, 4, 13, 23, 74, 85). Furthermore, Baines and colleagues (7) showed that HSV-1 gM and various Golgi apparatus/TGN markers relocalize to nuclear membranes at 13 to 16 h p.i. (7). However, our data indicated that gM was already at the nucleus much earlier. We therefore examined the kinetics of these events. gM and two markers of the TGN (TGN46 and p230) were followed during the course of an infection. gM was again detected as early as 4 h p.i. in the nucleus, although its expression was maximal only later (Fig. 3), in agreement with a global HSV-1 microarray analysis (80). Interestingly, gM was exclusively nuclear at early time points and only started to escape from the nucleus around 9 to 10 h.p.i. During the early stages of the infection, the TGN remained relatively intact and was perturbed only thereafter. Similar results were obtained upon analyzing the Golgi apparatus with the Golgin97 marker (data not shown). These experiments suggest that newly synthesized gM was actively retained at nuclear membranes and not passively redirected there upon TGN disruption.

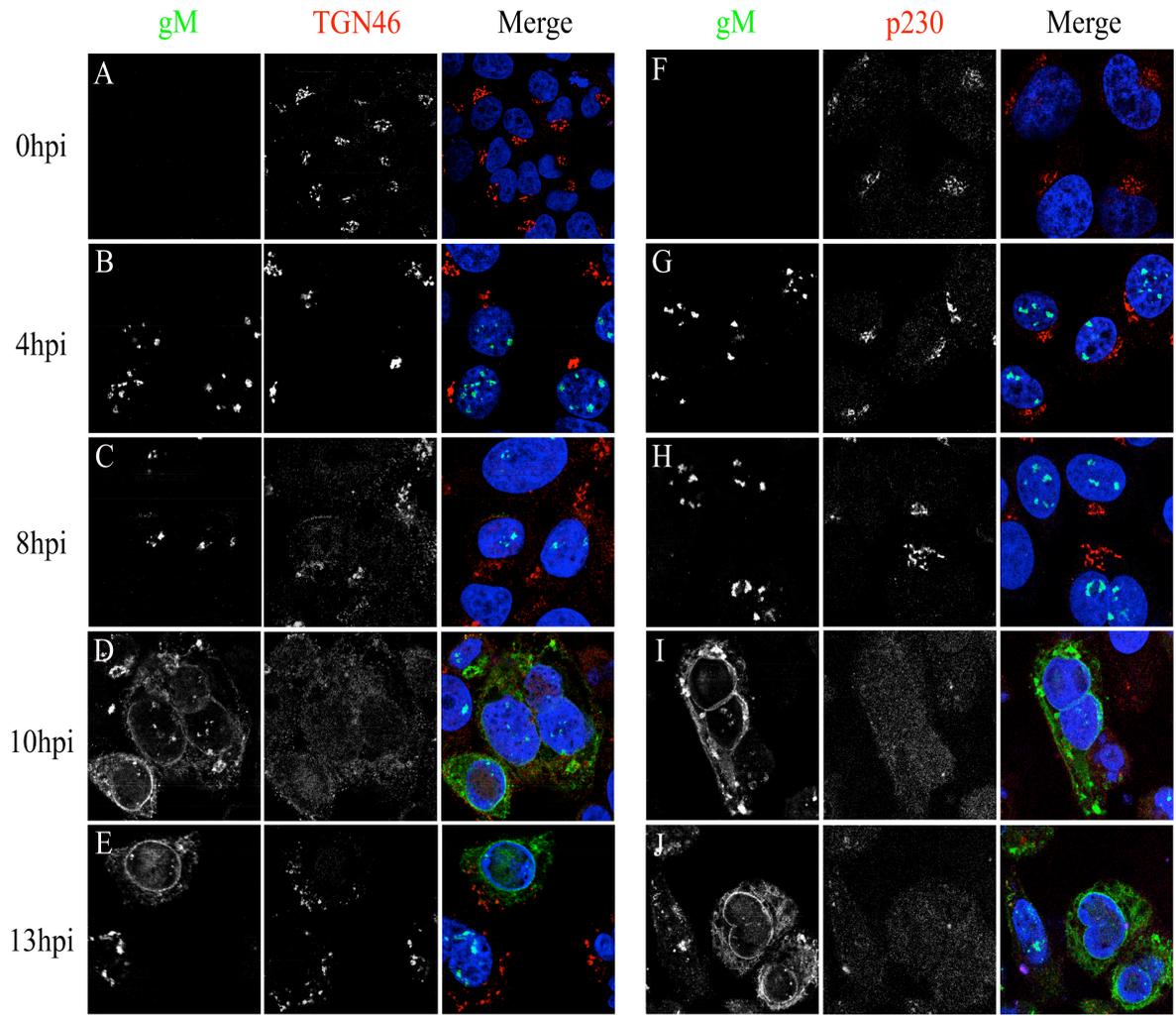


Fig.3 Nuclear membrane localization of gM occurs prior to the dispersion of the TGN. *143B* cells were infected with wild-type HSV-1 strain 17⁺ at an MOI of 2. The infected cells were fixed at various times during the infection and labeled for gM (green), TGN46 or p230 (red), and Topro-3 (blue) as indicated. The confocal images were processed as described in the legend to Fig. 2.

Contribution of the ER retrieval route to nuclear localization of gM.

Proteins synthesized in the ER and destined for that compartment occasionally escape and enter the secretory route toward the Golgi apparatus. To correct their mislocalization, the cell developed a retrieval apparatus to recycle mislocalized proteins back to the ER via retrograde transport pathways (34, 59, 62, 63). Though they achieve the same goal, two mechanisms operate in parallel. In the first, soluble ER proteins are retrieved via their carboxyl-terminal KDEL sequences (64). The second mechanism operates on integral proteins that contain a carboxyl-terminal KKXX motif. This motif interacts with COPI components that are packaged into vesicles destined for retrograde transport toward the ER (16, 49). Although such mechanisms are not known to direct proteins to the inner nuclear membrane, they do target proteins to the outer nuclear membrane, since it is continuous with the ER membrane. This is of particular interest given the presence of gM on the outer nuclear envelope (7, 92).

To evaluate a potential contribution of the COPI recycling pathway, gM was tagged with the ER retrieval signal KKSL. Such an approach has been used successfully with the herpesviral glycoproteins gD and gH (11, 79, 91). The ER tag was added to the very carboxyl-terminal end of GFP-gM encoded by a plasmid (pEGFP-gM/ER). As a control, an inactive form of such a tag, KKSLAL, was also generated (pEGFP-gM/CTL). Transfected gM/CTL colocalized very well with the TGN of transfected 143B cells (Fig. 4) and occasionally with the plasma membrane. This was consistent with an untagged gM construct (6, 17), indicating that the GFP tag did not perturb the normal localization of gM. In contrast, the localization of gM tagged with the KKSL signal was different. It colocalized to a significant extent with the ER and nuclear membranes, as indicated by its partial colocalization with the ER marker protein calnexin. As described for other KKSLtagged HSV-1 glycoproteins (11, 79, 91), some gM was also found at the TGN, particularly in highly expressing cells, presumably because the ER retrieval apparatus had been overloaded. Once again, the GFP moiety did not alter the ability of the KKSL

retrieval signal to function properly, since the molecules behaved exactly as for similar non-GFP-labeled constructions. The ER motif could therefore retrieve some of the transfected gM that had reached the Golgi apparatus back to the ER. Moreover, labeling with a gM-specific antibody gave the same results as the GFP signal, confirming the localization of gM (data not shown). Recycling of gM from the Golgi apparatus was therefore possible, but despite the presence of GFP-gM/ER at the nuclear periphery, its subcellular localization differed considerably from that of gM in HSV-1-infected cells (Fig. 2 and 3). Most prominently, gM expressed upon transient transfections was completely absent from nuclear speckles and invaginations (Fig. 4). Hence, these experiments were open to other interpretations. For instance, gM could be targeted to nuclear membranes by a different mechanism, or some component to transfer gM from the outer to the inner nuclear membrane might have been missing. Furthermore, viral proteins often exhibit a different subcellular localization when expressed in isolation or in the context of an infection. Another option would be that virus-expressed gM never gained access to the ER retrieval machinery in the first place.

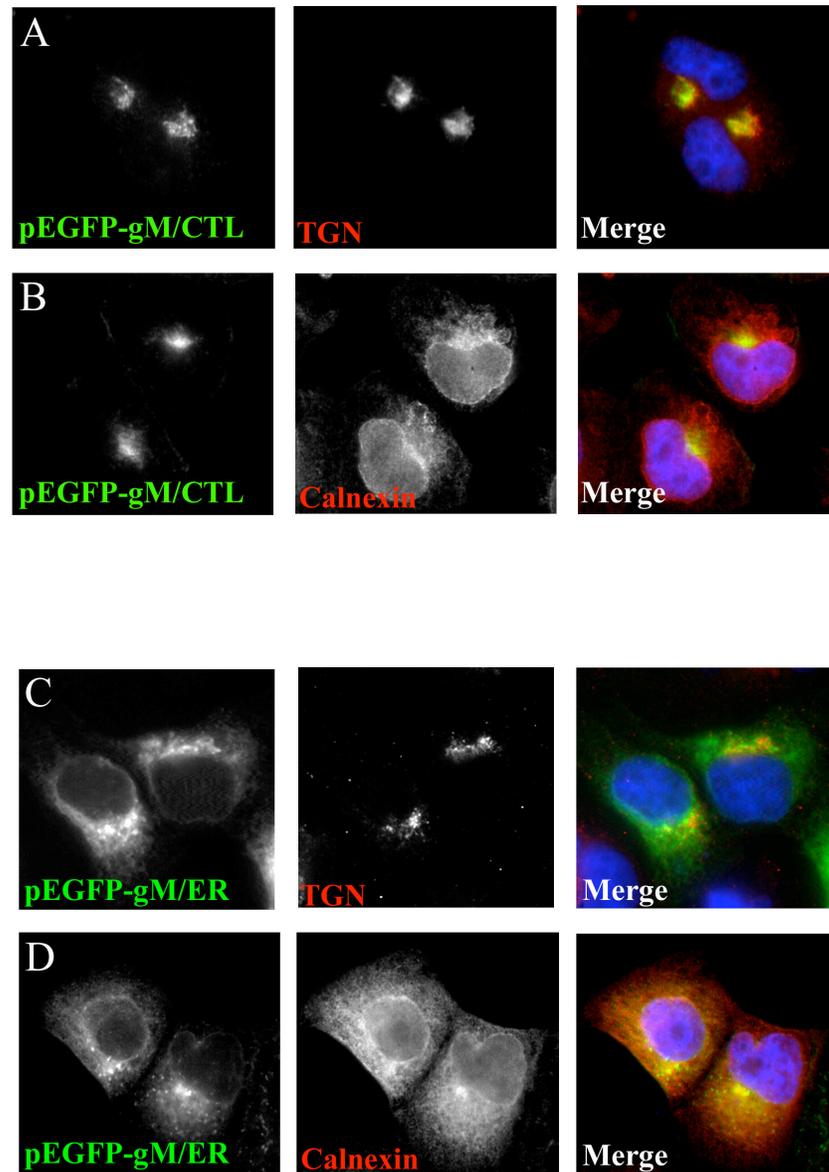


Fig.4 ER tag is functional. 143B cells were transfected with enhanced GFP plasmids expressing the targeted forms of gM pEGFPgM/CTL (A and B) or pEGFP-gM/ER (C and D). Twenty-four hours later, the cells were fixed, permeabilized, and stained in red for either TGN46 (TGN marker) or calnexin (ER marker).

gM accumulates in the nucleus upon infection with HSVBAC-gM/ER. Given a potential discrepancy between transfection and infection and the efficacy of the KKSL targeting signal to redirect gM and other glycoproteins to the ER compartment, the KKSL or control KKSLAL sequence was introduced into the HSV-1 genome using the BAC clone pHSV-1(17+)bluelox (61). As detailed in Materials and Methods, the bacmids were as expected and, given the clonal nature of our approach, devoid of any remaining traces of wild-type gM. Tagging gM had no impact on HSV-1 growth in noncomplementing cells and consequently had no effect on viral entry, replication, assembly, or egress (Fig. 1D). Next, we infected 143B cells with HSV-gM/ER or gM/CTL and analyzed the localization of gM using immunofluorescence microscopy. When infected at the physiological temperature of 37°C for 4 h, both gM/ER and gM/CTL proteins predominantly accumulated at the nuclear periphery and in nuclear speckles with limited colocalization with the TGN (Fig. 5). Thus, unless the ER tag did not work properly, the virus seemingly relocated gM from either the TGN (gM/CTL) or the ER (gM/ER) to the nucleus. These results were consistent with a potential retrieval of gM from the TGN and with a potential contribution of another viral factor in the targeting of gM to the nuclear membranes. However, there remained the formal possibility that gM had never reached the Golgi apparatus and in fact had never left the nucleus in the first place.

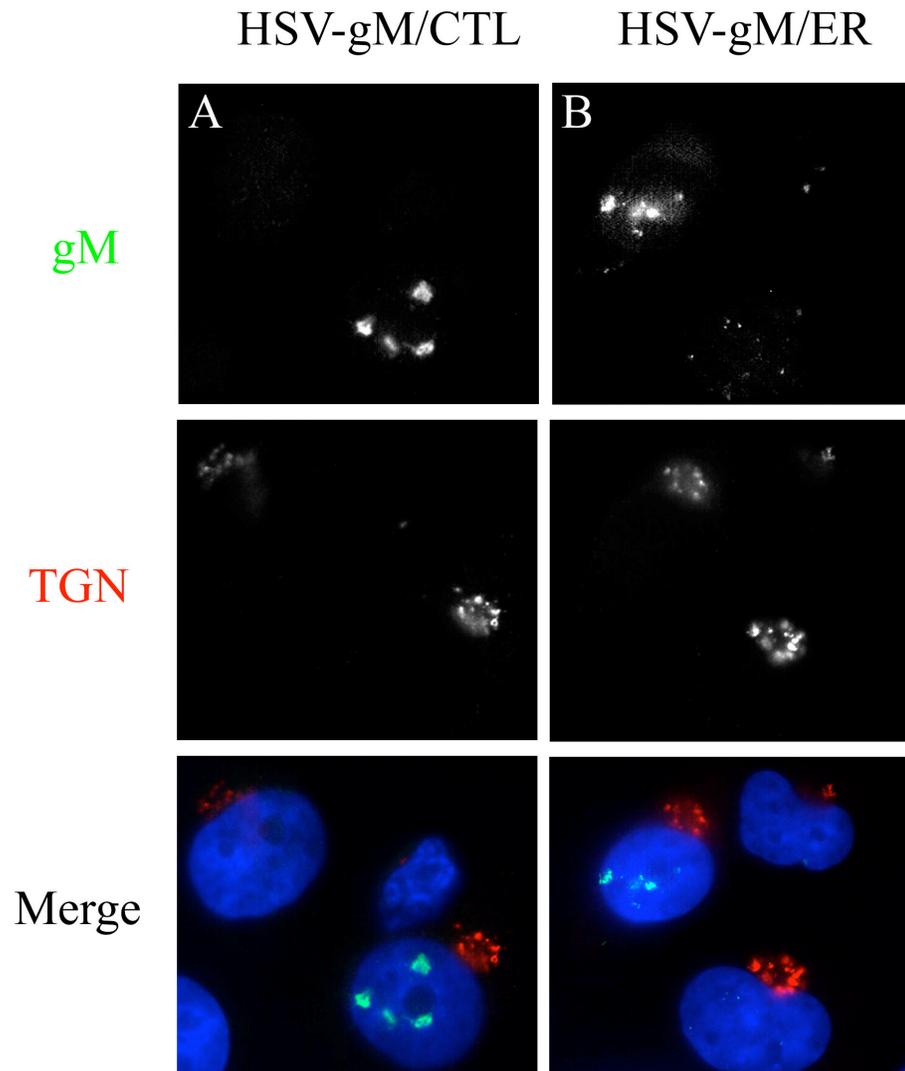


Fig.5 gM/CTL and gM/ER accumulate in the nucleus in infected cells. 143B cells were infected with HSV-gM/CTL (A) or HSV-gM/ER (B) for 4 h at 37°C. The cells were fixed, permeabilized, and double stained for gM (green) and TGN₄₆ (red).

Early nuclear gM does not transit through the secretory pathway. To probe whether gM expressed early during an infection enters the secretory pathway at all and is subsequently retrieved to the nuclear membranes from the Golgi/ TGN, we inhibited the transport between the ER and the Golgi/TGN and asked whether this impedes the presence of gM at the nucleus. This approach relied on the ability of a 15°C incubation to trap all cargo at the ERGIC (38, 53, 75). Thus, if gM transits through the TGN en route to the nucleus, it should accumulate at the ERGIC at 15°C and colocalize with the ERGIC53 marker protein (78). Cells were infected with HSV-1 or mock treated, incubated for 4 h at 37°C to allow viral entry and replication, and then kept for an additional 4 h at 15°C. As a control, cells were incubated in parallel for 8 h at 37°C. Note that during this time, gM was already expressed (Fig. 2 and 3) but viral egress was still in its early stages. A MAb directed against ERGIC53 labeled a typical perinuclear compartment (Fig. 6A to F), which was particularly tight at 15°C, as reported before (38, 78, 82). In this experiment, gM remained exclusively associated with nuclear membranes, suggesting that newly synthesized gM had never gained access to the secretory pathway (Fig. 6C and D). In contrast, the HSV-1 glycoproteins gB, gD, and gH clearly colocalized with ERGIC53 after prolonged incubation at 15°C (Fig. 6E and F and data not shown). Quantification of these results revealed that gM was exclusively nuclear in 90% of the cells, while few gB (4%), gD (0%), and gH (11%) molecules were nuclear but rather localized at the ERGIC (Fig. 6G). The data strongly supported a model whereby gM was actively retained in nuclear membranes and did not enter the secretory pathway. Furthermore, this nuclear localization appeared to a specific feature of gM.

Based on our results thus far, newly synthesized gM never seemed to reach the TGN but was specifically retained in the nucleus shortly after its synthesis. If this were the case, gM should mostly have an immature, high-mannose, N-linked glycosylation pattern. We therefore evaluated the sensitivity of gM to endo H, an enzyme that cleaves only high-mannose immature N-linked sugar chains, but not mature chains from glycoproteins (83).

We proceeded to analyze gM from total 143B cell lysates. Unfortunately, although gM was detected by immunofluorescence as early as 4 h p.i., it was not detected by Western blotting at that time even upon loading up to 150 μ g of total proteins per lane (data not shown). Given that gM is exclusively nuclear at 4 h. p.i. (Fig. 2, 3, and 5), we reasoned that gM was perhaps marginal in the sea of host and viral proteins. The obvious alternative was to enrich the preparation for nuclei. Whereas the isolation of HSV-1-infected nuclei requires lengthy optimization steps, our laboratory had already reported the purification of infected nuclei from HeLa cells (67). Since HeLa cells behave the same way as 143B cells with respect to the presence of gM on nuclear membranes early during infection (data not shown), it was possible to use them for this purpose. Consequently, to specifically ask whether the nuclear pool of gM had a mature glycosylation profile, we used the previously described assay to purify nuclei from HSV-1-infected HeLa cells at 6 to 8 h.p.i. (67). These relatively pure nuclei were lysed, treated with endo H, and analyzed for gM by immunoblotting. The vast majority of gM was sensitive to this enzyme (Fig. 6H), indicating that gM contained immature glycosylation chains and therefore never reached the Golgi apparatus or the TGN, where the N-linked sugar chains are further processed into the more mature forms. Quantification of the results with Image J software indicated that $91.0\% \pm 11.3\%$ of gM was endo H sensitive and hence immature. This high rate of immaturity was specific to gM, as reprobing of the same blot indicated that gD was $37.6\% \pm 7\%$ mature (Fig. 6I).

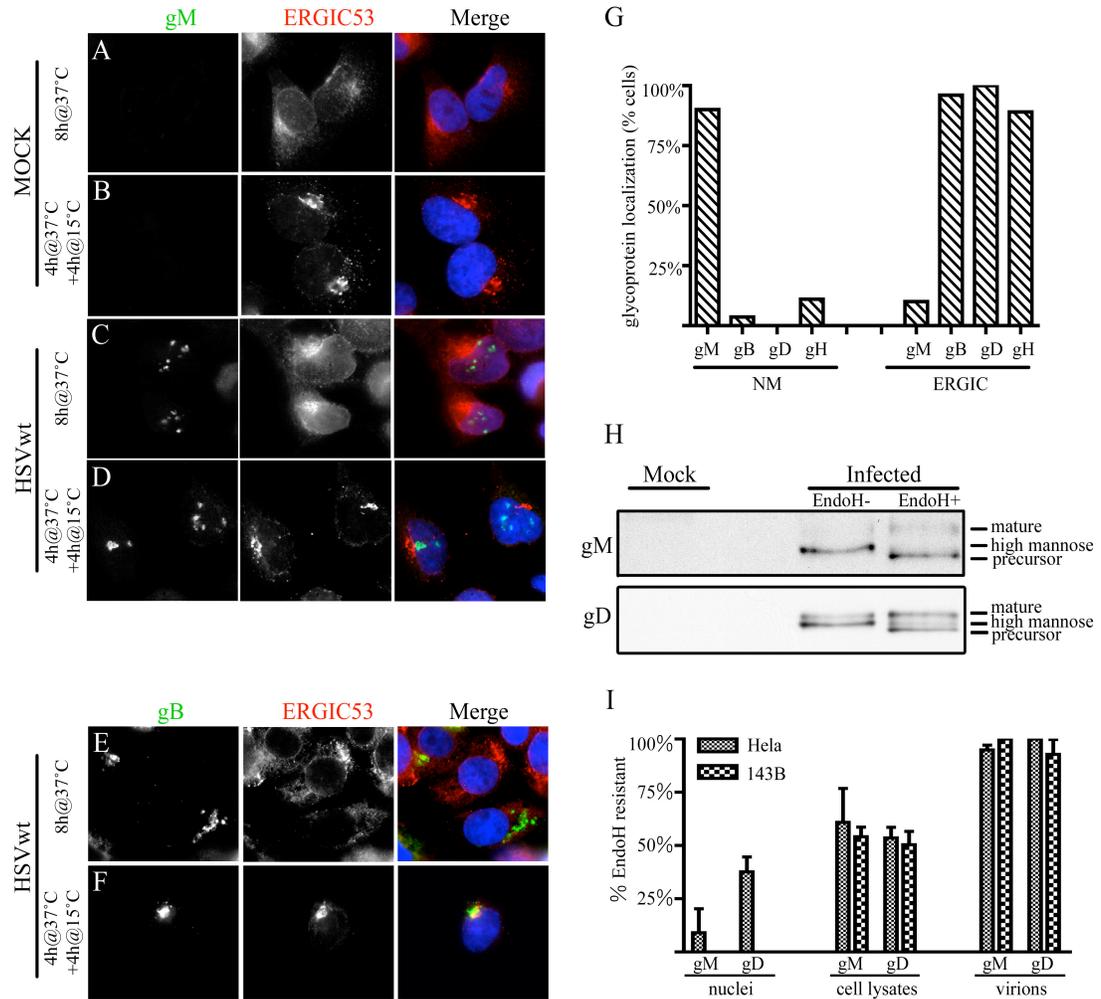


Fig. 6 The early gM nuclear pool does not transit through the TGN. 143B cells were infected with wild-type HSV-1 strain 17₋ (HSVwt) at an MOI of 2 for 4 h at 37°C, followed by an additional 4 h at 37°C or 15°C. The cells were fixed and stained against the ERGIC (red) and gM (A to D) or gB (E and F) (green). gD and gH were also analyzed, with results similar to those for gB (data notshown). (G) Quantification of the distribution of the glycoproteins in either the nucleus (NM [nuclear membrane]) or ERGIC in panels A to F was done for 10 random microscopy fields. The total cell number was between 34 and 147 for each condition and was normalized to 100%. (H) HeLa cells were mock infected or infected for 8 h with wild-type HSV-1 strain 17₋. At that point, the nuclei were isolated as described in Materials and Methods and treated with endo H (□) or incubated in the absence of the enzyme (○) and loaded on an SDS-PAGE gel. The separated proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane and probed for gM or gD by Western blotting. Note the various forms of the glycoproteins (nonglycosylated precursor, immature high-mannose form, and mature protein). (I) Quantification of endo H resistance by Image J. gM and gD on nuclei (H), in 24-h p.i. cell lysates, or in extracellular virions were resolved by SDS-PAGE, digested with endo H, probed by Western blotting, and quantified (see Materials and Methods). The error bars depict the standard deviations of the means.

