

Université de Montréal

**Caractérisation de la migration du virus Herpès  
simplex de type 1 (HSV-1) par protéomique**

par

Sandra LORET

Département de Pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Pathologie et biologie cellulaire  
option biologie cellulaire

Février 2012

© Sandra LORET, 2012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la migration du virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1)  
par protéomique

Présentée par :

Sandra LORET

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Nicole LECLERC, président-rapporteur

Dr. Roger LIPPÉ, directeur de recherche

Dre. Angela PEARSON, membre du jury

Dr. Louis FLAMAND, examinateur externe

Dr. Pierre THIBAUT, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1), agent étiologique des feux sauvages, possède une structure multicouche comprenant une capsidie icosaédrale qui protège le génome viral d'ADN, une couche protéique très structurée appelée tégument et une enveloppe lipidique dérivant de la cellule hôte et parsemée de glycoprotéines virales. Tous ces constituants sont acquis séquentiellement à partir du noyau, du cytoplasme et du réseau *trans*-golgien. Cette structure multicouche confère à HSV-1 un potentiel considérable pour incorporer des protéines virales et cellulaires. Toutefois, l'ensemble des protéines qui composent ce virus n'a pas encore été élucidé. De plus, malgré son rôle critique à différentes étapes de l'infection, le tégument demeure encore mal défini et ce, tant dans sa composition que dans la séquence d'addition des protéines qui le composent. Toutes ces incertitudes quant aux mécanismes impliqués dans la morphogenèse du virus nous amènent à l'objectif de ce projet, soit la caractérisation du processus de maturation d'HSV-1.

Le premier article présenté dans cette thèse et publié dans *Journal of Virology* s'attarde à la caractérisation protéique des virus extracellulaires matures. Grâce à l'élaboration d'un protocole d'isolation et de purification de ces virions, une étude protéomique a pu être effectuée. Celle-ci nous a permis de réaliser une cartographie de la composition globale en protéines virales des virus matures (8 protéines de la capsidie, 23 protéines du tégument et 13 glycoprotéines) qui a fait la page couverture de *Journal of Virology*. De plus, l'incorporation potentielle de 49 protéines cellulaires différentes a été révélée.

Lors de cette étude protéomique, nous avons aussi relevé la présence de nouveaux composants du virion dont U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, ICP0 et ICP4. Le deuxième article publié dans *Journal of General Virology* focalise sur ces protéines via

une analyse biochimique afin de mieux comprendre les interactions et la dynamique du tégment. Ces résultats nous révèlent que, contrairement aux protéines ICP0 et ICP4, U<sub>L</sub>7 et U<sub>L</sub>23 peuvent être relâchées de la capsidie en présence de sels et que les cystéines libres jouent un rôle dans cette relâche. De plus, cet article met en évidence la présence d'ICP0 et d'ICP4 sur les capsides nucléaires suggérant une acquisition possible du tégment au noyau.

La complexité du processus de morphogénèse du virus ainsi que la mise en évidence d'acquisition de protéines du tégment au noyau nous ont incités à poursuivre nos recherches sur la composition du virus à un stade précoce de son cycle viral. Les capsides C matures, prémisses des virus extracellulaires, ont donc été isolées et purifiées grâce à un protocole innovateur basé sur le tri par cytométrie en flux. L'analyse préliminaire de ces capsides par protéomique a permis d'identifier 28 protéines virales et 39 protéines cellulaires. Les données recueillies, comparées à celles obtenues avec les virus extracellulaires, suggèrent clairement un processus séquentiel d'acquisition des protéines du tégment débutant dans le noyau, site d'assemblage des capsides.

Finalement, tous ces résultats contribuent à une meilleure compréhension du processus complexe de maturation d'HSV-1 via l'utilisation de techniques variées et innovatrices, telles que la protéomique et la cytométrie en flux, pouvant être appliquées à d'autres virus mais aussi permettre le développement de meilleurs traitements pour vaincre l'HSV-1.

**Mots-clés :** Herpès simplex de type 1, virus extracellulaire, capsidie nucléaire, protéomique, tégment, cytométrie en flux

## Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the etiological agent of cold sores, has a multilayered structure that includes an icosahedral capsid that protects the viral DNA genome, a highly structured proteinaceous layer called tegument and a host-derived lipid envelope studded with viral glycoproteins. All these constituents are sequentially acquired from the nucleus, the cytoplasm and the *trans*-Golgi network. This multilayered structure confers to HSV-1 a considerable potential to incorporate viral and cellular proteins; however, all the proteins that compose this virus have not yet been elucidated. Moreover, despite its critical role at different stages of infection, the tegument is still poorly defined both in its composition and its sequence of addition of proteins. All these uncertainties about the mechanisms involved in the morphogenesis of the virus lead us to the goal of this project, which is the characterization of the maturation process of HSV-1.

The first article presented in this thesis and published in *Journal of Virology* focuses on the protein characterization of extracellular mature virus. After developing a protocol for the isolation and purification of these virions, a proteomics study was performed. It allowed us to map the global viral protein composition of mature virions (8 capsid proteins, 23 tegument proteins and 13 glycoproteins), which made the cover page of *Journal of Virology*. Moreover, the potential incorporation of 49 cellular proteins was revealed.

During this proteomics study, we confirmed the incorporation of novel virion components including U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, ICP0 and ICP4. The second article published in *Journal of General Virology* focuses on these viral proteins by using a biochemical analysis to better understand the interactions and dynamic of the tegument. Our results revealed that, unlike ICP0 and ICP4 proteins, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 can be released from the capsid in the presence of salts

and that free cysteines play a role in this release. Moreover, this article highlights the presence of ICP0 and ICP4 on the nuclear capsids suggesting a potential acquisition of tegument proteins in the nucleus.

The complexity of the viral morphogenesis process and the discovery of the tegument acquisition in the nucleus led us to pursue our research on the virus composition at an early stage of its viral cycle. The nuclear C capsids, precursors to the extracellular virus, were isolated and purified with an innovative protocol based on fluorescence activated cell sorting (FACS). The preliminary analysis of these capsids by proteomics allows us to identify 28 viral proteins and 39 cellular proteins. The collected data, compared to those obtained with extracellular viruses, clearly suggest a sequential process of tegument proteins acquisition starting in the nucleus, the assembly site of HSV-1 capsids.

Finally, all these results contribute to a better understanding of the complex process of HSV-1 maturation by using varied and innovative techniques such as proteomic and FACS, which can be applied to other viruses and allow the development of better treatments to fight HSV-1.

**Keywords:** Herpes simplex type 1, extracellular virus, nuclear capsid, proteomic, tegument, FACS



## Table des matières

<i>Résumé</i> .....	v
<i>Abstract</i> .....	vii
<i>Table des matières</i> .....	ix
<i>Liste des tableaux</i> .....	xiii
<i>Liste des figures</i> .....	xiv
<i>Liste des abréviations</i> .....	xvi
<i>Remerciements</i> .....	xxv
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1 - LE VIRUS HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1 (HSV-1)</b> .....	<b>2</b>
<i>A - Historique</i> .....	2
<i>B - La famille des Herpesviridae</i> .....	4
<i>C - Pathologies et symptômes causés par HSV-1</i> .....	7
▶ Herpès mucocutané .....	7
▶ Herpès oculaire .....	8
▶ Infections du système nerveux central .....	8
▶ Paralysie de Bell et maladie d'Alzheimer .....	9
▶ Herpès néonatal .....	10
▶ Herpès et patients immunodéficients .....	10
<i>D - Traitements et prévention</i> .....	11
<i>E - Latence d'HSV-1</i> .....	13
<b>2 - STRUCTURE D'HSV-1</b> .....	<b>17</b>
<i>A - Génome viral</i> .....	18
<i>B - Capside</i> .....	19
<i>C - Tégument</i> .....	20
<i>D - Enveloppe</i> .....	22

<b>3 - CYCLE VIRAL D'HSV-1 .....</b>	<b>23</b>
<i>A - Attachement et entrée .....</i>	<i>23</i>
<i>B - Cascade d'expression des gènes viraux .....</i>	<i>25</i>
<i>C - Réplication de l'ADN viral .....</i>	<i>28</i>
<i>D - Assemblage et maturation des capsides .....</i>	<i>29</i>
<i>E - Transport intracellulaire .....</i>	<i>32</i>
<i>F - Sortie extracellulaire .....</i>	<i>37</i>
<b>4 - SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET VIRUS .....</b>	<b>38</b>
<i>A - Principes et instrumentation .....</i>	<i>39</i>
<i>B - Protéomique virale .....</i>	<i>41</i>
<i>C - Avantages et limites de la protéomique .....</i>	<i>42</i>
<b>5 - OBJECTIFS DE RECHERCHE.....</b>	<b>42</b>
<b>RÉSULTATS – PRÉSENTATION PAR ARTICLES .....</b>	<b>45</b>
<b>ARTICLE 1 : COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR HSV-1 VIRIONS .....</b>	<b>45</b>
<i>Abstract .....</i>	<i>50</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>51</i>
<i>Materials and Methods.....</i>	<i>54</i>
<i>Results .....</i>	<i>59</i>
<i>Discussion .....</i>	<i>73</i>
<i>Acknowledgements .....</i>	<i>80</i>
<i>References.....</i>	<i>81</i>
<b>ARTICLE 2 : BIOCHEMICAL ANALYSIS OF ICP0, ICP4, U<sub>L</sub>7 AND U<sub>L</sub>23 INCORPORATED INTO EXTRACELLULAR HERPES SIMPLEX TYPE 1 VIRIONS.....</b>	<b>89</b>
<i>Summary .....</i>	<i>92</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>93</i>
<i>Materials and Methods.....</i>	<i>97</i>
<i>Results .....</i>	<i>101</i>

<i>Discussion</i> .....	109
<i>Acknowledgements</i> .....	114
<i>References</i> .....	115
<b>RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES</b> .....	<b>121</b>
<i>Introduction</i> .....	121
<i>Matériel et Méthodes</i> .....	123
<i>Résultats</i> .....	128
▶ Détection de billes de différentes tailles par cytométrie en flux .....	128
▶ Marquage fluorescent de l'ADN viral .....	129
▶ Détection, isolation et séparation des capsides nucléaires par FACS .....	131
▶ Analyse EM, PCR et quantification des capsides C .....	133
▶ Protéomique des capsides C obtenues par FACS .....	137
<i>Discussion</i> .....	143
▶ Validation de la méthode expérimentale .....	143
▶ Capsides nucléaires et virus extracellulaires .....	144
▶ Protéines cellulaires .....	148
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>151</b>
<i>Contribution à l'avancement des connaissances</i> .....	151
▶ Analyse protéomique des virus extracellulaires .....	151
▶ Analyse biochimique des nouvelles composantes virales d'HSV-1 ....	153
▶ Analyse protéomique préliminaire des capsides C nucléaires .....	154
<i>Perspectives de recherche</i> .....	155
▶ Protéomes des différents intermédiaires viraux d'HSV-1 .....	155
▶ Étude des interactions et de la dynamique du tégument .....	155
▶ Rôle du tégument dans la sortie nucléaire d'HSV-1 .....	156
▶ Effet de l'infection sur le protéome cellulaire .....	157
▶ Rôles des protéines cellulaires incorporées dans les virus .....	157

<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>163</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>XXIX</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales pathologies associées aux sous-familles des <i>Herpesviridae</i> .....	7
Tableau 2 : Quantification des capsides nucléaires .....	134
Tableau 3 : Protéines virales détectées par MS/MS dans les capsides C nucléaires d'HSV-1 .....	138
Tableau 4 : Protéines cellulaires détectées par MS/MS dans les capsides C nucléaires d'HSV-1 .....	141

### Article 1

TABLE 1: Viral content of extracellular virions.....	64
TABLE 2: MRM analysis .....	70
TABLE 3. Potential cellular proteins associated with extracellular virions identified by mass spectrometry .....	72

### Annexe

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

## Liste des figures

Figure 1 : Classification de l'ordre des <i>Herpesvirales</i> .....	5
Figure 2 : Les différentes phases de la latence chez HSV-1 .....	13
Figure 3 : Biogenèse des miARNs.....	15
Figure 4 : Structure et composition d'HSV-1 .....	17
Figure 5 : Organisation du génome d'HSV-1.....	18
Figure 6 : Mécanismes d'attachement et d'entrée d'HSV-1 .....	24
Figure 7 : Cascade d'expression des gènes viraux .....	26
Figure 8 : Modèle de la réplication de l'ADN d'HSV-1 .....	29
Figure 9 : Assemblage et maturation des capsides virales .....	30
Figure 10 : Capsides A, B et C par microscopie électronique .....	31
Figure 11 : Modèle luminal ou classique du transport d'HSV-1 .....	33
Figure 12 : Modèle des pores élargis du transport d'HSV-1.....	34
Figure 13 : Modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement du transport d'HSV-1.....	35
Figure 14 : Principe général d'analyse par spectrométrie de masse.....	40
Figure 15 : Détection de billes par cytométrie en flux.....	129
Figure 16 : Visualisation par microscopie à fluorescence du marquage de l'ADN viral à l'aide du SYTO 13.....	130
Figure 17 : Détection des capsides virales par cytométrie en flux .....	131
Figure 18 : Distribution des capsides nucléaires selon leur intensité de fluorescence.....	132
Figure 19 : Visualisation par coloration négative au microscope électronique des populations <i>No DNA</i> , <i>Low DNA</i> et <i>High DNA</i> obtenues par FACS.....	135
Figure 20 : Analyse par PCR des populations <i>No DNA</i> , <i>Low DNA</i> et <i>High DNA</i> obtenues par FACS.....	136
Figure 21 : Abondance et classification fonctionnelle des protéines cellulaires identifiées par MS/MS dans les capsides C nucléaires d'HSV-1 .....	142

Figure 22 : Abondance des protéines et des peptides viraux identifiés par MS/MS dans les capsides C nucléaires et les virus extracellulaires d'HSV-1 .....	145
Figure 23 : Comparaison de la composition en protéines virales des capsides C nucléaires avec celle des virions matures d'HSV-1 .....	149

### **Article 1**

Figure 1 – Kinetics of infection .....	59
Figure 2 – Purification scheme .....	60
Figure 3 – Analysis of extracellular virions by electron microscopy .....	61
Figure 4 – Analysis of purified virions by Silver stain and Western blot.....	62
Figure 5 –Western blotting analysis of the capsid .....	66
Figure 6 –Western blot analysis of the tegument.....	68
Figure 7 – Characterization of virions purified from BHK cells .....	71
Figure 8 – Schematic representation of mature extracellular virions .....	78

### **Article 2**

Figure 1. Western Blot analysis of de-tegmented extracellular HSV-1 virions .....	102
Figure 2. Western Blot analysis of de-tegmented extracellular HSV-1 virions treated with NEM.....	104
Figure 3. Evidence for the presence of ICP0 and ICP4 on HSV-1 nuclear capsids .....	106
Figure 4. Selective presence of ICP0 and ICP4 on A, B or C nuclear capsids. .	108

## Liste des abréviations

Abréviation	Désignation en français	Désignation en anglais
3-OS HS	3-O-sulfate d'héparane sulfaté	<i>3-O sulfated heparan sulfate</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique	<i>Deoxyribonucleic acid (DNA)</i>
ADNase	Désoxyribonucléase	<i>Deoxyribonuclease (DNase)</i>
AIHV-1	Herpèsvirus alcélaphin 1	<i>Alcelaphine herpesvirus 1</i>
ARN	Acide ribonucléique	<i>Ribonucleic acid (RNA)</i>
ARNase	Ribonucléase	<i>Ribonuclease (RNase)</i>
ARNm	ARN messager	<i>Messenger RNA (mRNA)</i>
av. J.-C.	Avant Jésus-Christ	<i>Before Christ</i>
DTT	Dithiothréitol	<i>Dithiothreitol</i>
dUTPase	Désoxyuridine triphosphatase	<i>Deoxyuridine triphosphatase</i>
EBV	Virus d'Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr virus</i>
EM	Microscopie électronique	<i>Electron microscopy</i>
ESCRT	Complexe de tri endosomal requis pour le transport	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
ESI	Ionisation par électrospray	<i>Electrospray ionization</i>
FACS	Tri par cytométrie en flux	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	Sérum fœtal bovin	<i>Fetal bovine serum</i>
FSC	Diffusion petits angles (diffraction → taille)	<i>Forward scatter</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
gB/gC/gD	Glycoprotéine B (ou C, D, etc.)	<i>Glycoprotein B (or C, D, etc.)</i>
Gène E	Gène précoce ou gène $\beta$	<i>Early gene</i>
Gène IE	Gène très précoce ou gène $\alpha$	<i>Immediate early gene</i>
Gène L	Gène tardif ou gène $\gamma$	<i>Late gene</i>
GFP	Protéine fluorescente verte	<i>Green fluorescent protein</i>
HCMV	Cytomégalovirus humain	<i>Human cytomegalovirus</i>
HHV-6A	Virus herpès humain de type 6A	<i>Human herpesvirus 6A</i>



<b>Abréviation</b>	<b>Désignation en français</b>	<b>Désignation en anglais</b>
HHV-6B	Virus herpès humain de type 6B	<i>Human herpesvirus 6B</i>
HHV-7	Virus herpès humain de type 7	<i>Human herpesvirus 7</i>
hpi	Heures post-infection	<i>Hours post-infection</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSV-1	Virus Herpès simplex de type 1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV-2	Virus Herpès simplex de type 2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
HveB	Nectine-1	<i>Herpes virus entry mediator B or nectin-1</i>
HveC	Nectine-2	<i>Herpes virus entry mediator C or nectin-2</i>
HVEM ou HveA	Médiateur de l'entrée du virus herpès simplex	<i>Herpes virus entry mediator or Herpes virus entry mediator A</i>
ICP	protéine de cellule infectée	<i>Infected cell protein</i>
ICTV	Comité international de taxonomie des virus	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IR <sub>L</sub>	Séquence répétée interne de la séquence unique longue	<i>Internal repeat long</i>
IR <sub>S</sub>	Séquence répétée interne de la séquence unique courte	<i>Internal repeat short</i>
JMEM	Milieu de culture d'Eagle modifié Joklik	<i>Joklik's modified Eagle's medium</i>
KSHV	Virus herpès associé au sarcome de Kaposi	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LAT	Transcrit associé à la latence	<i>Latency associated transcript</i>
m/z	Rapport masse/charge	<i>Mass-to-charge ratio</i>
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MCMV	Cytomégalovirus murin	<i>Murine cytomegalovirus</i>
MDa	Mégadalton (10 <sup>6</sup> daltons)	<i>Megadaltons (10<sup>6</sup> daltons)</i>
MES	Acide morpholino-4-éthane sulfonique	<i>4-Morpholineethanesulfonic acid</i>
MHV68	Virus herpès gamma murin	<i>Murine gammaherpesvirus 68</i>
miARN	MicroARN	<i>MicroRNA(miRNA)</i>
miARN	MicroARN	<i>MicroRNA (miRNA)</i>
MNE	Membrane nucléaire externe	<i>Outer nuclear membrane (ONM)</i>
MNI	Membrane nucléaire interne	<i>Inner nuclear membrane (INM)</i>

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation en français</b>	<b>Désignation en anglais</b>
MNT	Tampon MES, NaCl et Tris	<i>Buffer MES, NaCl and Tris</i>
MOI	Multiplicité d'infection	<i>Multiplicity of infection</i>
MP	Membrane plasmique	<i>Plasma membrane</i>
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem	<i>Tandem mass spectrometry</i>
MVB	Corp multivésiculaire	<i>Multivesicular body</i>
NEM	N-Éthylmaléimide	<i>N-Ethylmaleimide</i>
nt	Nucléotide	<i>Nucleotide</i>
ORF	Cadre de lecture ouvert	<i>Open reading frame</i>
ori	Origine de réplication	<i>Origin of replication</i>
ori <sub>L</sub>	Origine de réplication de la séquence unique longue	<i>Origin of replication of the unique long region</i>
ori <sub>S</sub>	Origine de réplication de la séquence unique courte	<i>Origin of replication of the unique short region</i>
pARNi	Petit ARN interférent	<i>Small interfering RNA (siRNA)</i>
pb / kpb	Paire de bases / kilopaire de bases	<i>Base pair / Kilo base pair</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne	<i>Polymerase chain reaction</i>
PILR $\alpha$	Récepteur $\alpha$ couplé à l'immunoglobuline de type 2	<i>Paired immunoglobulin-like type 2 receptor-<math>\alpha</math></i>
PM	Poids moléculaire	<i>Molecular weight (MW)</i>
pré-miARN	MicroARN précurseur	<i>Precursor microRNA (pre-miRNA)</i>
pri-miARN	MicroARN primaire	<i>Primary microRNA (pri-miRNA)</i>
PRV	Virus de la pseudorabie	<i>Pseudorabies virus</i>
pULX ou pUSX	Protéine codée par le gène U <sub>L</sub> X ou U <sub>S</sub> X	<i>Protein coded by U<sub>L</sub>X or U<sub>S</sub>X gene</i>
RE	Réticulum endoplasmique	<i>Endoplasmic reticulum (ER)</i>
RISC	Complexe d'inhibition induit par l'ARN	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RRV	Rhadinovirus de singe Rhésus	<i>Rhesus Monkey Rhadinovirus</i>
SD	Écart-type	<i>Standard Deviation</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
SNC	Système nerveux central	<i>Central nervous system</i>

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation en français</b>	<b>Désignation en anglais</b>
SSC	Diffusion grands angles (diffusion/réfraction/réflexion→ granulosité)	<i>Side scatter</i>
TGN	Réseau <i>trans</i> -golgien	<i>Trans-Golgi network</i>
TK	Thymidine kinase	<i>Thymidine kinase</i>
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TR <sub>L</sub>	Séquence répétée terminale de la séquence unique longue	<i>Terminal repeat long</i>
TR <sub>S</sub>	Séquence répétée terminale de la séquence unique courte	<i>Terminal repeat short</i>
U <sub>L</sub>	Séquence unique longue	<i>Unique long region</i>
U <sub>S</sub>	Séquence unique courte	<i>Unique short region</i>
vhs	<i>Virion host shutoff</i>	<i>Virion host shutoff</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine	<i>Human immunodeficiency virus (HIV)</i>
VP	Protéine virale	<i>Viral protein</i>
VZV	Virus varicelle-zona	<i>Varicella-zoster virus</i>



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



*L'important n'est pas de convaincre, mais de donner à réfléchir.*

**Bernard WERBER**

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.  
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.*

*Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne...*

*et personne ne sait pourquoi !*

**Albert Einstein**

La maladie est l'effort que fait la nature pour me guérir

**Carl Gustav Jung**





## Remerciements

La réalisation de cette thèse fut une merveilleuse occasion de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes qui m'ont guidée par leurs idées et leurs encouragements. L'occasion m'est ici offerte de faire leur éloge et de leur dire combien je leur suis redevable.

Au terme de ce doctorat, je tiens tout d'abord à exprimer ma sincère gratitude envers mon directeur de recherche, le **Dr. Roger Lippé**, qui m'a accueillie, encadrée et offert la chance d'évoluer au sein de son équipe. Il m'a aussi accordé la confiance et la liberté nécessaires à l'accomplissement de mes travaux, tout en y apportant son aide et ses précieux conseils et en gardant un œil critique et avisé. Sa patience et sa disponibilité ont permis des échanges passionnants qui ont sûrement été la clé de notre travail commun. Je le remercie aussi pour son enthousiasme contagieux envers la recherche, pour m'avoir attribué un sujet d'étude passionnant, pour avoir soutenu ma participation aux congrès et pour m'avoir aidée à développer ma rigueur et mon raisonnement scientifiques ainsi que mon sens critique.

Mes remerciements vont également au **Dr Michel Desjardins**, au **Dr. Louis Flamand**, à la **Dre. Nicole Leclerc** et à la **Dre. Angela Pearson** pour m'avoir fait l'honneur de participer en tant que membres de mon comité de parrainage et/ou de mon jury à cette soutenance de thèse. Le temps que vous m'avez accordé et les bons conseils que vous m'avez fournis ont grandement contribué à améliorer la qualité de ce document.

Je souhaite aussi remercier plusieurs personnes pour leur professionnalisme et leur généreuse aide technique dans mes recherches : **Johanne Duron**, pour toutes les commandes, les nombreux stocks de virus, ton soutien moral et notre intérêt partagé pour le plein-air, la nature et le sport ; **Ginette Guay**, pour ton implication autant professionnelle que

personnelle et pour avoir partagé avec moi ton expertise en microscopie électronique ainsi que **Michel Lauzon** et **Diane Gingras** pour votre précieuse collaboration en microscopie électronique. Merci aussi à **Claude Gauthier** pour son talent de graphiste, à **Daniel Boismenu**, **Marcos Di Falco**, **Nathalie Hamel**, **Sylvie LaBoissière** et **Line Roy** de la plateforme de protéomique de l'Université McGill et du Centre d'innovation Génome Québec ainsi qu'à **Danièle Gagné** et **Gaël Dulude** de la plateforme de cytométrie en flux de l'IRIC pour leur collaboration et leur expertise.

Merci également au personnel administratif (passés et présents) du **Département de pathologie et biologie cellulaire**, de la **Faculté de médecine** et du **Programme en sciences biomédicales** qui ont tous contribué à leur façon à un moment ou à un autre à la poursuite de mes études graduées.

Je tiens aussi à souligner et à remercier l'incroyable soutien que m'ont offert mes collègues de travail tout au long de mon doctorat et avec qui la vie au laboratoire ne fut que plus agréable : les « anciens » qui m'ont initiée à mon projet et à plusieurs techniques : **Geneviève**, **Sophie**, **Gaudeline** et **Jie** ainsi que **Pascal**, **Constantina** et **Sénami** pour nos nombreux échanges ; les membres actuels : **Yordanka** pour les conversations qui accompagnaient nos retours à la maison en métro, **Camille** (et tous tes petits amis) pour ta bonne humeur qui contribue à la bonne ambiance du laboratoire, **Imane** pour les bonnes pâtisseries offertes et **Daniel** « The Golden Boy » pour nos échanges plus ou moins scientifiques autour d'une bière.

J'ai une dette particulière aussi envers mes amis. **Isabelle**, ma Zabou, tu es une amie en or sur laquelle je peux toujours compter malgré la distance qui nous sépare. Mes amis de Québec : **Marie-Eve**, **Pablo** et **Yannik** pour votre amitié, votre ouverture d'esprit et pour tous les inoubliables moments passés en votre compagnie.