To show that gM did eventually mature, we performed two additional experiments. First, we isolated total cell lysates at 24 h p.i. from infected 143B and HeLa cells, digested the samples with endo H, and analyzed them as described above. As expected, a mixture of mature and immature gM molecules was detected ($54.1\% \pm 4.5\%$ mature) in 143B cells. Similar results were obtained for gD ($50.4\% \pm 6.2\%$ mature) in 143B cells or in HeLa cells (Fig. 6I). Second, we probed the maturity of the N-linked sugars of gM and gD in extracellular virions. Whereas gM was exclusively mature in extracellular virions (we did not detect any endo H-sensitive band), nearly all gD displayed mature sugars in 143B cells ($92.8\% \pm 7\%$) (Fig. 6I). Once again, the data were similar in HeLa cells (Fig. 6I). Surprisingly, mature gM was also found in HSV-gM/ER virions (data not shown). Together, these data corroborated all previous results and indicated that gM was not simply targeted to nuclear membranes as a result of TGN reorganization or through its retrieval from the secretory pathway. Instead, gM was actively targeted to the nucleus shortly after its synthesis during the early stages of the infection. gM is specifically targeted to the nucleus. Our results suggested that the nuclear localization of gM was specific to this HSV-1 glycoprotein. This was unexpected, given that gM interacts with the HSV-1 glycoproteins gD and gH but not with gB and redirects gD and gH from the cell surface to the TGN upon cotransfection (17). To address whether gM interacted with gB, gD, or gH, their subcellular localization was analyzed in infected 143B cells. Since gB, gD, and gH are typically located at the TGN (17, 85), the infected cells were arrested at 20°C. Incubation at that temperature favors the detection of proteins even transiently residing in the TGN, since they cannot escape from that compartment (85). In cells infected with either HSVBAC-gM/ER or -gM/CTL at an MOI of 2, gM was again located on nuclear membranes (Fig. 7), while gB was in a perinuclear compartment partially overlapping with the TGN (85). In contrast, gD and gH were almost exclusively located at the TGN, with no indication of a presence in the nucleus. Thus, HSVBAC-gM/ER failed to target the other HSV-1 glycoproteins to the nuclear membranes and gM seemed to interact with these

glycoproteins only later during infection and/or somewhere downstream in the secretory pathway. Alternatively, this interaction may only occur after their transient coexpression upon transfection. Most importantly, our data suggested that the early nuclear targeting of gM is highly specific.

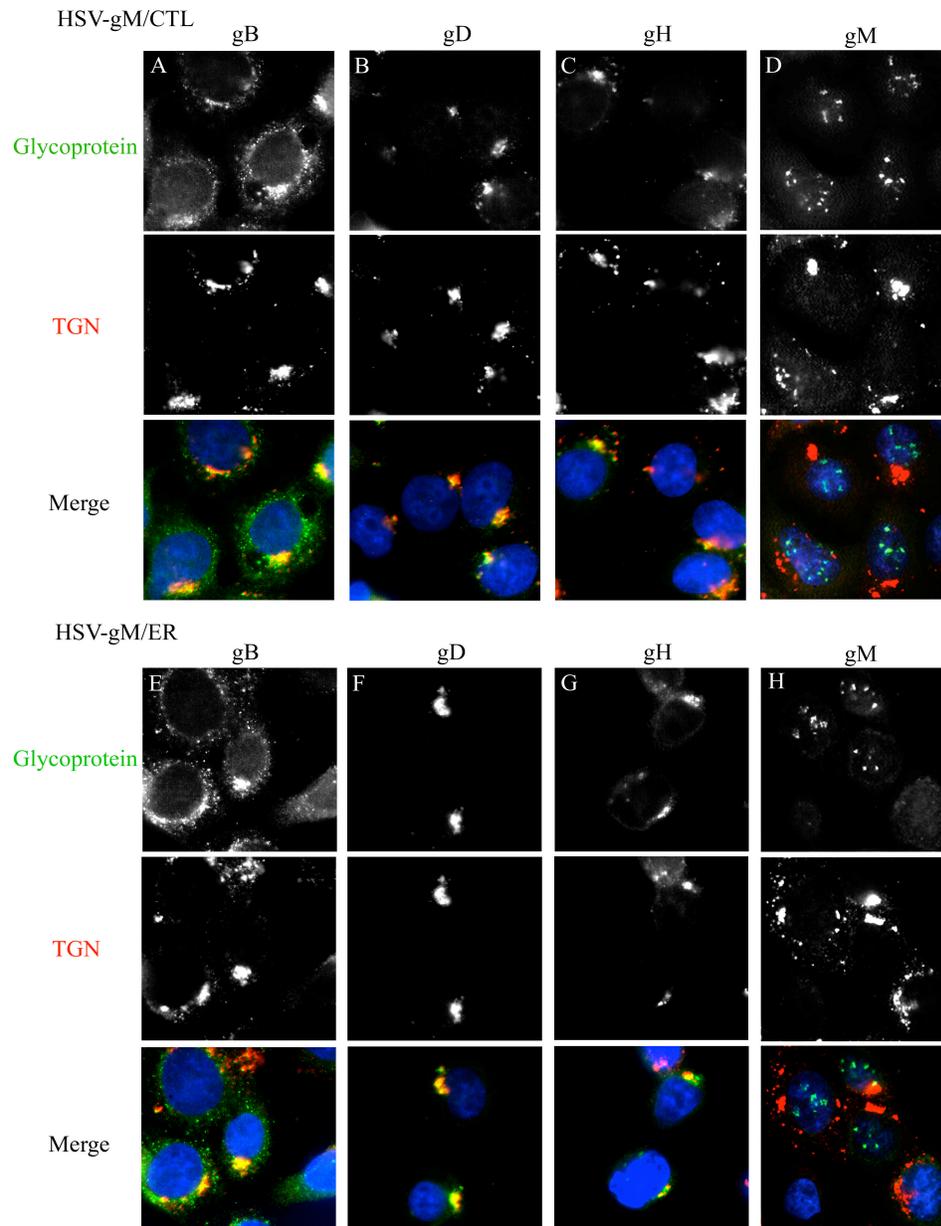


Fig.7 gM/ER does not alter the targeting of other viral glycoproteins. 143B cells were infected with HSV-gM/CTL (A to D) or HSV-gM/ER (E to H) at an MOI of 2 for 7 h at 37°C and then for 6 h at 20°C. The 20°C block, which specifically stops newly made proteins in the TGN, has been shown to arrest several HSV-1 envelope glycoproteins in the TGN. The cells were fixed, permeabilized, and double stained with antibodies against viral glycoprotein gB, gD, gH, or gM (green) and TGN46 (red).

Nuclear targeting of gM depends on other viral proteins. Upon transfection, gM/CTL was localized to the TGN and the cell surface (Fig. 4), in agreement with the results of others (17). In contrast, virus-expressed gM was predominantly located at nuclear membranes early during the HSV-1 infection (Fig. 2, 3, 5, and 6). Furthermore, the subcellular distribution of transfected gM/ER differed significantly from gM expressed during an infection (Fig. 4). Thus, gM localization to nuclear speckles and invaginations may require other viral proteins. To test this directly, cells were transfected with pEGFP-gM/CTL, subsequently infected with wild-type HSV-1, and examined at various times. Transfected gM was indeed relocated from the TGN to the nuclear membranes during the course of infection (Fig. 8A through F), albeit less efficiently than virus-expressed gM (Fig. 2 and 3). The nuclear localization of gM was particularly evident upon three-dimensional reconstruction of the data generated by confocal microscopy (Fig. 8G and H). Note that some gM was found at the TGN, but this was expected in the experimental design used, since the cells were transfected for 24 h prior to their infection with wild-type HSV-1 to allow the expression of the transgene. This allowed many gM molecules to reach the TGN before inoculation of the cells with the virus. Importantly, we never saw gM nuclear speckles in cells transfected with gM but not infected. Thus, HSV-1 actively redirected both transfected and virus-expressed gM to nuclear membranes in a process that required at least one other viral protein.

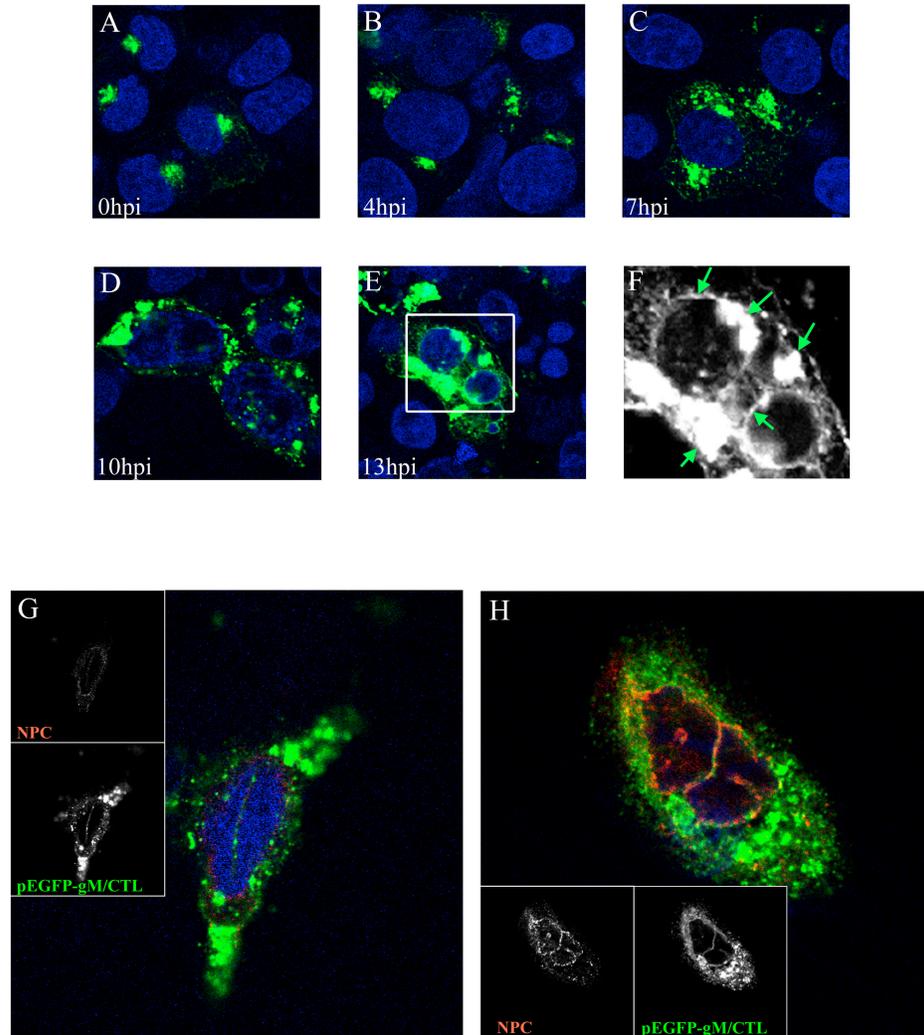


Fig.8 HSV-1 redistributes transfected gM to the nucleus. (A to F) 143B cells were transfected with the pEGFP-gM/CTL plasmid. Twenty-four hours posttransfection, the cells were infected with wild-type HSV-1 strain 17_ at an MOI of 2. Shown are confocal images of cells expressing enhanced GFP (EGFP)-tagged gM/CTL at the indicated times after infection. For the last time point (13 h p.i.), a zoom view (F) of the boxed area in panel E is provided to better show the presence of gM on nuclear membranes and the TGN (highlighted by arrows). (G and H) Enlarged images of cells expressing EGFP-gM/CTL at 13 h p.i., which were also probed for the nuclear membrane marker NPC (red) and with the nuclear DNA dye Topro-3 (blue). Confocal microscopy and image processing were performed as described in the legend to Fig.

Early nuclear gM does not colocalize with its partners. gM nuclear localization may be mediated via any one of its binding partners. Wills and colleagues recently reported the participation of UL31 and UL34 in this process late in infection (92).

Unfortunately, it was not known whether this also is the case at earlier time points. We therefore sought to verify this. Cells were consequently mock treated or infected with wild-type virus, and UL31 and UL34 localization was monitored at 4 h p.i. The data showed that neither protein colocalized with gM at 4 h p.i. (Fig. 9). We therefore asked whether other gM partners might contribute to the nuclear targeting of gM. VP22 (Fig. 9), which directly binds to gM during a PRV infection (26, 81), or gD and gH (Fig. 7), which both functionally interact with gM, were not detected in the nucleus by 4 h p.i. Although not yet proven for HSV-1, gM from many herpesviruses forms a complex with the integral protein gN, encoded by the UL49.5 or UL49A gene (8, 37, 94). Interestingly, proper transport and processing of the gM/gN complex often depends on their mutual interaction (28, 44, 51, 55, 73). Unfortunately, it was not possible to determine the subcellular localization of gN due to the lack of antibodies, but we monitored gN expression by RT-PCR (Fig. 9F). gN was expressed starting at 7 to 10 h p.i. and could not be detected at 4 h p.i., a time when gM was already in nuclear membranes. gN thus could not be responsible for the nuclear retention of gM. In conclusion, none of the described gM interaction partners could explain the early nuclear targeting of gM.

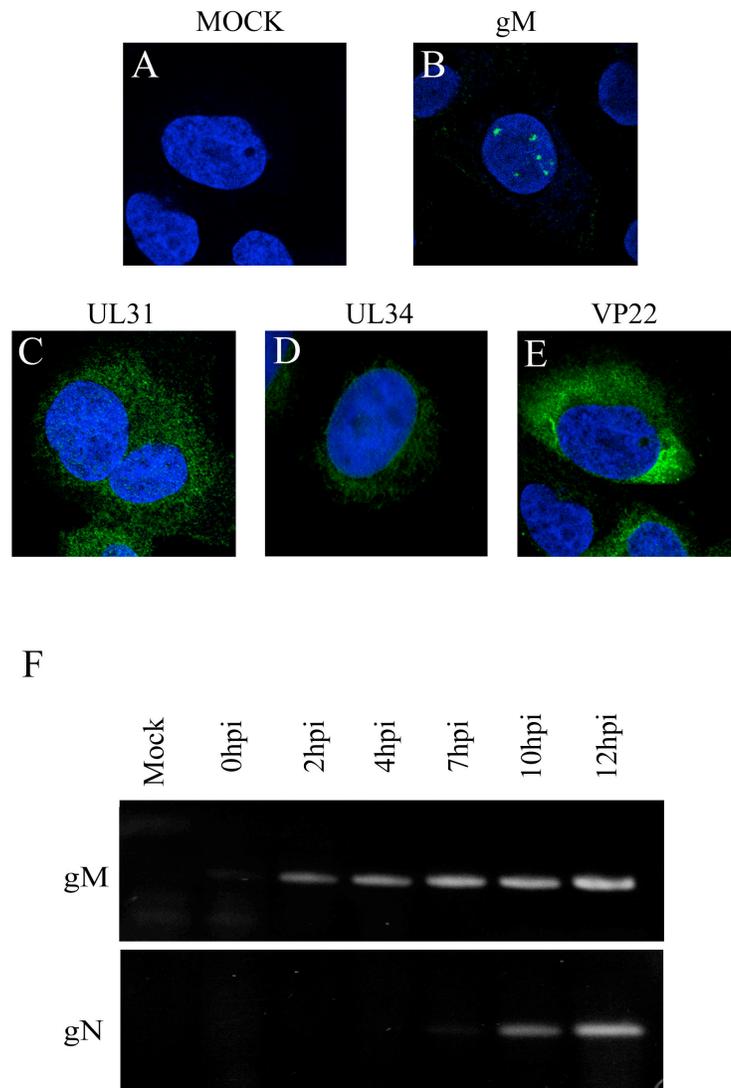


Fig.9 gM partners are not involved in gM nuclear localization. (A to E) 143B cells were infected with wild-type HSV-1 strain 17₊ at an MOI of 2 for 4 h at 37°C and then fixed and stained against the viral proteins gM, VP22, UL31, and UL34 (green) and with the nuclear DNA dye Topro-3 (blue). Confocal microscopy and image processing were performed as described in the legend to Fig. 2. (F) Total RNA was extracted from HSV-1-infected cells and reverse transcribed, and gM and gN were PCR amplified as described in Materials and Methods. The upper blot shows gM RNA expression from the control mock-infected 143B cells or cells infected for 0, 2, 4, 7, 10, or 12 h. The lower blot shows the same conditions for gN.

DISCUSSION

We initiated this study to elucidate the specificity and the mechanism of HSV-1 gM targeting to nuclear membranes. Our time course experiments indicated that gM was rapidly targeted to the nucleus early during HSV-1 infection in at least two different cell lines (Fig. 2 and 3). This is in line with the results of Baines and colleagues, who focused on late events from 13 to 16 h p.i. and convincingly demonstrated that gM is localized at both nuclear membranes and on perinuclear virions (7). While that initial study suggested that the nuclear localization of gM may be due to a bulk retrieval of the TGN/ Golgi components to the nucleus at those times (7), a subsequent study by the same group indicated that UL31 and UL34 may actively participate in this process (92). The present study adds an additional layer of complexity, as gM was targeted to nuclear membranes well before the TGN was disrupted (Fig. 3). In contrast, gB, gD, and gH, as well as two classical TGN markers and one Golgi marker, were all absent from the nucleus during the first 8 to 10 h p.i., while gM was already detected in the nucleus as early as 4 h p.i. (Fig. 3), in agreement with published microarray data (80). Furthermore, gM displayed immature sugars and never transited through the Golgi apparatus and the TGN at early time points but acquired mature sugars later on (Fig. 6). HSV-1 gM is thus actively and specifically recruited to nuclear membranes early in the viral life cycle and never enters the secretory pathway. Consequently, the early gM nuclear localization cannot be explained on the basis of the HSV-1-induced TGN reorganization.

The absence of a prominent phenotype in HSV-gM/ER may at first seem unexpected (Fig. 1D). However, it may merely reflect the nonessential status of gM during an HSV-1 infection (5, 21) and/or reiterate the redundant nature of herpesvirus glycoproteins to ensure the propagation of the virus. Another explanation may be the sheer abundance of viral proteins, in comparison to host proteins, which could therefore overwhelm the ER retrieval machinery. However, in view of the nuclear retention of gM, the results made

sense, since the KKSL retention signal can only function if the tagged protein escapes the ER and reaches the Golgi apparatus/TGN. As this occurred only late during infection, the ER tag could not operate until then and would not play any role early during infection. Altogether, the data confirmed that gM never transited through the ERGIC, the Golgi apparatus, or the TGN and therefore never encountered the ER retrieval machinery early during infection.

One surprising result was the incorporation of gM/ER into extracellular virions, since the protein should have been retained in the ER once it left the nucleus. This interpretation is consistent with reports regarding ER-tagged gD or gH (11, 79, 91). At this point, we cannot explain this discrepancy. It may be that enough gM/ER leaks out and makes it to the secondary site of reenvolvement later in the infection. This is supported by our findings that overexpressed gM/ER ends up in the TGN (Fig. 4), just like overexpressed gD/ER and gH/ER do (11, 79, 91). Though we sequenced the virions, found the anticipated ER retention signal, and used only low-passage viral stocks for our experiments, we cannot rule out the possibility that the ER tag did not work properly in the context of the infection. However, this caveat does not alter the overall conclusion that gM is found at the nuclear membranes early on.

The early presence of gM on nuclear membranes and its involvement in gD and gH recycling from the cell surface to the TGN later on (17) provided an experimental window to evaluate when such interactions occurred. Since gD and gH were absent from the nucleus at early time points, the results suggest that the interactions between them and gM occur later and/or somewhere downstream of the ER and nuclear membranes, once gM would have acquired a mature glycosylation (Fig. 6 and 7). Alternatively, these interactions may be measurable only under cotransfection conditions. Either way, the results underscored the unique property of gM to localize to nuclear membranes early in infection.

The targeting of integral proteins to nuclear membranes is the subject of intense scrutiny. To our knowledge, no specific trafficking signal has yet been indentified in these

proteins. Furthermore, gM does not contain any of the characterized nuclear localization signals (PredictNLS software; data not shown). However, this was not surprising, as nuclear localization signal motifs are normally used to target soluble proteins into the nucleus and may not be relevant for gM. Clearly, gM was directed to nuclear invaginations and speckles only in the presence of other viral proteins (Fig. 8). The targeting of gM to nuclear membranes may depend on its folding status, posttranslational modifications, and/or interactions with other proteins. Possible viral candidates for gM nuclear retention included gD, gH, VP22, UL31, and UL34. However, none of them colocalized with gM in the nucleus at 4 h p.i. (Fig. 7 and 9). These observations are consistent with published studies, which have reported on the largely cytoplasmic localization of VP22 and UL34 at early time points (22, 66, 71, 95, 96) or on the appearance of UL31 at the nuclear membranes only from 8 h p.i. onward (71). Note that at 12 h p.i., both UL31 and UL34 stainings gave a characteristic nuclear ring pattern (data not shown). Furthermore, the UL31/UL34 complex does not physically interact with gM in coimmunoprecipitation assays (92). Baines and colleagues also reported few effects of the HSV-1 US₃ kinase, which modulates UL31/UL34 localization, on the nuclear localization of gM (7). However, the UL31/UL34 complex seems to be involved late in infection, since at that time it does affect gM nuclear recruitment, as well as its relative distribution between the inner and outer nuclear membranes (92). Another potential gM-interacting partner, gN, was not detected at early times of infection when gM was retained at the nucleus (Fig. 9). Since gN seems to favor gM processing and transport, at least in some herpesviruses (28, 44, 51, 55, 73), it may facilitate gM exit from the nucleus later on, as the onset of gN transcription coincides with the nuclear egress of gM (Fig. 9). However, HSV-1 does not require gN to reach the TGN in transfected cells (17). In conclusion, none of the known interaction partners of gM seemed to be involved in its nuclear presence early in infection. Clearly, further experiments are needed to define how gM is targeted to nuclear membranes.

One stimulating issue is the potential role of HSV-1 gM at the nuclear membranes.

Although work by Leegre and colleagues suggests that deletion of gM does not impact the nuclear egress of both PRV and HSV-1 capsids (48), a compensatory mechanism cannot be ruled out in light of the built-in functional redundancy commonly observed in herpesviruses. In addition, the presence of gM on nuclear membranes is unlikely to be due merely to chance. This is substantiated by the numerous interactions between the related varicella-zoster virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gM and viral proteins found in the nucleus, including ICP0, ICP4, the packaging UL33 protein, and the UL30 polymerase, as well as the UL31 and UL34 molecules (87, 92). Should gM be involved in HSV-1 nuclear capsid egress, various hypothetical scenarios may be considered. One possibility is that gM marks some kind of nuclear exit site where gM would assume a scaffolding role. However, this would be surprising, as nuclear gM does not overlap with the major capsid protein at these early times (data not shown). Second, gM may induce or maintain nuclear invaginations in an effort to reduce the overall distance between any intranuclear assembly sites and the nuclear periphery. Interestingly, this possibility has previously been proposed for at least one cytomegalovirus and another herpesvirus (12, 65). In addition, the biological significance of the HSV-1-stimulated nuclear invaginations that were seen in this study is highlighted by the fact they are readily detectable in the unrelated 143B, HeLa, and NRK cells (this study and data not shown). Furthermore, they are not unique to infected cells but have also been reported in normal uninfected cells (25, 76). Third, since gM modulates the syncytial activities of gB, gD, and gH (40, 44, 86), which are ultimately also found on nuclear membranes (24, 35, 79, 84), gM may prevent uncontrolled fusion between the inner and the outer nuclear membranes. The recruitment of gM to the nucleus prior to the other glycoproteins is consistent with this idea. Alternatively, gM may fine tune and positively modulate the fusion of HSV-1 perinuclear virions with the outer nuclear membrane. Of course, gM could also have other unsuspected functions on nuclear membranes. Based on the present and past findings, a scenario emerges in which gM is targeted to nuclear membranes very early after its synthesis. This nuclear retention is achieved by one or several

viral proteins, but not by gB, gD, gH, gN, VP22, UL31, or UL34 at that moment. At the nucleus, gM mediates some aspect of the viral life cycle and later reaches the TGN, a process possibly facilitated by gN. At the TGN, gM participates in secondary and final capsid envelopment and is incorporated into mature virions. Late in the infection, gM may be passively redistributed to the nuclear envelopes as a consequence of TGN rearrangement by the virus.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to numerous people for reagents, including Hans- Peter Hauri (ERGIC-53 antibody), David Johnson (gB antibody), Gary Cohen and Rosalyn Eisenberg (gD antibody), Helena Brown (gH antibody), Lynn Enquist (gM antibody), Gillian Elliott (VP22 antibody), Joel Baines (UL31 antibody), Richard Roller and Susanne Bailer (UL34 antibodies), and Pascal Raymond and Gaudeline Rémillard- Labrosse (nucleus preparations). We also thank Sandra Loret, Camille Stegen, Yordanka Grudeva, and Gaudeline Rémillard-Labrosse for critical reading of the manuscript. This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (to R.L.; MOP 49547 and MOP 82921), the Canadian Foundation for Innovation (to R.L.; CFI 6908), and the German Research Council (to B.S.; DFG So403/2 and So403/3).

REFERENCES

1. Ackermann, W. W., and H. Kurtz. 1952. The relation of herpes virus to host cell mitochondria. *J. Exp. Med.* 96:151-157.
2. Adams, R., C. Cunningham, M. D. Davison, C. A. MacLean, and A. J. Davison. 1998. Characterization of the protein encoded by gene UL49A of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 79:813-823.
3. Alconada, A., U. Bauer, B. Sodeik, and B. Hoflack. 1999. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its *trans*-Golgi network localization. *J. Virol.* 73:377-387.
4. Avitabile, E., S. Di Gaeta, M. R. Torrisi, P. L. Ward, B. Roizman, and G. Campadelli-Fiume. 1995. Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J. Virol.* 69:7472-7482.
5. Baines, J. D., and B. Roizman. 1991. The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* 65:938-944.
6. Baines, J. D., and B. Roizman. 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* 67:1441-1452.
7. Baines, J. D., E. Wills, R. J. Jacob, J. Pennington, and B. Roizman. 2007. Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J. Virol.* 81:800-812.
8. Barnett, B. C., A. Dolan, E. A. Telford, A. J. Davison, and D. J. McGeoch. 1992. A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 73:2167-2171.
9. Brack, A. R., J. M. Dijkstra, H. Granzow, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.

1999. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J. Virol.* 73:5364-5372.
10. Browne, H., S. Bell, and T. Minson. 2004. Analysis of the requirement for glycoprotein M in herpes simplex virus type 1 morphogenesis. *J. Virol.* 78:1039-1041.
11. Browne, H., S. Bell, T. Minson, and D. W. Wilson. 1996. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J. Virol.* 70:4311-4316.
12. Buser, C., P. Walther, T. Mertens, and D. Michel. 2007. Cytomegalovirus primary envelopment occurs at large infoldings of the inner nuclear membrane. *J. Virol.* 81:3042-3048.
13. Campadelli-Fiume, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrisi. 1993. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2798-2802.
14. 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.
15. Compton, T., and R. J. Courtney. 1984. Virus-specific glycoproteins associated with the nuclear fraction of herpes simplex virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 49:594-597.
16. Cosson, P., and F. Letourneur. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263:1629-1631.
17. Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, and H. M. Browne. 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J. Gen. Virol.* 85:3517-3527.
18. Crump, C. M., C. H. Hung, L. Thomas, L. Wan, and G. Thomas. 2003. Role of

- PACS-1 in trafficking of human cytomegalovirus glycoprotein B and virus production. *J. Virol.* 77:11105-11113.
19. Davis, L. I., and G. Blobel. 1987. Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7552-7556.
 20. Desai, P., G. L. Sexton, E. Huang, and S. Person. 2008. Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures. *J. Virol.* 82:11354-11361.
 21. Dijkstra, J. M., N. Visser, T. C. Mettenleiter, and B. G. Klupp. 1996. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J. Virol.* 70:5684-5688.
 22. Elliott, G., and P. O'Hare. 1999. Live-cell analysis of a green fluorescent protein tagged herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 73:4110-4119.
 23. Falke, D. 1997. Herpes simplex virus and the cytoskeleton. *Trends Microbiol.* 5:306.
 24. Farnsworth, A., T. W. Wisner, M. Webb, R. Roller, G. Cohen, R. Eisenberg, and D. C. Johnson. 2007. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:10187-10192.
 25. Fricker, M., M. Hollinshead, N. White, and D. Vaux. 1997. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membranebound invaginations of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 136:531-544.
 26. Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, C. Hengartner, A. Brack, A. Mundt, L. W. Enquist, and T. C. Mettenleiter. 2002. Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J. Virol.* 76:8208-8217.
 27. Fuchs, W., and T. C. Mettenleiter. 1999. DNA sequence of the UL6 to UL20

- genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein. *J. Gen. Virol.* 80:2173-2182.
28. Fuchs, W., and T. C. Mettenleiter. 2005. The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res.* 112:108-114.
 29. Fulmer, P. A., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas. 2007. UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment. *J. Virol.* 81:3097-3108.
 30. Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, and M. D. Gershon. 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicellazoster virus: final envelopment in the *trans*-Golgi network. *J. Virol.* 68:6372-6390.
 31. Granzow, H., C. Birghan, T. C. Mettenleiter, J. Beyer, B. Kollner, and E. Mundt. 1997. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J. Virol.* 71:8879-8885.
 32. Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter. 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* 75:3675-3684.
 33. 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.
 34. Jackson, M. R., T. Nilsson, and P. A. Peterson. 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9:3153-3162.
 35. Jensen, H. L., and B. Norrild. 1998. Herpes simplex virus type 1-infected human embryonic lung cells studied by optimized immunogold cryosection electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 46:487-496.

36. Jons, A., J. M. Dijkstra, and T. C. Mettenleiter. 1998. Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J. Virol.* 72:550-557.
37. Jons, A., H. Granzow, R. Kuchling, and T. C. Mettenleiter. 1996. The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope. *J. Virol.* 70:1237-1241.
38. Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B. L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, and H. P. Hauri. 1998. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.* 111:3411-3425.
39. Klupp, B., J. Altenschmidt, H. Granzow, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter. 2008. Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J. Virol.* 82:6299-6309.
40. Klupp, B. G., R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter. 2000. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J. Virol.* 74:6760-6768.
41. 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.
42. König, P., K. Giesow, and G. M. Keil. 2002. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Vet. Microbiol.* 86:37-49.
43. Kopp, M., H. Granzow, W. Fuchs, B. Klupp, and T. C. Mettenleiter. 2004. Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J. Virol.* 78:3024-3034.
44. Koyano, S., E. C. Mar, F. R. Stamey, and N. Inoue. 2003. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J. Gen. Virol.* 84:1485-1491.
45. Lake, C. M., S. J. Molesworth, and L. M. Hutt-Fletcher. 1998. The Epstein-Barr

- virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J. Virol.* 72:5559-5564.
46. Lee, H. C., V. N. Chouljenko, D. V. Chouljenko, M. J. Boudreaux, and K. G. Kousoulas. 2009. The herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD) cytoplasmic terminus and full-length gE are not essential and do not function in a redundant manner for cytoplasmic virion envelopment and egress. *J. Virol.* 83:6115-6124.
 47. Lee, J. H., V. Vittone, E. Diefenbach, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach. 2008. Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology* 378:347-354.
 48. Leege, T., W. Fuchs, H. Granzow, M. Kopp, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter. 2009. Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83:896-907.
 49. Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79:1199-1207.
 50. Liang, X., B. Chow, C. Raggo, and L. A. Babiuk. 1996. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J. Virol.* 70:1448-1454.
 51. Lipinska, A. D., D. Koppers-Lalic, M. Rychlowski, P. Admiraal, F. A. Rijsewijk, K. Bienkowska-Szewczyk, and E. J. Wiertz. 2006. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J. Virol.* 80:5822-5832.
 52. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe. 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82:8605-8618.
 53. Lotti, L. V., M. R. Torrisi, M. C. Pascale, and S. Bonatti. 1992.

- Immunocytochemical analysis of the transfer of vesicular stomatitis virus G glycoprotein from the intermediate compartment to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 118:43-50.
54. Mach, M., B. Kropff, P. Dal Monte, and W. Britt. 2000. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J. Virol.* 74:11881-11892.
55. Mach, M., B. Kropff, M. Kryzaniak, and W. Britt. 2005. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J. Virol.* 79:2160-2170.
56. Melancon, J. M., R. E. Luna, T. P. Foster, and K. G. Kousoulas. 2005. Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and UL2op function redundantly in virion development. *J. Virol.* 79:299-313.
57. Mettenleiter, T. C. 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet. Microbiol.* 113:163-169.
58. Montague, M. G., and C. A. Hutchison III. 2000. Gene content phylogeny of herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5334-5339.
59. Munro, S., and H. R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
60. Murphy, K. C. 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:2063-2071.
61. 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 Δ). *J. Virol.* 82:3109-3124.
62. Nilsson, T., M. Jackson, and P. A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic

- reticulum. *Cell* 58:707-718.
63. Pelham, H. R. 1988. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* 7:913-918.
 64. Pfeffer, S. R. 2007. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.* 76:629-645.
 65. Pignatelli, S., P. Dal Monte, M. P. Landini, B. Severi, R. Nassiri, J. Gilloteaux, J. M. Papadimitriou, G. R. Shellam, T. Mertens, C. Buser, D. Michel, and P. Walther. 2007. Cytomegalovirus primary envelopment at large nuclear membrane infoldings: what's new? *J. Virol.* 81:7320-7321. (Author's reply, 81:7321-7322.)
 66. Pomeranz, L. E., and J. A. Blaho. 1999. Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 73:6769-6781.
 67. Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe. 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J. Virol.* 80:9741-9753.
 68. Remillard-Labrosse, G., and R. Lippe. 2009. Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN. *Commun. Integr. Biol.* 2:1-3.
 69. Remillard-Labrosse, G., C. Mihai, J. Duron, G. Guay, and R. Lippe. 2009. Protein kinase D-dependent trafficking of the large herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic* 10:1074-1083.
 70. Reske, A., G. Pollara, C. Krummenacher, B. M. Chain, and D. R. Katz. 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev. Med. Virol.* 17:205-215.
 71. Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller. 2001. UL31 and UL34 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.
 72. Roizman, B., and A. E. Sears. 1993. Herpes simplex viruses and their replication, p. 11-68. *In* B. Roizman, R. J. Whitley, and C. Lopez (ed.), *The human*

herpesviruses. Raven Press, New York, NY.

73. Rudolph, J., C. Seyboldt, H. Granzow, and N. Osterrieder. 2002. The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J. Virol.* 76:2952-2963.
74. Saffran, H. A., J. M. Pare, J. A. Corcoran, S. K. Weller, and J. R. Smiley. 2007. Herpes simplex virus eliminates host mitochondrial DNA. *EMBO Rep.* 8:188-193.
75. Saraste, J., and E. Kuismanen. 1984. Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* 38:535-549.
76. Schermelleh, L., P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, D. A. Agard, M. G. Gustafsson, H. Leonhardt, and J. W. Sedat. 2008. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* 320:1332-1336.
77. Schiff, P. B., and S. B. Horwitz. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1561-1565.
78. Schweizer, A., J. A. Fransen, T. Bachi, L. Ginsel, and H. P. Hauri. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 107:1643-1653.
79. Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne, and A. Minson. 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment 3 deenvelopment 3 reenvelopment pathway. *J. Virol.* 75:5697-5702.
80. 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.

81. Stylianou, J., K. Maringer, R. Cook, E. Bernard, and G. Elliott. 2009. 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.* 83:5204-5218.
82. Tang, B. L., S. H. Low, H. P. Hauri, and W. Hong. 1995. Segregation of ERGIC53 and the mammalian KDEL receptor upon exit from the 15 degrees C compartment. *Eur. J. Cell Biol.* 68:398-410.
83. Tarentino, A. L., T. H. Plummer, Jr., and F. Maley. 1973. A beta-mannosidic linkage in the unit A oligosaccharide of bovine thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 248:5547-5548.
84. Torrisi, M. R., C. Di Lazzaro, A. Pavan, L. Pereira, and G. Campadelli-Fiume. 1992. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J. Virol.* 66:554-561.
85. 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.
86. Turner, A., B. Bruun, T. Minson, and H. Browne. 1998. 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.* 72:873-875.
87. Uetz, P., Y. A. Dong, C. Zeretzke, C. Atzler, A. Baiker, B. Berger, S. V. Rajagopala, M. Roupelieva, D. Rose, E. Fossum, and J. Haas. 2006. Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* 311:239-242.
88. Van De Moortele, S., R. Picart, A. Tixier-Vidal, and C. Tougard. 1993. Nocodazole and taxol affect subcellular compartments but not secretory activity of GH3B6 prolactin cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60:217-227.
89. Van Genderen, I. L., R. Brandimarti, M. R. Torrisi, G. Campadelli, and G. van

- Meer. 1994. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 200:831-836.
90. 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.
91. 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.* 73:9515-9520.
92. Wills, E., F. Mou, and J. D. Baines. 2009. 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.* 83:4800-4809.
93. 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.* 83:3115-3126.
94. Wu, S. X., X. P. Zhu, and G. J. Letchworth. 1998. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the UL49.5 protein. *J. Virol.* 72:3029-3036.
95. Ye, G. J., K. T. Vaughan, R. B. Vallee, and B. Roizman. 2000. The herpes simplex virus 1 UL34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J. Virol.* 74:1355-1363.
96. Yedowitz, J. C., A. Kotsakis, E. F. Schlegel, and J. A. Blaho. 2005. Nuclear localizations of the herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP13/14, VHS, and VP16 precede VP22-dependent microtubule reorganization and VP22 nuclear import. *J. Virol.* 79:4730-4743.
97. Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muirers, and A. F. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20:123-

128.

Article II

Titre : Caractérisation du domaine carboxyl-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM

Auteurs: Jie Zhang,¹ Hannah Striebinger,²
Susanne M. Bailer² and Roger Lippé¹

En préparation

Contribution des auteurs :

Jie Zhang* : Conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Hannah Striebinger* : Réalisation des expériences de double-hybride et de sous-clonage de gM interacteurs, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Susanne M. Bailer : Creation et supervision du projet, conception des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

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

* premier auteur

Caractérisation du domaine cytoplasmique carboxyl-terminal de HSV-1 gM

Jie Zhang,¹ Hannah Striebinger,² Susanne M. Bailer² and Roger Lippé¹

1. Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, Canada,
2. Universität des Saarlandes, Fachrichtung 2.3 & 2.5, D-66421 Hamburg, Germany.

En préparation

RÉSUMÉ

La glycoprotéine M est l'une des treize glycoprotéines présente sur l'enveloppe d'HSV-1. Elle est la seule glycoprotéine qui ne soit pas essentielle au virus mais est toutefois conservée dans la famille de *Herpesviridae*. Lorsque transfectée, i.e. en absence d'autres protéines virales, gM se localise au TGN. Lors d'une infection, elle se retrouve dans la membrane nucléaire, la membrane plasmique, et le TGN où gM joue présumément un rôle dans l'enveloppement final des nucléocapsides. L'analyse de la séquence d'acides aminés du domaine carboxyl-terminal cytoplasmique de gM révèle des signaux de trafic intracellulaire connus dans la voie de sécrétion cellulaire qui pourraient déterminer la localisation de gM. Il a récemment été rapporté que ces signaux pourraient être importants pour la fonction de gM dans la réplication des autres virus herpès. Pour étudier le rôle de ce domaine de gM dans le cycle de réplication de HSV-1, nous avons généré un mutant qui code pour une protéine gM dépourvu de la queue C-terminale cytoplasmique (340-473aa). Nous avons analysé l'effet de la mutation sur la localisation de gM et aussi sur la réplication de HSV-1. Nos résultats indiquent que le transport de gM tronquée du RE à l'appareil de Golgi est presque complètement bloqué. En outre, la délétion du domaine cytoplasmique de gM cause une réduction légère de titre et de la taille des plaques des virus mutants. L'analyse de microscopie électronique a démontré une accumulation des nucléocapsides nonenveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées avec les mutants. Étrangement, ce phénotype était apparent dans les cellules BHK mais absent dans les cellules 143B, suggérant que la fonction de gM dépende du type cellulaire. Ces données suggèrent un rôle important du domaine carboxyl-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM dans l'enveloppement final et la propagation intercellulaire du virus. Finalement, le criblage de partenaires d'interaction du domaine C-terminal de gM identifiés par le système de double-hybride nous a permis de proposer plusieurs candidats intéressants qui sont susceptibles de réguler la fonction de gM dans la morphogénèse et la propagation de virus.

INTRODUCTION

La glycoprotéine gM d'HSV-1 se compose de 473 acides aminés et est une glycoprotéine transmembranaire de type III. Cette glycoprotéine contient trois domaines: une région hydrophile à son extrémité amino-terminale, huit domaines transmembranaires potentiels et un terminus carboxyl hydrophile hautement chargé. Le domaine N-terminal de gM contient deux sites de N-glycosylation et un résidu cystéine conservé qui forme possiblement un complexe via un pont disulfure avec la protéine d'enveloppe virale UL49A (nommé gN dans les autres virus herpès). L'orientation cytoplasmique des queues N- et C-terminales a été prédite par des études bioinformatiques de gM et confirmée expérimentalement *in vitro* ([244]). Le domaine C-terminal cytoplasmique de gM se compose de 134 acides aminés, soit le plus long des domaines cytoplasmiques parmi les gM de virus herpès. Récemment, les études visant à identifier les domaines fonctionnels de gM ont mis en évidence que cette région pourrait être importante pour la fonction de gM dans la réplication de virus herpès. Dans le cas de HCMV, le domaine C-terminal cytoplasmique de gM est requis pour la distribution du complexe gM/gN au site d'assemblage, ce qui est essentiel pour la production virale ([282]). La même exigence a également été rapportée pour MuHV-4, un autre virus herpès ([283]). Dans les deux cas, les motifs de trafic intracellulaire au sein du domaine constituent des éléments déterminants.

L'alignement des domaines C-terminaux cytoplasmiques de gM indique que ce segment contient plusieurs motifs structuraux conservés dans les membres de la sous-famille *alphaherpesvirus*, incluant une région riche en arginines juste après le domaine transmembranaire et deux clusters acides. Une troisième région conservée consiste en des motifs à base de tyrosine de type YXXØ. Le motif à base de tyrosine YXXØ inclut Y pour la tyrosine, X pour n'importe quel acide aminé, et Ø pour un résidu hydrophobe encombrant. Il en existe quatre dans HSV-1 gM (YDEV aa 423-426, YAKI aa 435-438, YDTV aa 451-454, et YSTV aa 467-470), parmi lesquels seulement le premier motif est

conservée dans six membres de la famille *alphaherpesvirus* (Fig.1A). Par contre, le domaine C-terminal d'HSV-1 gM diverge significativement par rapport aux beta- et gamma-herpèsvirus, surtout en terme de conservation des motifs de tyrosine (Fig.1B et C).

Les motifs YXXØ sont présents dans de nombreuses protéines transmembranaires cellulaires et qui sont connus pour établir diverses interactions avec des protéines cytoplasmiques. Ils jouent un rôle clé dans le contrôle d'une variété d'événements cellulaires essentiels, y compris l'activation de l'endocytose dépendante de la clathrine, le triage intracellulaire des protéines, et l'activation des voies de signalisation ([284], [285]). Ces motifs sont également présents dans plusieurs protéines de virus herpès. Par exemple, plusieurs protéines de l'enveloppe d'*alphaherpèsvirus*, gB, gD, gE, gH, gK, contiennent des motifs YXXØ dans leurs domaines cytoplasmiques. Ces motifs servent souvent de signal d'endocytose, causant l'internalisation des protéines de la membrane plasmique ([279], [286], [287], [288], [289], [290], [291]). Pour gM, un motif responsable de l'endocytose a aussi été proposé mais pas encore formellement démontré expérimentalement ([261]). Le motif YXXØ enclenche l'endocytose des protéines correspondantes en établissant une interaction physique avec la sous-unité μ de complexe d'adaptateur AP-2, qui est à son tour associée avec la chaîne lourde de la clathrine, la première étape de la formation des vésicules tapissées de clathrine ([284]). De tous les signaux identifiés sur des protéines de virus herpès, il a été prouvé que seul le motif YQRL présent dans PRV gB interagit avec l'adaptateur AP-2 ([292]).

Un second rôle des motifs YXXØ est leur implication dans le ciblage des protéines virales vers la surface basolatérale des cellules épithéliales polarisées. Ainsi, des motifs YXXØ dans les domaines cytoplasmiques de HSV-1 gE et gB sont responsables du mouvement directionnel de ces deux protéines de l'enveloppe aux jonctions cellulaires, qui se situent à la surface basolatérale ([293], [294]). Il y a de fortes indications que le ciblage de gE à la surface latérale promeut la propagation directe de particules de HSV-1 de cellule à cellule dans les cellules polarisées ([293]). Finalement, le motif YXXØ joue également un rôle crucial dans le transport de gB du RE (réticulum endoplasmique) au Golgi pour

différents virus herpès ([295], [296]). Les divers motifs à base de tyrosine YXXØ conservés dans le domaine cytoplasmique des différentes protéines de l'enveloppe d'*alphaherpèsvirus*, en influençant la localisation et la fonction de ces protéines, jouent un rôle dans différents aspects du cycle de vie viral, incluant le ciblage de ces protéines aux sites d'enveloppement des capsides virales, la modulation du système immunitaire, et la stimulation de la propagation intercellulaire des virus.

Outre des motifs tyrosine YXXØ, deux clusters acides existent dans le domaine cytoplasmique de gM. L'un se situe en amont du premier motif tyrosine et contient des sites potentiels de phosphorylation par la kinase caséine II (Fig. 1 bloc en vert). L'autre se situe juste en aval du premier motif tyrosine (Fig.1 bloc en bleu). Un nombre limité d'exemples illustre le rôle de ces clusters dans la régulation du transport des protéines virales. Certaines équipes de recherche ont démontré qu'une substitution de résidus phosphorylables au sein d'un cluster acide présent dans la queue cytoplasmique de VZV gE cause une relocalisation de gE du TGN à la membrane plasmique ([297], [298]).

Dans la littérature, les motifs riches en arginine sont des séquences consensus souvent présentes dans les protéines de liaison à l'ARN qui jouent un rôle dans la transcription, la traduction, le trafic et l'emballage de l'ARN. Toutefois, d'autres rôles dans divers événements cellulaires ont également été assignés à ces motifs, incluant la translocation des protéines transmembranaires ([299], [300]) et la rétention au RE ([301]). De plus, il a été rapporté qu'une région riche en arginine coopère avec le signal de localisation nucléaire (NLS) de la protéine régulatrice ICP27 d'HSV-1, ce qui est nécessaire pour sa localisation efficace au noyau et l'expression des gènes viraux tardifs ([302]).

Lorsque exprimée seule, la glycoprotéine gM des virus beta- ou gamma-herpesvirus est localisée dans le RE. Toutefois, pendant une infection, gM se localise au TGN avec la collaboration d'une autre glycoprotéine virale, gN, avec qui elle forme un complexe dans de nombreux virus herpès ([282], [252], [303], [269], [304], [259], [242], [257]). Par contraste, HSV-1 gM se localise au TGN lorsque exprimée tout seule ([261], [305]). Ceci suggère que HSV-1 gM contient des signaux de localisation intrinsèques qui l'amènent au TGN

indépendamment de gN. Les signaux de trafic intracellulaire présents dans le domaine C-terminal cytoplasmique de gM constituent naturellement d'excellents candidats permettant le ciblage de gM au TGN. Malgré tout, gM se localise dans les invaginations de la membrane nucléaire à la phase précoce de l'infection, ce qui suggère que gM peut être localisée ailleurs qu'au TGN et que d'autres protéines virales participent à ce processus ([305]). Finalement, gM se trouve au site d'enveloppement en phase tardive de l'infection et elle est présumée jouer un rôle dans l'enveloppement final, probablement en interagissant via sa queue cytoplasmique avec les protéines tégumentaires présentes sur les nucléocapsides cytoplasmiques, par exemple, UL49 ([262], [180], [181]). En résumé, il semble donc que le domaine C-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM soit important pour la localisation et la fonction de gM.