Je ne pourrais passer sous silence l'irremplaçable et inconditionnel support et amour des membres de ma famille. J'adresse donc un merci honorifique à mon père **Patrick**, un papa formidable, pour son aide et son talent artistique mais surtout pour m'avoir toujours encouragée à faire ce que j'aime dans la vie ; à mon grand frère **Frédéric**, pour la chance incroyable que j'ai de t'avoir, pour être toujours présent malgré les années que l'on a passées loin l'un de l'autre, pour notre complicité, pour nos longues conversations diurnes et parfois nocturnes et pour avoir toujours cru en moi ; j'ai aussi une tendre pensée pour ma demi-sœur **Olivia** et ma nièce **Norah**, mes deux rayons de soleil qui remplissent mon cœur de leur joie de vivre et de leur amour. Je ne peux aussi m'empêcher d'évoquer, ma maman **Anick**, cet ange gardien qui reste à mes côtés et me guide chaque jour. Vous, tous, aviez été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Sans vous, je ne serais probablement pas à ce stade-ci de ma vie. Vous êtes pour moi, de façon non intentionnelle, ma motivation, ma détermination à toujours donner le meilleur de moi.

Mon dernier et plus fort remerciement est dédié à mon mari, **David**, pour l'amour qu'il m'a témoigné pendant toutes ces années. Je te remercie d'être entré dans ma vie, de remplir ma tête de magnifiques souvenirs où chaque instant passé avec toi devient inoubliable et de m'avoir épaulé autant dans les moments heureux que dans les moments difficiles. Je t'aime de tout mon cœur.

Finalement, c'est grâce à toutes les personnes précédemment citées que j'ai réussi à finir ce long et beau projet de doctorat et que je continuerai avec succès les futurs défis que la vie me réserve car cette thèse n'est pas seulement un aboutissement mais plutôt un nouveau départ !



## INTRODUCTION

Aussi petits soient-ils, les virus ont, de par leur impact majeur sur toutes les formes de vie, façonné l'histoire et l'évolution de leurs hôtes. L'étude des virus et de leur cellule hôte a contribué de manière significative à des découvertes extraordinaires en élucidant de nouveaux concepts et outils à la base de nos connaissances les plus fondamentales en génétique, en biologie cellulaire et moléculaire et en médecine. Ainsi, les virus nous côtoient depuis des milliers d'années et nous nous sommes tellement bien adaptés à certains d'entre eux, et réciproquement, que de nombreux virus comme le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1), nous infectent à notre insu. Toutefois, malgré sa discrétion apparente, HSV-1 est à l'origine de différentes pathologies dont les lésions orolabiales, communément appelées feux sauvages, ainsi que de maladies plus graves telles que les kératites et les encéphalites. Le désir de comprendre et de contrôler de telles maladies devient alors une des raisons principales menant à l'étude du cycle viral d'HSV-1. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse de doctorat, intitulée caractérisation de la migration d'HSV-1 par protéomique, reflètent clairement cet intérêt scientifique. Par contre, avant de plonger dans ce sujet passionnant, il convient d'amener ce projet en introduisant brièvement les principales caractéristiques et propriétés d'HSV-1 et d'exposer clairement les objectifs de recherche. Afin d'appuyer ces objectifs, les résultats publiés ou non au cours de cette étude seront présentés. Finalement, une discussion générale incluant quelques suggestions de perspectives de recherche découlant des résultats obtenus au cours de ce projet de doctorat et une brève conclusion cloront cette thèse.

# 1 - Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1)

## A - Historique

Personne ne sait précisément quand et par qui a été découvert le virus herpès. Toutefois, en 2500 avant Jésus-Christ (av. J.-C), les premières descriptions de plaies ressemblant à celles causées par l'herpès ont été mises en évidence sur des tablettes sumériennes ainsi que dans l'un des plus anciens traités médicaux soit le Papyrus Ebers en 1500 av. J.-C. (1, 2). Le terme « herpès » d'origine grecque et signifiant « rampant » fut, quant à lui, utilisé pour la première fois par Hippocrate pour décrire des lésions se propageant à la surface de la peau (3). Plusieurs autres faits historiques ont ensuite été rapportés dont celui de la tentative de l'empereur romain Tibère de limiter la propagation de ce qui devait être l'herpès labial en proscrivant les baisers durant les cérémonies et les rituels publics (4). C'est ensuite au tour de l'écrivain William Shakespeare, dans sa célèbre pièce de *Roméo et Juliette*, de sous-entendre la présence de lésions herpétiques sur les lèvres de Juliette (5). En 1736, John Astruc, en tant que médecin du roi Louis XV, décrit pour la première fois, grâce à l'étude des prostituées sous surveillance médicale, la relation entre l'herpès et les organes génitaux dans son traité sur les maladies vénériennes intitulé *De Morbis Veneris* (6).

Au 19<sup>ème</sup> siècle, des définitions plus rigoureuses et contemporaines de cette maladie émergent et le terme « herpès simplex » fait son apparition (2). En 1808, Robert Willan et son collègue Thomas Bateman sont ainsi les premiers à différencier l'herpès labial de l'herpès génital (7). Toutefois, il faudra attendre près d'un siècle, soit en 1893 pour que la transmission du virus d'un individu à l'autre soit mise en évidence par le dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal tandis que le caractère infectieux de l'herpès nous sera révélé qu'en 1919 par Loewenstein (2).

Dès le 20<sup>ème</sup> siècle, les recherches s'intensifient. En 1912, Wilhelm Grüter poursuit ses travaux sur des modèles animaux et découvre que l'agent responsable des infections herpétiques peut croître sur des embryons de poulets et de lapins et qu'il peut aussi se transmettre d'un lapin à l'autre (2, 8). En 1938, Robert Doerr met en évidence la production endogène de virus sous l'influence de certains stimuli (2, 9). Cette découverte est immédiatement suivie par celle de Burnet et Williams qui, en 1939, publient un article décrivant les propriétés de persistance et de latence du virus de l'herpès (10).

Dans les années 1950, le développement de la culture cellulaire et l'étude du système nerveux central (SNC) permet l'isolation d'autres membres de la famille des herpèsvirus. Cette percée met alors en évidence la capacité du virus à causer d'autres maladies telles que les encéphalites, les kératites et l'herpès néonatal (11-15). Dès lors, en 1962, le Dr. Karl Schneweis découvre le fruit de millions d'années d'évolution et révèle l'existence de deux sérotypes différents : le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui affecte principalement la région labiale et le virus herpès simplex de type 2 (HSV-2) qui est associé aux organes génitaux (16).

Dans les années 1960 et 1970, les bases fondatrices de la recherche sur le virus herpès sont posées et des découvertes clés sont faites. Parmi celles-ci, on retrouve la caractérisation de l'architecture et de la taille de la particule virale (17-19), la description de la structure complexe du génome viral (20-23) ainsi que la mise en évidence de la grande variété de protéines qui composent le virus (24, 25).

La campagne médiatique entourant l'herpès dans les années 80 combinée au développement de la biochimie, de l'immunologie et de la biologie moléculaire permettent une collecte d'informations importantes concernant entre autres la fonction et la régulation de l'expression des gènes viraux ainsi que l'interaction entre les protéines virales et les protéines cellulaires (26, 27).

Au cours des vingt dernières années, la perception des virus comme agents étiologiques a considérablement évolué. En effet, grâce à l'avènement du génie génétique, la communauté scientifique prend graduellement conscience du potentiel des herpèsvirus en tant qu'outils thérapeutiques. Ces virus peuvent ainsi potentiellement être utilisés comme agents prophylactiques, vecteurs pour la thérapie génique ou encore comme virus oncolytiques (2, 28-32). D'agents responsables d'un mal honteux, les virus herpétiques deviennent peu à peu des alliés incontournables à la recherche biomédicale. Toutefois, comme pour toute approche thérapeutique, il convient de connaître parfaitement l'outil utilisé. Par conséquent, l'étude approfondie des virus et de leurs interactions avec les cellules qu'ils infectent devient alors indispensable afin d'éviter tout effet non désiré ou du moins de les limiter.

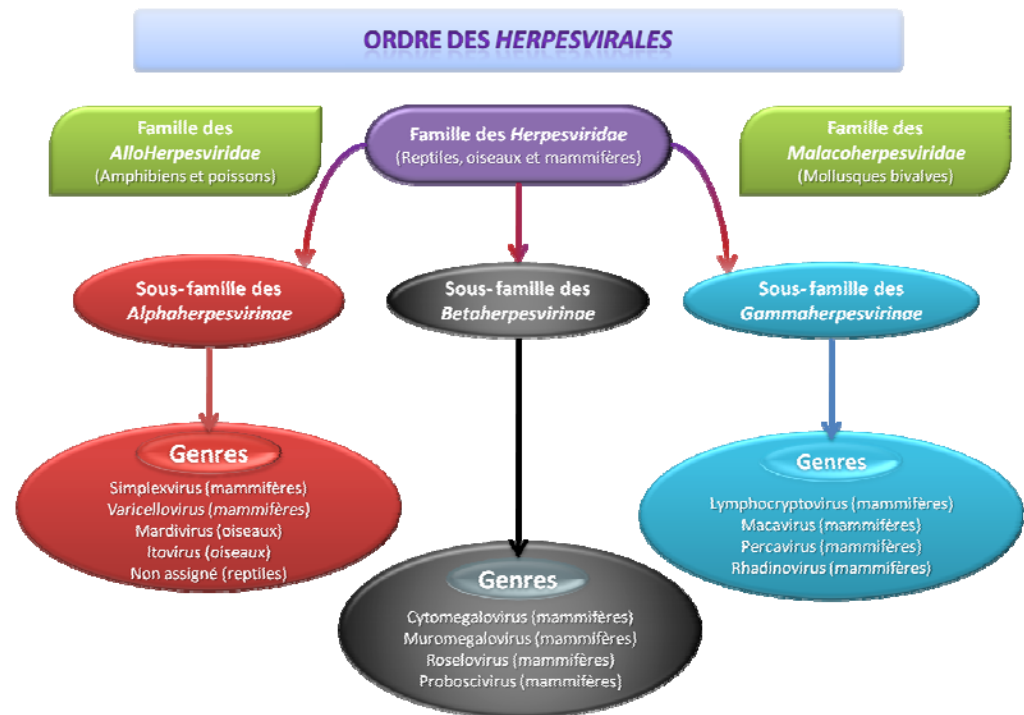
## **B - La famille des *Herpesviridae***

Historiquement, la classification de la famille *Herpesviridae*, dont fait partie HSV-1, était basée uniquement sur quatre caractéristiques structurales communes : un cœur d'ADN double brin linéaire de 124 à 230 kilopaires de bases (kpb), une capsidie icosaédrale d'environ 100 nm protégeant l'ADN, une couche de protéines entourant la capsidie et une enveloppe bilipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales (28, 33).

Récemment, l'accumulation de données par séquençage d'ADN a mené à la révision de cette classification par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV). Ainsi, un nouvel ordre nommé *Herpesvirales* a été créé et contient dorénavant trois familles : les *Alloherpesviridae* regroupant les virus d'amphibiens et de poissons, les *Malacoherpesviridae* qui n'inclut qu'un virus infectant les mollusques bivalves et la famille révisée des *Herpesviridae* ne comprenant maintenant plus que les virus de reptiles, d'oiseaux et de mammifères (34) (Figure 1).



Étant donné le nombre important de membres de la famille *Herpesviridae* et la grande diversité de leurs hôtes, cette famille a été subdivisée selon les propriétés biologiques des virus en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*.



**Figure 1 : Classification de l'ordre des *Herpesvirales***

Les *Alphaherpesvirinae* regroupent des virus capables d'infecter une large gamme d'hôtes. Ils se répliquent et se propagent rapidement en culture cellulaire. De plus, ils sont capables d'induire une lyse efficace des cellules infectées et d'établir une infection latente principalement, mais non exclusivement, dans les ganglions sensoriels. Cette sous-famille comprend les genres *Simplexvirus* et *Varicellovirus* qui infectent les mammifères, les genres *Mardivirus* et *Itovirus* qui ciblent les oiseaux ainsi que des virus de reptiles non catégorisés (28, 33).

Les *Betaherpesvirinae* se caractérisent plutôt par leur nombre restreint d'hôtes. Leur cycle répliatif est aussi plus long en culture cellulaire et les cellules deviennent souvent hypertrophiées (cytomégalie). Ces virus peuvent également établir la latence et ce, principalement dans les glandes sécrétoires, les cellules lymphoréticulaires et les cellules rénales. Cette sous-famille est divisée en quatre genres principaux qui infectent les mammifères : les *Cytomegalovirus*, les *Muromegalovirus*, les *Proboscivirus* et les *Roseolovirus* (28, 33).

Les *Gammaherpesvirinae* n'ont, quant à eux, qu'un nombre d'hôtes très restreint. En culture cellulaire, tous les membres peuvent se répliquer dans les cellules lymphoblastiques alors que seuls quelques-uns peuvent causer des infections lytiques et ce, seulement dans certaines lignées de cellules épithéliales et fibroblastiques. Les virus de cette sous-famille infectent les lymphocytes B ou T ainsi que les cellules endothéliales et induisent des infections latentes dans les tissus lymphoïdes. Certains de ces virus possèdent également un pouvoir oncogène. Les quatre principaux genres de cette sous-famille, qui ont pour hôte les mammifères, sont les *Lymphocryptovirus*, les *Macavirus*, les *Percavirus* et les *Rhadinovirus* (28, 33).

Parmi les différents pathogènes qui composent cette grande famille des *Herpesviridae*, seuls huit d'entre eux sont strictement associés à des pathologies humaines (Tableau 1). Chez les *Alphaherpesvirinae*, on retrouve les deux virus herpès simplex HSV-1 et HSV-2 ainsi que le virus varicelle-zona (VZV) qui cause, comme son nom l'indique, la varicelle et le zona. Dans la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, il y a le cytomégalovirus humain (HCMV) et les virus herpès humains de type 6A, 6B et 7 (HHV-6A, HHV-6B et HHV-7) qui sont associés à la roséole. Finalement, en ce qui concerne les *Gammaherpesvirinae*, ce sont le virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV) responsable de la mononucléose et pouvant causer divers lymphomes qui ont été identifiés (28, 33).

**Tableau 1 : Principales pathologies associées aux sous-familles des *Herpesviridae***

SOUS-FAMILLE GENRE	NOM COMMUN (abréviation)	PRINCIPALES PATHOLOGIES
<b><i>Alphaherpesvirinae</i></b>		
Simplexvirus	Virus Herpès simplex 1 (HSV-1)	Lésions orolabiales, oculaires et encéphalites
	Virus Herpès simplex 2 (HSV-2)	Lésions génitales et anales
Varicellovirus	Virus varicelle-zona (VZV)	Varicelle et zona
<b><i>Betaherpesvirinae</i></b>		
Cytomegalovirus	Cytomégalovirus (HCMV)	Rétinites, anomalies congénitales et rejet de greffes
Roselovirus	Herpèsvirus humain 6 (HHV6A et HHV6B)	Roséole, rejet de greffes et encéphalites
	Herpèsvirus humain 7 (HHV7)	Roséole, syndrome de fatigue chronique et pityriasis rosé de Gibert
<b><i>Gammaherpesvirinae</i></b>		
Lymphocryptovirus	Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt et carcinome nasopharyngé
Rhadinovirus	Virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV)	Sarcome de Kaposi, maladie de Castleman et lymphome à effusion primaire

*D'après Fields Virology (35)*

## C - Pathologies et symptômes causés par HSV-1

HSV-1 est responsable de plusieurs maladies dont la sévérité varie d'asymptomatique à létale (28, 36, 37). Bien qu'une grande proportion des individus infectés ne développe pas de symptômes, environ 40 % de cette population subit des épisodes de récurrence. Selon les individus, cette réactivation peut survenir à une fréquence se chiffrant en termes de mois ou d'années. La gravité des pathologies causées par HSV-1 peut toutefois avoir un impact considérable sur la vie des personnes atteintes.

### ➤ Herpès mucocutané

La manifestation physique la plus courante causée par HSV-1 est l'herpès labial, communément appelé bouton de fièvre ou feu sauvage (28, 33). La primo-infection est généralement asymptomatique. Toutefois, s'il y a des symptômes, ceux-ci sont souvent plus prononcés chez le jeune enfant. Les lèvres ainsi que les muqueuses de la cavité buccale et des gencives peuvent alors être atteintes. On parle donc d'une gingivo-stomatite. La réactivation d'HSV-1 se manifeste ensuite par l'apparition d'un bouquet de vésicules

douloureuses, le plus souvent sur et autour des lèvres. L'apparition du feu sauvage est habituellement précédée d'un prodrome associé à un picotement, à de la chaleur et à de la douleur probablement dus à la réplication précoce du virus dans les terminaisons nerveuses de l'épiderme ou de la muqueuse. En plus de causer des lésions labiales, HSV-1 peut aussi se manifester sous de multiples formes telles que l'herpès génital, le panaris herpétique (infection des mains), l'herpès du gladiateur chez les sportifs, l'eczéma herpétique, l'ulcère, l'amygdalite ainsi que diverses infections du système digestif (pharyngite et œsophagite) et respiratoire (infections de la trachée et des bronches) (38, 39).

#### ➤ Herpès oculaire

Parmi les troubles plus graves causés par HSV-1, on retrouve l'herpès oculaire. Les infections affectant l'appareil visuel peuvent causer des inflammations et des lésions au niveau de la paupière (blépharite), de la conjonctive (conjonctivite), de la cornée (kératite) et même de l'iris et du cristallin (iridocyclite) (40, 41). Les récurrences ne touchent typiquement qu'un seul œil et leur fréquence est habituellement similaire à celle des infections orolabiales. Des récurrences fréquentes peuvent cependant entraîner une détérioration cornéenne nécessitant une greffe de la cornée (28, 39). Cette maladie potentiellement grave peut conduire à la cécité en cas de récurrence. C'est d'ailleurs la première cause de cécité d'origine infectieuse dans les pays industrialisés (42, 43).

#### ➤ Infections du système nerveux central

D'autres manifestations sérieuses d'HSV-1 sont les infections du SNC pouvant mener à différents troubles neurologiques graves et même à la mort. Parmi ces infections, on retrouve la myélite, la radiculite, la méningite et l'encéphalite (44, 45). Les symptômes annonciateurs de cette dernière sont de

la fièvre, des maux de tête, une altération de l'état de conscience, des désordres mentaux et des convulsions. En présence de ces symptômes, si aucun traitement n'est apporté rapidement au patient, le taux de mortalité peut atteindre 70% (46). L'atteinte neurologique progressive semble résulter d'une accumulation des dommages causés par les réactivations fréquentes du virus dans le cerveau (47).

### ► Paralysie de Bell et maladie d'Alzheimer

HSV-1 a également été incriminé en tant qu'agent étiologique de plusieurs autres maladies du SNC dont la Paralysie de Bell et la maladie d'Alzheimer. La paralysie de Bell est un type de paralysie faciale impliquant le nerf crânien facial et empêchant ainsi le contrôle adéquat des muscles faciaux concernés. Bien que la cause exacte de cette paralysie reste inconnue, une hypothèse virale repose sur le fait qu'HSV-1 soit détecté dans le nerf facial de plus de 60% des patients atteints de cette maladie (48). De plus, il s'avère que les patients atteints de la paralysie de Bell sont plus sujets aux réactivations fréquentes d'HSV-1 (49). Ceci suggère donc qu'HSV-1 pourrait être impliqué dans la pathogenèse de cette maladie. La maladie d'Alzheimer est, quant à elle, une maladie neurodégénérative qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. Il s'agit en fait de la forme de démence la plus commune (50). La recherche actuelle sur cette maladie s'attarde principalement à la formation et à l'accumulation de plaques de  $\beta$ -amyloïde entre les neurones ainsi qu'aux agrégats de protéines tau formant les dégénérescences neurofibrillaires à l'intérieur des neurones (51-53). Même s'il reste encore beaucoup à apprendre sur les causes de cette maladie, certaines études ouvrent la porte à un possible rôle d'HSV-1 dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Dans un premier temps, les scientifiques ont émis l'hypothèse qu'un déséquilibre important de l'expression des protéines de l'hôte induite lors de l'infection par HSV-1 pouvait mener au

déclenchement de signaux pro-inflammatoires et apoptotiques conduisant alors à une dégénérescence prématurée des cellules cérébrales (54-56). Dans un second temps, la forte homologie entre certaines protéines virales et des protéines cellulaires impliquées dans la formation de plaques de  $\beta$ -amyloïde ou d'agrégats de protéines tau pourraient aussi potentiellement contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer (57-60). L'approfondissement des connaissances au sujet d'HSV-1 pourrait donc permettre d'éclaircir la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

### ➤ Herpès néonatal

L'infection herpétique néonatale est presque invariablement symptomatique et fréquemment fatale pour le nouveau-né. La transmission de l'infection *in utero* est plutôt rare, tandis que l'infection au cours du passage du fœtus par les voies génitales de la mère infectée est plus fréquente. L'herpès néonatal est habituellement dû à HSV-2, mais une infection à HSV-1 entraîne des formes disséminées évolutives plus graves qu'avec HSV-2. L'infection disséminée possède le moins bon pronostic et ce, malgré l'initiation précoce de la thérapie antivirale (33, 61-63).

### ➤ Herpès et patients immunodéficients

Les patients dont le système immunitaire est compromis à cause d'une immunothérapie (greffe et cancer), d'une maladie associée (SIDA ou maladie congénitale) ou d'une malnutrition sont plus à risque de développer des infections primaires et récurrentes sévères à HSV-1. De plus, puisque le virus persiste de façon permanente chez l'hôte, il y a un risque plus élevé d'infections concomitantes par des pathogènes multiples tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (64-71). Par exemple, il existe une forte association entre les lésions génitales herpétiques majoritairement dues à HSV-2, mais pouvant aussi être causées par HSV-1, et la présence du VIH

(67, 69, 72, 73). En effet, la rupture de la barrière épithéliale et l'agrégation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> engendrée par les ulcérations herpétiques rendent la porte d'entrée au VIH plus accessible (67, 70, 73). De plus, l'infection par le VIH intensifie la fréquence, la sévérité et la durée des infections actives des virus herpès simplex (67, 74, 75). Certains gènes d'HSV-1 (ICP0, ICP27, U<sub>S</sub>11 et VP16) augmenteraient même la transcription des gènes du VIH (76-82). Ainsi, de façon réciproque, le traitement de l'une des infections peut réduire la gravité des effets de l'autre infection.

## **D - Traitements et prévention**

Depuis le milieu des années 1920, le développement de vaccins pour prévenir l'infection par HSV-1 suscite l'intérêt des scientifiques. Ces recherches ont ainsi permis, à partir des années 1970, de développer plusieurs agents antiviraux à la base du traitement clinique actuel (2). Même si ces produits ne permettent pas d'éliminer le virus de l'organisme, ils soulagent tout de même la douleur en atténuant la sévérité des symptômes et limitent la propagation des lésions en diminuant la production active de nouveaux virus et en restreignant sa transmission.

Parmi les agents antiviraux disponibles sur le marché, notons, entre autres, l'Aciclovir, le Penciclovir, le Ganciclovir, des analogues nucléosidiques, le Cidofovir, un analogue nucléotidique ainsi que le Foscarnet, un analogue de pyrophosphates (33, 83). Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques ciblent tous l'activité de l'ADN polymérase virale. Les analogues nucléosidiques subissent une première phosphorylation sélective via la thymidine kinase virale plutôt que par celle de l'hôte, puis deux autres phosphorylations par des kinases cellulaires. Les analogues nucléotidiques sont, quant à eux, déjà monophosphatés et ne requiert donc qu'une di-phosphorylation par les kinases cellulaires. Tant pour les analogues nucléosidiques que pour les analogues nucléotidiques, la phosphorylation fournit alors un nucléotide triphosphaté qui

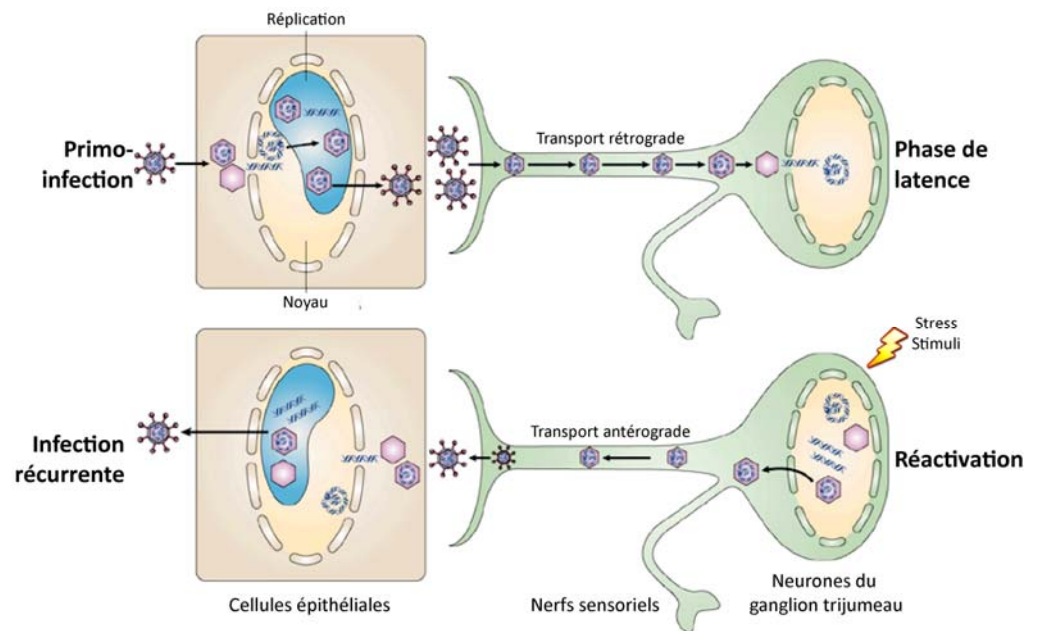
entre compétition avec un des substrats de l'ADN polymérase virale. Suite à son insertion irréversible dans l'ADN en cours de répllication, la synthèse de l'ADN viral prend fin et la multiplication virale est bloquée. Le Foscarnet, quant à lui, inhibe directement la polymérase virale et, par le fait même, la répllication du virus en bloquant sélectivement le site de liaisons des pyrophosphates sur l'ADN polymérase virale. D'autres mécanismes d'action ont aussi été envisagés pour lutter contre le virus dont l'inactivation de la ribonucléotide réductase (84) ou du complexe hélicase-primase (85-87), l'inhibition des protéases virales (88) ou de la glycosylase ADN-uracil (89) ou encore le blocage de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (90). Tous les mécanismes thérapeutiques décrits ci-haut agissent au niveau des protéines virales ce qui rend les médicaments spécifiques aux cellules infectées et empêchent ainsi les dommages collatéraux aux cellules saines. Toutefois, bien qu'ils parviennent à réduire les symptômes lors des épisodes de réactivation du virus, aucun de ces agents n'entraînent une guérison complète puisqu'aucun n'est capable de cibler les virus en phase latente. De plus, à long terme, l'utilisation de ces drogues exerce une pression sélective favorisant l'émergence spontanée de virus mutants résistants aux médicaments disponibles (28, 91).