Dans le but de mieux caractériser la partie carboxyl-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM, nous avons construit un mutant qui code pour une protéine gM qui n'exprime plus sa queue C-terminale cytoplasmique (gM Δ C). Dans les cellules transfectées, gM Δ C est considérablement compromise dans son transport intracellulaire vers le TGN et retenu dans le réticulum endoplasmique. Pendant une infection, un virus recombinant contenant la même délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM (HSV-1 gM Δ C) se réplique plus lentement et semble affecter spécifiquement au niveau de l'enveloppement cytoplasmique des capsides virales. La propagation intercellulaire des virus recombinants est également atténuée, suggérant que la queue C-terminale cytoplasmique de HSV-1 gM est fonctionnelle dans les cellules infectées et nécessaire pour une production viral efficace. Considérant l'implication d'autres protéines virales dans la localisation de HSV-1 gM, nous avons alors entrepris d'identifier les partenaires viraux qui interagissent spécifiquement avec son domaine C-terminal. Une approche par le système de double-hybride a permis l'identification de plusieurs candidats potentiels. Étrangement, aucun d'eux ne semblent *a priori* responsable de la localisation de HSV-1 gM. Par contre, ces partenaires influencent probablement la fonction de gM.

A

```

HSV-1 P04288 RCTRAYLYHRRHHTKFFMRMRDTRHRAHSALKRVRSSMRGSRDGRHRPAPGSPPGIPEYAEDPYA 404
HSV-2 P89433 RCTRAYLYHRRHHTKFFVVRMRDTRHRAHSALRRVRSSMRGSRRG-----GPPGDPGYAETPYA 397
EHV-1 Q6S6V2 RLVRAIMFHKKRNTEFYGRVKTVSSKARRYVNVKVRGPRR-----NPQPLNV 401
EHV-4 Q39292 RLVRAIMFHKKRNTEFYGRVKTVSSKARKYVNVVRGPRR-----TTKPLNV 401
PrV Q9DL74 RLVRAICIAHRARGSRFYANVDKARTTARRYLQKRLHGRG-----NEEYLLA 371
BHV-1 P52370 RLVRAICLHRRRKGSAFYGHVSAARQQAARYIARARSSRG-----MAP---L 378
      * . ** : * : : * : . : . * : :
HSV-1 P04288 -ISYGGQLDRYGSDGE-PIYDEVADDQTDVLYAKIQHPRHLPDDDPITYDTVGGYDPEPAEDPVYSTVRRW 473
HSV-2 P89433 SVSHHAEIDRYGSDGD-PIYDEVAPDHEAELIYARVQRPVDAEPIYDTVEGYAPRSAGEPVYSTVRRW 467
EHV-1 Q6S6V2 AESRGMLLAEDSETDAEPIYDVVSEEFETEYIDDPQRVFERSHRREYR----- 450
EHV-4 Q39292 AESRGMLLNEDSETDSEPIYDVVSNEFETEYIDDPHHDLNRRNSRRDYR----- 450
PrV Q9DL74 PG-----MTEDEFDDGDEVVYENLGFE----- 393
BHV-1 P52370 EGDAAALDRGVASDDEEAVYEAHAPPRPPTIPLRRPEVPHSRASHPRPPPRSPPAHVK----- 438
      : . * : : * : .

```

B

```

HSV-1 RCTRAYLYHRRHHTKFFMRMRDTRHRAHSALKRVRSSMRGSRDGRHRPAPGSPPGIPE 397
HCMV TCRAVRYFRGRGSGSVKYQALATASGEEVAVLSHSDSLESRR----- 356
      * . : : * .. : * . * : : . * : . *
HSV-1 LDRYGSDGGEPIYDEVADDQTDVLYAKIQHPRHLPDDDPITYDTVGGYDPEPAEDPVYSTVRRW 473
HCMV LREEEDDDDELFEDA----- 372
      * . * .

```

C

```

HSV-1 RCTRAYLYHRRHHTKFFMRMRDTRHRAHSALKRVRSSMRGSRDGRHRPAPGSPPGIPEYAEDPYAISYGGQLDRYGD 416
MHV68 RIIR-----LRSQTSTKVTYKLGISGAMEAQPFSIPQPP----- 368
      * * * : : : . : : * : : : : . **
HSV-1 SDGEPITYDEVADDQTDVLYAKIQHPRHLPDDDPITYDTVGGYDPEPAEDPVYSTVRRW 473
MHV68 ---RAKYTDLETESEDEL----- 383
      .. * : : : . * *

```

Fig.1 Alignement des séquences de domaine cytoplasmique des homologues gM de membres des virus herpès. A) Alignement multiple des séquences des domaines cytoplasmiques des homologues gM de six membres de sous-famille *alpha*herpèsvirus. Les séquences des homologues gM de HSV-1, HSV-2, EHV-1, EHV-4, PrV, BHV-1 correspondent aux numéros d'accèsion Uniprot P04288, P89433, Q6S6V2, O39292, Q9DL74, et P52370 respectivement. B) et C) Alignement des séquences du domaine cytoplasmique de gM d'HSV-1 avec ceux des membres des autres sous-familles de virus herpès. Les séquences des homologues gM de HSV-1, HCMV, MHV68 proviennent de numéro d'accèsion Uniprot, P04288, P16733, et O41956 respectivement. Les acides aminés identiques sont indiqués par des astérisques (*), et les substitutions conservées ou semi-conservées par «:» ou «.» respectivement. Les motifs YXXØ sont surlignés en jaune, les sites potentiels de phosphorylation pour la caséine kinase en vert, les clusters acides en bleu, et les régions enrichies en arginine en gris. Les positions des acides aminés pour chaque séquence (numérotation basée sur les protéines précurseurs) sont présentes à la droite de chaque bloc.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cellules et virus. Les cellules BHK, Véro, HeLa et 143B tk⁻ ont été cultivées dans le milieu de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de bovin foetal (Medicorp), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), et des antibiotiques (100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) à 37 °C avec 5% de CO₂. Pour les cellules 143B tk⁻, 15 µg/ml de 5-bromo-2 désoxyuridine (Sigma-Aldrich) a été ajouté dans le milieu, sauf avant ou durant une infection. Les virus de type sauvage HSV-1 17⁺ et les virus mutants (voir ci-dessous) ont tous été propagés sur des cellules BHK et leurs titres déterminés par essai de plaque sur des cellules Véro.

Analyse de double-hybride en levure. L'analyse de double hybride en levure a été effectuée comme décrit dans l'article précédent ([264]) selon le protocole du fabricant (Clontech). En bref, les souches de levure AH109 et Y187 sont transformées à l'aide de 1 mg d'ADN plasmidique de proie (pGADT7-DEST) ou appâts (pGBKT7-DEST), respectivement. Les colonies diploïdes ont été cultivées pendant 2 jours à 30°C et par la suite transférée sur les pétrie contenant le milieu SD (+2 % agar) selective pour leu/trp/his. Des interactions ont été considérés comme positives, si au moins 3 ou 4 colonies ont formées. Les gènes cellulaires c-myc (pGBKT7) et max (pGADT7) ont été inclus comme contrôles positifs, tandis que les vecteurs vides pGADT7 et pGBKT7 ont été utilisés comme témoins négatifs.

Analyse de la croissance en une seule étape. Des cellules BHK ou 143B tk⁻ étalées sur des plaques à six puits ont été infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 avec du virus de type sauvage (HSVwt), HSVΔgM, ou HSVgMΔC, puis recouvertes de milieu de culture standard. À différents moments, les surnageants ont été récoltés et les virions concentrés pendant 1 h à 39,000x g, remis en suspension dans un tampon de MNT (30 mM

MES [acide morpholineethanesulfonique], 100 mM NaCl, et 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), et surgelés dans de l'azote liquide. La quantité de virus infectieux dans les échantillons a été mesurée par titration sur les cellules Véro.

Transfections et Infections. Pour les transfections, des cellules 143B tk⁻, HeLa ou BHK ensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques à 24 puits ont individuellement été transfectées avec 0.8 µg de pEGFP-gM/CTL, pCR3-N-myc, pCR3-N-HA-UL10, pCR3-N-HA-UL10ΔC, ou co-transfectées avec 0.4 µg de pEGFP-gM/CTL et 0.4 µg de pCR3-N-myc à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été fixées et perméabilisées pour la microscopie d'immunofluorescence. Pour les infections, les cellules ont été ensemencées la veille sur des plaques à 24 puits contenant des lamelles. Le lendemain, elles ont été infectées avec les virus de type sauvage HSV-1 17⁺ à un MOI de 2 pour 1 h à 37°C (phase d'absorption), puis cultivées dans un milieu de culture standard à 37°C pour les durées indiquées. Tous les échantillons ont été traités pour la microscopie d'immunofluorescence tel que décrit ci-dessous.

Immunofluorescence. Les cellules ont été fixées avec 3% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate salin (PBS) et lavées avec du PBS, et le résidu de fixateur inactivé avec 50 mM NH₄Cl dans du PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées en utilisant 0.1% de Triton X-100 pendant 4 min et les sites de liaison non spécifiques bloqués avec 10% de sérum de bovin foetal. Les spécimens ont été marqués pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C avec des anticorps primaires dilués dans 10% sérum de bovin foetal. Ils ont ensuite été lavés et incubés avec des anticorps secondaires appropriés. Les échantillons ont finalement été montés sur des lames avec du Mowiol contenant 0.1 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) pour marquer les noyaux. Les anticorps suivants ont été utilisés: PAS980 polyclonal anti-gM (provenant de Lynn Enquist), anti-TGN46 (Serotec), HA-F7 anti-HA (Santa Cruz), anti-myc (Covance Research Products), anti-ICP4 et anti-ICP0

(Abcam), AGV031 anti-UL49 (gracieuseté de Gillian Elliott), anti-UL38 et anti-UL35 (don de Gary Cohen et Rosalyn Eisenberg), anti-UL28, anti-UL33, et anti-UL31 (obtenu de Joel Baines), anti-UL34 (obtenu de Susanne Bailer). Tous les anticorps secondaires (Alexa488, et 568) proviennent de Molecular Probes. La microscopie à fluorescence a été réalisée avec un microscope à fluorescence Axiophot à grand champ (Zeiss) muni de filtres et d'une caméra Retiga 1300 (Q Imaging). Les images ont été acquises et analysées avec le logiciel d'imagerie du Nord Eclipse (EMPIX Imaging) et traitées et assemblées avec Photoshop 6.0 (Adobe).

Immunoprécipitation. Des cellules ensemencées dans un pétri de 10 cm ont été infectées avec les virus HSV-1 gM/CTL. Après 16 heures, elles ont été lysées dans 1 ml de tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay) glacé contenant des inhibiteurs de protéinases fraîchement ajoutés (100 μ M chacun de chymostatin, leupeptin, antipain, pepstatin; Sigma.). Les lysats cellulaires ont ensuite été recueillis dans des eppendorf de 1,5ml, vortexés, et centrifugés à 18000x g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant (lysate total) a été récolté et transféré dans des nouveaux tubes. Pour l'immunoprécipitation, les échantillons ont tout d'abord été incubés avec du sérum de souris pré-immun pendant 15 min à 4°C (6 μ l sérum/échantillon) afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Un anticorps monoclonal anti-VSV G a ensuite été ajouté dans les échantillons et incubés pendant 1h à 4°C avec agitation. Subséquemment, des billes d'agarose couplées à la protéine A (Roche) lavées avec le tampon RIPA ont été ajoutées aux lysats et les échantillons incubés encore 1h à 4°C avec agitation. Nous avons ensuite récolté les billes d'agarose par centrifugation et les avons lavé 2 fois avec le tampon RIPA et une fois avec 10 mM Tris-HCl (pH 7,2) glacé. Les complexes d'anticorps-antigènes ont été précipités par centrifugation (20 sec à 12 000x g) et remis en suspension dans du tampon SDS-PAGE. Pour dénaturer les protéines, nous avons chauffé les échantillons à 37°C pendant 1h ou 56°C pendant 2 min pour éviter l'agrégation de gM ([244]). Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE, transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène, et sondés avec l'anticorps polyclonal

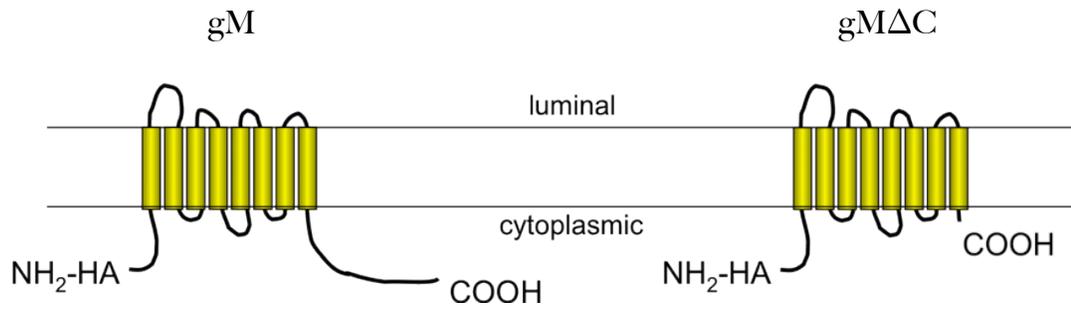
anti-gM PAS980 ou des anticorps contre divers partenaires potentiels, tel qu'indiqué. La détection des protéines a été réalisée avec un kit Super Signal West Pico chimiluminescence (Pierce) et des films légers de Kodak BioMax.

Microscopie électronique. Des cellules BHK ou 143Bensemencées dans des pétris de 10 cm ont été infectées avec des virus de type sauvage HSV-1 17⁺ à un MOI de 1 et incubées pendant 16 h à 37 °C. Les cellules ont été lavées 2 fois avec un tampon cacodylate 0.1 M, ensuite fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,2-7,4) pour 1 h à température ambiante et laissées toute la nuit dans 0,5% de glutaraldéhyde/0.1 M cacodylate de sodium. Le lendemain, elles ont été post-fixées avec 1% d'osmium tetroxide/0.1 M cacodylate de sodium, contrastées pour 1 h à 4°C avec 2% uranylacetate aqueuse, progressivement déshydratées dans l'alcool, incorporées dans l'Epon 812 et sectionnées avec une ultramicrotome de Reichert. Des sections de soixante-quinze nanomètres ont été analysées avec un microscope électronique à transmission Phillips 300. Pour chaque condition, des lamelles ont été ajoutées dans les pétris et utilisées pour confirmer l'efficacité de l'infection par immunofluorescence. La localisation des capsides a été analysée à partir de 10 champs choisis au hasard.

RÉSULTATS

La queue C-terminale de HSV-1 gM est requise pour la localisation de gM au TGN. Afin de déterminer si la queue C-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM est fonctionnelle, nous avons construit deux plasmides qui expriment gM en entier (pCR3-N-HA-UL10) ou sans ses résidus 340-473aa carboxyl terminaux (pCR3-N-HA-UL10 Δ C; Fig.2A). Les deux plasmides ont ensuite été transfectés individuellement et la distribution intracellulaire de gM analysée par immunofluorescence. Lorsqu'entière, gM se localise exclusivement dans une région périnucléaire compactée qui colocalise avec un marqueur du TGN (TGN46), tout comme la version taggée EGFP de HSV-1 gM que nous avons construit dans une étude précédente ([305]) (Fig.2B, panneaux supérieur). De façon intéressante, gM Δ C ne s'accumule pas au TGN mais est plutôt distribuée dans une structure dispersée et tubulaire s'apparentant au réticulum endoplasmique (Fig.2B, panneaux inférieur). Le meme résultat a été obtenu dans deux autres lignées cellulaires HeLa et BHK (données non montrées). Ce résultat suggère que le domaine C-terminal cytoplasmique de gM permet le transport de gM du réticulum endoplasmique vers le TGN.

A



B

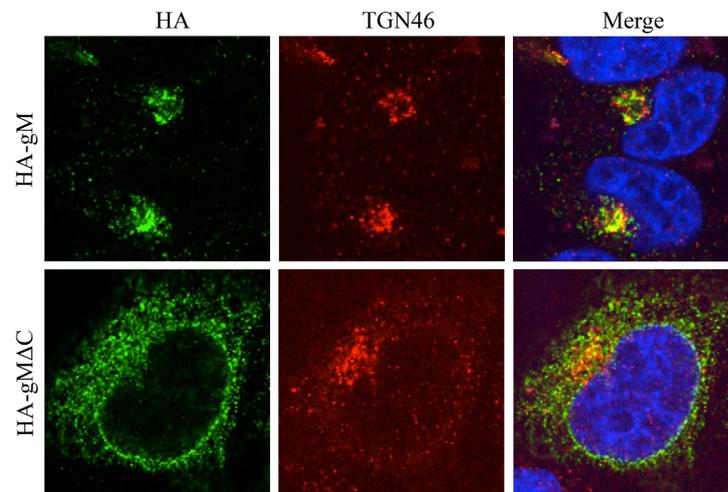


Fig.2 L'effet du domaine C-terminal cytoplasmique de gM sur sa localisation subcellulaire.

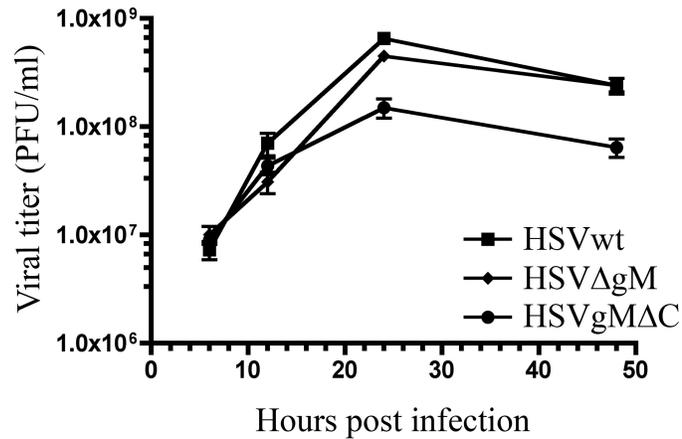
A) Schéma illustrant la topologie membranaire prédite pour HSV-1 gM, ainsi que celle de gM sans son domaine cytoplasmique B) Les plasmides pCR3-N-HA-UL10 et pCR3-N-HA-UL10ΔC, qui exprime la forme sauvage de gM ou gMΔC fusionnée avec le tag HA respectivement, ont été transfectés individuellement dans les cellules 143B. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été fixées, perméabilisées, et marquées en vert avec anticorps anti-HA. Les TGN sont marqués en rouge avec anticorps anti-TGN46 et les noyaux en bleu avec du Hoechst.

La délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM affecte la réplication virale dans les cellules BHK. Etant donné que la délétion de la queue C-terminal cytoplasmique de gM suggère un rôle de ce domaine dans le transport intracellulaire de gM dans le contexte d'une transfection, nous avons par la suite évalué son importance dans le contexte d'une infection. Pour ce faire, nous avons généré un virus mutant (nommé HSVgM Δ C) codant pour gM sans son domaine carboxyl-terminal cytoplasmique (délétion des acides aminés 340 à 473). Nous avons aussi généré un second mutant (nommé HSV Δ gM) dépourvu entièrement de gM afin de distinguer le rôle spécifique de la queue cytoplasmique de gM sur le virus. Ces mutants ont été construits en utilisant le bacmide pHSV-1(17⁺)bluelox par recombinaison homologique tel que décrit précédemment ([305]). Ces mutations ont été confirmées par séquençage, puis les virus recombinants correspondants ont été reconstitués par transfection des bacmids dans des cellules mammifères. La présence de virus mutants infectieux dans le surnageant de ces cellules transfectées est cohérent avec les études précédentes qui rapportent que gM n'est pas essentielle pour la réplication de HSV-1 en culture cellulaire ([234], [244]). Bien que les deux virus mutants se répliquent adéquatement, ils présentent toutefois une cinétique de croissance légèrement retardée par rapport au type sauvage (Fig.3A). Cependant, la quantité finale de virus produite par les cellules BHK infectées par HSV Δ gM est équivalente à celle du virus de type sauvage. Étonnement, le phénotype du virus HSVgM Δ C est nettement plus sévère et produit 5 à 6 fois moins de virus que la souche sauvage à 24 et 48 hpi lorsque propagé dans des BHK. Il est à noter que cette atténuation de production virale n'a pas été observée dans les cellules 143B (Fig.3B), ce qui indique que l'importance de ce domaine cytoplasmique de la gM dépend du type cellulaire.

Rôle du domaine C-terminal cytoplasmique de gM dans la propagation de HSV-1 de cellule à cellule. Afin de confirmer le rôle de la queue cytoplasmique de gM dans la réplication de HSV-1, nous avons examiné la taille des plaques. Comme montré

dans la Fig.4, HSV Δ gM produit des plaques 25% plus petites que les plaques sauvages (HSVwt), ce qui confirme un rôle limité de gM en culture cellulaire. De nouveau, la délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM a un phénotype nettement plus prononcé que la délétion de gM en entier et réduit jusqu'à 50% la taille des plaques. La formation des plaques sur l'agarose est principalement due à la propagation directe des virus de cellule à cellule. Parce que l'agarose limite grandement le mouvement de virus, les nouveaux virions peuvent seulement infecter les cellules contiguës. De ce fait, la taille des plaques représente plus ou moins l'efficacité de la propagation intercellulaire de virus. Par conséquent, le domaine cytoplasmique de gM pourrait être impliqué dans la propagation des particules virales infectieuses aux cellules adjacentes.

A) Cellules BHK



B) Cellules 143B

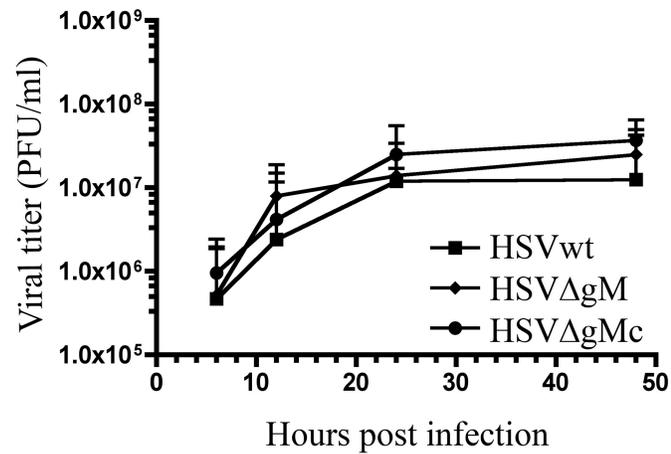
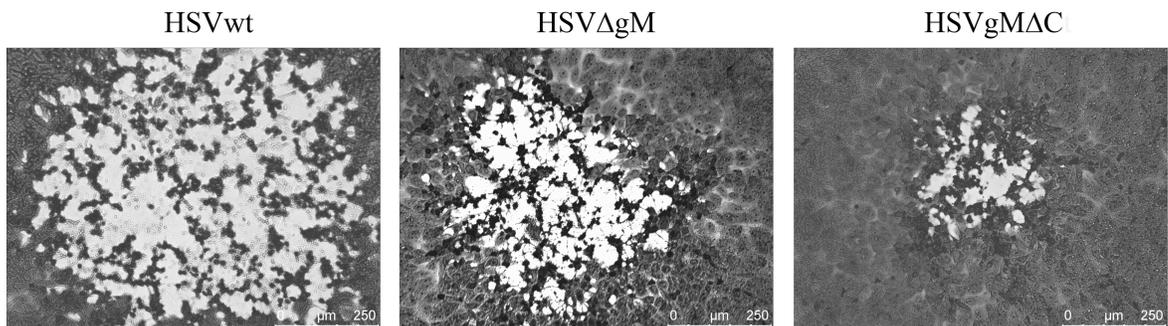


Fig.3 L'analyse de la cinétique de croissance (étape unique) des virus HSV-1 de type sauvage (HSVwt), délété pour gM en entier (HSV Δ gM) ou seulement délété pour la queue carboxyl-terminal de gM (HSVgM Δ C). Des cellules A) BHK ou B) 143B ont été infectées à un MOI de 10. Le surnageant a été récolté à l'heure indiquée et concentré par centrifugation. Les titres de virus infectieux libérés dans le surnageant ont été ensuite déterminés par essai de plaque sur des cellules Véro. Chaque point représente la valeur moyenne des duplicata et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

A



B

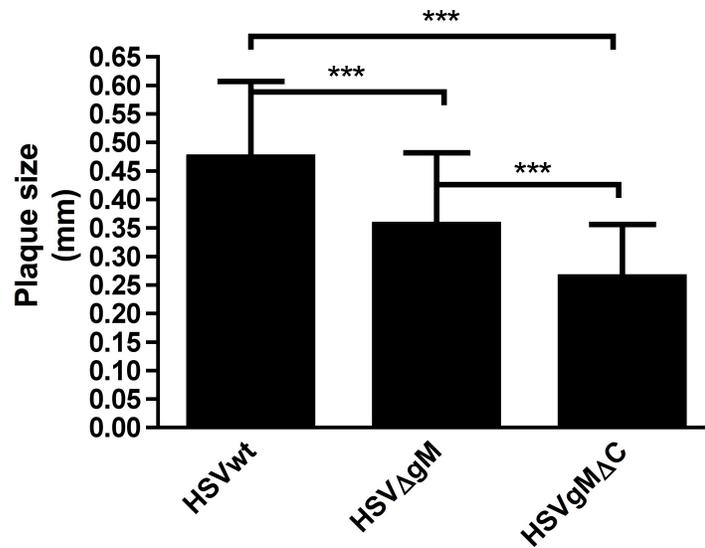
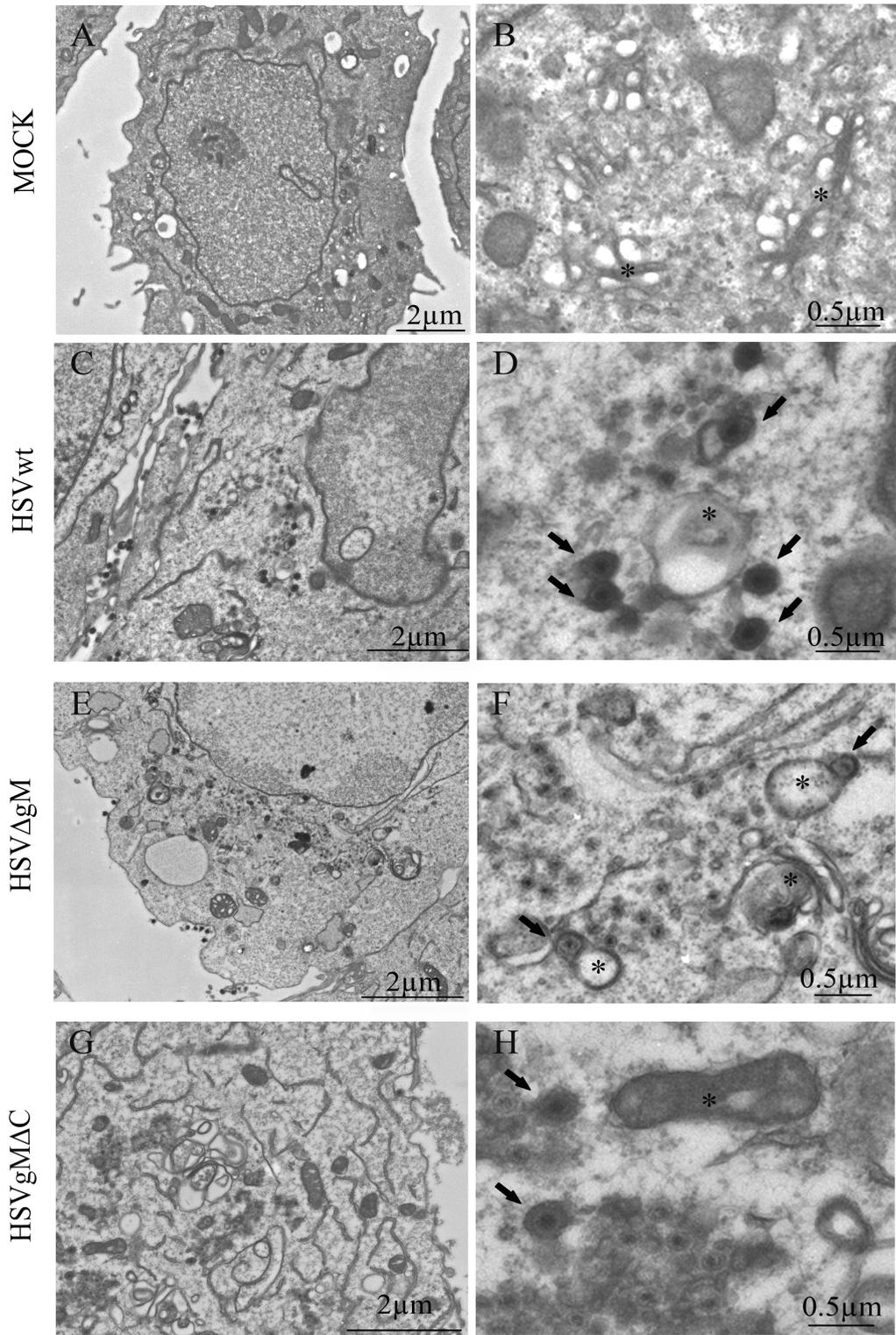


Fig.4 L'effet de la délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM sur la taille des plaques. **A)** Morphologie des plaques formées sur les cellules Véro par les virus de types sauvages et recombinants par microscopie en contraste de phase. **B)** Mesure du diamètre moyen des plaques pour chaque virus. Chaque point représente la moyenne de 100 à 200 plaques. Les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les valeurs de p ont été déterminées au moyen d'un student t-test avec logiciel prism 1.0 (GraphPad)

Analyse par microscopie électronique du rôle du domaine C-terminal cytoplasmique de gM dans l'assemblage et la relâche des virions de HSV-1.

Afin de déterminer plus précisément la ou les étape(s) du cycle de réplication qui pourraient être affectée(s) par la délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM, nous avons effectué des études ultrastructurales. Dans le cas de cellules BHK infectées avec la souche contrôle de type sauvage (HSVwt), des particules virales enveloppées ont facilement été détectées dans le cytoplasme et l'espace extracellulaire, alors que peu des nucléocapsides nues ont été observées dans le cytoplasme (Fig.5C et D). Dans le cas des cellules infectées avec les mutants de gM, beaucoup plus de nucléocapsides nues s'accumulent au cytoplasme et souvent dans la région de l'appareil de Golgi (Fig.5E-H). Pour HSVgM Δ C en particulier, les nucléocapsides cytoplasmiques se trouvent souvent entourées par des petites vésicules membranaires présentes dans de la matière dense aux électrons, présumément de la nature tégumentaire (Fig.5G et H). En dépit de l'accumulation des nucléocapsides cytoplasmiques, l'enveloppement secondaire a toutefois été observé (voir les flèches fermées, Fig.5F et H) pour les deux mutants, quoique avec une fréquence plus faible que pour la souche sauvage. Finalement, contrairement au virus sauvage et au mutant HSV Δ gM, des virions extracellulaires enveloppés ont rarement été détectés dans les cellules infectées avec HSVgM Δ C (Fig.5G). Ces observations ont été confirmées par une analyse quantitative du nombre des capsides avec ou sans enveloppe présents dans le noyau, le cytoplasme ou l'espace extracellulaire (Fig. 5I). Les pourcentages du nombre des capsides dans chaque catégorie par rapport au nombre des capsides totaux par cellule ont été calculés et comparés entre le virus sauvage et les virus mutants. Tel qu'indiqué plus haut, ces phénotypes n'ont pas été observés dans les cellules 143B (données non présentées). Ces observations ultrastructurales sont conformes avec le ralentissement de croissance des virus mutants observés par essai de plaques et les courbes de croissance et suggèrent que le domaine C-terminal cytoplasmique de gM pourrait favoriser l'enveloppement final et la relâche de virions enveloppés, mais que cette fonction dépend du type cellulaire.



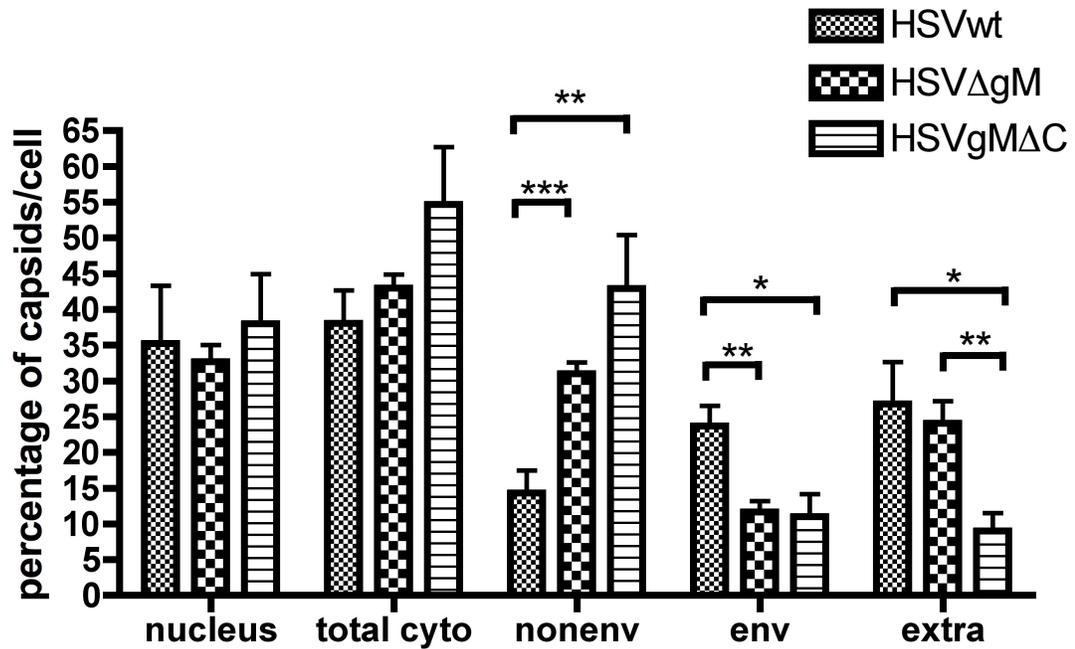


Fig.5 Analyse par microscopie électronique. A-H) Des cellules BHK ont été infectées avec HSVwt, HSVΔgM, HSVgMΔC ou sans virus (MOCK) à un MOI de 1 et analysées 16 heures plus tard. Les panneaux B, D, F, H représentent des images à plus fort grossissement des panneaux A, C, E, G, respectivement. La barre d'échelle est indiquée en bas de chaque panneau. Les flèches fermées représentent les virus enveloppés dans le cytoplasme. Les astérisques représentent l'empilement de saccules de Golgi. I) L'analyse statistique des pourcentages du nombre des capsides nonenveloppés ou enveloppés présents dans le noyau, le cytoplasme ou l'espace extracellulaire par rapport au nombre des capsides totaux par cellule. Pour coordonnée-X, nucleus : capsides nucléaires; total cyto : capsides totaux dans le cytoplasme; nonenv : capsides nonenveloppés dans le cytoplasme; env : capsides enveloppés dans le cytoplasme; extra : virions extracellulaire. Chaque colonne représente la moyenne des 10 cellules. Les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les valeurs de p ont été déterminées au moyen d'un student t-test avec logiciel prism 1.0 (GraphPad).

Criblage des partenaires d'interaction de la portion C-terminale de HSV-1 gM. Les résultats précédents suggèrent l'implication de la queue C-terminale de gM dans le transport et/ou la relâche des nouveaux virions. De plus, nos résultats par transfections indiquent que la portion C-terminale de gM est essentielle pour le transport de gM du ER au TGN. Récemment, une étude des interactions de toutes les protéines virales de HSV-1 avec un système de double-hybride en levure (yeast two-hybrid system) a été rapportée ([264]). Dans cette étude, 111 interactions différentes entre les protéines virales ont été identifiées, dont 20 interagissent avec gM lorsque exprimée entièrement (i.e. acides aminés 1-473). Afin de mieux cibler le rôle de la queue C-terminale de gM, nous avons répété ce criblage en utilisant un fragment qui ne code que pour le domaine C-terminal de gM (acides aminés 340-473) et identifiée 14 partenaires viraux potentiels. Afin de déterminer si un ou plusieurs des partenaires potentiels de la queue C-terminale de gM interagissent *in vivo*, nous avons d'abord examiné s'ils colocalisent avec gM lorsque co-exprimés. Puisque des anticorps ne sont pas disponibles pour toutes ces protéines, nous avons d'abord sous-cloné les 13 candidats (construction de ICP0 non disponible) dans le plasmide pCR3-N-myc qui inclue un tag myc en amont. Ces plasmides ont ensuite été transfectés un à un ou co-transfectés individuellement avec le plasmide pEGFP-gM/CTL, qui lui code pour une version GFP et VSV G taggée de HSV-1 gM. La localisation subcellulaire de ces protéines et de gM a finalement été examinée par immunofluorescence (Fig.6A-M et table 1). Parmi les 13 candidats, UL43, UL56 et Us2 colocalisent partiellement avec gM dans la région du Golgi/TGN (Fig.6G, K, L). Dans les trois cas, ces protéines se localisent au même endroit en l'absence de gM (Fig.6N, O, P), ce qui suggère que leur localisation ne dépend pas de gM. Toutefois, ceci n'exclut pas leur association avec gM dans ce compartiment. Il est à noter que nous n'avons pas observé d'altération de la localisation de gM par aucun de ses partenaires potentiels et gM demeure toujours au TGN lorsque transfectée, un résultat qui nous laisse croire qu'aucun de ces partenaires potentiels de gM n'est responsable de la localisation de gM au TGN tard lors d'une infection ([305], [278]).

Table 1

gM/CT interacteurs issues de Y2H	Localisation lorsque exprimé seule	Localisation lorsque exprimé avec gM	Localisation de gM lorsque co-expression
UL28a*	pancellulaire	pancellulaire	TGN
UL31	nucléoplasme	nucléoplasme	TGN
UL33	cytoplasme	pancellulaire	TGN
UL34	RE	RE	TGN
UL38	nucléoplasme	nucléoplasme	TGN
UL40	pancellulaire	pancellulaire	TGN
UL43	RE, juxtannucleaire	RE, juxtannucleaire	TGN (partiellement imbriqués)
UL49 (VP22)	pancellulaire	pancellulaire	TGN
UL52	pancellulaire	pancellulaire	TGN
UL53 (gK)	RE	RE	TGN
UL56	cytoplasme et ponctuée, Golgi	cytoplasme et ponctuée, Golgi	TGN (partiellement imbriqués)
US2	cytoplasme, Golgi (membrane associée)	cytoplasme, Golgi	TGN (partiellement imbriqués)
ICP4 (RS1)	nucléoplasme, cytoplasme	nucléoplasme, cytoplasme	TGN
ICP0 (RL2)	ND	ND	ND

ND : non déterminées , construction non disponible

* : UL28a se réfère à un fragment de UL28 (1-340aa)

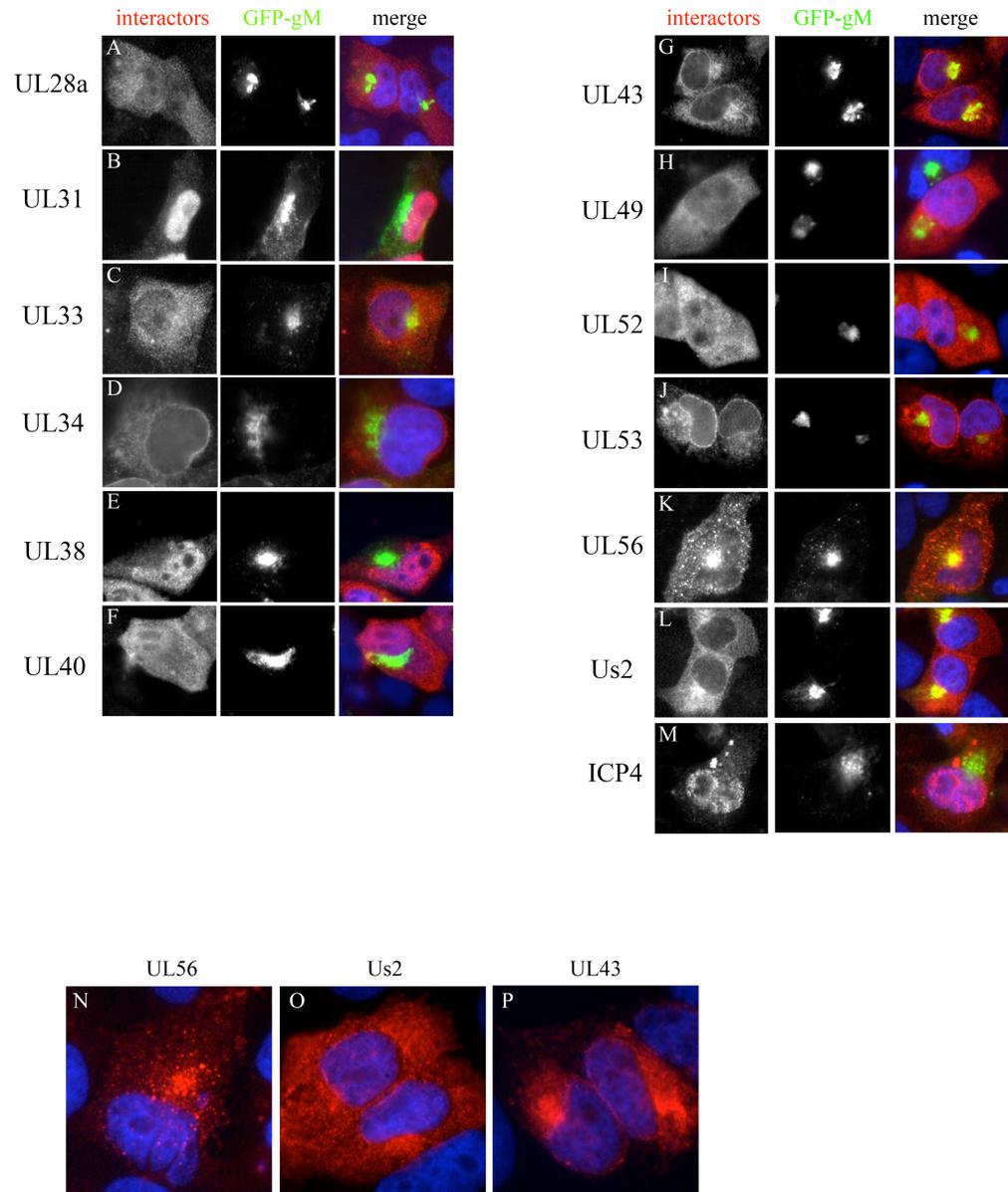


Fig.6 Effet des partenaires viraux potentiels sur la localisation subcellulaire de gM. Les plasmides pCR3-N-myc qui expriment différents partenaires d'interaction viraux potentiels ont été transfectés individuellement (panneaux **N**, **O**, **P**) ou co-transfectés avec le plasmide pEGFP-gM/CTL (panneaux **A-M**) dans les cellules 143B. Après 24h post-transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées et incubées avec des anticorps dirigés contre la protéine myc (rouge) ainsi que du Hoechst (bleu).

Puisque la localisation de gM pourrait dépendre de partenaires additionnels, nous avons ensuite examiné *in vivo* la localisation de gM avec ses partenaires endogènes potentiels dans le contexte d'une infection, i.e. en l'absence de tag myc. Faute d'anticorps pour certains partenaires (Table 2), nous n'avons testé que 8 des 14 partenaires. Deux cinétiques d'infection ont été choisies; d'une part en phase précoce de l'infection (4 hpi) et d'autre part en phase plus tardive de l'infection (10 hpi). Nous avons déjà précédemment démontrée que gM se retrouve exclusivement dans des invaginations de la membrane nucléaire en phase précoce de l'infection (à partir de 4 hpi) ([305]). Si un quelconque partenaire interagit avec gM à ce moment, il devrait se retrouver au même endroit et pourrait être impliqué dans le ciblage nucléaire de gM. Comme illustré dans la figure 7A et résumé dans le table 2, les 8 partenaires peuvent être regroupé en trois catégories à 4hpi : 1) certains partenaires ne sont pas détectables à 4 hpi, par exemple, UL28 et UL38 (données non présentées); 2) les autres partenaires sont détectables mais ne colocalisent pas avec gM dans les invaginations de la membrane nucléaire. Ceux-ci incluent UL31, UL34, et UL49, confirmant une étude précédente ([305], voir l'article I). Par ailleurs, bien qu'ICP4 se trouve au noyau, cette protéine est plutôt dispersée dans le nucléoplasme et ne colocalise pas avec gM (Fig.7A, panneau supérieur); 3) certains partenaires colocalisent partiellement avec gM ou sont adjacents à gM. Il s'agit tout d'abord de ICP0, qui est dispersée dans le nucléoplasme mais agglomérée dans certaines régions où se trouve gM (Fig.7A, panneau au milieu). UL33 se localise dans le cytoplasme mais aussi en foyers dans le noyau (Fig.7A, panneau en bas). Malheureusement, puisque que l'anticorps anti-UL33 de lapin est de même espèce que celui de l'anticorps anti-gM, on ne peut effectuer le double-marquage avec gM. Il reste donc à vérifier si cette localisation nucléaire se chevauche avec gM. À 10 hpi (Fig.7B), lorsque gM est nettement présente à la membrane nucléaire et commence à sortir du noyau pour atteindre le TGN (Fig.7B; panneau supérieur), seulement UL31 et UL34 colocalisent avec gM à la membrane nucléaire parmi les 8 partenaires testés (UL28, UL33, UL38, UL31, UL34, UL49, ICP0, ICP4) (Fig. 7B).

Afin de confirmer l'interaction putative entre gM et ses partenaires potentiels, nous

avons examiné leur co-immunoprécipitation à partir d'un lysat de cellules infectées. Pour ce faire, nous avons utilisé un virus recombinant (HSV-gM/CTL) qui contient un tag VSV G fusionné à l'extrémité C-terminale de gM, puisque nettement plus efficace pour immunoprécipiter gM qu'avec notre présent anticorps contre la protéine (données non montrées). De plus, puisque l'anticorps contre gM provient du lapin et celui contre VSV G de la souris, cela nous évite de détecter les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation, anticorps dont la chaîne lourde migre malencontreusement au même poids moléculaire que gM et la masque. Les cellules ont donc été infectées pendant 16 heures avec le virus mutant ou, comme contrôle, un virus de type sauvage qui ne contient pas de tag VSV G. Cette analyse révèle que l'anticorps contre VSV G immunoprécipite spécifiquement la version taggée de gM mais pas la version sauvage de gM (50 kDa, indiquée par une flèche rouge) ni d'autres protéines à partir de lysats non infectés (Fig. 7C, panneau supérieur). On peut aussi remarquer que le tag VSV G a ralenti la migration de gM exprimée par le virus recombinant, confirmant qu'il est bel et bien fusionné à gM. Deux autres bandes avec une migration plus rapide que gM ont aussi été précipitées. Celle juste au-dessus de gM (environ 55- 60 KDa, indiquée par une flèche noire) se trouve également dans le lysat total et le «flowthrough» de lysat infecté avec HSVwt (i.e. immunoprécipitation non quantitative), lorsque l'immunoblot est exposé plus longuement, correspond probablement à la forme mature de gM. Tel que mentionné dans l'introduction, gM a la particularité de former des agrégats lorsqu'on la fait bouillir ([244]). Tous les échantillons pour l'électrophorèse ont donc été chauffés à 56°C avant d'être déposés sur le gel. La bande au haut du gel (aux environs de 150 kDa, indiquée par flèche blanche) pourrait donc être un complexe qui n'a pas été séparé due à une dénaturation incomplète à 56°C. Ce complexe représente possiblement des oligomères de gM ([306]) ou bien un complexe de gM avec un ou plusieurs de ses partenaires. Pour vérifier cela, nous avons incubé à nouveau la membrane avec les anticorps contre les 8 partenaires. Malheureusement, les anticorps de UL38, ICP0, ICP4 se sont avérés inefficaces pour western blot. Pour les cinq autres molécules, tel que démontré dans la figure 7C et résumé dans le table 2, aucune protéine

testée n'a été immunoprécipitée avec gM, incluant UL31 et UL34 qui colocalisent pourtant avec gM dans la membrane nucléaire à 10 hpi (Fig. 7B), et UL49 qui interagit avec PRV gM ([262]). Il est important de noter que ces protéines testées ont spécifiquement été détectées dans les lysats cellulaires et les « flowthrough » de cellules infectées, indiquant que ces antiséras sont fonctionnels.

Jusqu'à présent, le criblage des partenaires potentiels du C-terminal de gM n'a donc identifié aucun partenaire d'interaction virale de façon définitive. Toutefois, plusieurs protéines se sont avérées fort intéressantes, ce qui inclut UL43, UL56, Us2, ICP0, UL33, UL31, UL34. De plus, ce criblage n'est pas complet puisque certaines protéines de la table 2 n'ont pu être testées puisqu'aucun anticorps n'est présentement disponible.