Afin de parvenir à une guérison complète, il s'avère donc primordial de parfaire nos connaissances sur le fonctionnement d'HSV-1 et sur ses interactions avec son hôte à l'aide de la recherche fondamentale. De plus, le développement de médicaments antiherpétiques devrait aussi s'attarder à la persistance du virus en identifiant les protéines virales et cellulaires essentielles au maintien de la latence. Tout cela pourrait alors permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques menant à l'élaboration de nouveaux antiviraux, voire à la mise au point d'un vaccin.



## E - Latence d'HSV-1

Tous les virus de la famille *Herpesviridae* partagent une propriété biologique remarquable : la latence (63, 92). De façon théorique, la latence peut se définir comme étant une infection durant laquelle le génome viral est présent sous un état non réplcatif dans une cellule infectée et de laquelle il peut se réactiver de façon intermittente (93). La latence d'HSV-1 peut être divisée en trois phases : l'établissement, le maintien et la réactivation (Figure 2) (28, 94).



**Figure 2 : Les différentes phases de la latence chez HSV-1**

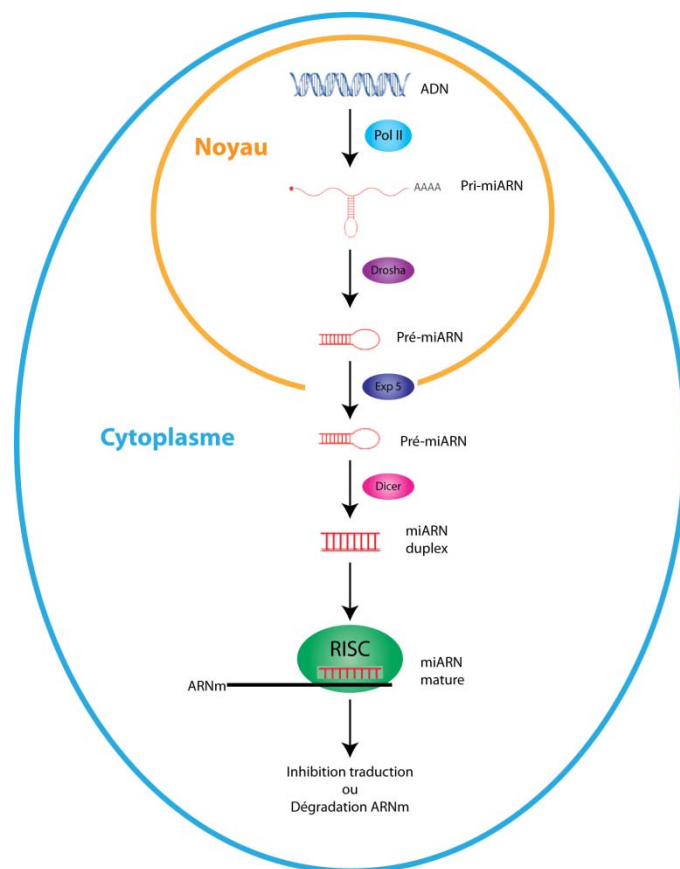
La primo-infection des cellules épithéliales de la muqueuse buccale donne lieu à une production de virus qui migrent par transport rétrograde jusqu'aux neurones du ganglion trijumeau. La latence est alors établie et le génome viral persiste sous forme épisomale. Sous l'effet de divers stimuli, la réactivation est amorcée et permet la production de nouveaux virus qui retournent par transport antérograde vers les cellules épithéliales proches du site de la primo-infection. Image adaptée de Knipe et al. (95).

L'établissement de la latence est précédé d'une primo-infection durant laquelle le virus infecte généralement les cellules épithéliales de la muqueuse

buccale. Dès lors, les virus nouvellement produits pénètrent dans les neurones sensoriels innervant l'épithélium des muqueuses. Ils migrent ensuite par transport rétrograde axonal dans le nerf trijumeau jusqu'aux corps cellulaires des neurones du ganglion trijumeau (aussi appelé ganglion de Gasser). C'est à cet endroit que la latence virale s'installe et, par conséquent, le ganglion trijumeau devient donc un réservoir naturel d'HSV-1 (63, 93, 96, 97).

Durant la phase de latence, le génome viral persiste sous forme épisomale (95, 98, 99). De plus, étant associé à de nombreuses histones hypoacétylées, le génome très condensé devient alors incapable de se répliquer et l'expression des gènes en protéines est réprimée (100-102). Malgré l'absence de répllication et de traduction virale, une activité transcriptionnelle est maintenue sur le gène LAT (103-105). Cette région transcriptionnelle complexe conduit à la synthèse d'un ARN polyadénylé non codant de 8.3kb (106-109). Ce transcrit primaire, peu abondant et instable, est rapidement épissé en un ARN exonique instable de 6.3kb et en un intron stable et abondant de 2kb (105-107, 109, 110). Ce dernier peut alors subir un second épissage générant un nouvel intron de 1.5kb (109, 111-113). Ces trois ARNs (8.3kb, 2kb et 1.5kb) sont nommés LATs (transcrits associés à la latence). D'autres transcrits issus du gène LAT ont aussi été identifiés dont un transcrit en amont (UOL), un transcrit de 0.7kb débutant en amont du gène LAT et se terminant dans le gène LAT, trois transcrits antisens (AL, AL2 et AL3) ainsi que deux petits ARNs (LAT sRNA1 et LAT sRNA2) (109, 113-115). De plus, récemment, il a été mis en évidence que le gène LAT code aussi pour huit microARNs (miARNs) d'environ 22 nucléotides (nt), soit miR-H1 à miR-H8 (107, 116-122). La biogenèse de ces miARNs non immunogéniques commence par la synthèse de longs ARNs primaires (pri-miARNs) à partir du gène LAT via l'ARN polymérase II. Ces pri-miARNs possèdent au moins une structure en épingle à cheveux reconnue par une ARNase III nommée Drosha qui clive les extrémités 5' et 3' pour former un pré-miARN. Celui-ci, constitué de 60 à 80 nt en épingle à cheveux,

est rapidement exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5, une GTPase Ran. Ce pré-miARN est ensuite reconnu par une ARNase III cytoplasmique, appelée Dicer, qui clive la boucle de la structure en épingle à cheveux pour générer un petit ARN double brin. Un des brins de ce duplex est finalement incorporé dans le complexe RISC pour former un miARN mature (107, 113, 117-119, 122-125).



### Figure 3 : Biogenèse des miARNs

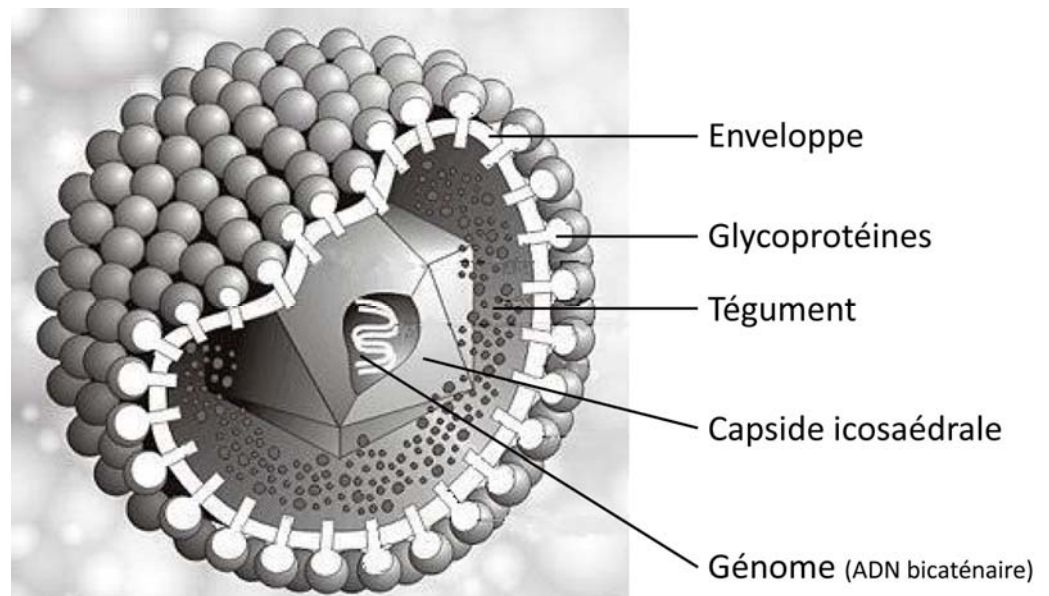
*Le gène est transcrit via l'ARN polymérase II (Pol II) en ARN possédant une ou plusieurs structures en épingle à cheveux et est appelé pri-miARN. Celui-ci est alors reconnu par l'ARNase III nommée Drosha qui clive les extrémités 5' et 3' pour former un pré-miARN. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 (Exp 5). Le pré-miARN est finalement reconnu par une ARNase III cytoplasmique (Dicer) qui clive la structure en épingle à cheveux et ainsi forme un miARN duplex. Un des brins de ce duplex est finalement incorporé dans le complexe RISC pour former un miARN mature pouvant inhiber la traduction ou dégrader les ARNm de la protéine ciblée. Image adaptée de Cullen (126).*

Ces miARNs ont alors, entre autres, la capacité de réguler négativement, par un mécanisme antisens, les ARN messagers (ARNm) des gènes viraux tels qu'ICP0, ICP4 et ICP34.5 (108, 113, 117-119, 122, 127-131). Il n'est donc pas surprenant que plusieurs fonctions soient attribuées à la complexité transcriptionnelle du gène LAT telles que l'établissement et le maintien de l'état de latence, la réactivation lorsque nécessaire mais aussi la virulence et la protection des neurones face à l'apoptose pour assurer leur survie (109, 113, 132-135).

La réactivation peut avoir lieu à la suite de divers stimuli tels qu'un traumatisme local au site de l'infection primaire, un stress émotionnel ou physique, une exposition aux rayons ultraviolets, une immunodéficience, un changement hormonal, le froid, la fatigue, etc (28, 136-139). Certaines protéines virales semblent aussi impliquées dans la réactivation d'HSV-1 notamment pour modifier la configuration du génome qui doit passer de sa forme épisomale condensée à une forme linéaire non nucléosomique mais aussi pour amorcer l'expression et la synthèse des protéines virales nécessaires à la production de nouveaux virus (140-145). Une fois la réactivation amorcée, les virus infectieux nouvellement produits voyagent par transport antérograde axonal du ganglion trijumeau jusqu'aux tissus périphériques des muqueuses ayant servi de site d'entrée du virus lors de la primo-infection (146-151). Cette nouvelle infection due à la réactivation peut toutefois être associée ou non à des symptômes.

## 2 - Structure d'HSV-1

Tout comme les autres membres de la famille des *Herpesviridae*, HSV-1 se caractérise par quatre éléments distincts : un cœur d'ADN double brin linéaire, une capsidie icosaédrale d'environ 100 nm protégeant l'ADN, une couche de protéines entourant la capsidie et une enveloppe bilipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales (28, 33) (Figure 4). Passons donc maintenant en revue chacune de ces caractéristiques morphologiques.



**Figure 4 : Structure et composition d'HSV-1**

Le virus *Herpès simplex de type 1* est constitué de quatre structures principales : un génome d'ADN bicaténaire linéaire, une capsidie icosaédrale d'environ 100 nm protégeant l'ADN, une couche protéique appelée tégument entourant la capsidie et une enveloppe bilipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales. Image adaptée de Dr. Marko Reschke (<http://www.biografix.de/>).

## A - Génome viral

Le génome d'HSV-1, séquencé en 1988, est composé d'un ADN bicaténaire linéaire de 152 kpb (152, 153) (Figure 5). Cet ADN est constitué de deux segments liés de façon covalente, soit une séquence unique longue ( $U_L$ ) et une séquence unique courte ( $U_S$ ). Ces segments sont flanqués de séquences nommées  $TR_L$  et  $TR_S$  pour les séquences répétées terminales et  $IR_L$  et  $IR_S$  pour les séquences répétées internes de chacun des segments  $U_L$  et  $U_S$  respectivement (20, 154, 155). Dans la région  $U_L$ , les séquences répétées sont aussi désignées  $ab$  ( $TR_L$ ) et  $b'a'$  ( $IR_L$ ) et dans la région  $U_S$ , les séquences répétées sont  $ca$  ( $TR_S$ ) et  $a'c'$  ( $IR_S$ ) (155). Le génome viral contient 3 origines de réplication nommées selon leur localisation dans les segments  $U_L$  et  $U_S$ , soit  $ori_L$  et  $ori_S$ .  $ori_L$  se trouve en une seule copie dans le segment  $U_L$ , alors qu' $ori_S$ , située dans une séquence répétée du segment  $U_S$ , est présente en deux copies (155-159).



**Figure 5 : Organisation du génome d'HSV-1**

*Le génome d'HSV-1 est constitué d'une séquence unique longue ( $U_L$ ) et d'une séquence unique courte ( $U_S$ ). Ces segments sont flanqués de séquences nommées  $TR_L$  ( $ab$ ) et  $TR_S$  ( $ca$ ) pour les séquences répétées terminales et  $IR_L$  ( $b'a'$ ) et  $IR_S$  ( $a'c'$ ) pour les séquences répétées internes de chacun des segments  $U_L$  et  $U_S$  respectivement. Le génome viral contient aussi trois origines de réplication, une dans la séquence  $U_L$  ( $ori_L$ ) et deux dans la séquence  $U_S$  ( $ori_S$ ).*

Tant les séquences uniques, courtes et longues, que les séquences répétées codent pour des protéines virales. Le génome d'HSV-1 exprime au moins 84 protéines différentes à partir de 89 cadres de lecture ouverts (ORF). Parmi les 84 protéines, 5 sont exprimées à partir des séquences répétées, 65 à

partir du segment long  $U_L$  et 14 à partir du segment court  $U_S$  (160). Les gènes viraux sont généralement nommés selon leur localisation dans chacun des segments  $U_L$  et  $U_S$ , suivi d'un numéro correspondant à leur position relative de gauche à droite (28, 152). Les protéines virales sont, quant à elles, désignées selon leur propriété générale, i.e. VP pour protéine virale, ICP pour protéine de cellule infectée, g pour glycoprotéine ou encore par leur fonction. Dans certains cas, elles peuvent même être identifiées par le gène à partir duquel elles sont transcrites ( $pU_L$  ou  $pU_S$ ). Ces désignations sont, de plus, suivies d'un numéro ou d'une lettre. À des fins de simplification, la nomenclature utilisée dans le texte qui suit se fera à l'aide de la terminologie la plus communément utilisée pour désigner une protéine virale. De plus, une énumération complète des gènes et des protéines virales codées par HSV-1 est présentée en annexe afin de servir de référence tout au long de cette thèse (Annexe 1).

## B - Capside

La capsid virale est un polyèdre à 20 faces (icosaèdre) qui mesure environ 100 nm de diamètre. Elle est composée de 162 sous-unités protéiques appelées capsomères. Ces derniers sont constitués de 150 hexons (6 copies) et de 12 pentons (5 copies) de la protéine VP5 (28, 161, 162). Les capsomères sont reliés entre eux par 320 triplexes, chacun composé de deux copies de VP23 et d'une copie de VP19C (163, 164). De plus, au sommet de chaque hexon de VP5, on retrouve 6 copies de VP26 formant un anneau (28, 164, 165). La capsid contient aussi un dodécamère (12 copies) de la protéine  $U_L6$ , nommée *portal* étant donné sa fonction permettant l'entrée ou la relâche du matériel génétique viral (166-168). Cette structure est fermée par un « bouchon » formé de la protéine  $U_L25$  (169, 170).

## C - Tégument

Le tégument représente la couche protéique située entre la nucléocapside (capside contenant l'ADN viral) et l'enveloppe virale. Cette structure organisée serait composée d'au moins 20 protéines virales (28). Les protéines constituant le tégument sont acquises de façon séquentielle à partir de trois compartiments cellulaires majeurs, soit le noyau, le cytoplasme et le réseau *trans*-golgien (TGN) durant la morphogénèse du virus (171-173). Bien que cette séquence d'addition soit encore floue, plusieurs études récentes soulignent l'importance des protéines tégumentaires tout au long du cycle viral (174-176).

Dès l'entrée dans la cellule, la majorité des protéines du tégument se dissocient de la capsid et sont libérées dans le cytoplasme suite à l'action de kinases cellulaires et virales (U<sub>L</sub>13 et U<sub>S</sub>3) (175, 177). Toutefois, les protéines U<sub>L</sub>36 et U<sub>L</sub>37 demeurent associées à la capsid et facilitent le transport des capsides vers le noyau via les microtubules (178-180). Parmi les protéines tégumentaires relâchées dans le cytoplasme lors de l'entrée, certaines jouent un rôle précoce dans les mécanismes d'évasion immunitaire (U<sub>S</sub>3, U<sub>S</sub>11, ICP0, ICP27, ICP34.5, ICP47 et U<sub>L</sub>41) (175, 181-183) et d'apoptose (U<sub>S</sub>3, U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>13, U<sub>L</sub>14, ICP4, ICP22 et ICP27) (109, 175, 184, 185) tandis que la protéine VP16 (U<sub>L</sub>48) est redirigée vers le noyau via son interaction avec U<sub>L</sub>14 pour initier la cascade d'expression des gènes viraux (186). Au cours de l'expression génique et de la réplication de l'ADN viral, plusieurs protéines interviennent pour réguler l'expression des différentes classes de gènes viraux dont ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47 alors que d'autres protéines tégumentaires ayant une activité enzymatique telles que la thymidine kinase U<sub>L</sub>23 et la dUTPase U<sub>L</sub>50 sont impliquées dans le métabolisme des nucléotides (174, 175). Ensuite, l'addition des premiers téguments dont U<sub>L</sub>36 et U<sub>L</sub>37 débute dans le noyau tandis que d'autres protéines du tégument (U<sub>S</sub>3, U<sub>L</sub>31 et U<sub>L</sub>34) aident les



capsides à sortir du noyau (172, 187). Toutefois, la majorité de la couche tégumentaire est acquise dans le cytoplasme et au TGN. Les protéines U<sub>L</sub>11, U<sub>L</sub>48 et U<sub>L</sub>49 forment le noyau des interactions capsid-tégument et tégument-enveloppe en créant de nombreuses liaisons avec d'autres protéines du tégument telles qu'U<sub>L</sub>16, U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>21, U<sub>L</sub>35, U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>38, U<sub>L</sub>46, etc (172, 174, 175, 187, 188). Tel que mentionné, les protéines du tégument sont donc impliquées dans différentes étapes de maturation du virus dont le ciblage des composantes virales vers les sites adéquats (sites de réplication, d'assemblage, d'enveloppement secondaire, etc.) (186, 189-191), dans le transport du virus (de l'entrée du virus jusqu'à sa sortie de la cellule hôte) via l'interaction avec différents constituants du cytosquelette et le recrutement de moteurs (179, 180, 189, 192-195), dans la régulation de l'expression des protéines et des gènes cellulaires et viraux (175, 196), dans l'assemblage des virions (175, 197-203) et même dans les mécanismes d'évasion immunitaire et dans l'apoptose (181, 185, 204-207). Certaines de ces protéines du tégument possèdent également une activité enzymatique fort utile (protéine kinase, thymidine kinase, déubiquitinase, E3 ubiquitine ligase, deoxyuridine triphosphatase) (208-216). L'ajout de ces nombreuses protéines implique, bien entendu, un réseau complexe d'interactions capsid-tégument, tégument-tégument et tégument-enveloppe (174, 175, 188, 217-220). À noter que les protéines du tégument sont aussi capables de s'auto-assembler selon un processus indépendant de l'assemblage de la capsid. Ce processus mène à la formation de particules non infectieuses comprenant le tégument et l'enveloppe nommées *L-particles* (221-223).

Longtemps considéré comme une couche amorphe de protéines (224), plusieurs études soulèvent maintenant l'idée que le tégument serait une structure dynamique (175, 225-227). Les premières évidences à ce sujet viennent de l'étude de la morphogénèse du virus puisque celui-ci subit plusieurs étapes d'association-dissociation du tégument. En effet, dès l'entrée,

la majorité du tégument se dissocie de la capside. Puis, d'autres téguments sont de nouveau acquis au noyau, dans le cytoplasme et au TGN. Ce caractère dynamique du tégument est aussi accentué par la différence de composition protéique des virus périnucléaires, qui contiennent les téguments U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34 et U<sub>S</sub>3, comparés aux virus extracellulaires qui perdent U<sub>L</sub>31 et U<sub>L</sub>34 pour ne conserver qu'U<sub>S</sub>3. Plus récemment, une étude a démontré qu'une maturation du tégument favorisant les interactions capside-tégument au sein des virus extracellulaires pourrait aussi agir comme mécanisme d'adaptation du virus afin de maintenir son infectivité lors de sa relâche dans l'environnement extérieur (225). Finalement, il a aussi été démontré que les cystéines des protéines du tégument pouvaient être modifiées lors de l'attachement du virus à la cellule ainsi que lors du passage du virus par les vésicules à faible pH du TGN et ainsi influencer les interactions entre les différentes composantes du virus (226-229).

## **D - Enveloppe**

L'enveloppe des virus matures est enrichie en sphingomyéline et en phosphatidylsérine, deux lipides caractéristiques des membranes du TGN (230). Ceci confirme d'ailleurs les études supportant le TGN comme étant le site d'enveloppement final d'HSV-1 (171-173, 218, 231-236). Cette enveloppe virale est parsemée de plusieurs glycoprotéines virales (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM et gN) ainsi que de quelques protéines virales membranaires non glycosylées (U<sub>L</sub>20, U<sub>L</sub>43, U<sub>L</sub>45, U<sub>L</sub>56 et U<sub>S</sub>9) (28). Bien que toutes les protéines de l'enveloppe ne soient pas essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire, il n'en demeure pas moins que l'enveloppe virale est, quant à elle, essentielle pour que le virus soit infectieux (237-239). De plus, les glycoprotéines sont particulièrement importantes lors de l'entrée du virus dans la cellule (240-242), lors de la relâche nucléaire du virus (236, 243-246),

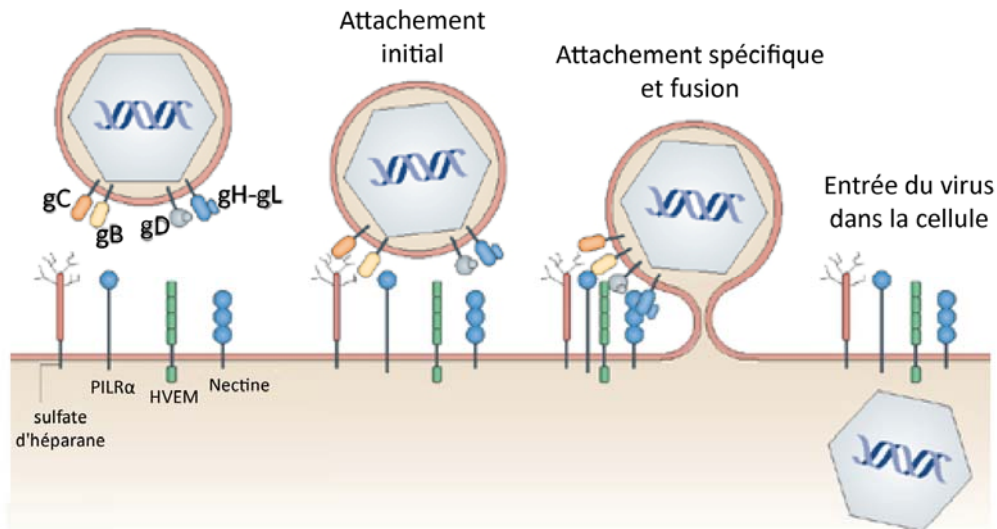
lors de l'enveloppement final (236, 247-249), lors de la fusion cellule-cellule (250-252), mais aussi en ce qui concerne la réponse immunitaire (253-256). Finalement, l'ADN viral, la capside, le tégument et l'enveloppe assemblés forment un virion mature mesurant environ 200 nm de diamètre (28).

### **3 - Cycle viral d'HSV-1**

#### **A - Attachement et entrée**

La première étape du cycle viral d'HSV-1 est l'attachement du virus à une cellule hôte afin d'y entrer et de s'y répliquer (Figure 6). Pour initier une infection, le virus doit donc s'attacher à la surface des cellules et fusionner son enveloppe avec la membrane cellulaire. Ce processus est complexe parce qu'il requiert plusieurs glycoprotéines et que chacune de ces glycoprotéines est multifonctionnelle et capable d'interagir avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires ainsi qu'avec d'autres glycoprotéines virales pour induire la fusion (257). De plus, selon le type cellulaire infecté, il existe différents modes d'entrée du virus, soit par la fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (MP) dans les cellules Véro, Hep2 et les cellules neuronales (97, 258) ou par la voie de l'endocytose via un mode dépendant du pH dans les cellules épithéliales HeLa, CHO-K1 et les kératinocytes (259-261) ou indépendant du pH dans les mélanomes B78H1 (262, 263).

Malgré des mécanismes d'entrée distincts, tous nécessitent une liaison avec un récepteur cellulaire ainsi qu'un processus de fusion. Les cinq glycoprotéines virales impliquées dans ce processus sont gB, gC, gD et le complexe hétérodimérique gH/gL (264, 265).