Table 2

gM/CT interacteurs	IF (4hpi)	IF (10hpi)	IP (16hpi)
UL28	non signal	noyaux, non colocalisation avec gM	non immuno- precipité
UL38	non signal	noyaux et cytoplasme , non colocalisation avec gM	ND ¹
UL33	partiellement imbriqués ou adjacent?	noyaux, non colocalisation avec gM	non immuno- precipité
UL31	non colocalisation avec gM	membrane nucléaire, partiellement imbriqués	non immuno- precipité
UL34	non colocalisation avec gM	membrane nucléaire, partiellement imbriqués	non immuno- precipité
UL49	non colocalisation avec gM	noyaux et cytoplasme, non colocalisation avec gM	non immuno- precipité
ICP4	non colocalisation avec gM	noyaux , non colocalisation avec gM	non immuno- precipité
ICP0	partiellement imbriqués ou adjacent	noyaux , non colocalisation avec gM	non immuno- precipité
UL40	ND ²	ND ²	ND ²
UL43	ND ²	ND ²	ND ²
UL52	ND ²	ND ²	ND ²
UL53	ND ²	ND ²	ND ²
UL56	ND ²	ND ²	ND ²
Us2	ND ¹	ND ¹	ND ¹

ND₁ : anticorps non fonctionnel

ND₂ : anticorps non disponible

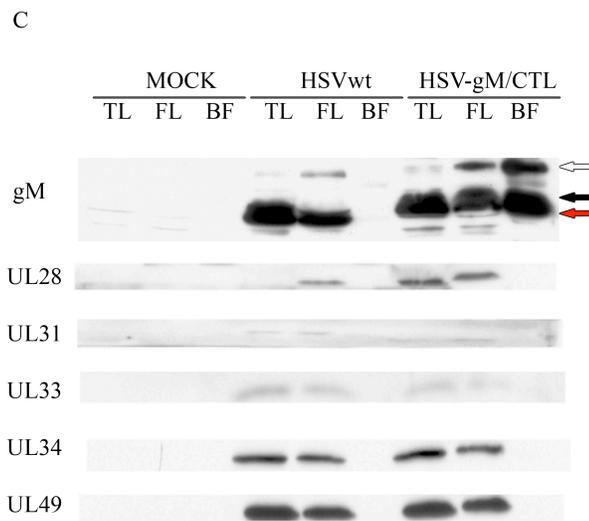
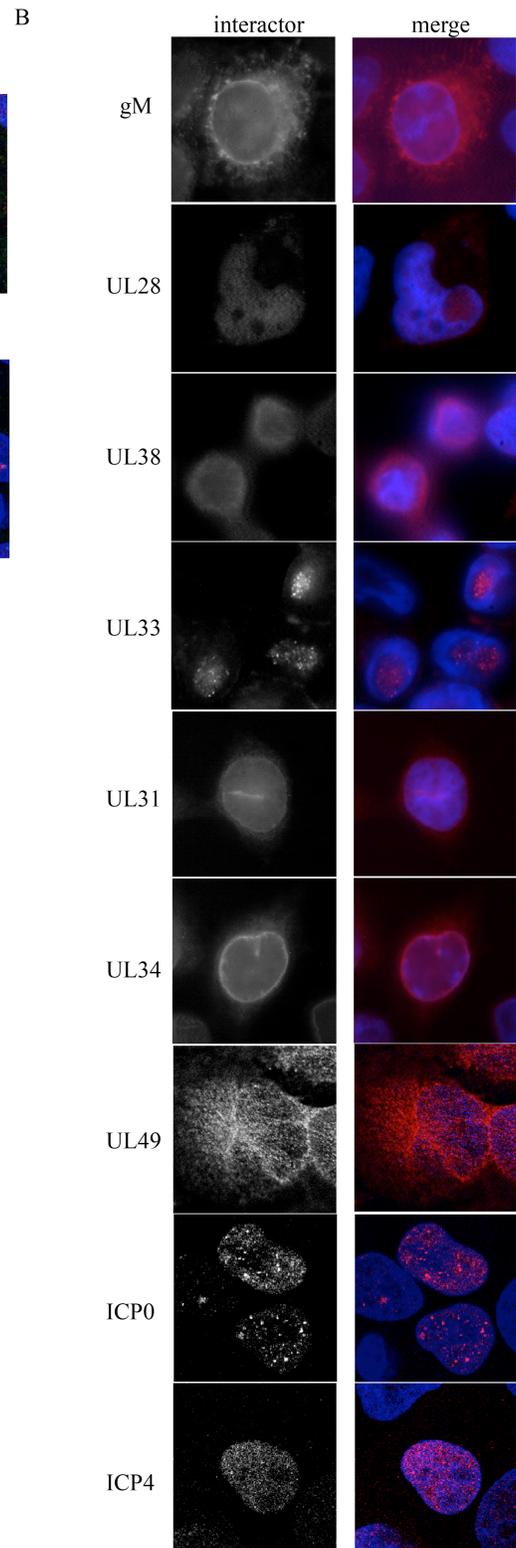
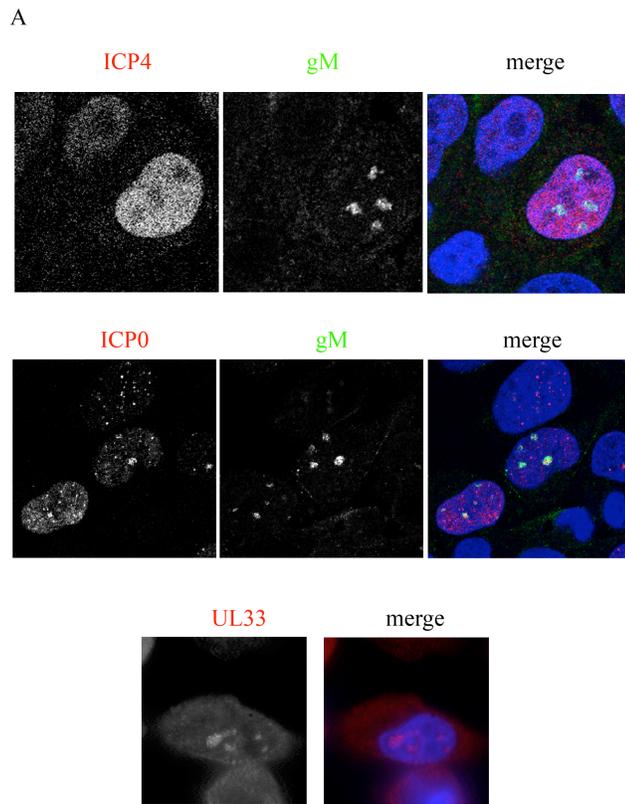


Fig.7 Localisation intracellulaire de gM et ses partenaires d'interaction viraux potentiels dans le contexte d'une infection. La localisation des partenaires potentiels (A) en phase précoce de l'infection (4 hpi) et (B) en phase tardive de l'infection (10 hpi). Des cellules 143B ont été infectées avec la souche sauvage de HSV-1 (HSVwt) à différents moments, ensuite fixées et marquées avec les anticorps spécifiques contre les différents partenaires potentiels (l'anticorps de souris anti-ICP₀ et ICP₄, les autres de l'espèce lapin, en rouge,) et l'anticorps monoclonal de lapin anti-gM PAS980 (en vert). C) Coimmunoprécipitation de gM taggée avec VSV G et ses partenaires potentiels. Des cellules 143B ont été infectées ou non par HSV-1 wt ou HSV-1 gM/CTL dont le C-terminal de la gM est fusionné avec un tag VSV G. Après 16h post-infection, les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-VSV G. Les immunoprécipitats ont ensuite été séparés par électrophorèse et analysés par immunoblot avec les différents anticorps contre gM ou ses partenaires potentiels. TL, total lysat; FL, flowthrough; BF, bound fraction.

DISCUSSION

Nous avons démontré ici que le domaine C-terminal cytoplasmique de HSV-1 gM est essentiel pour son transport du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi dans le contexte d'une transfection (Fig.2). Ainsi, la délétion des résidus 340 à 473 aa de domaine C-terminal cytoplasmique HSV-1 gM bloque presque complètement son transport vers le Golgi. Il n'y a pas de signaux classiques de type KDEL ou KKXX pour la rétention RE ou pour la localisation nucléaire (NLS) au sein du domaine cytoplasmique de gM (observation personnelle). D'autres signaux non classiques pourraient donc être engagés dans la rétention de gM au RE ou son ciblage nucléaire. Une caractéristique intéressante du domaine C-terminal de HSV-1 gM est la présence des motifs à base de tyrosine YXXØ (YDEV aa 423-426, YAKI aa 435-438, YDTV aa 451-454, YSTV aa 467-470), analogues à la séquence YTDIE qui se trouve dans le domaine cytoplasmique de la protéine G du virus stomatite vésiculaire (VSV G), un signal de transport connu pour le transport du ER au Golgi ([307]). Un tel motif a d'ailleurs été démontré comme jouant un rôle dans le transport du ER au Golgi de la glycoprotéine B de HSV-1 ([296]). Par rapport à ses homologues, HSV-1 gM contient plusieurs motifs YXXØ dans son domaine C-terminal. L'existence de ces motifs exclusifs pourrait expliquer la localisation de gM au TGN lorsque exprimée tout seule, contrairement aux autres homologues qui nécessitent la formation d'un complexe avec la glycoprotéine gN pour atteindre ce compartiment. Malheureusement, le mécanisme par lequel le motif YXXØ dirige l'export de protéines du RE n'est pas bien compris. Une des possibilités est que le motif sert de site d'interaction pour des protéines cellulaires qui ainsi masquent un signal de rétention RE non classique, comme par exemple, le motif riche en arginine. Il est également possible que le motif (en combinaison avec les acides aminés acidiques) puisse activement promouvoir le transport de gM du RE au Golgi en établissant une interaction avec des éléments du manteau COPII ([296]). Evidemment, les autres motifs comme le motif riche en arginine et le cluster

acidique pourraient aussi être impliqués dans le transport intracellulaire de gM et ainsi jouer un rôle pendant l'infection. Afin de déterminer si ces signaux de trafic intracellulaire sont fonctionnels sans la délétion complète du domaine C-terminal cytoplasmique, la mutagenèse individuelle de ces signaux dans la queue cytoplasmique de gM est requise.

Outre l'apport de mécanisme de rétention au réticulum ou de transport actif hors de ce compartiment, nous ne pouvons exclure que la délétion de la queue carboxyl terminal entraîne simplement un changement de conformation de gM dans la lumière de RE, causant ainsi la rétention de gM dans le RE via une interaction avec les protéines chaperonnes. Il a d'ailleurs été rapporté que des mutations au sein du domaine transmembranaire de gB de HCMV provoquent sa rétention dans le RE en permettant la liaison de certaines chaperonnes ([308]). Pour le tester, il faudra analyser la stabilité de gM sans son domaine C-terminal cytoplasmique. La mutagenèse des divers motifs présents dans gM sera aussi nécessaire pour mieux comprendre son transport intracellulaire. Ces travaux sont présentement en cours.

L'importance du domaine cytoplasmique de gM durant le cycle de réplication de HSV-1 a été examinée dans la présente étude par essais de plaques et microscopie électronique. Nous avons démontré une réduction légère de production virale des cellules infectées avec les virus recombinants contenant une délétion du domaine C-terminal cytoplasmique dans gM (Fig.3). Ce résultat est conforme avec ceux d'autres équipes qui ont démontré que gM n'est pas essentielle pour la réplication virale de HSV-1 en culture de tissus mais que la délétion de gM diminue la production virale de façon modérée ([234], [244], [271]). La production virale réduite pourrait être expliquée par un défaut dans une ou plusieurs étape(s) de la réplication virale. D'après les résultats de nos études ultrastructurales (Fig.5), les nucléocapsides semblent être assemblées et sortir normalement du noyau sans difficulté, ce qui suggère que les virus ont réussi à entrer dans les cellules, à déclencher la réplication de l'ADN viral, la transcription et la traduction de ses protéines, et ont réussi à s'assembler au noyau avant de migrer au cytoplasme. Toutefois, pour en être plus sûre, il faudra déterminer quantitativement le taux de pénétration viral et la quantité

d'ADN répliqué lors de l'infection.

Les deux dernières étapes du cycle viral semblent être affectées. Ainsi, dans les cellules infectées avec les mutant HSVgM Δ C, une accumulation des nucléocapsides nonenveloppées dans le cytoplasme et une diminution du nombre des nucléocapsides enveloppées a été observée (Fig.5), ce qui suggère un défaut dans l'enveloppement cytoplasmique, et que gM joue un rôle durant cette étape. Toutefois, ces phénotypes semblent variés selon le type de cellules, suggérant l'implication possible de facteurs cellulaires dans ce processus. Dans la littérature, un phénotype similaire encore plus prononcé a été observé pour un triple mutant de PRV délété des glycoprotéines gM, gE et gI ([1]) ainsi que pour un double mutant de HSV-1 qui n'exprime pas gM et la protéine tégumentaire UL11 ([99]). Dans ces études, des nucléocapsides enveloppées ont rarement été observées dans le cytoplasme, ce qui indique des limitations additionnelles ou une synergie par rapport à la simple délétion de gM. Cela pourrait aussi mettre en évidence une possible redondance fonctionnelle de gM avec d'autres protéines virales lors de l'enveloppement final des capsides au TGN. L'absence de virions enveloppés extracellulaires avec HSVgM Δ C peut être dûe d'une part à la diminution du nombre de virions enveloppés intracellulaires, d'autre part à la relâche moins importante de ces virions du site d'enveloppement jusqu'à la membrane plasmique.

Il est intrigant de constater que la délétion de gM en entier produise un phénotype moins prononcé que la seule délétion du domaine C-terminal cytoplasmique de gM (Fig.3, 4, 5). Deux explications viennent à l'esprit. La première est que la délétion de gM ne soit pas « tight », i.e. qu'un peu de gM serait synthétisée malgré la mutation. Ceci est techniquement possible puisque ce mutant a été généré par l'addition d'un codon stop unique après le second acide aminé de gM, alors que le reste de la séquence demeure présente. Cette approche a été sélectionnée puisque le gène de gM couvre partiellement UL9, un gène essentiel au virus. Il serait donc opportun de déléter entièrement gM du virus pour voir si cela résulterait en une diminution plus importante de la production des virus. La seconde explication est que la mutation dans le virus HSVgM Δ C est dominante, i.e.

qu'en se liant aux partenaires de gM elle prévient leur fonctionnement. Pour vérifier ceci, il faudrait surexprimer gM Δ C pendant une infection et voir quel phénotype on obtient. Nous croyons toutefois que le premier scénario est le plus probable puisque l'absence complète de gM dans une autre étude conduit à un phénotype similaire à celui de la délétion du domaine cytoplasmique de gM dans la présente étude ([99]). Ceci nous permet donc de présumer que le domaine C-terminal cytoplasmique de gM constitue la domaine fonctionnelle essentiel de gM dans son rôle de la morphogénèse des virions et la propagation intercellulaire.

Le mécanisme d'action du domaine C-terminal cytoplasmique de gM dans la production des virus HSV-1 demeure imprécis. Toutefois, l'ablation de signaux de trafic intracellulaire, des motifs à base de tyrosine YXX Φ et des acides aminés acides entraîne la rétention de gM au RE dans le contexte d'une transfection. Durant l'infection, ceci signifierait que gM Δ C est probablement absente au site d'enveloppement. À cet endroit, gM pourrait normalement médier l'enveloppement final des nucléocapsides tégmentés en faisant le pont entre le TGN et les protéines du tégment présentes sur les capsides cytoplasmiques ([181], [180]). Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer la localisation de gM dans le mutant HSVgM Δ C puisque l'anticorps anti-gM utilisé au laboratoire est dirigé contre la portion C-terminale de la protéine, qui est absente dans ce virus. Il nous faudra générer un nouveau virus recombinant contenant un tag fusionné à gM ou alors de nouveaux anticorps.

L'impact des motifs sur la localisation de gM pourrait avoir d'autres impacts durant le cycle de vie de HSV-1. Par exemple, HSV-1 pourrait usurper la machinerie d'endocytose pour livrer certaines protéines requises au site d'enveloppement. À cet effet, il a été rapporté que gM est capable de promouvoir l'internalisation des plusieurs autres protéines de l'enveloppe virale, incluant gD, gH et gL, des glycoprotéines qui ne sont pas reconnues former des complexes avec gM ([261]). D'autre part, les motifs YXX Φ pourraient effectuer une fonction similaire que pour gE en ciblant des protéines virales et les particules virales aux jonctions cellulaires afin de promouvoir la propagation des virus de cellule à cellule.

Ceci est conforme avec notre observation que la propagation intercellulaire a été inhibée lorsque le domaine cytoplasmique de gM a été délété (Fig.4).

De plus en plus des données expérimentales mettent en évidence des interactions de gM avec d'autres protéines virales durant l'infection. Dans la présente étude, nous avons identifié et testé 14 interactions potentielles de HSV-1 gM avec des protéines virales en utilisant le fragment cytosolique C-terminal de la protéine. Il est fort possible que d'autres interactions existent mais n'aient pas été détectées par le système de double hybride. Ce manque de détection inclue l'auto-activation des protéines et l'absence d'expression des protéines dans les levures, des problèmes communs du système du double-hybride. De plus, l'expression unique de la queue cytoplasmique de gM ne peut pas détecter les interactions qui dépendent de l'oligomérisation de gM via ses domaines transmembranaires ou autres domaines. La protéine UL49A (gN) est un bon exemple, parce qu'elle interagit avec l'extrémité amino-terminale de gM et par conséquent, n'est pas présente dans notre liste. Le second point est la spécificité du double hybride avec un taux parfois élevé de faux positifs. Dans la plupart des 14 protéines détectées dans le présent criblage, aucune interaction n'a été confirmée par immunofluorescence ou co-immunoprécipitation. Naturellement, ces interactions pourraient n'être que transitoires. Pour UL40, UL52, ou UL53, UL43, UL56, Us2, il n'a pas été possible de tester l'interaction de gM avec ces protéines endogènes pendant une infection, faute d'anticorps. Malgré ces limitations, UL43, UL56, Us2 colocalisent partiellement avec gM lorsque co-transfectées et constituent donc des candidats fort intéressants. (Fig. 6G, K, L). De plus, UL31 et UL34 (Fig. 7B) colocalisent aussi avec gM à 10hpi, mais cette interaction n'a pas été confirmée par immunoprécipitation, ce qui pourrait refléter une interaction transitoire. Finalement, ICPo et UL33 colocalisent partiellement avec gM en phase précoce de l'infection, malheureusement, le faible niveau d'expression de gM à ce moment ([305]) nous empêche de confirmer ces résultats par immunoprécipitation. D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre la nature de ces interactions et leur implication pour le virus. Toutefois, la présente étude démontre que gM interagit potentiellement avec beaucoup

plus de partenaires que précédemment envisagés.

CHAPITRE III:

Discussion

DISCUSSION

1. Spécificité et mécanisme du ciblage nucléaire de HSV-1 gM

Le premier article traite de la caractérisation du mécanisme du ciblage nucléaire de HSV-1 gM. gM se retrouve au noyau très tôt pendant l'infection, i.e. bien avant la réorganisation du TGN (Fig.4, Article I) qui a lieu plus tard lors de l'infection. Cette localisation ne peut donc être une conséquence passive de la redistribution du TGN induite par HSV-1. Par ailleurs, la portion nucléaire de HSV-1 gM ne transite pas par la voie de sécrétion à ce stade de l'infection (Fig.6, Article I). Par conséquent, elle est donc redirigée vers la membrane nucléaire immédiatement après sa synthèse au réticulum endoplasmique. Ce phénotype nécessite l'expression d'au moins une autre protéine virale, puisque la seule transfection de gM ne cause pas la localisation de gM dans le noyau.

Le ciblage nucléaire de gM est un mécanisme rapide, actif et spécifique. Malheureusement, la localisation nucléaire de gM ne dépend pas des partenaires d'interaction testés jusqu'à présent. Aucune protéine partenaire transfectée dans les cellules exprimées gM n'a altéré la localisation de gM vers le noyau. De plus, à 4 hpi pendant une infection, les partenaires, par exemple gN qui forme un complexe avec gM de plusieurs virus herpès ([252], [255], [256], [240], [241], [257], [258]); gD et gH qui sont pourtant redistribués de la membrane plasmique au TGN par gM ([261]); VP22(UL49) qui interagit avec la queue C-terminale cytoplasmique de PRV gM ([262]), ne colocalisent pas avec gM au noyau (Fig. 9, Article I). De plus, UL31 et UL34, précédemment impliqués dans la localisation de gM plus tard dans l'infection ([263]), et qui colocalisent partiellement avec gM au noyau à 10 hpi (Fig.7B, Article II) ne sont pas présentes aux sites nucléaires marquées par gM à 4 hpi. ICP0 et UL33 semble être colocalisée partiellement avec gM à ce moment, malheureusement leur interaction avec gM n'a pas pu être confirmée par immunoprécipitation, et nécessite ainsi des études supplémentaires. Il reste également

quelques molécules à tester, pour lesquels des anticorps doivent d'abord être générés. Naturellement, l'implication des protéines cellulaires ne peut pas être exclue et est fort possible. Finalement, il est possible que des protéines cellulaires soient modifiées par le virus ou qu'elles coopèrent avec les protéines virales afin de médier le ciblage nucléaire de gM.

2. Rôle potentiel de HSV-1 gM dans le noyau

Le rôle de HSV-1 gM au noyau demeure un mystère. Elle y joue probablement un rôle complètement différent de sa fonction au site de réenveloppement (voir plus bas). Bien que les travaux de Leege et ses collègues suggèrent que la suppression de gM n'a pas d'impact sur la sortie nucléaire de PRV et HSV-1 ([99]), la possibilité d'un mécanisme de compensation ne peut être exclut si on considère la redondance fonctionnelle fréquemment observée chez les virus herpes. De plus, la présence de gM sur la membrane nucléaire est peu probablement simplement au hasard. Ce constat est corroboré par le fait que de nombreuses protéines d'interactions virales de gM se trouvent dans le noyau, y compris ICP0, ICP4, les protéines de l'emballage UL33, et la polymérase UL30, ainsi que UL31, UL34 ([188], [263]). Au noyau, gM pourrait démarquer un site de sortie nucléaire où gM assumerait un rôle d'échafaudage. Deuxièmement, gM pourrait induire ou entretenir des invaginations nucléaires dans un effort pour réduire la distance totale entre le site de réplication intracellulaire et le cytoplasme. Il est à noter que ces invaginations nucléaires sont détectables dans les cellules 143B, HeLa et les cellules NRK (cette étude et des données non présentées). En outre, les invaginations nucléaires ne sont pas spécifiques aux cellules infectées mais ont également été signalés dans les cellules normales non infectées ([309], [310]). Troisièmement, puisque gM module les activités syncytiales de gB, gD, et gH ([273], [257], [272]), qui sont éventuellement aussi présentes sur les membranes nucléaires ([97], [311], [145], [312]), gM pourrait empêcher la fusion incontrôlée entre la membrane nucléaire interne et externe. Le recrutement de gM dans le noyau avant ces autres glycoprotéines est compatible avec cette hypothèse. Finalement, gM peut moduler

de façon positive la fusion des virions HSV-1 périnucléaires avec la membrane nucléaire externe. Bien entendu, gM pourrait avoir d'autres fonctions insoupçonnées à la membrane nucléaire.

3. Rôle de HSV-1 gM dans l'enveloppement final et la propagation intercellulaire du virus

HSV-1 gM est l'une des cinq glycoprotéines conservée dans toute la famille de *Herpesviridae*. Ceci signifie qu'elle existe depuis plus de 200 millions années sur le plan évolutif, ce qui suggère que des contraintes fonctionnelles l'ont empêché de disparaître au cours de l'évolution et que, par conséquent, elle doit jouer un rôle essentiel dans la biologie des virus herpès. Curieusement, elle n'est pas essentielle pour la réplication virale en culture cellulaire. Par suite, bien qu'elle ait suscité l'intérêt de nombreux chercheurs depuis 20 ans, son rôle précis demeure toujours obscur. Ce n'est que récemment des chercheurs ont évoqué un rôle possible pour gM dans l'enveloppement final pendant la réplication virale en culture cellulaire. Les résultats présentés dans l'article II de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles preuves à l'appui de cette hypothèse, puisque la délétion du domaine carboxyl-terminal de HSV-1 gM a entraînée une accumulation des capsides nonenveloppées dans le cytoplasme. Par ailleurs, la même mutation a causé également une diminution de la taille de plaque, ce qui laisse croire un rôle possible de gM dans la propagation des virus d'une cellule à l'autre.

Le fait que des protéines non essentielles (i.e. protéines accessoires) remplissent néanmoins un rôle important dans la réplication virale n'est pas surprenant. D'une part, ces protéines sont souvent requises dans leur hôte naturel. En fait, aucun HSV mutant dépourvu d'un gène accessoire n'a été isolé chez les humains à ce jour. De plus, l'atténuation du virus HSV-1 Δ gM a effectivement été observée chez l'animal ([265]). D'autre part, l'absence d'essentialité de HSV-1 gM peut être expliquée par un mécanisme d'une redondance partielle avec d'autres protéines virales gE ou UL11, ([1], [98], [99]) et/ou une dépendance du type cellulaire (présente étude). Ceux-ci ont révélé la possibilité que gM ne

soit capable de remplir son rôle que dans des cellules spécialisées en coopérant avec certains facteurs cellulaires, rôle que des protéines virales pourraient assumer dans certains types de cellules. Fait intéressant, les effets inhibiteurs des mutants de gM sur l'assemblage et la relâche des virions étaient nettement plus évidents dans les cellules BHK que dans les cellules 143B. Cette dépendance du type cellulaire a également été observée par d'autres auteurs qui ont démontré que la gravité des défauts de croissance (i.e. la production virale et la taille de plaque) causée par la délétion de gM est plus sévère dans les cellules RK13 que dans les cellules Véro ([99]).

Le concept de redondance n'est pas unique à HSV-1 gM. Par exemple, les glycoprotéines non essentielles PRV gI et gE se sont avérées être indispensables pour la propagation du virus dans les cellules neuronales ([313]), et la protéine membranaire HSV UL20 est nécessaire pour l'assemblage du virus dans les cellules Véro, mais pas dans d'autres cellules ([314]). D'ailleurs, la redondance et la dépendance du type cellulaire de gM pourraient également se traduire par le fait que HSV-1 possède une large gamme d'hôtes *in vitro* et *in vivo*, capables d'infecter une grande variété de types cellulaires d'origine humaine ou animale, et expliquer la nécessité de conserver certaines fonctions. Le fait qu'une accumulation de capsides nonenveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées par des mutant HSV-1 Δ gM n'aie pas été observé auparavant pourrait donc être causé par des différents types cellulaires utilisés ([271]). Toute étude ultérieure concernant HSV-1 gM devrait donc être prudente quant au choix du type cellulaire. Evidemment, l'un des aspects les plus intéressants serait d'identifier les facteurs cellulaires qui coopèrent avec gM. Il est fort probable que gM favorise l'enveloppement final et la propagation intercellulaire, en exploitant le trafic intracellulaire. Ceci permettrait de mettre en lumière une nouvelle interaction entre le virus HSV-1 et la cellule hôte.

4. Importance du domaine carboxyle-terminal de HSV-1 gM et son implication dans le cycle de réplication viral.

Les données dans l'article II portant sur l'évaluation du domaine carboxyl-terminal de HSV-1 gM est un indice démontrant que ce domaine est un déterminant important pour la fonction de HSV-1 gM dans le cycle de réplication virale. La délétion de ce domaine a causé un défaut dans l'enveloppement final des nucléocapsides et la propagation du virus de cellule à cellule (Fig. 3, 4, 5, Article II). Le fait que la délétion de ce domaine ait compromis complètement le transport de gM du RE au Golgi (Fig. 2, Article II) tend à suggérer l'implication des motifs de transport intracellulaire à base de tyrosine YXXØ.

Le domaine cytoplasmique de HSV-1 gM est particulier. Il est le plus long parmi ses homologues des autres virus herpès et contient 4 motifs distincts à base tyrosine YXXØ (YDEV, YAKI, YDTV, YSTV) (Fig. 1, Article II). En plus d'agir sur l'exportation du RE, les motifs YXXØ sont impliqués également dans d'autres événements cellulaires, par exemple, l'endocytose et le ciblage basolatéral. Quels rôles jouent-ils pour HSV-1 gM? Leurs fonctions semblent dépendre en partie des acides aminés précis à la position X dans le motif, des acides aminés qui flanquent le motif et la localisation de la protéine dans la cellule ([284]). Il est donc plausible d'attribuer des fonctions distinctes à ces quatre motifs. Ce principe a été déjà démontré pour HSV-1 gB dans laquelle YTQV sert de motif d'endocytose, alors que YMAL sert de motif qui dirige l'exportation de gB du RE ([289], [296]). Ces motifs pourraient donc d'abord coordonner la localisation de gM qui varie tout au long de l'infection. Subséquemment, ces motifs pourraient directement ou indirectement altérer la fonction de gM, par exemple en favorisant certaines interactions spécifiques avec certaines protéines virales ou cellulaires. HSV-1 pourrait usurper la machinerie d'endocytose pour livrer les protéines requises au site d'enveloppement, ou cibler des protéines virales et les particules virales aux jonctions cellulaires afin de favoriser la propagation des virus de cellule à cellule.

Les motifs YXXØ accomplissent leurs tâches en recrutant des protéines cellulaires cytoplasmiques. Pour les motifs d'endocytose, ils interagissent avec le complexe d'adaptateur AP-2 qui s'associe avec les clathrines. Tel que mentionné précédemment, parmi les motifs YXXØ identifiés dans les protéines de l'enveloppe de virus herpès, il a été prouvé que seul

le motif YQRL présent dans PRV gB interagit avec AP-2 ([292]). Récemment, Krzyzaniak et ses collègues ([315]) ont identifié FIP4, une protéine effectrice de la GTPase Rab11, qui interagit avec le domaine cytoplasmique de HCMV gM et favorise sa localisation au compartiment d'assemblage. Pour le moment, nous ne savons pas si HSV-1 gM interagit également avec certaines protéines cellulaires.

PERSPECTIVES

1. Mécanisme du ciblage nucléaire de HSV-1 gM

Dans les cellules transfectées, gM se trouve au TGN ([261]) et à la membrane plasmique, mais suite à l'infection, gM est redirigée vers le noyau ([305], [278]). Cela suggère fortement l'implication d'une (des) composante (s) virale (s) dans le ciblage nucléaire de gM. La localisation nucléaire de gM en phase précoce de l'infection pourrait suggérer que ce sont les protéines virales exprimées en premier qui sont impliquées. Toutefois, des protéines virales incorporées dans les virions entrants peuvent également agir après l'entrée du virus ([54]). Il n'est donc pas possible de les exclure. Tout d'abord, il est possible d'exploiter le fait que les protéines d'HSV-1 soient exprimées avec différentes cinétiques. Nous pourrions ainsi examiner la localisation de gM en synchronisant l'expression des protéines durant l'infection par des drogues. Par exemple, pour permettre seulement la production des protéines précoces immédiates, nous pourrions accumuler les ARNm des protéines précoces immédiates (avec cycloheximide qui inhibe la synthèse des protéines) puis relâcher ce bloc en présence de l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. L'acide phosphonoacétique, un inhibiteur qui empêche la réplication de HSV-1 et permet à la fois l'expression des protéines précoces et précoces immédiates ([316], [317]) serait une autre option. En second lieu, nous allons continuer le criblage des partenaires potentiels de gM basé sur les résultats de double-hybride. Bien que nous n'ayons à présent trouvé aucun partenaire qui colocalise avec gM à la membrane nucléaire en phase précoce de l'infection, il nous reste à tester plusieurs autres protéines qui interagissent avec la glycoprotéine gM en entier avec le système de double-hybride (UL26.5, UL27, UL30, UL35, UL36, UL46, UL49A, UL50, Us8a; [264], [188], [91]). Ceci implique: 1) l'évaluation de leur localisation respective à différents moments durant l'infection (confocal, immuno-EM); 2) des expériences de sauvetage dans lesquelles les candidats vont être co-exprimés dans des cellules transfectées avec une construction GFP-gM afin de déterminer si l'une de ces

protéines cause la redistribution de gM du TGN vers la membrane nucléaire et 3) la co-immunoprécipitation à partir de la fraction nucléaire de cellules infectées pour confirmer l'interaction physique de gM dans ce compartiment. Le cas échéant, les protéines virales qui co-localisent et/ou affectent la localisation de la gM seront déplétées lors d'une infection par ARNi et des mutants de délétion seront construits pour confirmer les résultats.

2. Rôle de l'importin-alpha cellulaire sur la localisation nucléaire de HSV-1 gM

Même si des protéines virales participent activement au ciblage nucléaire de HSV-1 gM, nous ne pourrions toujours pas exclure la contribution de protéines cellulaires dans ce processus. La glycoprotéine gM se trouve dans la membrane nucléaire au tout début de l'infection et de nouveau tard durant l'infection (réorganisation du TGN au noyau (article I et [278]). Jusqu'à présent, très peu de protéines ont été documentées au INM ([318]). Dans le passé, le dogme voulait que l'importation de protéines à la membrane nucléaire interne (INM) se produise par diffusion passive à partir du réticulum endoplasmique et la membrane externe nucléaire (ONM). Les protéines seraient alors maintenues en place par des interactions avec les composants de la matrice nucléaire ou des chromosomes ([318], [319]). Toutefois, le pore nucléaire constitue un obstacle physique majeur entre l'INM et l'ONM et un mécanisme du transport actif a récemment été dévoilé ([320]).

Braunagel et ses collègues ([321]) ont identifié un motif INM (INM-SM) composé de 18 acides aminés hydrophobes et 4-8 résidus d'acides aminés chargés en aval. Ce motif interagit avec l'importine - α 16 dans la levure (ou KPNA4 chez l'homme), qui reste associée à sa cargaison sur les INM ([225], [322], [323]). Cependant, les détails moléculaires de cette machinerie restent à définir. Dans les cellules infectées avec des baculovirus, importine - α 16 a même été recrutée dans les occlusions de la membrane intranucléaire induites par le virus. Il est intéressant de savoir que HSV-1 induit aussi le remodelage de l'INM dans les cellules infectées (Article I et [305]). En outre, une analyse de la séquence de HSV-1 gM indique un motif INM-SM putatif situé près de son extrémité carboxyle (observations non publiées). Compte-tenu de ces faits, il serait logique d'examiner si importine - α pourrait médier le

ciblage nucléaire de HSV-1 gM. Pour ce faire, la localisation de divers importines - α humaines, incluant KPNA4, sera suivie par confocal pour voir si celles-ci colocalisent avec gM au noyau. Deuxièmement, la co-immunoprecipitation de KPNA4 et gM sera effectuée pour voir si elles forment un complexe. Troisièmement, KPNA4 sera depletée par ARN d'interférence pour voir si cela perturbe la localisation nucléaire de gM en phase précoce de l'infection et/ou le cycle de réplication virale (immunofluorescence, EM et essai de plaque). Si pertinent, le motif INM-SM putatif de gM sera muté et introduit dans le virus par technologie de BACmid que nous avons utilisé auparavant au laboratoire et la localisation de gM sera suivie par immunofluorescence. Il est à noter que toutes les expériences décrites ci-dessous devront être faites durant une infection, puisque gM exprimée seule ne se localise pas au noyau. Tel que mentionnée plus haut, il est fort probable que la localisation nucléaire de gM résulte d'une coopération entre protéines virales et cellulaires. Cette notion a été démontrée pour une autre protéine d'enveloppe virale ODV-E66 de baculovirus dont le trafic à la membrane nucléaire est facilité par son motif INM-SM ainsi que par d'autres protéines virales ([321]).

3. Rôle de HSV-1 gM au noyau

L'objectif ultime de ce projet est d'élucider le rôle de gM, particulièrement au niveau du noyau. L'identification des partenaires d'interaction virales et/ou cellulaires de gM nucléaire pourrait expliquer à la fois sa localisation mais aussi sa fonction à la membrane nucléaire. Sa présence dans ce compartiment ne résulte probablement pas du hasard. Ceci est corroboré par les nombreux partenaires potentiels de gM, incluant ICP0, ICP4, UL33, UL30 ainsi que UL31 et UL34, qui se trouvent dans le noyau et qui y accomplissent divers rôles comme la réplication et l'assemblage des nucléocapsides. Étant donné que les virus se répliquent et sortent préférentiellement du noyau à des sites spécialisés et que gM se trouve aussi sur des sites ponctués le long de la membrane nucléaire, nous allons suivre la localisation des protéines ICP0, ICP4, ICP8, PML, et ND10, qui identifient le compartiment de réplication. Les résultats préliminaires de l'article

II qui ont montré que gM est adjacent à ICP₀, pourraient indiquer une implication de gM dans la réplication et la transcription d'ADN virale. Bien entendu, la glycoprotéine gM pourrait avoir d'autres fonctions insoupçonnées dans la membrane nucléaire.

4. Rôle de la queue cytoplasmique carboxyl terminale de HSV-1 gM

Les résultats présentés dans le deuxième article suggèrent une importance du domaine carboxy-terminal cytoplasmique de gM pour sa fonction dans le cycle de réplication virale. Il reste toujours à confirmer que les effets observés sur la production virale ne sont pas simplement causés par la faible stabilité de gM due à la délétion du domaine carboxy-terminal. À cette fin, nous allons effectuer la mutagenèse de ce domaine, en commençant par les motifs à base de tyrosine. Le résidu tyrosine, qui a été démontré comme étant un déterminant important pour la fonction des ces motifs ([324]), sera individuellement remplacé par de l'alanine. L'impact de ces mutations sur la localisation de gM dans des cellules transfectées et infectées aussi bien que sur la production virale sera évaluée par le biais des approches déployées dans les études présentes. En outre, ceci devrait préciser si un ou plusieurs des motifs contribue(nt) à la fonction de gM dans l'assemblage et la propagation du virus. Une fois un motif identifié, ce mutant pourrait servir de contrôle négatif dans les expériences de co-immunoprécipitation pour identifier les partenaires cellulaires de gM. Si aucun motif à base de tyrosine n'est impliqué, la mutagenèse subséquente des autres motifs au sein du gM sera envisagée.

5. Identification de nouveaux partenaires d'interaction de HSV-1 gM

La localisation de gM au niveau du noyau en phase précoce de l'infection nécessite la présence d'au moins une autre protéine virale ([305]). À l'inverse, gM se localise par la suite au TGN et dans la membrane plasmique des cellules infectées ainsi que dans les cellules transfectées ([278], [305], [261], [263]). Ces phénotypes distincts reflètent vraisemblablement des interactions distinctes avec différents partenaires à différents moments. La diversité des protéines virales qui interagissent avec gM, tel que démontré par

les études en double-hybride, constitue un argument à l'appui de cette hypothèse. De plus, considérant l'importance du domaine C-terminal cytoplasmique de gM dans son transport et dans le cycle de réplication virale, et que les motifs au sein de ce domaine interagissent souvent avec des protéines cellulaires, suggèrent l'implication de protéines de la cellule hôte. En fait, la relocalisation de protéines de l'enveloppe virale (gD, gH) de la membrane plasmique vers le TGN par gM ([261]) pourrait être due à l'interaction et l'interférence de gM avec des protéines cellulaires liées au trafic intracellulaire entre la membrane plasmique et le TGN.

Par conséquent, l'identification des molécules qui se lient à gM dans les noyaux ou ailleurs dans la cellule aiderait à définir les mécanismes de ciblage au niveau moléculaire et à fournir des pistes concernant le rôle précis de gM au cours de l'infection. Une approche protéomique est parfaitement adaptée pour une telle tentative. Nous avons entrepris une telle approche par immunoprécipitation de gM à partir de lysats de cellulaires infectées. Puisque l'anticorps contre gM est médiocre pour cette tâche (notre observation), une étiquette VSV G a été ajoutée dans la protéine et sera utilisée. Les résultats préliminaires indiquent que gM est précipitée efficacement par un anticorps monoclonal dirigé contre VSV G (Fig. 7C, Article II). Les étapes suivantes consistent en une analyse des protéines immunoprécipitées par coomassie et/ou nitrate d'argent, suivi de spectrométrie de masse. Jusqu'à présent, nous avons immunoprécipité gM mais sans réussir à la détecter ni ses partenaires par nitrate d'argent (une condition pour la spectrométrie de masse). Ceci est probablement dû à la faible expression de gM et l'interférence de la chaîne lourde de l'anticorps VSV G dans nos analyses (le poids moléculaire de gM est le même que celui de la chaîne lourde de l'anticorps, données non présentées). Comme approche alternative, une colonne d'affinité avec une construction taggée avec GST sera mise en place. En fait, cette construction de GST-gM a déjà été achevée avec succès et l'expression ainsi que la purification des protéines GST-gM est en cours (données non présentées). Pour aborder la question des différentes interactions en fonction du temps, des lysats cellulaires seront préparés à différents moments post-infection. De plus, pour évaluer si les protéines

identifiées par protéomique sont spécifiques au type cellulaire, les expériences seront répétées dans une seconde lignée cellulaire. Finalement, les résultats seront validés par confocal et immuno-EM pour voir si ces protéines interagissent bel et bien avec gM et si elles ont un impact sur la localisation de cette dernière.

CONCLUSION

Les résultats dans les deux articles développés dans le cadre des études de doctorat permettent de proposer que gM est une glycoprotéine multifonctionnelle qui joue des rôles distincts selon la cinétique de l'infection et sa localisation. En phase précoce de l'infection, gM est ciblée activement et spécifiquement à la membrane nucléaire par un mécanisme qui n'implique pas la perturbation générale du TGN induite par le virus, suggérant que gM nucléaire remplit un rôle nucléaire précoce. En phase tardive, gM semble impliquée dans la régulation de l'enveloppement final du virus au niveau du TGN et la propagation du virus de cellule à cellule. Nos résultats sont consistents avec des études précédentes et indiquent que le domaine C-terminal cytoplasmique de gM est requis pour la fonction de gM dans l'enveloppement final et la propagation intercellulaire du virus, ainsi que pour le transport intracellulaire de HSV-1 gM. La fonctionnalité du domaine C-terminal de gM pourrait être assurée par l'un ou plusieurs des nombreux motifs présents dans ce domaine. Plusieurs partenaires d'interaction viraux du domaine C-terminal de gM ont été identifiés par système de double-hybride, dont UL43, UL52, UL33, ICP0, UL31, UL34 constituent des candidats intéressants. Finalement, compte tenu de la redondance fonctionnelle de gM avec d'autres protéines virales et la dépendance du type cellulaire, les homologues de gM dans d'autres virus herpétiques pourraient fonctionner de façon analogue, mais pas nécessairement identiquement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brack, A.R., et al., *Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5364-72.
2. Farnsworth, A., K. Goldsmith, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8481-94.
3. Hamilton, R., *The herpes book* ed. J.P. Tarcher. 1980: Los Angeles: St-Martin Press 206p.
4. Cartwright, F.F. and M.D. Biddiss., *Disease and History*. 1972: Crowell. 247 p.
5. Wildy, P., *Herpes: history and classification*. In: Kaplan AS, ed. *The herpes-viruses* 1973: New York: Academic Press. 1-25.
6. Andrews, C.H. and E.A. Carmichael, *A note on the presence of antibodies to herpesvirus in post-encephalitic and other human sera*. Lancet, 1930. **1**: p. 857-858.
7. Doerr, R., In: *Handbuck der Virusforschung (Doerr R, Hallauer C, eds)*. Vienna: Springer, 1938.
8. Burnet, F.M. and S.W. Williams, *Herpes simplex: new point of view*. . Med J, Aust 1939. **1**: p. 637-640.
9. Smith, M.G., E.H. Lennette, and H.R. Reames, *Isolation of the virus of herpes simplex and the demonstration of intranuclear inclusions in a case of acute encephalitis*. . Am J Pathol, 1941. **17**: p. 55-68.
10. Gruter, W., *Das herpesvirus, seine atiologische und klinische bedeutung*. Munch Med Wschr 1924. **71**: p. 1058.
11. Weller, T.H. and M.B. Stoddard, *Intranuclear inclusion bodies in cultures of human tissue inoculated with varicella vesicle fluid*. J Immunol 1952. **68**: p. 311-319.
12. Smith, M.G., *Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease*. Proc Soc Exp Biol Med 1956. **92**: p. 424-430.
13. Rowe, W.P., J.W. Hartley, and S.e.a. Waterman, *Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids*. Proc Soc Exp Biol Med 1956. **92**: p. 418-424.
14. Weller, T.H., et al., *Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease*. . Proc Soc Exp Biol Med 1957. **94**: p. 4-12.

15. Schneweis, K.E. and A.J. Nahmias, *Antigens of herpes simplex virus types 1 and 2 – immunodiffusion and inhibition passive hemagglutination studies*. . Z Immunitaetsforsch Exp Klin Immunol 1971. **141**: p. 471-487.
16. Roizman, B., et al., *Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy*. *The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Intervirology, 1981. **16**(4): p. 201-17.
17. Wildy, P. and D.H. Watson, *Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1963. **27**: p. 25-47.
18. Furlong, D., H. Swift, and B. Roizman, *Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1071-4.
19. Kieff, E. and D. Liebowitz, *Epstein-Barr virus and its replication*. In: *Field's Virology, 2nd edn, volume 2 (Fields BN, Knipe DM, Chanock R et al., eds)*. 1990: New York: Raven Press. 1889-1920.
20. Sheldrick, P. and N. Berthelot, *Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1975. **39 Pt 2**: p. 667-78.
21. Hayward, G.S., et al., *Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4243-7.
22. Mocarski, E.S. and B. Roizman, *Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA*. Cell, 1982. **31**(1): p. 89-97.
23. Spear, P.G. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion*. J Virol, 1972. **9**(1): p. 143-59.
24. Gibson, W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1044-52.
25. Honess, R.W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell*. J Virol, 1973. **12**(6): p. 1347-65.
26. Honess, R.W. and B. Roizman, *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins*. J Virol, 1974. **14**(1): p. 8-19.
27. Boehmer, P.E. and A.V. Nimonkar, *Herpes virus replication*. IUBMB Life, 2003. **55**(1): p. 13-22.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. Holmes, C. and D. Cotterell, *Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment*. CNS Drugs, 2009. **23**(12): p. 993-1002.
32. Wozniak, M.A., A.P. Mee, and R.F. Itzhaki, *Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques*. J Pathol, 2009. **217**(1): p. 131-8.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Naesens, L. and E. De Clercq, *Recent developments in herpesvirus therapy*. Herpes, 2001. **8**(1): p. 12-6.
38. 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.
39. Biron, K.K., et al., *Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(8): p. 2365-72.
40. Baek, M.C., P.M. Krosky, and D.M. Coen, *Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 11943-52.
41. Krosky, P.M., M.C. Baek, and D.M. Coen, *The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 905-14.
42. Wolf, D.G., et al., *Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1895-900.

43. Schang, L.M., J. Phillips, and P.A. Schaffer, *Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 5626-37.
44. Schang, L.M., et al., *Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins*. *J Virol*, 2002. **76**(15): p. 7874-82.
45. Bresnahan, W.A., et al., *Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication*. *Virology*, 1997. **231**(2): p. 239-47.
46. Zhu, H., et al., *Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(6): p. 3932-7.
47. Johannsen, E., et al., *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(46): p. 16286-91.
48. Kattenhorn, L.M., et al., *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions*. *J Virol*, 2004. **78**(20): p. 11187-97.
49. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. *J Virol*, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
50. Zhu, F.X., et al., *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 800-11.
51. Bresnahan, W.A. and T. Shenk, *A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles [In Process Citation]*. *Science*, 2000. **288**(5475): p. 2373-6.
52. Bechtel, J., A. Grundhoff, and D. Ganem, *RNAs in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10138-46.
53. Sciortino, M.T., et al., *RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions*. *J Virol*, 2001. **75**(17): p. 8105-16.
54. 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.
55. 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.
56. Dolan, A., et al., *The genome sequence of herpes simplex virus type 2*. *J Virol*, 1998. **72**(3): p. 2010-21.
57. 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.