### Figure 6 : Mécanismes d'attachement et d'entrée d'HSV-1

Cinq glycoprotéines d'HSV-1 sont impliquées dans l'entrée : gB, gC, gD, gH et gL. gB et gC initient l'attachement via leurs liaisons aux différents récepteurs cellulaires. gD stabilise de façon spécifique cet attachement en se liant à son récepteur cellulaire. Cette interaction provoque un changement conformationnel de gD déclenchant la fusion de l'enveloppe virale avec la MP via l'activation de gB et du complexe gH/gL. Image adaptée de Sedy et al. (266).

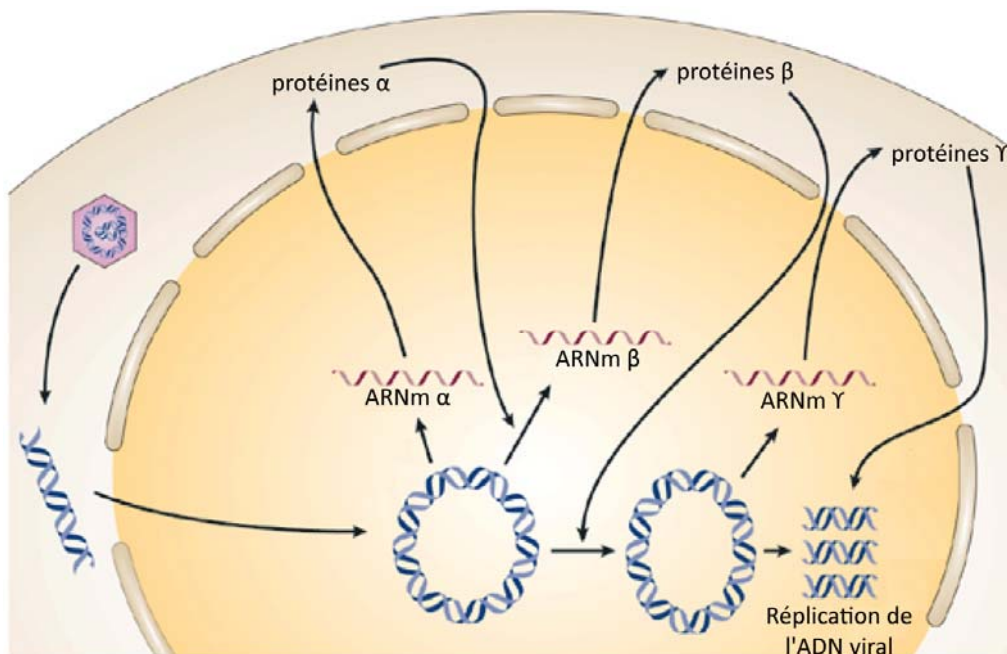
L'attachement du virus est une étape réversible qui est initiée par l'interaction de gB et/ou gC avec le sulfate d'héparane présent à la surface des cellules ou pour gB avec d'autres récepteurs tels que le PILR $\alpha$  (récepteur  $\alpha$  couplé à l'immunoglobuline de type 2) (28, 267-272). Malgré le fait que ces interactions améliorent l'efficacité de l'infection, gC n'est pas essentielle à cette étape (268). L'attachement viral est ensuite stabilisé par une étape irréversible de liaison entre gD et l'un de ses récepteurs cellulaires (28, 242, 257, 273). Brièvement, gD peut interagir avec au moins trois types de récepteurs différents : le médiateur d'entrée des virus herpétiques (HVEM ou HveA) qui est un membre de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) (274-276) ; la nectine-1 (ou HveB) et la nectine-2 (ou HveC) qui font partie des molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (277-281) ainsi qu'une forme spécifique de sulfate

d'héparane, le 3-O-sulfate d'héparane sulfaté (3-OS HS), modifiée par une 3-O-sulfotransférase (282-285). Suite à son interaction avec son récepteur, gD subit un changement conformationnel permettant l'activation de gB et du complexe gH/gL déclenchant ainsi la machinerie nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la MP de la cellule hôte (28, 240, 241, 286). Même si gB, gH et gL sont indispensables à ce mécanisme de fusion (287, 288), les détails de celui-ci demeurent toutefois encore méconnus et controversés dans la littérature (289-291). La fusion des membranes virale et cellulaire permet ensuite l'entrée et la libération de la nucléocapside et des protéines du tégument dans le cytoplasme de la cellule hôte. Après l'entrée, tandis que la majorité des protéines du tégument se détachent de la nucléocapside, seules trois protéines ont été identifiées comme restant potentiellement associées à la nucléocapside, soit U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37 et U<sub>S</sub>3 (180, 189, 292). En exploitant la machinerie cellulaire, ces protéines deviennent alors essentielles au transport de la nucléocapside vers le noyau via les dynéines associées aux microtubules (179, 180, 192, 193, 293). Ce transport intracytoplasmique permet finalement aux nucléocapsides d'atteindre les pores nucléaires par lesquels le transfert de l'ADN viral au cœur du noyau aura lieu (178, 294-299).

## **B - Cascade d'expression des gènes viraux**

Une fois que l'ADN viral se trouve dans le noyau de la cellule hôte, l'objectif du virus est de répliquer son ADN et de produire toutes les protéines virales nécessaires à la formation de nouveaux virions. La transcription du génome viral est alors initiée par l'ARN polymérase II cellulaire, responsable de la synthèse des ARNm viraux nécessaires à l'expression des protéines virales, en collaboration avec la protéine virale VP16 (28). En effet, VP16, relâchée lors de l'entrée du virus avec les autres protéines du tégument, interagit ensuite avec au moins deux facteurs cellulaires différents (Oct-1 et HCF-1) pour être rapidement importée dans le noyau et y former un complexe avec l'ARN

polymérase II (142, 300-304). Ainsi, une synthèse *de novo* de VP16 n'est pas nécessaire pour commencer la transcription des gènes viraux. Ces gènes sont classés en trois groupes selon leur cinétique d'expression : les gènes très précoces ( $\alpha$  ou IE pour *immediate early*), les gènes précoces ( $\beta$  ou E pour *early*) et les gènes tardifs ( $\gamma$  ou L pour *late*) (28, 196) (Figure 7).



**Figure 7 : Cascade d'expression des gènes viraux**

L'ADN viral est injecté dans le noyau et rapidement circularisé. Les gènes  $\alpha$  sont exprimés et transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire stimulée par VP16. Les protéines  $\alpha$  transportées dans le noyau activent l'expression des gènes  $\beta$ . Les protéines  $\beta$  impliquées dans la réplication de l'ADN permettent à celle-ci de commencer et stimulent l'expression des gènes  $\gamma$  codant pour des protéines structurales. Image adaptée de Knipe et al. (95).

Les gènes  $\alpha$  expriment 5 protéines multifonctionnelles ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47 qui stimulent la transcription subséquente des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ . Les protéines exprimées par les gènes  $\beta$  sont, quant à elles, majoritairement impliquées dans la réplication du génome viral. Sept protéines virales issues de ces gènes sont essentielles à la réplication de l'ADN viral (U<sub>L</sub>5, U<sub>L</sub>8, U<sub>L</sub>9, U<sub>L</sub>29, U<sub>L</sub>30, U<sub>L</sub>42 et U<sub>L</sub>52). Les autres, notamment la thymidine kinase virale (TK ou

U<sub>L</sub>23), la ribonucléotide réductase (U<sub>L</sub>39/U<sub>L</sub>40), la dUTPase (U<sub>L</sub>50) et l'uracyl ADN glycosylase (U<sub>L</sub>2) contrôlent le métabolisme des nucléotides. L'expression des protéines  $\beta$  permet le déclenchement de la réplication du génome viral qui, à son tour, promeut l'expression des protéines issues des gènes  $\gamma$ . Ces protéines  $\gamma$  sont pour la plupart des composantes structurales du virion, incluant des protéines de la capsid, du tégument et de l'enveloppe. Parmi les protéines  $\gamma$ , il existe deux sous-classes : les  $\gamma_1$  qui sont exprimées relativement tôt suite à leur activation par les protéines  $\alpha$  et qui ne sont donc pas dépendantes de la réplication de l'ADN viral, même si celle-ci stimule leur synthèse et les  $\gamma_2$  exprimées plus tardivement puisqu'elles requièrent absolument l'initiation de la réplication du génome viral (305).

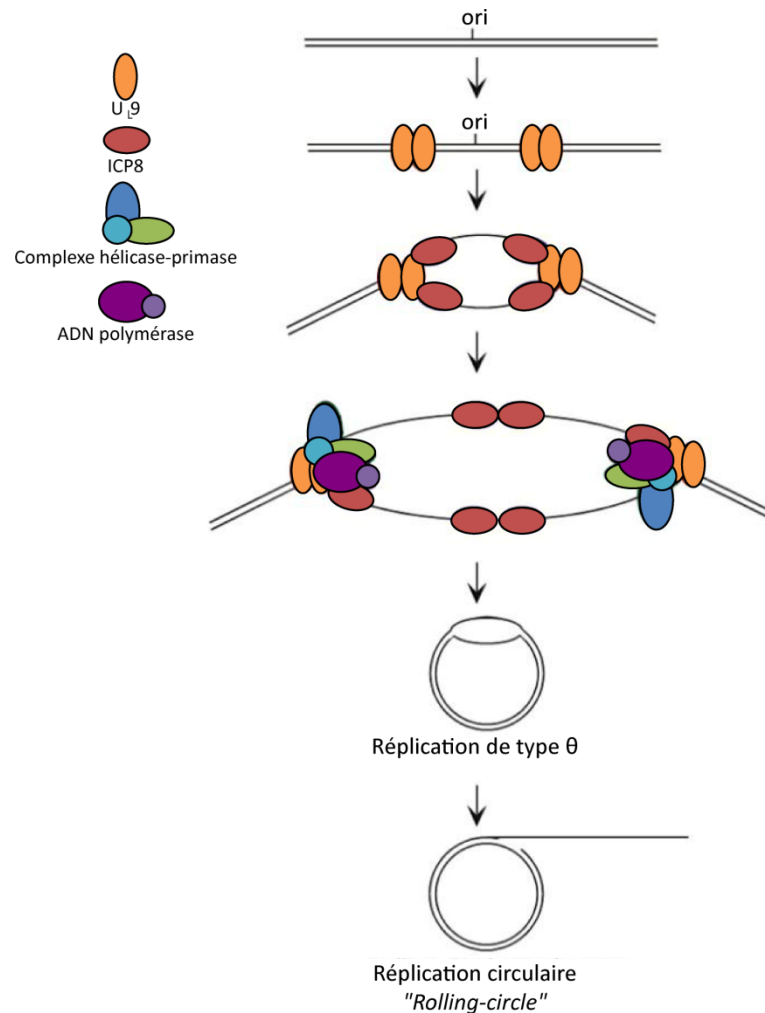
Cette cascade d'expression protéique des gènes viraux est accompagnée d'une série de mécanismes permettant de favoriser l'expression des protéines virales au détriment de celle des protéines cellulaires. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'autorégulation de l'expression des gènes  $\alpha$  via la liaison d'ICP4 à des éléments répresseurs sur son propre promoteur ce qui favorise l'expression des gènes  $\beta$  et  $\gamma$  (28, 306-308). Le virus provoque aussi la dégradation des ARNm cellulaires et viraux spécifiques via la protéine U<sub>L</sub>41 (vhs) permettant ainsi une transition plus rapide entre les différentes classes de gènes viraux (309-312). Toujours dans le but de favoriser les ARNm viraux qui, eux, ne nécessitent que très peu d'épissage, la protéine ICP27 inhibe l'épissage des ARNm bloquant ainsi la traduction adéquate des protéines cellulaires (313-316). L'accumulation d'ARNs viraux tend toutefois à stimuler la phosphorylation d'un facteur cellulaire d'initiation de la traduction (eIF-2 $\alpha$ ) menant à l'arrêt de la synthèse protéique. Pour contrecarrer cet effet, les protéines ICP34.5, U<sub>S</sub>11 et gB agissent de concert pour prévenir cette inhibition par la cellule (317-320).

## C - Réplication de l'ADN viral

Les protéines  $\beta$  sont responsables de l'initiation de la réplication du génome viral. Une fois ces protéines exprimées, plusieurs d'entre elles se regroupent au sein de structures spécialisées, appelées compartiments de réplication, et formées dans le noyau de la cellule infectée (28, 155, 321). L'ADN viral linéaire nouvellement arrivé dans le noyau se circularise et rejoint les protéines  $\beta$  au niveau des compartiments de réplication (155, 322). La réplication de l'ADN viral est alors initiée selon un mécanisme de type  $\theta$  (Figure 8).

La protéine  $U_L9$  se lie à des séquences spécifiques présentes dans les origines de réplication et, grâce à sa liaison à l'ADN et à son activité hélicase, elle initie le déroulement et la séparation des brins d'ADN. Ceci permet alors le recrutement de la protéine ICP8 qui se lie à l'ADN simple brin. Ensemble, ces deux protéines mobilisent à la fourche de réplication les cinq autres protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, soit  $U_L5$ ,  $U_L8$ ,  $U_L30$ ,  $U_L42$  et  $U_L52$ . Le complexe hélicase-primase ( $U_L5/U_L52$ ), aussi appelé primosome, possède à lui seul les activités ATPase ADN-dépendante, hélicase et primase (155). À ce complexe s'ajoute la protéine  $U_L8$  qui stimule l'activité et l'efficacité du primosome ainsi que l'ADN polymérase ( $U_L30/U_L42$ ) permettant la synthèse de nouveaux brins d'ADN viraux. La réplication virale passe ensuite du mode  $\theta$  au mode de réplication circulaire (*rolling circle*) par un mécanisme encore inconnu (28). Ce dernier mode de réplication génère plusieurs copies de l'ADN viral arrangées en un concatémère qui sera ensuite clivé en monomères lors de l'incorporation de l'ADN viral dans les capsides (323-326).



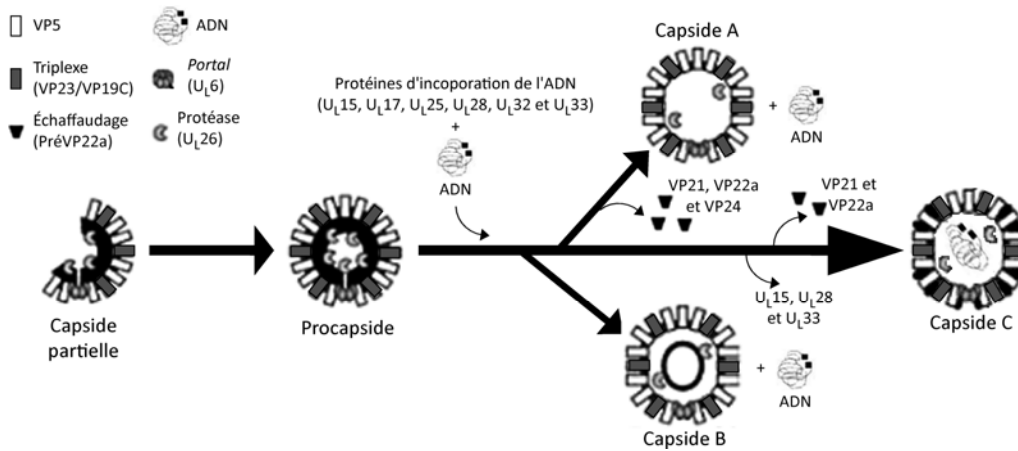


### Figure 8 : Modèle de la réplication de l'ADN d'HSV-1

La réplication de l'ADN viral débute par un mécanisme de type  $\vartheta$  au cours duquel U<sub>L</sub>9 puis ICP8 se lie à une origine de réplication pour initier le déroulement et la séparation des brins d'ADN. Les protéines formant les complexes de l'hélicase-primase et de l'ADN polymérase sont recrutées pour cette première phase de la réplication. Celle-ci sera suivie d'une réplication circulaire (rolling circle) permettant la production de concatémères d'ADN. Image adaptée de Lehman et al. (322).

## D - Assemblage et maturation des capsides

La synthèse des différentes protéines virales permet maintenant au virus de procéder à l'assemblage et à la maturation de ses capsides dans le noyau (Figure 9).



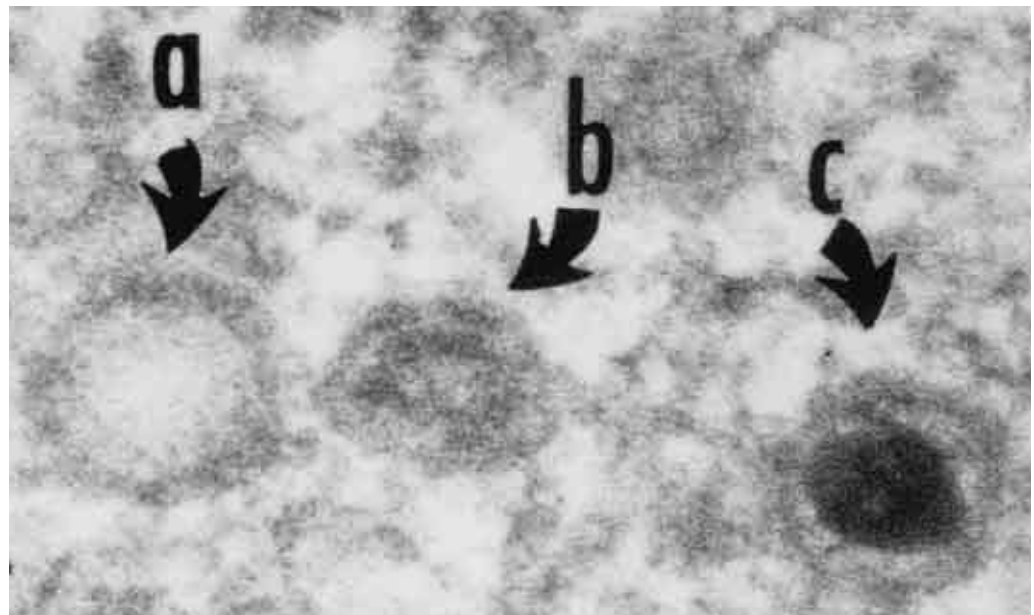
### Figure 9 : Assemblage et maturation des capsides virales

L'assemblage des capsides d'HSV-1 débute par la formation d'une procapside composée des protéines VP5, préVP22a, VP23, VP19C, U<sub>L</sub>26 et U<sub>L</sub>6. Après différentes étapes de maturation via U<sub>L</sub>26, cette procapside peut alors devenir une capside A ou une capside B, qui sont des produits incomplets, ou encore une capside C mature. Image adaptée de Catalano et al. (327) et de Weller et al. (109).

Tout d'abord, un complexe se forme entre la protéine majeure de la capside VP5 et la protéine préVP22a (U<sub>L</sub>26.5) qui constitue l'échafaudage interne de la capside en formation. À ce complexe s'ajoutent le triplex formé des protéines VP23 et VP19C, la protéase U<sub>L</sub>26 essentielle à la maturation ainsi que la protéine *portal* U<sub>L</sub>6. Cet arrangement de protéines donne ainsi naissance à une capside immature nommée procapside (91, 109, 328). Celle-ci diffère de la capside mature par sa forme plus relâchée et donc plutôt sphérique qu'icosaédrale. Ensuite, afin d'augmenter leur stabilité, ces procapsides passent par une série d'étapes de maturation (329). Tout d'abord, elles subissent un clivage des protéines d'échafaudage interne, soit préVP22a et U<sub>L</sub>26. Au cours de ce processus, la protéine U<sub>L</sub>26 s'autoprotéolyse pour donner deux protéines, soit VP21 et VP24. La protéine VP24, qui constitue la forme active de la protéase, digère à son tour la protéine préVP22a en protéine VP22a. Ces modifications mènent alors au changement de conformation de la capside. Celle-ci s'angularise et passe donc d'une forme

sphérique à une forme icosaédrale. La capside dorénavant plus stable est maintenant prête à emballer l'ADN viral (91, 109, 328, 330).

À ce stade, trois types de capsides peuvent être formés, soit les capsides A, B et C (91, 109, 327, 331). Ces trois formes de capsides sont distinguables par microscopie électronique (EM) (Figure 10).



**Figure 10 : Capsides A, B et C par microscopie électronique**

*Par microscopie électronique, plusieurs caractéristiques distinctives différencient les trois types de capsides nucléaires. Les capsides A ont le centre de la capside blanc car elles ne contiennent ni ADN, ni protéines d'échafaudage. Les capsides B, qui ont conservé leurs protéines d'échafaudage et pouvant contenir un peu d'ADN, sont plutôt grisées en leur centre. Les capsides C ont, quant à elles, un cœur très dense aux électrons typique de la présence d'ADN. Image tirée de Chang et al. (332).*

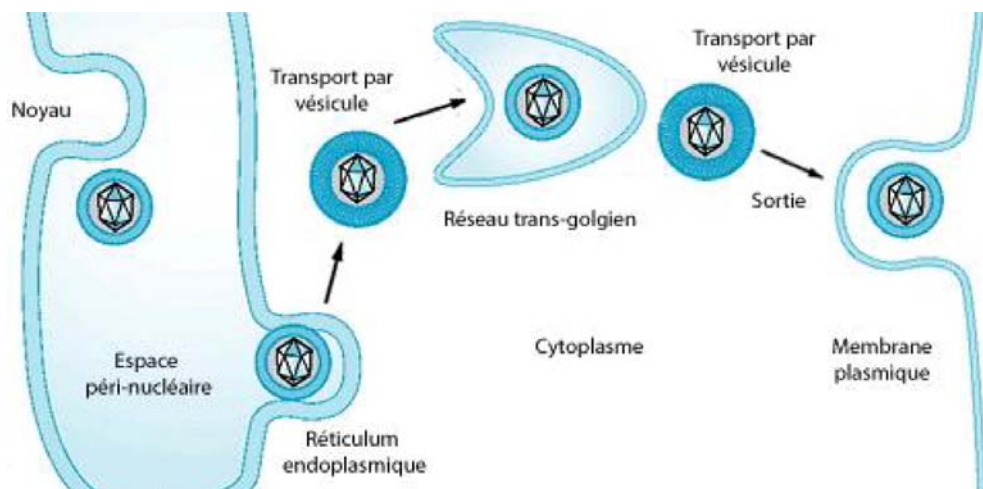
Les capsides A relâchent les protéines d'échafaudage VP21, VP22a et VP24 et sont incapables d'incorporer l'ADN viral. Ces capsides sont donc considérées comme abortives. Les capsides B conservent, quant à elles, les protéines VP21, VP22a et VP24. Cependant, la place occupée par ces protéines au cœur de la capside empêche l'ADN d'être totalement emballé. Ces capsides ne contiennent donc que peu ou pas d'ADN. Pour la plupart des auteurs, les capsides A et B sont considérées comme étant des produits incomplets, sans

maturation subséquente. Les capsides C correspondent à la forme mature de la capside retrouvée dans les virions. Toutefois, pour atteindre ce stade de maturation, plusieurs étapes sont encore nécessaires. Ainsi, simultanément, on assiste à la relâche des protéines VP21 et VP22a et à la conservation de la protéine VP24 ainsi qu'à l'incorporation de l'ADN au cœur de la capside (109, 330). L'encapsidation nécessite l'action de sept protéines virales : U<sub>L</sub>6, U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>25, U<sub>L</sub>28, U<sub>L</sub>32 et U<sub>L</sub>33 (91, 109, 333). Grâce, entre autres, aux protéines U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>25 et U<sub>L</sub>32 impliquées dans l'empaquetage de l'ADN (169, 334-337), celui-ci est inséré sous sa forme concatémérique dans la capside via le *portal* (U<sub>L</sub>6) (338, 339). Lorsqu'une unité complète du génome est présente dans la capside, les protéines du complexe de la terminase (U<sub>L</sub>15 et U<sub>L</sub>28) ainsi que la protéine U<sub>L</sub>33 s'associent pour cliver spécifiquement le concatémère d'ADN viral en un monomère (340-345). De plus, pour empêcher une sortie non contrôlée de l'ADN viral, U<sub>L</sub>25, qui agit comme un bouchon, retient l'ADN viral à l'intérieur de la capside (335). Une fois l'ADN incorporé, les nucléocapsides matures formées sont des capsides C. Celles-ci sont maintenant prêtes à sortir du noyau et à poursuivre leur périple au sein de la cellule.

## **E - Transport intracellulaire**

Les nucléocapsides virales nouvellement formées dans le noyau doivent maintenant franchir plusieurs étapes avant d'être relâchées hors de la cellule en tant que virus matures infectieux. Le parcours exact que vont emprunter ces nucléocapsides lors des dernières étapes de maturation et de transport sont encore aujourd'hui matière à controverse (28, 171, 346). En effet, trois modèles tentant d'expliquer la sortie des capsides du noyau ainsi que leur transport jusqu'à la MP existent : le modèle classique ou luminal (347, 348) , le modèle des pores élargis (349, 350) ainsi que le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement (171, 176, 351).

Le modèle luminal ou classique (Figure 11) propose tout d'abord que les nucléocapsides bourgeonnent avec la membrane nucléaire interne (MNI). Ensuite, ces virus enveloppés contenus dans l'espace périnucléaire, soit l'espace compris entre les membranes nucléaires interne et externe, migrent jusqu'à la MP à l'aide de vésicules de transport empruntant la voie de sécrétion classique (réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi et TGN). Les virus sont finalement relâchés hors de la cellule suite à la fusion entre la vésicule de transport et la MP.