58. Schrag, J.D., et al., *Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid*. Cell, 1989. **56**(4): p. 651-60.
59. Zhou, Z.H., et al., *Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å*. Science, 2000. **288**(5467): p. 877-80.
60. Newcomb, W.W., et al., *Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes*. J Mol Biol, 1993. **232**(2): p. 499-511.
61. Trus, B.L., et al., *Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2004. **78**(22): p. 12668-71.
62. Davison, M.D., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol, 1992. **73**(Pt 10): p. 2709-13.
63. Deckman, I.C., M. Hagen, and P.J. McCann, 3rd, *Herpes simplex virus type 1 protease expressed in Escherichia coli exhibits autoprocessing and specific cleavage of the ICP35 assembly protein*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7362-7.
64. Liu, F.Y. and B. Roizman, *The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate*. J Virol, 1991. **65**(10): p. 5149-56.
65. Person, S., et al., *Herpes simplex virus type 1 capsid protein, VP21, originates within the UL26 open reading frame*. J Gen Virol, 1993. **74**(Pt 10): p. 2269-73.
66. Steven, A.C. and P.G. Spear, *Herpes virus capsid assembly and envelopment*, in *Structural biology of viruses*, W. Chiu, R.M. Burnett, and R.L. Garca, Editors. 1997, Oxford University Press: New York. p. 312-351.
67. 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.
68. Newcomb, W.W., et al., *Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 1663-73.
69. Rixon, F.J. and D. McNab, *Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of In vitro-assembled procapsids [In Process Citation]*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5714-21.
70. 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.
71. Perdue, M.L., et al., *Biochemical studies of the maturation of herpesvirus nucleocapsid species*. Virology, 1976. **74**(1): p. 194-208.

72. 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.
73. Newcomb, W.W. and J.C. Brown, *Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids*. *J Virol*, 1991. **65**(2): p. 613-20.
74. Rixon, F.J., et al., *The products of herpes simplex virus type 1 gene UL26 which are involved in DNA packaging are strongly associated with empty but not with full capsids*. *J Gen Virol*, 1988. **69**(Pt 11): p. 2879-91.
75. Chen, D.H., et al., *The pattern of tegument-capsid interaction in the herpes simplex virus type 1 virion is not influenced by the small hexon-associated protein VP26*. *J Virol*, 2001. **75**(23): p. 11863-7.
76. Zhou, Z.H., et al., *Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions*. *J Virol*, 1999. **73**(4): p. 3210-8.
77. 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.
78. Chi, J.H., et al., *The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids*. *J Gen Virol*, 2005. **86**(Pt 2): p. 253-61.
79. Farnsworth, A., T.W. Wisner, and D.C. Johnson, *Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD*. *J Virol*, 2007. **81**(1): p. 319-31.
80. Kamen, D.E., et al., *Structural basis for the physiological temperature dependence of the association of VP16 with the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H*. *J Virol*, 2005. **79**(10): p. 6134-41.
81. Klupp, B.G., et al., *Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein*. *J Virol*, 2002. **76**(6): p. 3065-71.
82. McNab, A.R., et al., *The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA*. *J Virol*, 1998. **72**(2): p. 1060-70.
83. Meekes, 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.
84. Meekes, D.G., Jr. and J.W. Wills, *Structural rearrangement within an enveloped virus upon binding to the host cell*. *J Virol*, 2008. **82**(21): p. 10429-35.
85. 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.

86. Newcomb, W.W., F.L. Homa, and J.C. Brown, *Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices.* J Virol, 2006. **80**(13): p. 6286-94.
87. Vittone, V., et al., *Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1.* J Virol, 2005. **79**(15): p. 9566-71.
88. Yeh, P.C., D.G. Meckes, Jr., and J.W. Wills, *Analysis of the interaction between the UL11 and UL16 tegument proteins of herpes simplex virus.* J Virol, 2008. **82**(21): p. 10693-700.
89. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1.* Virus Res, 2009. **145**(2): p. 173-86.
90. 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.
91. Lee, J.H., et al., *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1.* Virology, 2008. **378**(2): p. 347-54.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Gretch, D.R., et al., *Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus.* J Virol, 1988. **62**(3): p. 875-81.
96. Mettenleiter, T.C., *Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread.* Virus Res, 2003. **92**(2): p. 197-206.
97. Farnsworth, A., et al., *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10187-92.
98. Kopp, M., et al., *Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment.* J Virol, 2004. **78**(6): p. 3024-34.
99. Leege, T., et al., *Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1.* J Virol, 2009. **83**(2): p. 896-907.

100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. Fusco, D., C. Forghieri, and G. Campadelli-Fiume, *The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9323-8.
113. 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.

114. 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.
115. Wolfstein, A., et al., *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-37.
116. 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.
117. Mohl, B.S., et al., *Intracellular localization of the pseudorabies virus large tegument protein pUL36*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 9641-51.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Costanzo, F., et al., *Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B*. J Virol, 1977. **21**(3): p. 996-1001.
126. LaBoissiere, S. and P. O'Hare, *Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 99-109.
127. Ishov, A.M. and G.G. Maul, *The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 815-26.

128. Uprichard, S.L. and D.M. Knipe, *Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes*. J Virol, 1996. 70(3): p. 1969-80.
129. Quinlan, M.P., L.B. Chen, and D.M. Knipe, *The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication*. Cell, 1984. 36(4): p. 857-68.
130. Jacob, R.J., L.S. Morse, and B. Roizman, *Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA*. J Virol, 1979. 29(2): p. 448-57.
131. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *HERPES SIMPLEX VIRUS DNA REPLICATION*. Annual Review of Biochemistry, 1997. 66(1): p. 347-384.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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. 83(16): p. 8076-81.
136. 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. 83(17): p. 8938-45.
137. 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.
138. Cockrell, S.K., et al., *Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation*. J Virol, 2009. 83(1): p. 47-57.
139. 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.

140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. Johnson, D.C. and P.G. Spear, *Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells*. J Virol, 1982. 43(3): p. 1102-12.
147. Roizman, B., Knipe, D.M., Whiteley, R.J., *Herpes simplex viruses*. In: Knipe, D., Howley, P.M. . 5 ed. 2007, Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. pp. 2501-2601.
148. Wild, P., et al., *Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells*. J Virol, 2005. 79(2): p. 1071-83.
149. Forest, T., S. Barnard, and J.D. Baines, *Active intranuclear movement of herpesvirus capsids*. Nat Cell Biol, 2005. 7(4): p. 429-31.
150. Muranyi, W., et al., *Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina*. Science, 2002. 297(5582): p. 854-7.
151. 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.
152. 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 U(L)34-encoded protein to the inner nuclear membrane*. J Virol, 2008. 82(16): p. 8094-104.

153. Klupp, B.G., et al., *Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7241-6.
154. 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.
155. Reynolds, A.E., L. Liang, and J.D. Baines, *Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5564-75.
156. Roop, C., L. Hutchinson, and D.C. Johnson, *A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2285-97.
157. Baines, J.D., et al., *The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6414-24.
158. Fuchs, W., et al., *The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions*. J Virol, 2002. **76**(1): p. 364-78.
159. Granzow, H., B.G. Klupp, and T.C. Mettenleiter, *The Pseudorabies Virus US3 Protein Is a Component of Primary and of Mature Virions*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1314-23.
160. 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.
161. Naldinho-Souto, R., H. Browne, and T. Minson, *Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2582-4.
162. Kato, A., et al., *Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 250-61.
163. Mou, F., E. Wills, and J.D. Baines, *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, 2009. **83**(10): p. 5181-91.
164. Atanasiu, D., et al., *Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18718-23.

165. Wild, P., et al., *Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 408-19.
166. Leuzinger, H., et al., *Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 13047-59.
167. Mettenleiter, T.C., T. Minson, and P. Wild, *Egress of alphaherpesviruses*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1610-2.
168. 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.
169. Nagel, C.H., et al., *Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+)*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 3109-24.
170. Krautwald, M., et al., *Translocation of incoming pseudorabies virus capsids to the cell nucleus is delayed in the absence of tegument protein pUL37*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3389-96.
171. Lyman, M.G. and L.W. Enquist, *Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2058-66.
172. Sathish, N., F.X. Zhu, and Y. Yuan, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 interacts with kinesin-2 transporting viral capsid-tegument complexes along microtubules*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000332.
173. Granzow, H., et al., *Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2072-82.
174. de Oliveira, A.P., et al., *Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 4974-90.
175. 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.
176. 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.
177. Sanchez, V., et al., *Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 975-86.
178. Das, S., A. Vasanthi, and P.E. Pellett, *Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 11861-9.

179. Tooze, J., et al., *Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes*. Eur J Cell Biol, 1993. **60**(1): p. 163-78.
180. Mettenleiter, T.C., *Herpesvirus assembly and egress*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1537-47.
181. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
182. 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.
183. 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.
184. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
185. 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.
186. Calderwood, M.A., et al., *Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7606-11.
187. Rozen, R., et al., *Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 4742-50.
188. Uetz, P., et al., *Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome*. Science, 2006. **311**(5758): p. 239-42.
189. Loomis, J.S., R.J. Courtney, and J.W. Wills, *Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11417-24.
190. Klupp, B.G., et al., *Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1510-22.
191. Mossman, K.L., et al., *Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event [In Process Citation]*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6287-99.
192. Fuchs, W., et al., *The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6729-42.
193. Desai, P.J., *A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11608-18.

194. Desai, P., et al., *A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation.* J Virol, 2001. **75**(21): p. 10259-71.
195. Fulmer, P.A., et al., *UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment.* J Virol, 2007. **81**(7): p. 3097-108.
196. Melancon, J.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and UL20p function redundantly in virion de-envelopment.* J Virol, 2005. **79**(1): p. 299-313.
197. Remillard-Labrosse, G., et al., *Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane.* Traffic, 2009. **10**(8): p. 1074-83.
198. Polcicova, K., et al., *The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors.* J Virol, 2005. **79**(18): p. 11990-2001.
199. Saldanha, C.E., et al., *Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E domains involved in virus spread and disease.* J Virol, 2000. **74**(15): p. 6712-9.
200. Fraser, J.W., *Molecular biology of latent HSV-1.* In C. Lopez and Roizman B (ed.), *Human herpesvirus infections: Pathogenesis, diagnosis, and treatment.* . 1986: Raven Press, New York. 39-54.
201. 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.
202. Rock, D.L. and N.W. Fraser, *Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice.* Nature, 1983. **302**(5908): p. 523-5.
203. Rock, D.L. and N.W. Fraser, *Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region.* J Virol, 1985. **55**(3): p. 849-52.
204. Wang, Q.Y., et al., *Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16055-9.
205. Stevens, J.G., et al., *RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons.* Science, 1987. **235**(4792): p. 1056-9.
206. Stevens, J.G., et al., *Prominence of the herpes simplex virus latency-associated transcript in trigeminal ganglia from seropositive humans.* J Infect Dis, 1988. **158**(1): p. 117-23.

207. Krause, P.R., et al., *Detection and preliminary characterization of herpes simplex virus type 1 transcripts in latently infected human trigeminal ganglia*. J Virol, 1988. **62**(12): p. 4819-23.
208. 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.
209. 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.
210. Spivack, J.G. and N.W. Fraser, *Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection*. J Virol, 1988. **62**(5): p. 1479-85.
211. Amelio, A.L., et al., *Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 2063-8.
212. Devi-Rao, G.B., et al., *Herpes simplex virus type 1 DNA replication and gene expression during explant-induced reactivation of latently infected murine sensory ganglia*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1271-82.
213. Kosz-Vnenchak, M., et al., *Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5383-93.
214. Kemp, L.M., C.L. Dent, and D.S. Latchman, *Octamer motif mediates transcriptional repression of HSV immediate-early genes and octamer-containing cellular promoters in neuronal cells*. Neuron, 1990. **4**(2): p. 215-22.
215. Lillycrop, K.A., et al., *The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons*. Neuron, 1991. **7**(3): p. 381-90.
216. Haggmann, M., et al., *Transcription factors interacting with herpes simplex virus alpha gene promoters in sensory neurons*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(24): p. 4978-85.
217. He, X., et al., *Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development*. Nature, 1989. **340**(6228): p. 35-41.
218. Valyi-Nagy, T., et al., *Induction of cellular transcription factors in trigeminal ganglia of mice by corneal scarification, herpes simplex virus type 1 infection, and explantation of trigeminal ganglia*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4142-52.

219. Garber, D.A., P.A. Schaffer, and D.M. Knipe, *A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1997. **71**(8): p. 5885-93.
220. Chen, S.H., et al., *A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus*. J Virol, 1997. **71**(8): p. 5878-84.
221. Deeman, V., et al., *Immune control of HSV-1 latency*. Viral Immunol, 2005. **18**(3): p. 466-73.
222. Liu, T., et al., *Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 11178-84.
223. Liu, T., et al., *CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons*. J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1459-66.
224. Enquist, L.W., et al., *Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system*. Adv Virus Res, 1999. **51**: p. 237-347.
225. 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. 3592-3606.
226. De Regge, N., et al., *Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites*. J Cell Biol, 2006. **174**(2): p. 267-75.
227. 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. 3187-3199.
228. Penfold, M.E., P. Armati, and A.L. Cunningham, *Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6529-33.
229. LaVail, J.H., et al., *Genetic and molecular in vivo analysis of herpes simplex virus assembly in murine visual system neurons*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11142-50.
230. Tomishima, M.J., G.A. Smith, and L.W. Enquist, *Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons*. Traffic, 2001. **2**(7): p. 429-36.
231. Antinone, S.E., et al., *The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5494-8.
232. 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.

233. 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.
234. Baines, J.D. and B. Roizman, *The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 938-44.
235. Dijkstra, J.M., et al., *Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5684-8.
236. Konig, P., K. Giesow, and G.M. Keil, *Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells*. Vet Microbiol, 2002. **86**(1-2): p. 37-49.
237. Osterrieder, N., et al., *The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 4110-5.
238. Fuchs, W. and T.C. Mettenleiter, *DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 8): p. 2173-82.
239. Yamagishi, Y., et al., *Varicella-Zoster Virus Glycoprotein M Homolog is Glycosylated, Expressed on the Viral Envelope, and Functions in Viral Cell-to-Cell Spread*. [10.1128/JVI.01722-07](https://doi.org/10.1128/JVI.01722-07). J. Virol., 2007: p. JVI.01722-07.
240. Tischer, B.K., et al., *The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 5): p. 997-1003.
241. Mach, M., et al., *Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73)*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11881-92.
242. Lake, C.M. and L.M. Hutt-Fletcher, *Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11162-72.
243. Lehner, R., H. Meyer, and M. Mach, *Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3792-800.
244. Baines, J.D. and B. Roizman, *The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1441-52.

245. Baines, J.D. and B. Roizman, *The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells.* J. Virol., 1993. **67**(3): p. 1441-1452.
246. Pilling, A., et al., *The equine herpesvirus type 1 glycoprotein homologous to herpes simplex virus type 1 glycoprotein M is a major constituent of the virus particle.* J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 2): p. 439-42.
247. MacLean, C.A., et al., *Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins.* J Gen Virol, 1991. **72**(4): p. 897-906.
248. Roizman, B., R.J. Whitley, and C. Lopez, *The Human herpesviruses*, ed. R.J.W. Bernard Roizman, Carlos Lopez. 1993, New York: Raven Press. 433.
249. Stingley, S.W., et al., *Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray.* J Virol, 2000. **74**(21): p. 9916-27.
250. Liang, X., et al., *Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein.* J Virol, 1996. **70**(3): p. 1448-54.
251. Adams, R., et al., *Characterization of the protein encoded by gene UL49A of herpes simplex virus type 1.* J Gen Virol, 1998. **79**(Pt 4): p. 813-23.
252. Jons, A., J.M. Dijkstra, and T.C. Mettenleiter, *Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 550-7.
253. Pyles, R.B., N.M. Sawtell, and R.L. Thompson, *Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency.* J Virol, 1992. **66**(11): p. 6706-13.
254. Ross, J., M. Williams, and J.I. Cohen, *Disruption of the varicella-zoster virus dUTPase and the adjacent ORF9A gene results in impaired growth and reduced syncytia formation in vitro.* Virology, 1997. **234**(2): p. 186-95.
255. Wu, S.X., X.P. Zhu, and G.J. Letchworth, *Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 3029-36.
256. Lake, C.M., S.J. Molesworth, and L.M. Hutt-Fletcher, *The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3.* J Virol, 1998. **72**(7): p. 5559-64.
257. Koyano, S., et al., *Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion.* J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 6): p. 1485-91.
258. Fuchs, W. and T.C. Mettenleiter, *The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex*

- with the non-glycosylated UL10 gene product.* Virus Research, 2005. **112**(1-2): p. 108-114.
259. Mach, M., et al., *Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects.* J Virol, 2005. **79**(4): p. 2160-70.
260. Lipinska, A.D., et al., *Bovine Herpesvirus 1 UL49.5 Protein Inhibits the Transporter Associated with Antigen Processing despite Complex Formation with Glycoprotein M*
10.1128/JVI.02707-05. J. Virol., 2006. **80**(12): p. 5822-5832.
261. Crump, C.M., et al., *Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins.* J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 12): p. 3517-27.
262. Fuchs, W., et al., *Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49.* J Virol, 2002. **76**(16): p. 8208-17.
263. Wills, E., F. Mou, and J.D. Baines, *The U(L)31 and U(L)34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells.* J Virol, 2009. **83**(10): p. 4800-9.
264. Fossum, E., et al., *Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks.* PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000570.
265. MacLean, C.A., L.M. Robertson, and F.E. Jamieson, *Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo.* J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 6): p. 975-83.
266. Dijkstra, J.M., et al., *Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host.* J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 9): p. 2147-51.
267. Neubauer, A., et al., *Equine Herpesvirus 1 Mutants Devoid of Glycoprotein B or M Are Apathogenic for Mice but Induce Protection against Challenge Infection.* Virology, 1997. **239**(1): p. 36-45.
268. May, J.S., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68.* J Virol, 2005. **79**(6): p. 3459-67.
269. Rudolph, J. and N. Osterrieder, *Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread.* Virology, 2002. **293**(2): p. 356-67.
270. Seyboldt, C., H. Granzow, and N. Osterrieder, *Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein M: effect of deletions of transmembrane domains.* Virology, 2000. **278**(2): p. 477-89.

271. Browne, H., S. Bell, and T. Minson, *Analysis of the requirement for glycoprotein m in herpes simplex virus type 1 morphogenesis*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 1039-41.
272. 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.
273. Klupp, B.G., R. Nixdorf, and T.C. Mettenleiter, *Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6760-8.
274. Sadaoka, T., et al., *Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M*. J Virol. **84**(7): p. 3488-502.
275. 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.
276. 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.
277. 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.
278. 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.
279. Alconada, A., et al., *Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 377-87.
280. 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.
281. 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.
282. Krzyzaniak, M., M. Mach, and W.J. Britt, *The Cytoplasmic Tail of Glycoprotein M (gpUL100) Expresses Trafficking Signals Required for Human Cytomegalovirus Assembly and Replication* 10.1128/JVI.00375-07. J. Virol., 2007. **81**(19): p. 10316-10328.

283. May, J.S., et al., *An essential role for the proximal but not the distal cytoplasmic tail of glycoprotein M in murid herpesvirus 4 infection*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2131.
284. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.
285. Tamir, I. and J.C. Cambier, *Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1353-64.
286. Heineman, T.C. and S.L. Hall, *VZV gB endocytosis and Golgi localization are mediated by YXXphi motifs in its cytoplasmic domain*. Virology, 2001. **285**(1): p. 42-9.
287. Favoreel, H.W., et al., *A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6845-51.
288. Fan, Z., et al., *Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9271-83.
289. Beitia Ortiz de Zarate, I., K. Kaelin, and F. Rozenberg, *Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1540-51.
290. Pasieka, T.J., L. Maresova, and C. Grose, *A functional YNKI motif in the short cytoplasmic tail of varicella-zoster virus glycoprotein gH mediates clathrin-dependent and antibody-independent endocytosis*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 4191-204.
291. Ficinska, J., et al., *Pseudorabies Virus Glycoprotein gD Contains a Functional Endocytosis Motif That Acts in Concert with an Endocytosis Motif in gB To Drive Internalization of Antibody-Antigen Complexes from the Surface of Infected Monocytes*. J. Virol., 2005. **79**(11): p. 7248-7254.
292. Van Minnebruggen, G., H.W. Favoreel, and H.J. Nauwynck, *Internalization of pseudorabies virus glycoprotein B is mediated by an interaction between the YQRL motif in its cytoplasmic domain and the clathrin-associated AP-2 adaptor complex*. J Virol, 2004. **78**(16): p. 8852-9.
293. Johnson, D.C., et al., *Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 821-33.
294. Wisner, T.W. and D.C. Johnson, *Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11519-35.

295. Heineman, T.C., N. Krudwig, and S.L. Hall, *Cytoplasmic domain signal sequences that mediate transport of varicella-zoster virus gB from the endoplasmic reticulum to the Golgi*. *J Virol*, 2000. **74**(20): p. 9421-30.
296. Heineman, T.C., et al., *Conserved cytoplasmic domain sequences mediate the ER export of VZV, HSV-1, and HCMV gB*. *Virology*, 2004. **328**(1): p. 131-41.
297. Zhu, Z., et al., *Targeting of glycoprotein I (gE) of varicella-zoster virus to the trans-Golgi network by an AYRV sequence and an acidic amino acid-rich patch in the cytosolic domain of the molecule*. *J Virol*, 1996. **70**(10): p. 6563-75.
298. Alconada, A., U. Bauer, and B. Hoflack, *A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network*. *Embo J*, 1996. **15**(22): p. 6096-110.
299. Futaki, S., et al., *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(8): p. 5836-40.
300. Sargent, F., *The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 835-47.
301. Marcello, E., et al., *An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*. **285**(14): p. 10376-84.
302. Hibbard, M.K. and R.M. Sandri-Goldin, *Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression*. *J Virol*, 1995. **69**(8): p. 4656-67.
303. Wu, X., et al., *Examination of conditions affecting the efficiency of HVS-1 amplicon packaging*. *J Virol Methods*, 1995. **52**(1-2): p. 219-29.
304. Fuchs, W., et al., *In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 705-16.
305. Zhang, J., et al., *Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes*. *J Virol*, 2009. **83**(24): p. 12984-97.
306. Dijkstra, J.M., T.C. Mettenleiter, and B.G. Klupp, *Intracellular processing of pseudorabies virus glycoprotein M (gM): gM of strain Bartha lacks N-glycosylation*. *Virology*, 1997. **237**(1): p. 113-22.
307. Nishimura, N. and W.E. Balch, *A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum*. *Science*, 1997. **277**(5325): p. 556-8.

308. Zheng, Z., et al., *Mutations in the carboxyl-terminal hydrophobic sequence of human cytomegalovirus glycoprotein B alter transport and protein chaperone binding.* J Virol, 1996. 70(11): p. 8029-40.
309. Fricker, M., et al., *Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope.* J Cell Biol, 1997. 136(3): p. 531-44.
310. Schermelleh, L., et al., *Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy.* Science, 2008. 320(5881): p. 1332-6.
311. Jensen, H.L. and B. Norrild, *Herpes simplex virus type 1-infected human embryonic lung cells studied by optimized immunogold cryosection electron microscopy.* J Histochem Cytochem, 1998. 46(4): p. 487-96.
312. Torrisi, M.R., et al., *Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label.* J Virol, 1992. 66(1): p. 554-61.
313. Mulder, W., et al., *Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron-to-neuron transmission in its natural host, the pig, but not after additional inactivation of gE or gI.* J Virol, 1996. 70(4): p. 2191-200.
314. Fuchs, W., et al., *The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress.* J Virol, 1997. 71(7): p. 5639-46.
315. Krzyzaniak, M.A., M. Mach, and W.J. Britt, *HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4.* Traffic, 2009. 10(10): p. 1439-57.
316. Kern, E.R., et al., *Treatment of experimental herpesvirus infections with phosphonoformate and some comparisons with phosphonoacetate.* Antimicrob Agents Chemother, 1978. 14(6): p. 817-23.
317. Overby, L.R., et al., *Inhibition of herpes simplex virus replication by phosphonoacetic acid.* Antimicrob Agents Chemother, 1974. 6(3): p. 360-5.
318. Worman, H.J. and J.C. Courvalin, *The inner nuclear membrane.* J Membr Biol, 2000. 177(1): p. 1-11.
319. Hetzer, M.W., T.C. Walther, and I.W. Mattaj, *Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 347-80.
320. Saksena, S., et al., *Cotranslational integration and initial sorting at the endoplasmic reticulum translocon of proteins destined for the inner nuclear membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(34): p. 12537-42.

321. Braunagel, S.C., et al., *Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: facilitated trafficking to the inner nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(22): p. 8372-7.
322. Braunagel, S.C., et al., *Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(22): p. 9307-12.
323. Braunagel, S.C., V. Cox, and M.D. Summers, *Baculovirus data suggest a common but multifaceted pathway for sorting proteins to the inner nuclear membrane*. J Virol, 2009. 83(3): p. 1280-8.
324. Lazarovits, J. and M. Roth, *A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits*. Cell, 1988. 53(5): p. 743-52.