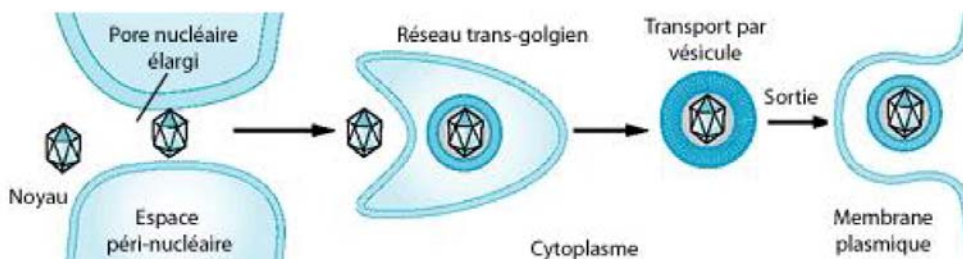
**Figure 11 : Modèle luminal ou classique du transport d'HSV-1**

*Selon le modèle luminal de transport d'HSV-1, les nucléocapsides bourgeonnent à la MNI pour former des virus enveloppés qui migrent jusqu'à la MP via des vésicules empruntant la voie de sécrétion classique : ER, Golgi et TGN. Les virions sont finalement relâchés à l'extérieur de la cellule lors de la fusion entre la vésicule et la MP. Image adaptée de Fields Virology (35).*

La principale critique de ce modèle vient de la composition protéique et lipidique de l'enveloppe des virus relâchés. En effet, les virions produits via ce modèle possèdent une enveloppe ayant une composition lipidique dérivée de celle des membranes nucléaires et contenant les protéines virales U<sub>L</sub>31 et U<sub>L</sub>34. Or, il a été démontré que les virus extracellulaires possèdent plutôt une enveloppe ayant une composition lipidique proche des membranes

cytoplasmiques et qu'ils sont exempts des protéines U<sub>L</sub>31 et U<sub>L</sub>34 (230, 352, 353). De plus, ce modèle n'explique en aucun cas la présence de capsides nues dans le cytoplasme observée par plusieurs laboratoires (28, 346).

Le modèle des pores élargis (Figure 12), récemment suggéré par P. Wild, ajoute au modèle luminal une voie alternative de sortie des nucléocapsides du noyau. Selon ce nouveau modèle, les nucléocapsides sortent du noyau en empruntant des pores nucléaires élargis. Les capsides nues délivrées dans le cytoplasme peuvent ensuite bourgeonner avec l'un des compartiments cellulaires tels que l'espace périnucléaire, le RE, l'appareil de Golgi ou le TGN. Peu importe où les capsides bourgeonnent, elles seront ensuite sécrétées hors de la cellule par la voie de sécrétion classique.



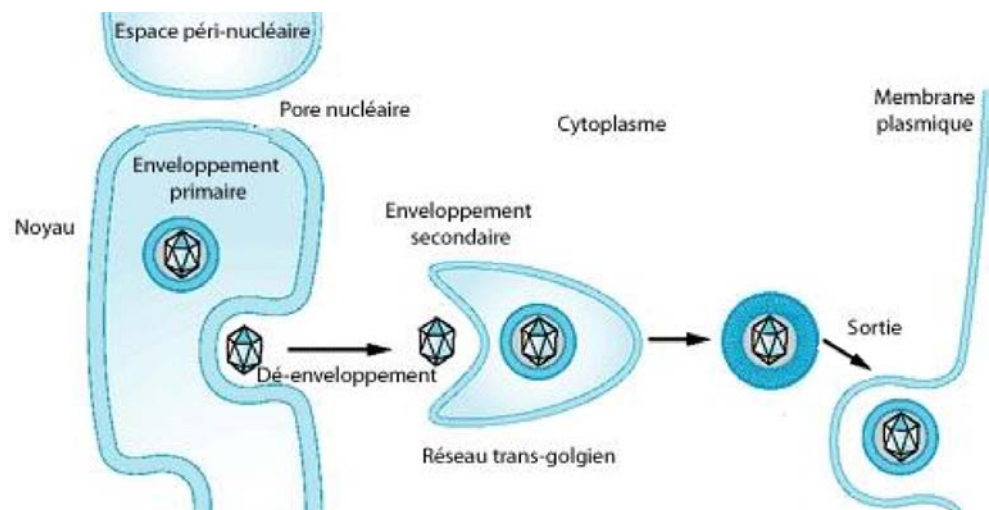
**Figure 12 : Modèle des pores élargis du transport d'HSV-1**

*Selon le modèle des pores élargis, les nucléocapsides sont délivrées sous forme de capsides nues dans le cytoplasme via un passage par des pores nucléaires élargis. Ces capsides bourgeonnent ensuite avec un des compartiments cellulaires (MNE, ER, Golgi ou TGN) et empruntent la voie de sécrétion classique afin d'être relâchées à l'extérieur de la cellule sous forme de virus enveloppés. Image adaptée de Fields Virology (35).*

Même si ce modèle, contrairement au modèle luminal, fournit une explication à la présence de capsides nues dans le cytoplasme, il n'en demeure pas moins que ce modèle des pores élargis est très critiqué. En effet, étant donné la taille imposante des capsides (100 nm de diamètre et environ 200 MDa) (354, 355), le passage de celles-ci à travers des pores nucléaires dilatés ne peut s'effectuer de façon passive. Il y aurait donc une perte de

l'intégrité nucléaire et donc une perte de la rétention des protéines nucléaires. Or, plusieurs études concernant le déplacement de certaines protéines virales entre le noyau et le cytoplasme lors de l'infection confirment que l'intégrité nucléaire est conservée et ne supportent donc pas l'hypothèse de la sortie des capsides virales hors du noyau via des pores nucléaires élargis (28, 356-358).

Le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement comporte trois étapes principales (Figure 13).



**Figure 13 : Modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement du transport d'HSV-1**

*Selon le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement, les nucléocapsides bourgeonnent avec la MNI (enveloppement primaire). Ces virus maintenant enveloppés fusionnent ensuite avec la MNE et sont libérés dans le cytoplasme sous forme de capsides nues (dé-enveloppement). Les capsides cytoplasmiques acquièrent finalement leur enveloppe au TGN (ré-enveloppement/enveloppement secondaire). À partir de ce compartiment, les vésicules contenant les virions sont transportées jusqu'à la MP afin de relâcher les virus matures à l'extérieur de la cellule. Image adaptée de Fields Virology (35).*

Tout d'abord, les nucléocapsides acquièrent une enveloppe en bourgeonnant avec la MNI. Cette première étape est appelée enveloppement primaire. Ensuite, ces nouveaux virus enveloppés fusionnent avec la membrane nucléaire externe (MNE) permettant la libération de

nucléocapsides nues dans le cytoplasme. C'est l'étape du dé-enveloppement. Finalement, les nucléocapsides acquièrent leur enveloppe finale au TGN, c'est l'étape du ré-enveloppement.

Ce modèle est très largement accepté car ils supportent les différentes évidences morphologiques et biochimiques rapportées dans la littérature (230, 346, 352, 353, 359). Étant donné la prépondérance de ce modèle, plusieurs étapes et joueurs clés dans le transport du virus doivent être approfondies.

Selon le modèle de dé-enveloppement/ré-enveloppement, les nucléocapsides présentes dans le noyau doivent rejoindre la MNI afin d'y bourgeonner. Le transport intranucléaire des capsides semble dépendre des filaments d'actine nucléaires induits lors de l'infection (360-362). Cependant, pour que les capsides puissent atteindre la MNI, le réseau de lamines nucléaires doit être altéré. À l'origine de cette modification, on retrouve une kinase cellulaire, la protéine kinase C, ainsi que trois protéines virales U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34 et U<sub>S</sub>3 (353, 363-367). Ces protéines agissent ensemble pour phosphoryler les lamines nucléaires et ainsi permettre leur dissolution. Ceci permet alors un contact étroit entre les nucléocapsides et la MNI menant au bourgeonnement. D'ailleurs, seules deux protéines virales, soit U<sub>L</sub>31 et U<sub>L</sub>34, sont nécessaires à cette étape (212, 368-370). Les nouvelles particules virales enveloppées présentes dans l'espace périnucléaire sont appelés virus périnucléaires. Ces derniers procèdent ensuite à une étape de dé-enveloppement au cours de laquelle, ils se débarrassent de leur enveloppe primaire en fusionnant avec la MNE et sont libérés sous forme de nucléocapsides nues dans le cytoplasme (172, 236, 371). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la fusion des virus périnucléaires avec la MNE demeurent toutefois encore peu compris. La plupart des données générées à l'aide d'expériences utilisant des mutants d'HSV-1 démontrent un potentiel rôle des protéines U<sub>S</sub>3, gB, gD, gH/gL, gM, U<sub>L</sub>20 et gK dans ce processus (172, 187, 218, 236, 244-246). Une fois relâchées dans le cytoplasme, les



nucléocapsides doivent migrer jusqu'au TGN pour effectuer leur enveloppement final. À ce jour, le processus permettant aux capsides d'atteindre le TGN n'est pas encore clair. Certains suggèrent un potentiel transport via les microtubules impliquant les moteurs kinésines ainsi que les protéines tégmentaires U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37 et/ou U<sub>S</sub>11 présentes à la surface des capsides (192, 362, 372, 373). Durant ce trajet jusqu'au TGN, plusieurs protéines du tégment sont ajoutées, c'est le processus de tégmentation (171, 172, 346). Les nucléocapsides acquièrent leur enveloppe finale au site principal de ré-enveloppement, soit le TGN (173, 231-233, 374), où plusieurs protéines du tégment et des glycoprotéines s'accumulent. L'acquisition de l'enveloppe finale se fait via un réseau complexe d'interactions protéiques (188, 217, 220, 375). Ainsi, les virus terminent leur processus de maturation. Ces virus matures contenus dans des vésicules de sécrétion du TGN doivent maintenant migrer jusqu'à la MP pour effectuer leur sortie de la cellule.

## **F - Sortie extracellulaire**

La sortie du virus, c'est-à-dire le passage du TGN à la MP, est l'étape finale du transport d'HSV-1. Lors de ce processus, les virions sont incorporés dans des vésicules qui fusionnent avec la MP pour permettre la relâche des particules virales dans le milieu extracellulaire via exocytose. Toutefois, les mécanismes sous-jacents à la formation et au transport de ces vésicules jusqu'à la MP demeurent encore mystérieux. Une étude récente au sein de notre laboratoire a révélé l'implication d'une protéine cellulaire : la protéine kinase D (234, 235). Cette protéine, reconnue pour réguler la fission des petits cargos du TGN destinés à l'exocytose, permet le transport de la vésicule contenant le virus mature jusqu'à la MP. Une autre équipe suggère aussi l'utilisation d'une protéine cellulaire, la myosine 5a, afin de faciliter le transport des vésicules à travers le réseau d'actine corticale situé à la MP (376). D'autres équipes proposent, quant à elles, l'utilisation de la machinerie

du complexe de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT) via les corps multivésiculaires (MVB) et la protéine Vps4 (377-379). Toutes ces études s'entendent toutefois pour affirmer que le processus de libération du virus dans le milieu extracellulaire s'apparente davantage à la relâche de molécules de sécrétion et impliquerait la machinerie cellulaire de fusion de l'exocytose plutôt que des protéines virales comme certaines études l'ont suggéré (218, 236, 252, 380-383). Les protéines virales auraient, quant à elles, un rôle plus important lors de la propagation du virus d'une cellule à l'autre via les jonctions cellulaires des cellules polarisées où les glycoprotéines gE, gI et gM semblent intervenir (236, 384-387) ainsi que lors de la formation de syncytiums impliquant les protéines gB, gK, U<sub>L</sub>20 et U<sub>L</sub>24 (388-393).

#### **4 - Spectrométrie de masse et virus**

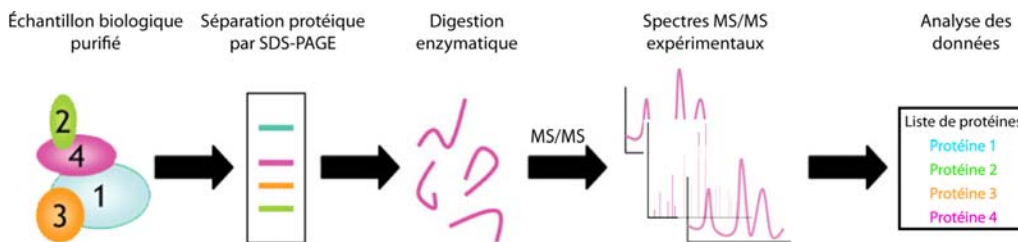
Une meilleure compréhension du cycle viral d'HSV-1 passe, sans contredit, par la caractérisation des protéines constitutives du virus. Avant le séquençage du génome d'HSV-1 en 1988 (152, 153), l'identification des principales protéines du virus était effectuée via une approche biochimique sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) combinée à une coloration au bleu de Coomassie ou à un marquage radioactif (24-26, 394-398). Le développement des techniques de production des anticorps monoclonaux et polyclonaux confirma la spécificité des protéines identifiées en tant que protéines virales (399-401). La catégorisation des protéines virales selon leur appartenance à la capsid, au tégument ou à l'enveloppe a été réalisée par différentes méthodes biochimiques classiques. Parmi celles-ci, l'observation par EM a permis de révéler différents types de capsides dont celles non enveloppées dans le noyau et celles enveloppées dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire (24, 402, 403). Le cytoplasme et le noyau pouvaient alors être séparés par centrifugation sur gradient. La découverte des *L-particles* (virus enveloppés

sans capsid) par gradient de Ficoll et leur caractérisation par EM ont permis de déterminer que les protéines absentes correspondaient à celles constituant la capsid (221, 404). Différents essais biochimiques basés sur l'utilisation de détergent et de sels sont aussi à l'origine de la mise en évidence des protéines associées à l'enveloppe (sensible au détergent) et de celles sensibles aux sels en présence de détergent, soit les protéines tégumentaires (24, 25, 405). La fragilité de l'enveloppe face aux gels/dégels consécutifs fut aussi une méthode permettant de déterminer les protéines associées à l'enveloppe (398). Toutes ces méthodes classiques d'analyse des virus pouvaient cependant s'avérer être un travail ardu et de longue durée. Le développement de la génomique a ensuite permis le séquençage du matériel génétique de nombreux virus et la création de banque de données. Au début des années 1990, on assiste à l'émergence de la spectrométrie de masse dans le domaine de la recherche biologique. Récemment appliquée à l'étude des virus, une petite incursion dans le domaine de la spectrométrie de masse devient donc primordiale afin d'analyser rapidement tous les constituants d'HSV-1.

## **A - Principes et instrumentation**

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant, entre autres, de détecter, d'identifier, de caractériser et de quantifier les protéines d'un mélange complexe (406-409). À partir d'un échantillon purifié, la technique la plus couramment utilisée est la séparation des protéines par électrophorèse sur gel. Des bandes excisées à partir du gel sont ensuite digérées via une enzyme protéolytique telle que la trypsine. Le mélange de peptides obtenus par clivage des protéines est alors analysé par le spectromètre de masse. Fondamentalement, un spectromètre de masse est constitué des éléments suivants : un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ions, un ou plusieurs analyseurs, un détecteur et un système de

traitement informatique (410). Le système d'introduction permet d'exposer l'échantillon sous forme gazeuse, liquide ou solide à la source d'ions. Cette dernière ionise les molécules afin que les ions obtenus soient séparés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) par le(s) analyseur(s). Finalement, le détecteur quantifie les ions et transforme ce compte en un signal électrique amplifié afin que celui-ci puisse être traité informatiquement et fournisse un spectre de masse. Les spectres expérimentaux obtenus peuvent alors être comparés aux spectres théoriques prédits sur la base des règles de clivage pour toutes les séquences présentes dans les banques de données sélectionnées. Cette approche est l'empreinte de masse peptidique (*peptid mass fingerprinting*) et permet de déterminer les protéines constitutives d'un mélange complexe (410) (Figure 14).



#### Figure 14 : Principe général d'analyse par spectrométrie de masse

L'échantillon biologique contenant les protéines à analyser est purifié puis séparé par SDS-PAGE. Les protéines sont digérées enzymatiquement en peptides. Ces derniers sont séparés par chromatographie liquide et élués dans une source d'ionisation. Les peptides ionisés sont ensuite analysés par le spectromètre de masse afin de fournir les spectres expérimentaux. La comparaison de ces spectres aux banques de données permet de générer la liste des protéines contenues dans l'échantillon initial.

Au cours des trois dernières décennies, la spectrométrie de masse a connu une croissance accrue et d'importantes améliorations ont été apportées aux méthodes expérimentales, à l'instrumentation et aux approches pour l'analyse des données. L'un des progrès les plus notables est le développement des sources d'ionisation douces, soit la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électrospray (ESI), qui ont permis l'analyse

des protéines et des peptides (410). Grâce à ces deux méthodes, l'étude de l'ensemble des protéines qui constitue un virus, soit la protéomique virale, fait dès lors son apparition.

## **B - Protéomique virale**

Au cours des siècles, les virus ont évolués pour s'adapter à leur environnement en empaquetant leur matériel génétique dans une capsid, en ajoutant une couche tégumentaire et une enveloppe. Les virus ont adopté cette structure multicouches pour accomplir un large spectre de fonctions pendant l'infection (entrée, réplication, assemblage, sortie, propagation, évation immunitaire, etc.). Afin de mieux comprendre le rôle des différents constituants ainsi que les mécanismes cellulaires exploités par le virus au cours de l'infection, il devient donc primordial de connaître la composition protéique des virus.

À la fin des années 1990, de nombreuses analyses de protéomique virale sont alors effectuées dont plusieurs sur les virus herpès tels que les cytomégalovirus humain (HCMV) et murin (MCMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV), le rhadinovirus de singe Rhésus (RRV), le virus herpès gamma murin (MHV68), l'herpèsvirus alcélaphin 1 (AIHV-1) et le virus de la pseudorange (PRV) (411-420). Même si ces études ont permis l'identification de composantes, parfois inconnues, au sein de la particule virale, aucune n'a encore été réalisée, jusqu'à maintenant, sur les *Alphaherpesvirinae* dont fait partie HSV-1. Une telle analyse demeure toutefois essentielle étant donné que la structure multicouches (capsid, tégument, enveloppe) et la grande taille (environ 200 nm de diamètre) d'HSV-1 lui confère la capacité d'incorporer de nombreuses protéines virales mais aussi des protéines cellulaires dans les virions nouvellement formés. Comme toute technique, la protéomique virale possède cependant des

avantages et des limites qu'il faut prendre en considération lors de chaque analyse.

### **C - Avantages et limites de la protéomique**

Grâce à l'essor de la spectrométrie de masse, il est désormais possible de caractériser très rapidement les protéines d'un mélange aussi complexe qu'une particule virale. L'identification des protéines par spectrométrie de masse requiert cependant que la séquence des protéines d'intérêt soit disponible dans les banques de données. De plus, la grande sensibilité de cette méthode fait en sorte que peu de matériel est nécessaire et qu'il est possible de détecter une protéine présente même en infime quantité (410). Cette sensibilité peut toutefois s'avérer un désavantage dans la mesure où les contaminants sont aussi aisément détectés. L'abondance d'un contaminant peut alors masquer une protéine importante mais en faible quantité. Outre la faible abondance d'une protéine, des propriétés physico-chimiques propres aux peptides, telles que l'hydrophobicité, peuvent favoriser la détection de certaines protéines au détriment d'autres. Une fois ces paramètres pris en considération, la protéomique virale demeure néanmoins un outil indéniablement performant et précieux dans l'identification et l'étude de l'entière des protéines qui composent un virus.

## **5 - Objectifs de recherche**

Outre l'étude des virus pour les différentes pathologies et maladies qui leur sont associées, les virus jouent aussi un rôle important en tant que modèle expérimental pour étudier et comprendre les mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire. À cet effet, HSV-1 est d'ailleurs un excellent modèle biologique car il se réplique rapidement dans

une grande variété de lignées cellulaires, ses séquences génomique et protéique sont disponibles et il est aisé de se procurer différents réactifs tels que des anticorps, des souches virales mutantes et des bacmides. De plus, les connaissances acquises via HSV-1 s'appliquent généralement aux autres *Herpesviridae* puisque les principales étapes du cycle viral sont communes aux différents membres de cette famille.

Au cours des dernières années, le développement des techniques de protéomique a permis l'émergence de nombreuses études appliquant une approche protéomique aux virus. Ces analyses de protéomique ont servi notamment à identifier la composition protéique des virions, la structure des protéines virales, les interactions virus-hôte et virus-virus ainsi que les changements du protéome cellulaire suite à une infection virale. Ces découvertes, en plus de permettre une meilleure compréhension de la pathogénèse des virus, ont contribué au développement de nouveaux traitements et vaccins antiviraux plus efficaces (421-426). Ces méthodes ont aussi permis d'apporter des précisions concernant le rôle de régulation de certaines protéines cellulaires et même de découvrir de nouveaux processus cellulaires (406, 407, 409).

L'objectif principal de ce projet de recherche de doctorat est donc de caractériser le processus complexe de maturation d'HSV-1 grâce à une approche multidisciplinaire alliant la biologie cellulaire, la virologie et la protéomique. Pour atteindre cet objectif majeur, celui-ci a été subdivisé en objectifs secondaires qui ont pour but de déterminer et de comparer le contenu protéique de différents intermédiaires viraux (extracellulaire et nucléaire), d'analyser les interactions et la dynamique sous-jacentes au tégument et de clarifier le processus complexe d'acquisition du tégument.





## **RÉSULTATS – PRÉSENTATION PAR ARTICLES**

### **Article 1 : Comprehensive characterization of extracellular HSV-1 virions**

Auteurs : Sandra Loret, Ginette Guay et Roger Lippé

Publié dans : Journal of Virology. Septembre 2008 ; volume 82, n°17 : pages 8605-18.

#### Contribution des auteurs :

Sandra Loret\* : conception, planification et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

Ginette Guay : réalisation des techniques liées à la microscopie électronique

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

\* Premier auteur

#### Notes sur le texte :

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



Page couverture relative à l'article 1.

VOLUME 82, NUMBER 20 JOURNAL OF VIROLOGY

OCTOBER 2008 Pages 9807-10327

Published \_\_\_\_\_  
Twice Monthly \_\_\_\_\_  
by the \_\_\_\_\_  
**American** \_\_\_\_\_  
**Society** \_\_\_\_\_  
for \_\_\_\_\_  
**Microbiology** \_\_\_\_\_

# Journal of Virology

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

OCTOBER 2008, VOLUME 82, NUMBER 20

Cover page : Depiction of all viral proteins identified by proteomics in the capsid, tegument, and envelope of mature extracellular herpes simplex virus type 1 virions, superimposed on a picture of a virion. The size of each circle illustrates the relative abundance of the protein. The colors reflect the functions of the proteins as follows: entry (green), replication (lavender), transcription/translation (yellow), DNA incorporation (orange), capsid core (red), nuclear egress (dark blue), post-nuclear egress (light blue), and other or undetermined functions (white).



**Comprehensive characterization of extracellular HSV-1 virions**

Sandra Loret, Ginette Guay and Roger Lippé\*

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

Running title: Proteomics of mature HSV-1 virions

Word count for the abstract: 243

Word count for the text: 6458

*\*Corresponding author:*

*Dr. Roger Lippé*

*Department of Pathology and Cell Biology*

*University of Montreal*

[Redacted contact information]

## ABSTRACT

The HSV-1 genome is contained in a capsid wrapped by a complex tegument layer and an external envelope. The poorly defined tegument plays a critical role throughout the viral life cycle, including delivery of capsids to the nucleus, viral gene expression, capsid egress and acquisition of the viral envelope. Current data suggest tegumentation is a dynamic and sequential process that starts in the nucleus and continues in the cytoplasm. Over two dozens proteins are assumed or known to ultimately be added to virions as tegument, but its precise composition is currently unknown. Moreover, a comprehensive analysis of all proteins found in HSV-1 virions is still lacking. To better understand the implication of the tegument and host proteins incorporated in the virions, highly purified mature extracellular viruses were analyzed by mass spectrometry. The method proved accurate (95%), sensitive and hint at 8 different viral capsid proteins, 13 viral glycoproteins and 23 potential viral teguments. Interestingly, four novel virion components were identified (U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55) and two teguments confirmed (ICP0, ICP4). In contrast, U<sub>L</sub>4, U<sub>L</sub>24, the U<sub>L</sub>31/U<sub>L</sub>34 complex and the viral U<sub>L</sub>15/U<sub>L</sub>28/U<sub>L</sub>33 terminase were undetected, as was most of the viral replication machinery, with the notable exception of U<sub>L</sub>23. Surprisingly, the viral glycoproteins gJ, gK, gN and U<sub>L</sub>43 were absent. Analysis of virions produced by two unrelated cell lines suggests their protein composition is largely cell type independent. Finally but not least, up to 49 distinct host proteins were identified in the virions.

## INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a multilayered particle composed of a DNA core surrounded by a capsid, a tegument and finally an envelope. The tegument consists of several proteins that are critical for the virus. For instance, upon viral entry in the cell, the tegument likely directs the virus to the nucleus (20, 33, 52, 90). There, the U<sub>L</sub>36 tegument protein anchors the capsids to the nuclear pore to enable viral DNA transfer into the nucleus (90). Three other teguments, namely ICP0, ICP4 and U<sub>L</sub>48 (VP16), then play an essential role in initiating viral transcription (24). Meanwhile, the U<sub>L</sub>41 (VHS) tegument specifically degrades some mRNAs to the benefit of the virus (93, 94). During egress, passage of the newly assembled capsids across the two nuclear membranes relies on the U<sub>L</sub>31 (tegument)/U<sub>L</sub>34 (transmembrane protein) complex as well as the U<sub>S</sub>3 tegument (46, 81). Interestingly, despite the involvement of all three proteins in nuclear viral egress, only U<sub>S</sub>3 is found in mature virions (81). Other teguments also participate in nuclear capsid egress, including U<sub>L</sub>48 (VP16), ICP34.5, U<sub>L</sub>36, U<sub>L</sub>37 and possibly U<sub>L</sub>51 (12, 65), (45, 71). The tegument further mediates the anterograde transport of newly assembled capsids (53, 101). Finally, several teguments are involved in the acquisition of the mature viral envelope, including U<sub>L</sub>36 and U<sub>L</sub>37 (19, 30), U<sub>L</sub>7 (29), U<sub>L</sub>11 (6, 47), U<sub>L</sub>20 (26), U<sub>L</sub>46-49 (31, 65) and perhaps U<sub>L</sub>51 (45, 71).

Given the multiple roles played by the tegument throughout the life cycle of the virus, its incorporation in mature extracellular virions is surely significant. So far, possible HSV-1 teguments present in mature extracellular virions include U<sub>L</sub>11 (54), U<sub>L</sub>13 (15, 74), U<sub>L</sub>14 (16), U<sub>L</sub>16 (61, 68), U<sub>L</sub>21 (5), U<sub>L</sub>36 (60), U<sub>L</sub>37 (57, 86), U<sub>L</sub>41 (25, 88), U<sub>L</sub>46 (110), U<sub>L</sub>47 (59, 110), U<sub>L</sub>48 (67), U<sub>L</sub>49 (23, 91), U<sub>L</sub>51 (17), U<sub>S</sub>2 (in HSV-2; (37)), U<sub>S</sub>3 (81), U<sub>S</sub>10 (102), U<sub>S</sub>11 (83) and ICP34.5 (34). In addition, conflicting reports have hinted at the presence of ICP0 (22, 39, 106, 107) and ICP4 (22, 58, 106, 108). Finally, a number of

proteins with predicted transmembrane domains, but often referred to as teguments in the literature, are also found in virions. They include U<sub>L</sub>20 (99), U<sub>L</sub>56 (41, 42) and U<sub>S</sub>9 (28). Despite this knowledge, the complete composition of mature extracellular virions, including its tegument, awaits a comprehensive characterization.

Little is known so far of the presence and role of host proteins in HSV-1 virions. However, a variety of host proteins have been found in other herpesviruses (7, 9, 18, 21, 38, 40, 63, 96, 111). Though some of these proteins are uniquely incorporated in a given virus, cytoskeleton, heat shock and other cellular proteins are shared by several members of the herpes family. Unfortunately, their roles have yet to be elucidated. As the presence of these proteins is unlikely anecdotic, it is of utmost interest to identify and characterize them.

Mass spectrometry is a powerful mean to identify the protein composition of complex samples. Such proteomics approach has successfully been performed for various herpesviruses, including HCMV (7, 96), MCMV (40), EBV (38), KSHV (9, 111), RRV (72), MHV68 (11) and very recently Alcelaphine herpesvirus-1 (21). HSV-1 is conspicuously absent from this list. As a first step towards elucidating the process of tegumentation and the role played by host proteins, we opted to analyze by mass spectrometry the composition of highly purified HSV-1 extracellular virions. This approach detected low abundance proteins such as U<sub>L</sub>6 (12 copies), some the smallest viral proteins (for example U<sub>S</sub>9; 10 kDa) as well as multi-membrane spanning proteins such as the gM glycoprotein.

Overall, this study successfully detected 37 of 40 known viral components and correctly diagnosed the absence of 21 non structural proteins for an estimated 95.1% accuracy. This accuracy was accrued to 96.7% when performing an in-depth MRM analysis, an approach that targets specific proteins by mass spectrometry. The data further revealed the presence of four



novel virion components (U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55) and confirmed the presence of ICP0 and ICP4 in mature virions. In contrast, the viral terminase (U<sub>L</sub>15/U<sub>L</sub>28/U<sub>L</sub>33), the U<sub>L</sub>31/U<sub>L</sub>34 complex, four different glycoproteins (gJ, gK, gN and U<sub>L</sub>43) as well as U<sub>L</sub>4 and U<sub>L</sub>24 were all absent. Finally, analysis of the host protein content revealed the potential incorporation of up to 49 distinct cellular proteins in extracellular virions.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** HeLa and baby hamster kidney (BHK) cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Medicorp), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Invitrogen). Wild-type HSV-1 strain F virus, provided by Beate Sodeik, was propagated on BHK cells and titrated on Vero cells as described previously (95).

**Antibodies.** Primary antibodies were graciously provided by various sources and diluted as follows. Anti-HSV-1 Remus, a general HSV-1 polyclonal serum from B. Sodeik (1:1,000); anti-U<sub>L</sub>4 (1:1,000), U<sub>L</sub>20 (1:4,000), U<sub>S</sub>3 (1:4,000) and U<sub>S</sub>11 (1:1,000) from B. Roizman; anti-U<sub>L</sub>7 from Y Nishiyama (1:1,000); anti-U<sub>L</sub>15 (1:1,000), U<sub>L</sub>28 (1:5,000), U<sub>L</sub>31 (1:1,000) and U<sub>L</sub>33 (1:1,000) from J. Baines; anti-U<sub>L</sub>23 from J. Smiley (1:5,000); anti-U<sub>L</sub>24 from A. Pearson and D. Coen (1:750); anti-U<sub>L</sub>34 from R. Roller (1:1,000); and anti-U<sub>S</sub>6 gD-DL6 from R.J. Eisenberg and G.H. Cohen (1:2,000). Commercial antibodies directed against U<sub>L</sub>19 (1:1,000, Cedarlane), ICP0 (1:5,000, Abcam) and ICP4 (1:1,000, Abcam). Goat anti-mouse, rabbit or rat as well as donkey anti-chicken secondary antibodies were used 1:20,000 and were from Jackson ImmunoResearch or Cedarlane.

**Determination of optimal infection kinetics.** HeLa cells were mock treated or infected with HSV-1 at a multiplicity of infection (MOI) of 5 at 37°C. Extracellular medium was collected at 9, 12, 16 and 24 hours post-infection (hpi), concentrated 1h at 39,000 x g (rotor SW41ti - Beckman) and finally resuspended in MNT buffer (30 mM MES, 100 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 7.4). In parallel, cells were also collected by scrapping them in

phosphate-buffered saline (PBS), spun at 300 x g for 5 min at 4°C and the viral pellets resuspended in MNT buffer. Five micrograms of each sample were loaded on a 8 % SDS-PAGE gel and analysed by Western blot using the Remus polyclonal antibody against HSV-1.

**Purification of extracellular virions.** HeLa or BHK cells were grown on 500 cm<sup>2</sup> dish until 70% confluent. Cells were mock treated or infected with wild type HSV-1 at a MOI of 5. Six hours post-infection, the cells were washed twice with PBS and the medium replaced by serum free DMEM until harvesting of the extracellular medium at either 24 hpi (HeLa) or 16 hpi (BHK). The medium was then collected, clarified by centrifugation at 300 x g for 10 min and treated with 50 µg/mL DNase I (Roche) for 30 min at 4°C. The sample was then filtered through a 0.45 µm filter to eliminate intact cells and large cellular debris. Extracellular virions were subsequently pelleted by centrifugation at 20,000 x g for 30 min at 4°C in a Beckman JA25.50 rotor. The viral pellet was resuspended in MNT buffer and was further purified by layering them over a 10% Ficoll 400 cushion centrifuged at 26,000 x g for 2 hours at 4°C in a SW41ti rotor (92). The virus was washed with MNT and concentrated by centrifugation at 20,000 x g for 30 min at 4°C. Purified viruses were stored at –80°C in MNT buffer.

**Electron microscopy.** Sample purity was first evaluated by negative staining. Briefly, purified viruses were deposited on square 150-mesh copper grids coated with Formvar and carbonated (Canemco and Marivac). Excess liquid was blotted away with filter paper and the samples contrasted with 2% of uranyl acetate (Canemco and Marivac). The grids were then washed in distilled water and dried on filter paper. Samples were examined with a Philips 300 transmission electron microscope (79).

**Gel electrophoresis and Western blotting.** All samples were boiled for 10 min in loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulphate, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) and separated on 8, 10, 12 or 15% gels by SDS-PAGE. Proteins were electrophoretically transferred from the gels to polyvinylidene difluoride (PVDF) and the membranes blocked for 1 hour in blocking buffer (5% non fat dry milk, 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 0.1% Tween-20). All primary antibodies were diluted in blocking buffer and added to blots for 1-2 hours. Blots were then washed three times in blocking buffer and probed with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The detection was done on Kodak BioMax MR films and with the Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce).

**Silver staining.** Following electrophoresis, gels were fixed overnight in 5% acetic acid/50% methanol solution. Gels were then intensively rinsed in distilled water for 30 min and incubated in 0.02% thiosulfate sodium solution for 1 min. Gels were briefly washed with distilled water for 2 min and incubated in 0.1% silver nitrate solution for 20 min. After this incubation, gels were again briefly washed in distilled water and then incubated in reaction buffer (0.04% formaldehyde and 2% carbonate sodium). The reaction was stopped by the addition of 5% acetic acid solution to the gels.

**Mass spectrometry.** Purified virions were first acetone precipitated and solubilized in Laemmli buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue and 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8). Twenty micrograms of sample were loaded on 7-15% SDS-PAGE gradient gels. Following electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G (Sigma) and then subjected to automated band excision. Proteins from gel bands were subjected to reduction, cysteine-alkylation and in-gel tryptic digestion by

automation in a MassPrep Workstation (Micromass). Extracted peptides were injected onto a Zorbax C18 (Agilent) desalting column and subsequently chromatographically separated on a Biobasic C18 Integrafrit (New Objective) capillary column using a Nano HPLC system (Agilent 1100 series). Eluted peptides were electrosprayed as they exited the column and analyzed on a QTRAP 4000 linear ion trap mass spectrometer (SCIEX/ABI). Individual MS/MS spectra were peaklisted and searched with MASCOT (Matrix science) against a homemade database generated from the complete NCBI non redundant protein data set and limited to the Human herpes simplex virus type 1 taxonomy. To identify host proteins, a second search was performed against the non redundant human NCBI database. Only peptides that were both unique and above the minimal score proposed by Mascot were considered. When indicated, the relative abundance of individual proteins was roughly estimated by clustering the data and using the percentage of queries (NQPCT), a value that takes into consideration the number of peptides detected for a given protein as well as the size of that protein (10, 51). Note that the sum of all NQPCT is 100%, i.e. all proteins identified by Mascot. Given the semi-quantitative nature of this approach, the proteins were grouped into four categories (< 1%: low abundance; 1-4%: medium abundance; 5-10%: very abundant; > 10%: very high abundance).

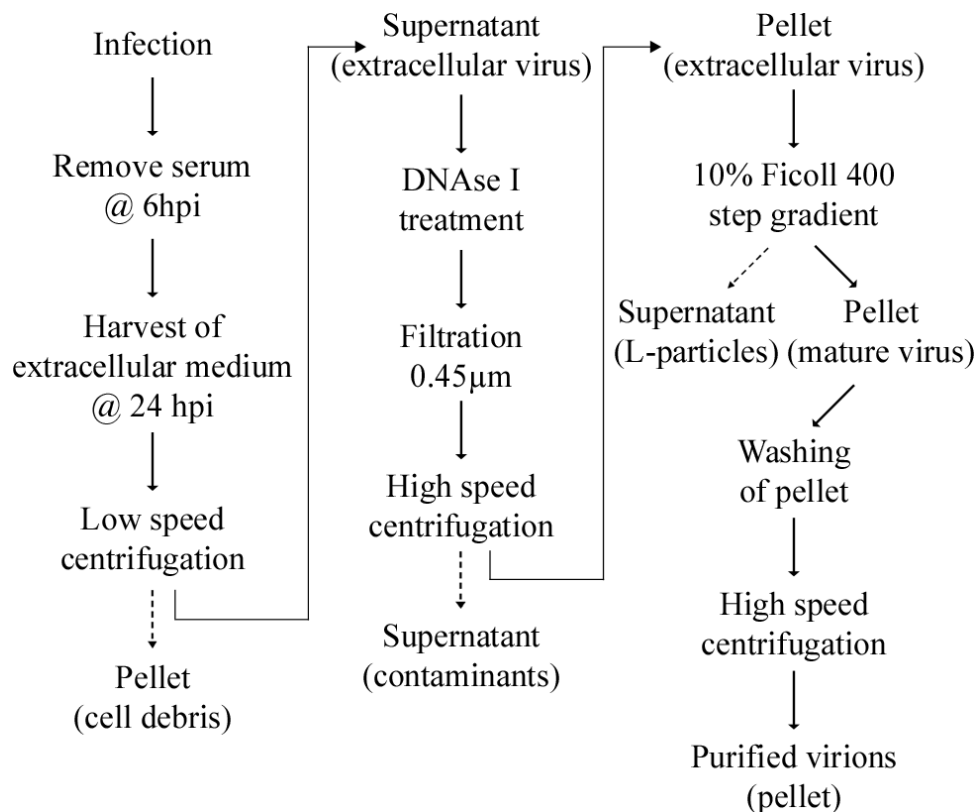
**Analysis by Multiple Reaction Monitoring (MRM).** To re-evaluate more precisely the presence of U<sub>L</sub>20, U<sub>L</sub>43, gJ, gK, gN, U<sub>S</sub>11, full length U<sub>L</sub>26, VP21 and VP22a in the virions, the proteins were reanalyzed by MRM. This technique allows the detection of specific proteins of interest in complete mixtures and thus is a more sensitive method than classical mass spectrometry (3, 48). To this end, a transition table containing the predicted masses of tryptic peptides for U<sub>L</sub>20, U<sub>L</sub>43, gJ, gK, gN, U<sub>S</sub>11, full length U<sub>L</sub>26, VP21 and VP22a was generated. Appropriate bands from the above gels were

reanalyzed as before by tandem mass spectrometry except that only peptides matching the predicted masses were considered. To minimize the risk of missing a protein due to its unexpected migration by SDS-PAGE, adjacent bands were also analyzed.



As shown in Fig. 1, viral release into the extracellular medium was detectable by 16 hpi but significantly increased by 24 hpi. By then, cell lysis was less than 5% (data not shown). Given these results, the latter time point was chosen to pursue the analysis.

A scheme was next elaborated to purify the extracellular virions (depicted in Fig. 2). First, to reduce the contribution of proteins found in the tissue culture medium, the cells were washed twice at 6 hpi with PBS and fed with serum free medium. The infection was then allowed to proceed for an additional 18 hours, at which point the extracellular viruses were harvested. The sample was spun at low speed to remove intact cells and nuclei, treated with DNase I to reduce viscosity and passed over a 0.45  $\mu\text{m}$  filter to remove intact cells and large cellular debris.



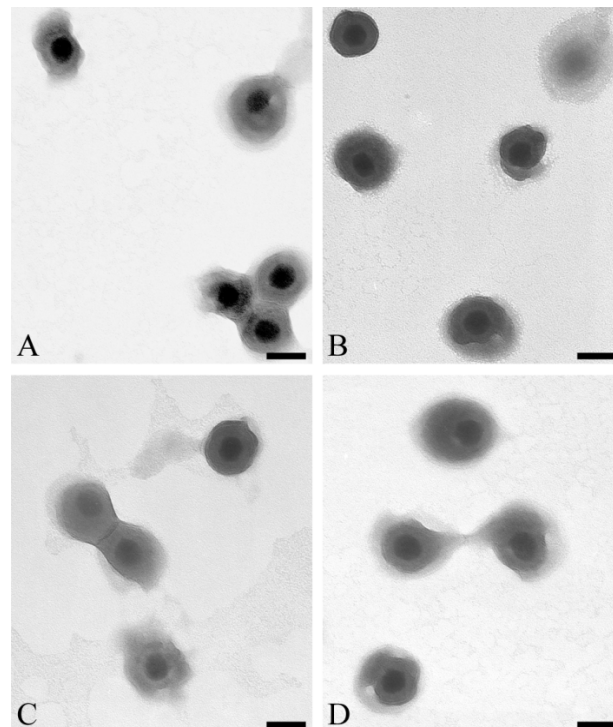
**Figure 2 – Purification scheme**

*Schematic description of the different steps to purify extracellular HSV-1 virions. See text as well as Materials and Methods for details.*



Extracellular viruses were spun at 20,000 x g, a condition that efficiently pellets the virions but minimizes contamination by small cellular organelles. The virus was then further purified over an adapted Ficoll 400 gradient. In typical 5-15% Ficoll gradients, the defective L-particles migrate at the 5% mark, whereas the heavier mature virions remains near the bottom at 15% (92). Consequently, the virions were top loaded over a 10% Ficoll step gradient, the viral pellet washed with MNT and the virus finally concentrated at 20,000 x g.

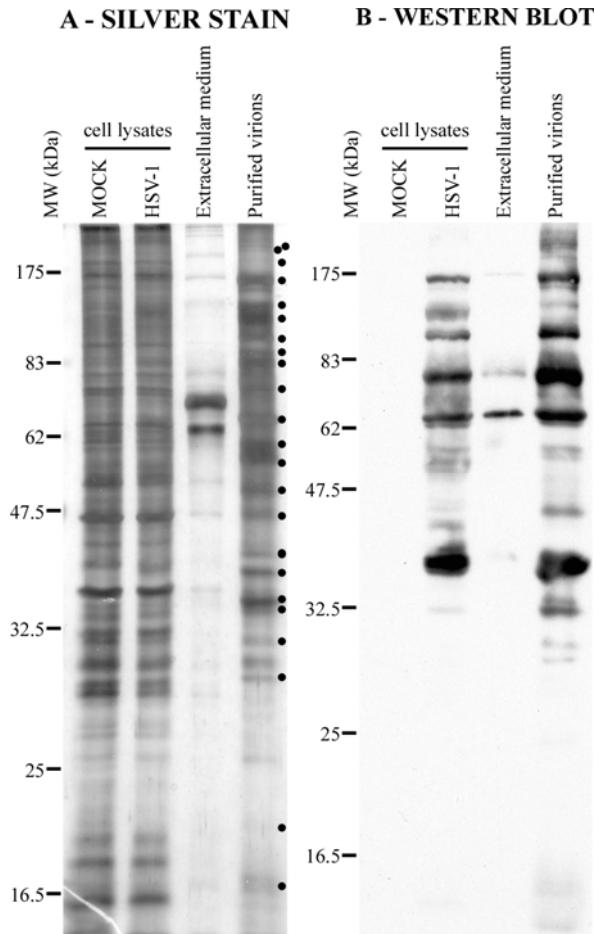
To monitor sample purity, negative staining was performed and the samples examined by EM. As shown in Fig. 3, the viral preparation was completely devoid of cellular debris, L-particles, nuclei, mitochondria and even small vesicles. Note that all viruses shared the characteristics of mature virions with an envelope and a DNA core (Fig. 3).



**Figure 3 – Analysis of extracellular virions by electron microscopy**

*Purified virions from HeLa cells were negatively stained and analyzed by electron microscopy. Panels A-D show typical views of the sample. Note that the sample exclusively consisted of enveloped virions and was exempt of cellular debris and L-particles. Bars represent 100 nm.*

To determine the efficacy of the purification scheme, the virions were monitored by Western blots using a pan HSV-1 polyclonal and by silver coloration. As controls, total cell lysates from mock treated or HSV-1 infected cells were included.



**Figure 4 – Analysis of purified virions by Silver stain and Western blot**

(A) Five micrograms of unpurified (“Extracellular medium”) or purified virions from HeLa cells were loaded on a 12% SDS-PAGE gel and silver stained. As control, an equivalent amount of total mock and infected cell lysates were also loaded. Note the different protein pattern of purified virions when compared to control total cell lysates (see dots). (B) The same samples were also analysed by Western blotting with the Remus antibody, but in this case 25  $\mu$ g of control mock and infected total cell lysates were loaded. Viral enrichment of the purified virions was particularly evident compared to the unpurified sample. As before, the masses of the protein markers were indicated to the left of the gels.

Figure 4A shows the strong enrichment of numerous viral bands when compared to the unpurified extracellular medium (compare lanes 3 and 4). Furthermore, the total protein pattern seen by silver staining was significantly different than mock or HSV cell control lysates (see dots). The enrichment of virions was particularly evident by Western blotting (Fig. 4B). Further purification of the virions by additional means such as immunoprecipitation against the viral glycoproteins, affinity chromatography using a heparin column or other density gradients only reduced viral yield and did not improve sample purity, suggesting the samples were already relatively pure (data not shown).

**Viral content of extracellular virions.** One goal of this study was to identify the viral protein content of extracellular virions. Given their high purity, we pursued with protein separation by SDS-PAGE, in gel trypsin digestion and tandem mass spectrometry (see Materials and Methods). To optimize viral protein identification, a database was generated using all human herpesvirus type 1 proteins present in the NCBI non redundant protein databank. These proteins were trypsin digested *in silico* and the viral peptides found by mass spectrometry identified with Mascot against this homemade tryptic database. Over 400 highly confident unique peptides matched HSV-1 proteins (Table 1). For simplicity, they are organized according to the proposed localisation of the proteins in virions (4, 62). Since the number of peptides is one measure of relative abundance (10, 21), albeit imperfect, the data suggested the tegument is the major virion component and represented 54% of all peptides, by comparison to 27% for the capsid and 19% for the envelope. Similarly, 23 of the identified proteins were from the tegument, while 8 proteins matched capsid proteins and 12 corresponded to the envelope.

**TABLE 1: Viral content of extracellular virions**

Viral protein group and gene	Protein name	MW (kDa) <sup>a</sup>	Size (aa)	Number of unique peptides	% Coverage <sup>b</sup>	Viral protein group and gene	Protein name	MW (kDa) <sup>a</sup>	Size (aa)	Number of unique peptides	% Coverage <sup>b</sup>
<b>Capsid<sup>c</sup> (d)</b>						<b>Tegument<sup>c</sup> (d)</b>					
UL6 (+)		74.1	676	1	2.5	RL1 (+)	ICP34.5	26.2	248	1	3.4
UL15 (?)	Terminase	80.9	735	-	NA <sup>e</sup>	RL2 (?)	ICP0	78.5	776	10	21.3
UL17 (+)		74.6	703	10	23.8	RS1 (?)	ICP4	132.8	1298	20	22.6
UL18 (+)	VP23	34.3	318	15	65.7	UL4 (-)		78.2	718	-	NA
UL19 (+)	VP5 / ICP5	149.1	1374	54	59.5	UL7 (?)		33.1	296	4	25.0
UL25 (+)		62.7	580	8	19.5	UL11 (+)		10.5	96	2	20.8
UL26 (protease)	VP24 (+)	26.6	247	7	41.3	UL13 (+)		57.2	518	3	10.0
	VP21 (-)	37.3	363	-	NA	UL14 (+)		23.9	219	1	10.5
	COOH term (-)	2.6	25	-	NA	UL16 (+)		40.4	373	7	32.4
UL26.5	VP22a (-)	31.2	304	-	NA	UL21 (+)		57.6	535	9	27.5
	COOH term (-)	2.6	25	-	NA	UL23 (?)	TK	41.0	376	1	4.4
UL28 (?)	ICP18.5	85.6	785	-	NA	UL31 (-)		34.0	306	-	NA
UL33 (?)		14.4	130	-	NA	UL36 (+)	Large tegument	335.9	3164	42	20.7
UL35 (+)	VP26	12.1	112	3	39.3	UL37 (+)	ICP32	120.6	1123	22	33.2
UL38 (+)	VP19C	50.3	465	9	23.9	UL41 (+)	Vhs	54.9	489	9	30.1
	<b>Total of peptides</b>			<b>107</b>		UL46 (+)	VP11/12	78.2	718	16	34.3
<b>Envelope<sup>c</sup> (d)</b>						UL47 (+)	VP13/14	73.8	693	25	51.2
UL1 (+)	gL	24.9	224	4	24.6	UL48 (+)	VP16 / ICP25	54.3	490	15	45.5
UL10 (+)	gM	51.4	473	2	11.2	UL49 (+)	VP22	32.3	301	8	39.5
UL20 (+)		24.2	222	-	NA	UL50 (?)	dUTPase	39.1	371	6	26.7
UL22 (+)	gH	90.4	838	11	18.7	UL51 (+)		25.5	244	4	27.0
UL27 (+)	gB	100.3	904	22	30.2	UL55 (?)		20.5	186	4	37.6
UL34 (-)		29.8	275	-	NA	US2 (+)		32.5	291	5	15.6
UL43 (?)		44.9	434	-	NA	US3 (+)		52.8	481	1	6.7
UL44 (+)	gC	55.0	511	7	26.6	US10 (+)		34.1	312	3	13.7
UL45 (+)		18.2	172	5	39.0	US11 (+)		17.8	161	-	NA
UL49A (+)	gN	9.2	91	-	NA		<b>Total of peptides</b>			<b>218</b>	
UL53 (?)	gK	37.6	338	-	NA	<b>Other<sup>c</sup> (d)</b>					
UL56 (+)		21.2	197	2	22.8	UL2 (-)		36.3	334	-	NA
US4 (+)	gG	25.2	238	2	3.8	UL3 (-)		25.6	235	-	NA
US5 (?)	gJ	9.6	92	-	NA	UL5 (-)		98.7	882	-	NA
US6 (+)	gD	43.3	394	7	23.2	UL8 (-)		79.9	750	-	NA
US7 (+)	gI	41.4	390	4	16.7	UL9 (-)		94.3	851	-	NA
US8 (+)	gE	59.1	550	9	18.4	UL12 (-)		67.5	626	-	NA
US8A (?)		16.8	159	-	NA	UL24 (?)		29.5	269	-	NA
US9 (+)		10.0	90	1	37.8	UL29 (-)	ICP8	128.4	1196	-	NA
	<b>Total of peptides</b>			<b>76</b>		UL30 (-)		136.4	1235	-	NA
						UL32 (-)		64.0	596	-	NA
						UL39 (-)	ICP6/10	124.1	1137	-	NA
						UL40 (-)		38.0	340	-	NA
						UL42 (-)		51.2	488	-	NA
						UL52 (-)		114.4	1058	-	NA
						UL54 (-)	ICP27	55.3	512	-	NA
						US1 (-)	ICP22	46.5	420	-	NA
						US12 (-)	ICP47	9.8	88	-	NA

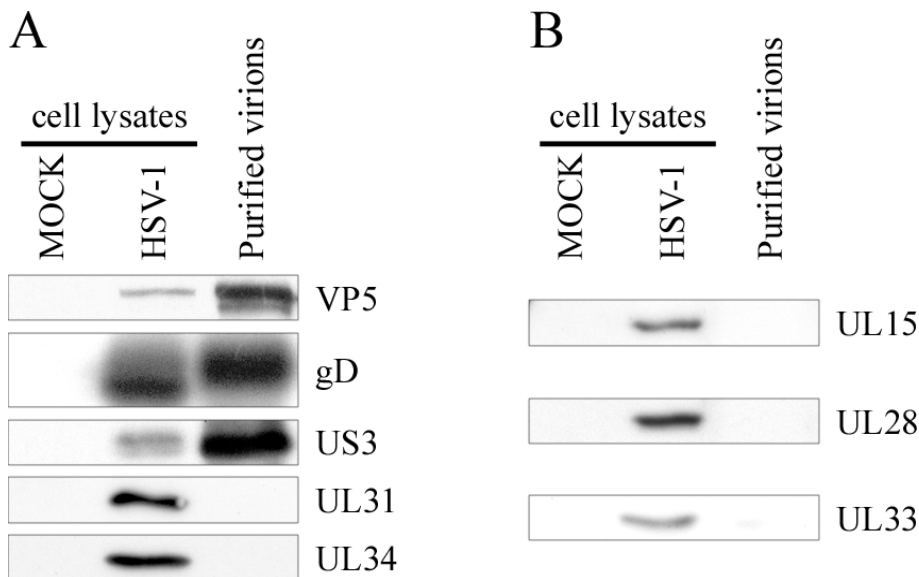
	Abundance <sup>f</sup>	Total	
Capsid	26.7%	8	
Envelope	19.0%	12*	*+UL20 (see MRM)
Tegument	54.4%	23	

<sup>a</sup>: Estimated molecular weight<sup>b</sup>: % coverage of protein by peptides<sup>c</sup>: Localisation based on ref 2 & 56<sup>d</sup>: Expected in virions<sup>e</sup>: Not applicable<sup>f</sup>: Relative peptide abundance

**Validation of proteomics approach.** One caveat of proteomics is the possible inclusion of false positives (contaminants) and negatives (below detection threshold). Fortunately, many components of HSV-1 virions have been identified by other means by several laboratories. This independent input represented an ideal opportunity to validate our approach. Thus analysis of the literature revealed that 37 of the 40 anticipated capsid, tegument and viral glycoproteins were detected (Table 1). This translates to 92.5% accuracy for true positives. Similarly, none of the 21 non structural viral proteins, i.e. not anticipated on mature virions, were detected (100% accuracy for true negatives). This included the viral replication machinery, the U<sub>L</sub>31/U<sub>L</sub>34 complex, U<sub>L</sub>4 and VP22a. Altogether, this means a 95.1% accuracy rate (58 out of 61). Furthermore, the mass spectrometer appeared sufficiently sensitive to detect low abundance proteins such as U<sub>L</sub>6, a protein only present in twelve copies in mature virions (69). U<sub>S</sub>9 and U<sub>L</sub>11, the two smallest proteins expected in virions, were also detected (90 and 96 amino acids respectively). In addition, numerous glycoproteins were also found, suggesting that hydrophobicity was not a major issue. Collectively, these data highlighted the remarkable accuracy and sensitivity of the approach.

An important aspect is whether the sample only consisted of mature viruses. As indicated above, EM analysis suggested the sample was relatively pure (Fig. 3). Another way to probe this issue is to examine the U<sub>L</sub>26 protease, the U<sub>L</sub>26.5 (preVP22a) scaffold and their respective cleavage products. Though full length versions of these proteins are present in immature capsids, the former is cleaved into VP21 and VP24, while the second is processed into VP22a. Incidentally, all but VP24 are removed from mature capsids and are thus useful markers (reviewed in Baines et al (4)). Interestingly, mass spectrometry identified seven peptides matching VP24, but none corresponded to the full length U<sub>L</sub>26, VP21, preVP22a or processed VP22a (Table 1). Consequently, only mature virions were detected in the sample.

To further validate the mass spectrometric approach, control proteins were examined by Western blot. These included the VP5 major capsid protein, the gD glycoprotein expected of mature envelope virions and the U<sub>5</sub>3 tegument as positive controls. In contrast, U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34, acted as negative controls as they are known to be absent on mature virions (81). As noted in Fig. 5, the results were all fully consistent with the mass spectrometry data, i.e. that the virions were VP5, gD and U<sub>5</sub>3 positive but U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 negative. Once again, the data strongly suggested the mass spectrometry was sensitive and correctly identified the viral protein content of mature virions. Note that it was unfortunately not possible to evaluate the presence of gJ, gK and gN in mature virions by Western blotting due to the lack of appropriate antibodies.



### Figure 5 –Western blotting analysis of the capsid

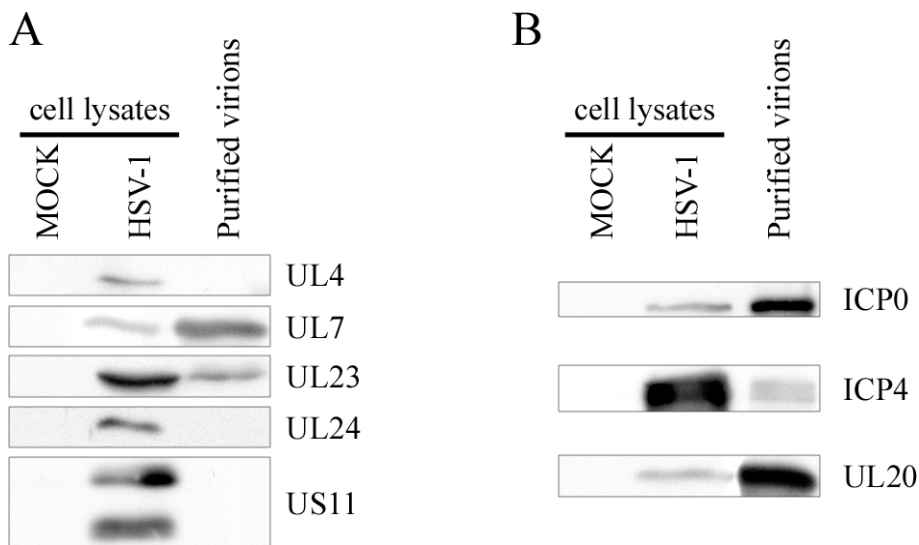
A) Five micrograms of purified virions from HeLa cells were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF and probed with antibodies against the major VP5 capsid, a control glycoprotein D envelope protein (gD), the serine/threonine viral kinase (U<sub>5</sub>3) and the U<sub>L</sub>31/U<sub>L</sub>34 complex. Fifteen micrograms of total mock or infected cell lysates were also included as antibody controls. B) As above except that the viral terminase components (U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>28, U<sub>L</sub>33) were analyzed with specific antibodies.

Encapsidation of the viral DNA requires the participation of the tripartite U<sub>L</sub>15/U<sub>L</sub>28/U<sub>L</sub>33 terminase (104, 105). It has been suggested it remains associated with mature C capsids (4). However, the present study failed to detect these proteins by mass spectrometry. To independently validate the data, these proteins were probed by the more sensitive Western blotting technique using sera specific for each of the terminase subunits. Once again, the results fully matched those obtained by mass spectrometry in that none of these proteins were detected, despite being detected in control infected lysates (Fig. 5).

**Analysis of teguments.** Having established the validity of the approach, it was possible to specifically examine the tegument. Surprisingly, four novel virion components were identified by mass spectrometry. They include U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23 (TK), U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 (Table 1). Based on the well characterized capsid constituents and the lack of a predicted transmembrane domain in these proteins (data not shown), the novel virion components were tentatively assigned to the tegument layer. However, biochemical confirmation of this assignment will be required. In contrast, U<sub>L</sub>4, U<sub>L</sub>24 and U<sub>S</sub>11 were not detected. This was also the case for U<sub>L</sub>20, a predicted transmembrane protein often referred to as a tegument (see below). To confirm these findings and probe the apparent discrepancy between these results and that reported for U<sub>S</sub>11 (83), the samples were once again analyzed by Western blotting, with the exception of U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 for which no antibodies are available. As seen in Fig. 6A, the results perfectly matched the mass spectrometry data. Hence, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 were detected, while U<sub>L</sub>4, U<sub>L</sub>24 and U<sub>S</sub>11 were absent.

**Incorporation of ICP0 and ICP4.** ICP0 and ICP4 have been considered by many as minor components of mature virions (22, 87, 107, 108). However, Roizman and colleagues failed to detect ICP0 on virions by immuno-EM (39).

Furthermore, Courtney and his team reported the cell type specific inclusion of ICP0 and ICP4 in some virions (106). In addition, others have argued that ICP4 may rather be present in contaminating L-particles (56, 92). In this study, ICP0 and ICP4 were readily identified in a highly enriched virion preparation (Table 1) that contained no noticeable L-particles (Fig. 3). To confirm these findings, we next monitored ICP0 and ICP4 by Western blotting. As shown in Fig. 6B, both proteins were once again detected. We conclude that mature extracellular virions do indeed contain ICP0 and ICP4.



**Figure 6 –Western blot analysis of the tegument**

*Five micrograms of purified virions from HeLa cells were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF and probed with antibodies against (A) U<sub>L</sub>4, U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>24 and U<sub>S</sub>11 or (B) ICP0, ICP4 and U<sub>L</sub>20. Fifteen micrograms of mock or infected cell lysates were included as antibody controls.*

**Incorporation of U<sub>L</sub>20/gK in virions.** Our proteomics data suggested the absence of gK and U<sub>L</sub>20 in mature viruses (Table 1). This was unexpected given U<sub>L</sub>20 and gK have been reported on herpesvirions (27, 44, 99). However, in support of our initial results, gK was not detected in HSV-1 virions in at least one study (36). To sort out this issue, we probed the highly purified virions by Western blotting. Unfortunately, three distinct antibodies against gK could not



detect the native protein in control infected cell lysates (data not shown). Consequently, only U<sub>L</sub>20 was followed more closely. To our surprise, U<sub>L</sub>20 was detected by Western on the purified virions (Fig. 6B), in contrast to the proteomics results (Table 1). Given the specificity of the antibody used (data not shown), it could only be that U<sub>L</sub>20 is truly on mature virions but was simply not detected by mass spectrometry.

**MRM analysis.** Low abundance peptides can at times be masked in mass spectrometry by more abundant ones and lead to false negatives. However, it is possible to look for specific peptides using Multiple Reaction Monitoring (MRM). This is a well established method that essentially instructs the mass spectrometer which proteins to look for based on the predicted mass of its tryptic peptides (3, 48). In doing so, the instrument ignores all other proteins and makes it possible to detect rarer peptides. Thus, to independently test for proteins not identified by standard mass spectrometry, a table with their predicted tryptic fragments was generated and the mass of appropriately sized, hydrophilic and non N-glycosylated peptides signalled to the mass spectrometer so it could detect them in the sea of peptides. This analysis was performed for the problematic gK, U<sub>L</sub>20 and U<sub>S</sub>11 proteins (see above) as well as for U<sub>L</sub>43, gJ, gN, full length U<sub>L</sub>26, VP21 and preVP22a, all molecules that were undetected by conventional proteomics in this study. To reduce the chances of missing a protein because it unexpectedly runs on SDS-PAGE, adjacent bands were also analyzed. Table 2 shows that among all these proteins, only U<sub>L</sub>20 was found by this more sensitive approach. We conclude U<sub>L</sub>20 is indeed present on mature virions, while U<sub>L</sub>43, gJ, gK, gN and U<sub>S</sub>11 are likely absent. Furthermore, the full length U<sub>L</sub>26, VP21 and preVP22a markers of immature capsids were all absent and reiterated the sole presence of mature virions in the sample. Naturally, we cannot exclude the possibility that all undetected proteins were below the resolution limit of this study.

**TABLE 2: MRM analysis**

Protein analyzed	Comment	MW (kDa) <sup>a</sup>	Size (aa)	Unique peptides	% Coverage <sup>b</sup>
UL20		24.2	222	DDLPLVDR	3
UL26	Full length	66.5	635	-	NA
	VP21	37.3	363	-	NA
	COOH termini	2.6	25	-	NA
UL26.5	preVP22a	33.7	329	-	NA
	COOH termini	2.6	25	-	NA
UL43		44.9	434	-	NA
UL49A	gN	9.2	91	-	NA
UL53	gK	37.6	338	-	NA
US5	gJ	9.6	92	-	NA
US11		17.8	161	-	NA

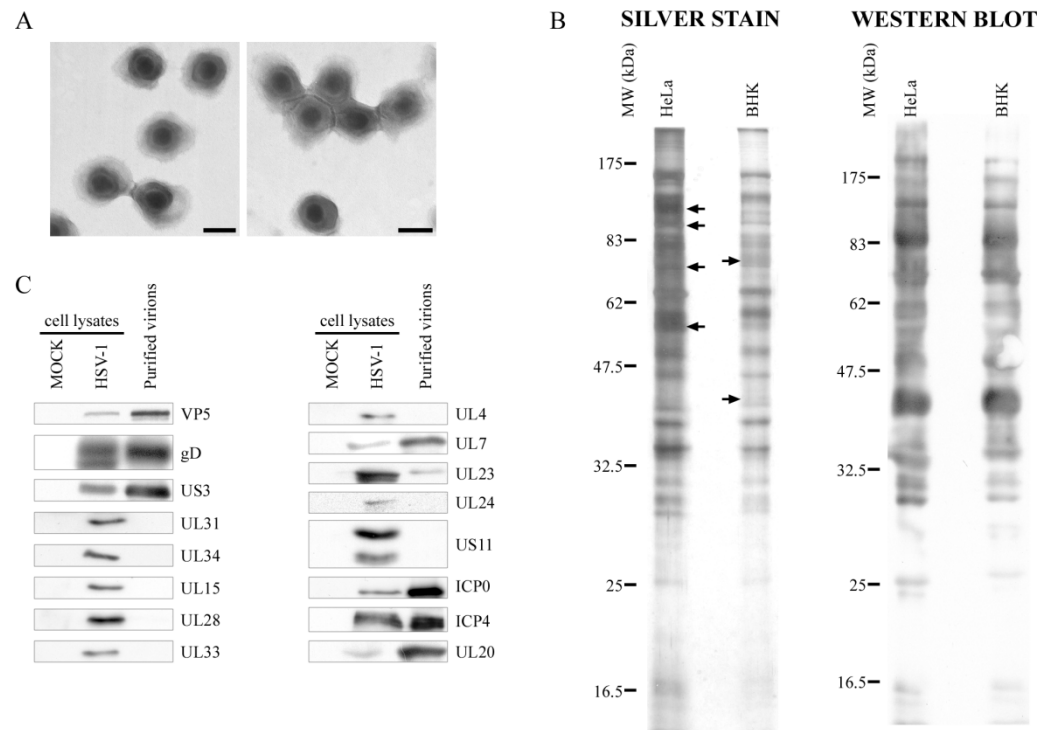
<sup>a</sup> Estimated molecular weight in kilo Daltons

<sup>b</sup> Percent coverage of protein by polypeptides detected by MS/MS

<sup>c</sup>: Not applicable

**Cell type specific incorporation of viral proteins.** To determine whether the composition of the virions may be cell type related, extracellular virions were isolated from the unrelated BHK cell line, using the same protocol as for HeLa cells, except they were harvested slightly earlier (see Materials and Methods). EM analysis of these virions once again reiterated the purity of the sample (Fig. 7A). To get a quick overall picture of the protein composition of the virions, viral preparations from HeLa and BHK cells were compared by Western blot with the Remus polyclonal HSV-1 antibody and by silver staining. Figure 7B shows that the protein patterns were overall very similar, with few distinct bands. To confirm these findings, several viral proteins were specifically probed by Western blot to evaluate potential difference between the two virion preparations (Fig. 7C). The results essentially revealed identical

expression patterns for BHK and HeLa derived virions. Though a full mass spectrometry analysis may be useful, the present data nonetheless strongly suggest the protein composition of the virions is largely independent of the cell type.



**Figure 7 – Characterization of virions purified from BHK cells**

(A) Virions were purified from BHK cells by the same procedure as for HeLa cells, negatively stained and examined by electron microscopy. The viruses were all enveloped and exempt of cellular debris and L-particles. Bars represent 100 nm. (B) Five micrograms of purified virions from HeLa and BHK cells were loaded on a 12% SDS-PAGE gel and the overall protein composition determined by silver staining (left panel). In contrast, viral enrichment was examined by Western blotting using a polyclonal HSV-1 antibody (right panel). Note the similar protein pattern (arrows indicate differences). (C) To more specifically probe differences between HeLa and BHK virions, 15  $\mu$ g of mock or infected cell lysates (antibody controls) and 5  $\mu$ g of purified virions from BHK cells were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF and immunoblotted for various viral proteins as indicated.

**Incorporation of host proteins.** The purity of the sample and the accuracy, sensitivity and strong validation of our approach allowed us to probe host proteins present in HSV-1 virions. To this end, the non redundant human NCBI database was digested *in silico* and used to reanalyze the purified virions by

mass spectrometry. As before, only significant and unique peptides were considered. Remarkably, 85 highly confident unique peptides, corresponding to up to forty nine distinct cell derived proteins, were identified in mature extracellular HSV-1 virions (Table 3). In all cases, only one to four peptides were identified for each of these proteins, suggesting they may be minor components of the virions.

**TABLE 3. Potential cellular proteins associated with extracellular virions identified by mass spectrometry**

Protein name	MW (kDa) <sup>a</sup>	Size (aa)	Number of unique peptides	% Coverage <sup>b</sup>	Protein name	MW (kDa) <sup>a</sup>	Size (aa)	Number of unique peptides	% Coverage <sup>b</sup>
14-3-3 protein	28.2 <sup>*</sup>	248	1 <sup>c</sup>	4.0	Nucleoside diphosphate kinase A/B	17.3	152	1	11.8
14-3-3 protein epsilon	29.2	255	3	16.9	Peroxiredoxin-1	22.1	199	2	10.6
14-3-3 protein gamma	28.3	247	1	5.7	Peroxiredoxin-2	21.9	198	1	5.5
14-3-3 protein zeta/delta	27.7	245	2	12.7	Profilin-1	15.1	140	4	28.6
Actin	41.8 <sup>*</sup>	375	3 <sup>d</sup>	16.3	Programmed cell death protein 6	21.9	191	2	10.5
Annexin A1	38.7	346	1	4.6	Rab	24.0 <sup>*</sup>	215	3 <sup>f</sup>	15.3
Annexin A2	38.6	339	3	13.6	Rab2A / Rab 2B / Rab4B	23.8	214	1	6.1
Annexin A5	35.9	320	1	5.0	Rab5	23.6	215	1	5.1
Arf1 / Arf 3	20.7	181	3 <sup>e</sup>	26.0	Rab6	25.2	223	3	21.1
Arf1 / Arf3 / Arf5	20.6	181	2 <sup>e</sup>	11.0	Rab7A	23.5	207	1	6.8
Arf1 / Arf3 / Arf4 / Arf5	20.6	181	2 <sup>e</sup>	16.0	Rab10	22.5	200	1	5.5
Arf4	20.5	180	1	10.0	Rab11	24.5	217	2	11.1
ATP dependant RNA helicase DDX3X	73.2	662	2	3.3	Rab15	24.4	212	1	5.2
Casein kinase 2	45.1	391	1	4.6	Rab33B	25.7	229	1	4.8
Cofilin 1	18.5	166	1	7.4	Rab35	23.0	201	1	5.5
Cyclophilin A	18.0	164	8	64.8	Rab-like protein 3	26.4	236	1	4.7
Cystein-glycin rich protein 1	20.6	193	1	11.4	S100 calcium protein binding A11	11.7	105	2	25.7
Eukaryotic translation initiation factor 4H (eIF4H)	27.4	248	4	28.2	Sec14-like protein 4	46.6	406	1	2.2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	36.1	335	1	4.2	Tetraspanin 13	22.2	204	1	10.3
Growth factor receptor bound protein 2	25.2	217	1	6.5	Transferrin receptor protein 1 (CD71)	84.9	760	1	1.2
Heat shock protein HSP70	70.4	641	3	7.8	Translocase of inner mitochondrial membrane 50 (TIMM50)	39.6	353	1	3.1
Keratin 1	66.0	644	1	2.5	Triosephosphatase isomerase	26.7	249	1	11.7
Keratin 10	59.5	593	1	2.0	Ubiquitin C	8.6	76	2	32.9
Macrophage Migration Inhibitory Factor	12.5	115	1	9.5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	17.9	154	1	14.3
Membrane attack complex inhibition factor (CD59)	14.2	128	1	9.4					
					<b>Total of peptides</b>			<b>85</b>	

<sup>a</sup> Estimated molecular weight in kilo Daltons (\*: averaged for family members)

<sup>b</sup> Percent coverage of protein by polypeptides detected by MS/MS

<sup>c</sup> Shared among 14-3-3 protein family members

<sup>d</sup> Shared among actin family members

<sup>e</sup> Shared among indicated Arf proteins

<sup>f</sup> Shared among Rab family members

## DISCUSSION

**Efficacy of the proteomic approach.** Three criteria are essential for proteomics studies, namely purity, sensitivity and accuracy. First, examination of sample purity by EM revealed a homogeneous virion preparation free of cellular debris, small contaminating vesicles and L-particles (Fig. 3). Importantly, the latter were not expected as the sample was passed over a Ficoll gradient known to effectively segregate them (92). Moreover, the purified sample was highly infectious (data not shown). Contamination by other components was also deemed non significant based on the lack of intracellular naked capsids, mitochondria, nuclei and other organelles that would result from extensive cell lysis (Fig. 3). In addition, preVP22a, VP21 or full length U<sub>L</sub>26, all markers of immature capsids (reviewed in Baines *et al* (4)), were absent in our sample (Tables 1 & 2). Similarly, the absence of U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34, known to solely interact with nuclear capsids, is additional evidence that cell lysis and cellular contamination were minimal. Finally, further purification of the virions by additional means did not improve sample purity, suggesting the virions were already pure (data not shown). Second, sensitivity was very high as the assay readily detected both low copy (U<sub>L</sub>6) and low molecular weight proteins (ex: U<sub>L</sub>11 and U<sub>S</sub>9). Moreover, this extended to hydrophobic proteins, such as the multi-membrane spanning gM glycoprotein. Third, accuracy was very significant with an estimated 95.1% overall rate. The similar detection of the viral proteins in the two unrelated HeLa and BHK cell lines is further evidence of the accuracy of the data (Fig. 7). Finally, the results were validated by Western blotting against several individual proteins. The proteomics approach was thus an accurate and efficient mean to address HSV-1 virion composition.

**Transient interactions with the capsid.** HSV-1 assembles its new capsids in the nucleus. Their maturation implies the packaging of monomeric viral genomes

into procapsids with the participation of the viral U<sub>L</sub>15/U<sub>L</sub>28/U<sub>L</sub>33 terminase (reviewed in (4)). While these proteins are components of immature capsids (100), it has been suggested they may be incorporated in very low copy in nuclear and cell associated C capsids (8, 109). Functionally, the incorporation of the terminase onto nuclear capsids makes good sense given its role in DNA packaging (4). However, there is no current evidence for its role in mature virions or for unpacking of the viral genome at the nuclear pore following entry. The lack of detection of the terminase by mass spectrometry in this study suggests it may be absent in mature extracellular virions (Table 1). Although we cannot rule out that the terminase is below the detection threshold of the mass spectrometry approach used, the absence of signal for all three terminase subunits by the more sensitive Western blotting is consistent with the former interpretation (Fig. 5). Moreover, these findings were reproducible for virions produced in two unrelated cell lines (Fig. 5, 7). In addition, the sizes of U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>28 and U<sub>L</sub>33 (1931, 785 and 130 amino acids respectively) are well beyond the size of other viral proteins detected in this study (for instance U<sub>S</sub>9 has 90 amino acids, while U<sub>L</sub>11 is 96 amino acid long). Taken together, the most straight forward interpretation is that the terminase is not incorporated in mature extracellular virions. Mechanistically, this implies the complex dissociates at some point from the capsids, highlighting a potential dynamic interaction. The precise moment when these proteins are released is most interesting but beyond the scope of the present study.

The U<sub>L</sub>31 tegument and the U<sub>L</sub>34 envelope protein bind one another and facilitate the egress from the nucleus of newly formed capsids (50, 80, 81, 84). Interestingly, U<sub>L</sub>34 is the substrate of yet another necessary tegument, the U<sub>S</sub>3 viral kinase (46, 78, 81, 98). The detection in this study of U<sub>S</sub>3 and the absence of the U<sub>L</sub>31/U<sub>L</sub>34 partners on mature extracellular virions are consistent with previous reports (81). As for the viral terminase (see above), it hints at transitory interactions of viral proteins with the capsids in the nucleus that do

not persist later on. While the incorporation of U<sub>53</sub> in the extracellular virions may merely be fortuitous, a more appealing scenario is that it interacts with other targets at subsequent steps of the viral life cycle. This is in line with the numerous U<sub>53</sub> substrates already discovered to date (13, 49, 64, 66, 75, 77, 78, 89).

**Missing glycoproteins.** Standard mass spectrometry and the more sensitive MRM approach failed to detect gJ, gK, gN and U<sub>L43</sub> on mature virions (Tables 1 & 2). For gK, this is controversial as some reports claim its presence in mature virions (27, 44) while others failed to see it (36). Similarly, U<sub>L43</sub> and gJ were reportedly present on PRV and HSV-1 virions respectively (32, 43). These discrepancies may be related to the hydrophobicity of these proteins, since such proteins tend to aggregate upon boiling (40) and may never reach the mass spectrometer. Unfortunately, it was not possible to probe their presence on virions by Western for lack of appropriate antibodies. Consequently, we cannot say with certainty whether these gJ, gK, gN and U<sub>L43</sub> are truly absent.

The detection of gM but the absence of gN on mature extracellular virions (Tables 1 & 2) was surprising given the two proteins form a complex and that gN is needed for the proper localization of gM at the TGN (14). This is further puzzling as gN was previously reported in 35S methionine labeled mature virions based on its molecular weight (1). Regrettably, it was not possible to probe for gN by Western blotting for lack of antibodies against the protein. Although we cannot completely rule out that gN was simply undetected in this study, it may dissociate from gM prior to final envelopment of the capsids. As proposed for HCMV, it may also be that gM exist in two forms, either by itself or in complex with gN and that free gM is preferentially incorporated in virions (96). These suggestions are in agreement with a recent proteomics study of Alcelaphine herpesvirus-1 that found gM but not gN in virions (21).

**Composition of the tegument.** Little information is available concerning the incorporation of U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 in HSV-1. Some laboratories have reported their analysis in related herpesviruses. Hence U<sub>L</sub>7 was found in HSV-2 virions (70), while U<sub>L</sub>23 was detected in KSHV and Alcelaphine herpesvirus-1 virions (21, 111). In contrast to U<sub>L</sub>55 is seemingly absent in HSV-2 mature viruses (103). The current report clearly shows that all four proteins constitute novel components of the virions. At present, their inclusion as teguments is circumstantial and based on their absence in the well characterized capsids and the lack of transmembrane domains (data not shown). Biochemical studies to confirm their exact location in the virus will be needed. It will also be most interesting to elucidate the functional relevance of these proteins in virions.

A number of studies point to ICP0 and ICP4 as minor components of the tegument (22, 107, 108). However, a recent study failed to detect ICP0 on virions by immuno-EM (39). Furthermore, it has also been reported that ICP4 may rather be preferentially incorporated in L-particles (56, 92), which typically outnumber viable virions in the extracellular medium. Similarly, conflicting reports either support the presence of U<sub>L</sub>24 protein in herpesvirions (11, 35) or failed to detect it (76). Given the lack of noticeable L-particles in our viral preparation (Fig. 3), the detection of ICP0 and ICP4 by both proteomics and Western blotting and the absence of U<sub>L</sub>24 by these techniques (Table 1, Fig. 6 & 7), we conclude that ICP0 and ICP4 are components of extracellular virions but that U<sub>L</sub>24 is most likely absent.

Oddly, U<sub>S</sub>11 was not detected in this study (Tables 1 & 2; Fig. 6 & 7), in sharp contrast with Roller and colleagues who estimated 600-1000 copies of U<sub>S</sub>11 in virions (83). The significance of this discrepancy is unclear at the moment. Given the overall homology between various HSV-1 strains, (90-99% identity at the amino acid level, unpublished observations), it is unlikely to explain such disagreement. Note that U<sub>S</sub>11, like U<sub>L</sub>20, migrates at the expected

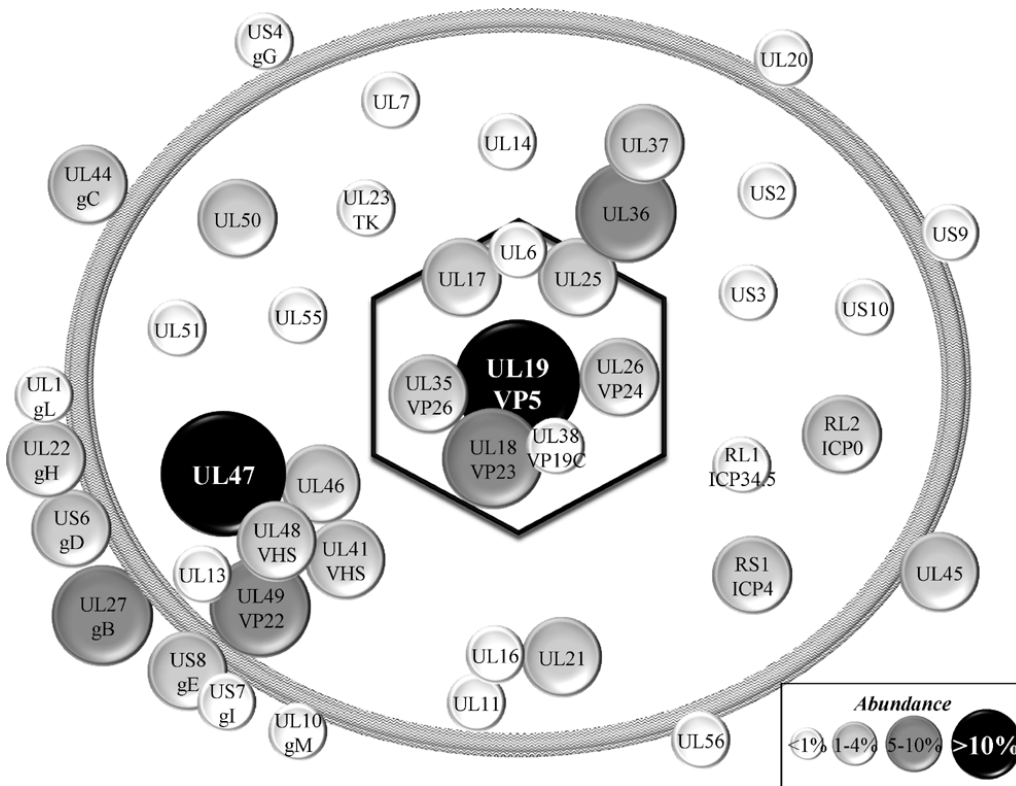


molecular weight in our hands (data not shown) and cannot be responsible for the lack of U<sub>5</sub>11 detection by MRM.

**Incorporation of host proteins in virions.** The excellent sample purity and accuracy of the method made it possible to evaluate the presence of host protein components. The present study reveals a heteroclite collection of up to 49 distinct potential cellular proteins incorporated into mature virions. Interestingly, a variety of transport, cytoskeleton, enzymes and other proteins were identified (Table 3). The low number of peptides identified for these proteins suggest they are minor virion components. While some of these proteins were found on other herpesviruses (7, 9, 18, 21, 38, 40, 63, 96, 111), many are seemingly specific to HSV-1. It will now be important to functionally validate their presence and ultimately address their putative functions for the virus.

**Relative abundance of virion components.** It should be pointed out that quantitative mass spectrometry of complex protein mixtures is still actively being pursued by mass spectrometry specialists (2, 73, 82, 85). At issue is the different behaviour of different proteins and peptides during separation, ionization and solvation, not including relative abundance and potential unpredictable posttranslational modifications. This means some peptides are never detected, while others are under or over represented. This naturally impacts on the lack of detection of some proteins in our study. To satisfy ourselves of these quantitative limitations, a plot of the relative abundance of the viral proteins detected in our study (measured by NQCPT or the number of unique peptides) against published copy numbers was drawn in an effort to determine the exact copy number or molar ratios of the viral components. At best, this "standard curve" had a correlation coefficient of  $R^2=0.42$  when normalized for the size of the proteins (data not shown), confirming the semi-

quantitative nature of our results. For this reason, the contribution of the viral components can only roughly be estimated. Figure 8 shows the results of this evaluation. Although not depicted in the figure, all but one host protein from Table 3 fall within the two lowest abundance brackets.



**Figure 8 – Schematic representation of mature extracellular virions**

The viral composition of the capsid, tegument and envelope is indicated. The diameter of each color coded circle indicates the relative abundance of the proteins based on their NQPCT score (see Materials and Methods). Given the semi-quantitative nature of this score, they are grouped into low abundance (<1% of total proteins), medium abundance (1-4%), high abundance (5-10%) and very high abundance (> 10%). The potential cellular components identified in Table 3 have been omitted since in need of validation. However, all but one of them (profilin-1) falls within the first two lowest abundance brackets.

**Concluding remarks.** Mass spectrometry is a powerful method to identify complex protein samples. Recently, the proteomics of several herpesviruses, including HCMV (7, 96), MCMV (40), EBV (38), KSHV (9, 111), RRV (72), MHV68 (11) and Alcelaphine herpesvirus-1 (21) were reported and reviewed (55, 97). These studies revealed the important contribution of the teguments to the total mass of the virions, identified novel ORFs, highlighted the presence of various cellular components in the virions and examined virulence genes. The present study is the first ever complete analysis of HSV-1 virions. It corroborates the importance of the tegument (54% of all peptides found by mass spectrometry), identified four novel virion components, confirms the presence of two controversial teguments and hints at the surprising absence of a number of viral glycoproteins. It also raises several interesting questions, for instance the potential dynamic interaction of the terminase with the capsids, the putative existence of distinct gM complexes in infected cells (alone or with gN), the precise localisation of the novel U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 virion components and role of the thymidine kinase in virions. As the sequential process of capsid tegumentation is currently under intense scrutiny, this study should prove useful by identifying the final outcome of tegumentation in mature virions. Finally, the work presented here hints at 8 virally encoded capsid proteins, 13 glycoproteins (including U<sub>L</sub>20), 23 teguments and up to 49 distinct host proteins.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank the generous gift of antibodies by Beate Sodeik, Bernard Roizman, Joel Baines, Y. Nishiyama, Angela Pearson, Don Coen, Jim Smiley, Gary Cohen, Rosalyn Eisenberg, David Johnson and Richard Roller. We also wish to thank Sylvie Laboissière and her team at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre Proteomics Platform for their help with mass spectrometry and analysis of the data. Finally, we are indebted to Joël Lanoix, Sylvie Laboissière and Marcos Di Falco for the critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. **Adams, R., C. Cunningham, M. D. Davison, C. A. MacLean, and A. J. Davison.** 1998. Characterization of the protein encoded by gene U<sub>L</sub>49A of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **79**:813-23.
2. **America, A. H., and J. H. Cordewener.** 2008. Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys. *Proteomics* **8**:731-49.
3. **Anderson, L., and C. L. Hunter.** 2006. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**:573-88.
4. **Baines, J., and C. Duffy.** 2006. Nucleocapsid Assembly and Envelopment of Herpes Simplex Virus, p. 175-204. *In* R. M. Sandri-Goldin (ed.), *Alpha Herpesviruses. Molecular and Cellular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk.
5. **Baines, J. D., A. H. Koyama, T. Huang, and B. Roizman.** 1994. The U<sub>L</sub>21 gene products of herpes simplex virus 1 are dispensable for growth in cultured cells. *J Virol* **68**:2929-36.
6. **Baines, J. D., and B. Roizman.** 1992. The U<sub>L</sub>11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *J Virol* **66**:5168-74.
7. **Baldick, C. J., Jr., and T. Shenk.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* **70**:6097-105.
8. **Beard, P. M., and J. D. Baines.** 2004. The DNA cleavage and packaging protein encoded by the U<sub>L</sub>33 gene of herpes simplex virus 1 associates with capsids. *Virology* **324**:475-82.
9. **Bechtel, J. T., R. C. Winant, and D. Ganem.** 2005. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:4952-64.
10. **Blondeau, F., B. Ritter, P. D. Allaire, S. Wasiak, M. Girard, N. K. Hussain, A. Angers, V. Legendre-Guillemain, L. Roy, D. Boismenu, R. E. Kearney, A. W. Bell, J. J. Bergeron, and P. S. McPherson.** 2004. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3833-8.
11. **Bortz, E., J. P. Whitelegge, Q. Jia, Z. H. Zhou, J. P. Stewart, T. T. Wu, and R. Sun.** 2003. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol* **77**:13425-32.
12. **Brown, S. M., A. R. MacLean, J. D. Aitken, and J. Harland.** 1994. ICP34.5 influences herpes simplex virus type 1 maturation and egress from infected cells in vitro. *J Gen Virol* **75**:3679-86.
13. **Cartier, A., E. Broberg, T. Komai, M. Henriksson, and M. G. Masucci.** 2003. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ* **10**:1320-8.
14. **Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, and H. M. Browne.** 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol* **85**:3517-27.
15. **Cunningham, C., A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame, D. J. McGeoch, D. M. Meredith, H. W. Moss, and A. C. Orr.** 1992. The U<sub>L</sub>13 virion protein of herpes simplex virus type 1 is phosphorylated by a novel virus-induced protein kinase. *J Gen Virol* **73**:303-11.

16. **Cunningham, C., A. J. Davison, A. R. MacLean, N. S. Taus, and J. D. Baines.** 2000. Herpes simplex virus type 1 gene U<sub>L</sub>14: phenotype of a null mutant and identification of the encoded protein. *J Virol* **74**:33-41.
17. **Daikoku, T., K. Ikenoya, H. Yamada, F. Goshima, and Y. Nishiyama.** 1998. Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>51 gene product. *J Gen Virol* **79 ( Pt 12)**:3027-31.
18. **Del Rio, T., T. H. Ch'ng, E. A. Flood, S. P. Gross, and L. W. Enquist.** 2005. Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* **79**:3903-19.
19. **Desai, P. J.** 2000. A null mutation in the U<sub>L</sub>36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* **74**:11608-18.
20. **Dohner, K., A. Wolfstein, U. Prank, C. Echeverri, D. Dujardin, R. Vallee, and B. Sodeik.** 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**:2795-809.
21. **Dry, I., D. M. MHAig, N. F. Inglis, L. Imrie, J. P. Stewart, and G. C. Russell.** 2008. Proteomic analysis of pathogenic and attenuated Alcelaphine herpesvirus-1. *J Virol*:eprint on 19 March 2008, doi:10.1128/JVI.00094-08.
22. **Elliott, G., W. Hafezi, A. Whiteley, and E. Bernard.** 2005. Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (U<sub>L</sub>49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *J Virol* **79**:9735-45.
23. **Elliott, G. D., and D. M. Meredith.** 1992. The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene U<sub>L</sub>49. *J Gen Virol* **73**:723-6.
24. **Everett, R. D.** 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**:761-70.
25. **Fenwick, M. L., and R. D. Everett.** 1990. Inactivation of the shutoff gene (U<sub>L</sub>41) of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Gen Virol* **71 ( Pt 12)**:2961-7.
26. **Foster, T. P., J. M. Melancon, J. D. Baines, and K. G. Kousoulas.** 2004. The herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J Virol* **78**:5347-57.
27. **Foster, T. P., G. V. Rybachuk, and K. G. Kousoulas.** 2001. Glycoprotein K specified by herpes simplex virus type 1 is expressed on virions as a Golgi complex-dependent glycosylated species and functions in virion entry. *J Virol* **75**:12431-8.
28. **Frame, M. C., D. J. McGeoch, F. J. Rixon, A. C. Orr, and H. S. Marsden.** 1986. The 10K virion phosphoprotein encoded by gene U<sub>S</sub>9 from herpes simplex virus type 1. *Virology* **150**:321-32.
29. **Fuchs, W., H. Granzow, R. Klopffleisch, B. G. Klupp, D. Rosenkranz, and T. C. Mettenleiter.** 2005. The U<sub>L</sub>7 gene of pseudorabies virus encodes a nonessential structural protein which is involved in virion formation and egress. *J Virol* **79**:11291-9.
30. **Fuchs, W., H. Granzow, B. G. Klupp, M. Kopp, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The U<sub>L</sub>48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* **76**:6729-42.
31. **Fuchs, W., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2003. A pseudorabies virus recombinant simultaneously lacking the major tegument proteins encoded by the U<sub>L</sub>46, U<sub>L</sub>47, U<sub>L</sub>48, and U<sub>L</sub>49 genes is viable in cultured cells. *J Virol* **77**:12891-900.
32. **Ghiasi, H., A. B. Nesburn, S. Cai, and S. L. Wechsler.** 1998. The U<sub>S</sub>5 open reading frame of herpes simplex virus type 1 does encode a glycoprotein (gJ). *Intervirology* **41**:91-7.

33. **Granzow, H., B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2005. Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol* **79**:3200-5.
34. **Harland, J., P. Dunn, E. Cameron, J. Conner, and S. M. Brown.** 2003. The herpes simplex virus (HSV) protein ICP34.5 is a virion component that forms a DNA-binding complex with proliferating cell nuclear antigen and HSV replication proteins. *J Neurovirol* **9**:477-88.
35. **Hong-Yan, Z., T. Murata, F. Goshima, H. Takakuwa, T. Koshizuka, Y. Yamauchi, and Y. Nishiyama.** 2001. Identification and characterization of the U<sub>L</sub>24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **22**:321-7.
36. **Hutchinson, L., C. Roop-Beauchamp, and D. C. Johnson.** 1995. Herpes simplex virus glycoprotein K is known to influence fusion of infected cells, yet is not on the cell surface. *J Virol* **69**:4556-63.
37. **Jiang, Y. M., H. Yamada, F. Goshima, T. Daikoku, S. Oshima, K. Wada, and Y. Nishiyama.** 1998. Characterization of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) U<sub>S</sub>2 gene product and a U<sub>S</sub>2-deficient HSV-2 mutant. *J Gen Virol* **79 ( Pt 11)**:2777-84.
38. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16286-91.
39. **Kalamvoki, M., J. Qu, and B. Roizman.** 2008. Translocation and colocalization of ICP4 and ICPO in cells infected with herpes simplex virus 1 mutants lacking glycoprotein E, glycoprotein I, or the virion host shutoff product of the U<sub>L</sub>41 gene. *J Virol* **82**:1701-13.
40. **Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* **78**:11187-97.
41. **Kehm, R., H. R. Gelderblom, and G. Darai.** 1998. Identification of the U<sub>L</sub>56 protein of herpes simplex virus type 1 within the virion by immuno electron microscopy. *Virus Genes* **17**:49-53.
42. **Kehm, R., E. Lorentzen, A. Rosen-Wolff, and G. Darai.** 1994. In vitro expression of U<sub>L</sub>56 gene of herpes simplex virus type 1; detection of U<sub>L</sub>56 gene product in infected cells and in virions. *Virus Res* **33**:55-66.
43. **Klupp, B. G., J. Altenschmidt, H. Granzow, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter.** 2005. Identification and characterization of the pseudorabies virus U<sub>L</sub>43 protein. *Virology* **334**:224-33.
44. **Klupp, B. G., J. Baumeister, P. Dietz, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 1998. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J Virol* **72**:1949-58.
45. **Klupp, B. G., H. Granzow, R. Klopffleisch, W. Fuchs, M. Kopp, M. Lenk, and T. C. Mettenleiter.** 2005. Functional analysis of the pseudorabies virus U<sub>L</sub>51 protein. *J Virol* **79**:3831-40.
46. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Effect of the pseudorabies virus U<sub>S</sub>3 protein on nuclear membrane localization of the U<sub>L</sub>34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* **82**:2363-71.
47. **Kopp, M., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, E. Mundt, A. Karger, and T. C. Mettenleiter.** 2003. The pseudorabies virus U<sub>L</sub>11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. *J Virol* **77**:5339-51.
48. **Kuhn, E., J. Wu, J. Karl, H. Liao, W. Zolg, and B. Guild.** 2004. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple

reaction monitoring mass spectrometry and <sup>13</sup>C-labeled peptide standards. *Proteomics* **4**:1175-86.

49. **Leach, N., S. L. Bjerke, D. K. Christensen, J. M. Bouchard, F. Mou, R. Park, J. Baines, T. Haraguchi, and R. J. Roller.** 2007. Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both U<sub>L</sub>34 and U<sub>S</sub>3. *J Virol* **81**:10792-803.
50. **Liang, L., M. Tanaka, Y. Kawaguchi, and J. D. Baines.** 2004. Cell lines that support replication of a novel herpes simplex virus 1 U<sub>L</sub>31 deletion mutant can properly target U<sub>L</sub>34 protein to the nuclear rim in the absence of U<sub>L</sub>31. *Virology* **329**:68-76.
51. **Liu, H., R. G. Sadygov, and J. R. Yates, 3rd.** 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* **76**:4193-201.
52. **Luxton, G. W., S. Haverlock, K. E. Collier, S. E. Antinone, A. Pincetic, and G. A. Smith.** 2005. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5832-7.
53. **Luxton, G. W., J. I. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith.** 2006. The Pseudorabies Virus VP1/2 Tegument Protein Is Required for Intracellular Capsid Transport. *J Virol* **80**:201-9.
54. **MacLean, C. A., B. Clark, and D. J. McGeoch.** 1989. Gene U<sub>L</sub>11 of herpes simplex virus type 1 encodes a virion protein which is myristylated. *J Gen Virol* **70**:3147-57.
55. **Maxwell, K. L., and L. Frappier.** 2007. Viral proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:398-411.
56. **McLauchlan, J., C. Addison, M. C. Craigie, and F. J. Rixon.** 1992. Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology* **190**:682-8.
57. **McLauchlan, J., K. Liefkens, and N. D. Stow.** 1994. The herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>37 gene product is a component of virus particles. *J Gen Virol* **75**:2047-52.
58. **McLauchlan, J., and F. J. Rixon.** 1992. Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol* **73**:269-76.
59. **McLean, G., F. Rixon, N. Langeland, L. Haarr, and H. Marsden.** 1990. Identification and characterization of the virion protein products of herpes simplex virus type 1 gene U<sub>L</sub>47. *J Gen Virol* **71**:2953-60.
60. **McNabb, D. S., and R. J. Courtney.** 1992. Analysis of the U<sub>L</sub>36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **66**:7581-4.
61. **Meckes, D. G., Jr., and J. W. Wills.** 2007. Dynamic interactions of the U<sub>L</sub>16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *J Virol* **81**:13028-36.
62. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**:167-80.
63. **Michael, K., B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter, and A. Karger.** 2006. Composition of Pseudorabies Virus Particles Lacking Tegument Protein U<sub>S</sub>3, U<sub>L</sub>47, or U<sub>L</sub>49 or Envelope Glycoprotein E. *J Virol* **80**:1332-9.
64. **Morris, J. B., H. Hofemeister, and P. O'Hare.** 2007. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol* **81**:4429-37.



65. **Mossman, K. L., R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, and J. R. Smiley.** 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* **74**:6287-99.
66. **Mou, F., T. Forest, and J. D. Baines.** 2007. U<sub>S</sub>3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol* **81**:6459-70.
67. **Naldinho-Souto, R., H. Browne, and T. Minson.** 2006. Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions. *J Virol* **80**:2582-4.
68. **Nalwanga, D., S. Rempel, B. Roizman, and J. D. Baines.** 1996. The U<sub>L</sub> 16 gene product of herpes simplex virus 1 is a virion protein that colocalizes with intranuclear capsid proteins. *Virology* **226**:236-42.
69. **Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller, and J. C. Brown.** 2001. The U<sub>L</sub>6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **75**:10923-32.
70. **Nozawa, N., T. Daikoku, Y. Yamauchi, H. Takakuwa, F. Goshima, T. Yoshikawa, and Y. Nishiyama.** 2002. Identification and characterization of the U<sub>L</sub>7 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* **24**:257-66.
71. **Nozawa, N., Y. Kawaguchi, M. Tanaka, A. Kato, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** 2005. Herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *J Virol* **79**:6947-56.
72. **O'Connor, C. M., and D. H. Kedes.** 2006. Mass spectrometric analyses of purified rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins. *J Virol* **80**:1574-83.
73. **Ong, S. E., and M. Mann.** 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* **1**:252-62.
74. **Overton, H. A., D. J. McMillan, L. S. Klavinskis, L. Hope, A. J. Ritchie, and P. Wongkai-in.** 1992. Herpes simplex virus type 1 gene U<sub>L</sub>13 encodes a phosphoprotein that is a component of the virion. *Virology* **190**:184-92.
75. **Park, R., and J. D. Baines.** 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol* **80**:494-504.
76. **Pearson, A., and D. M. Coen.** 2002. Identification, localization, and regulation of expression of the U<sub>L</sub>24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**:10821-8.
77. **Poon, A. P., and B. Roizman.** 2007. Mapping of key functions of the herpes simplex virus 1 U(S)3 protein kinase: the U(S)3 protein can form functional heteromultimeric structures derived from overlapping truncated polypeptides. *J Virol* **81**:1980-9.
78. **Purves, F. C., D. Spector, and B. Roizman.** 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the U<sub>S</sub>3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the U<sub>L</sub>34 gene. *J Virol* **65**:5757-64.
79. **Remillard-Labrosse, G., G. Guay, and R. Lippe.** 2006. Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**:9741-53.
80. **Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller.** 2001. U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**:8803-17.
81. **Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34, and U<sub>S</sub>3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**:8939-52.

82. **Righetti, P. G., and E. Boschetti.** 2008. The ProteoMiner and the FortyNiners: Searching for gold nuggets in the proteomic arena. *Mass Spectrom Rev.*
83. **Roller, R. J., and B. Roizman.** 1992. The herpes simplex virus 1 RNA binding protein U<sub>S</sub>11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *J Virol* **66**:3624-32.
84. **Roller, R. J., Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, and D. DeSalvo.** 2000. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**:117-29.
85. **Schmidt, A., N. Gehlenborg, B. Bodenmiller, L. N. Mueller, D. Campbell, M. Mueller, R. Aebersold, and B. Domon.** 2008. An integrated, directed mass spectrometric approach for in-depth characterization of complex peptide mixtures. *Mol Cell Proteomics.*
86. **Schmitz, J. B., A. G. Albright, P. R. Kinchington, and F. J. Jenkins.** 1995. The U<sub>L</sub>37 protein of herpes simplex virus type 1 is associated with the tegument of purified virions. *Virology* **206**:1055-65.
87. **Sedlackova, L., and S. A. Rice.** 2008. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions. *J Virol* **82**:268-77.
88. **Smibert, C. A., D. C. Johnson, and J. R. Smiley.** 1992. Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene U<sub>L</sub>41. *J Gen Virol* **73**:467-70.
89. **Smith-Donald, B. A., and B. Roizman.** 2008. The interaction of herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP22 with the cdc25C phosphatase is enabled in vitro by viral protein kinases U<sub>S</sub>3 and U<sub>L</sub>13. *J Virol.*
90. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
91. **Spear, P. G., and B. Roizman.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J Virol* **9**:143-59.
92. **Szilagyi, J. F., and C. Cunningham.** 1991. Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J Gen Virol* **72**:661-8.
93. **Taddeo, B., and B. Roizman.** 2006. The virion host shutoff protein (U<sub>L</sub>41) of herpes simplex virus 1 is an endoribonuclease with a substrate specificity similar to that of RNase A. *J Virol* **80**:9341-5.
94. **Taddeo, B., W. Zhang, and B. Roizman.** 2006. The U(L)41 protein of herpes simplex virus 1 degrades RNA by endonucleolytic cleavage in absence of other cellular or viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2827-32.
95. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
96. **Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, 2nd, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**:10960-6.
97. **Viswanathan, K., and K. Fruh.** 2007. Viral proteomics: global evaluation of viruses and their interaction with the host. *Expert Rev Proteomics* **4**:815-29.
98. **Wagenaar, F., J. M. Pol, B. Peeters, A. L. Gielkens, N. de Wind, and T. G. Kimman.** 1995. The U<sub>S</sub>3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J Gen Virol* **76**:1851-9.

99. **Ward, P. L., G. Campadelli-Fiume, E. Avitabile, and B. Roizman.** 1994. Localization and putative function of the U<sub>L</sub>20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **68**:7406-17.
100. **Wills, E., L. Scholtes, and J. D. Baines.** 2006. Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by U<sub>L</sub>6, U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>17, U<sub>L</sub>28, and U<sub>L</sub>33 are located on the external surface of the viral capsid. *J Virol* **80**:10894-9.
101. **Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. J. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-37.
102. **Yamada, H., T. Daikoku, Y. Yamashita, Y. M. Jiang, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama.** 1997. The product of the U<sub>S</sub>10 gene of herpes simplex virus type 1 is a capsid/tegument-associated phosphoprotein which copurifies with the nuclear matrix. *J Gen Virol* **78**:2923-31.
103. **Yamada, H., Y. M. Jiang, S. Oshima, T. Daikoku, Y. Yamashita, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama.** 1998. Characterization of the U<sub>L</sub>55 gene product of herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol* **79 ( Pt 8)**:1989-95.
104. **Yang, K., F. Homa, and J. D. Baines.** 2007. Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J Virol* **81**:6419-33.
105. **Yang, K., A. P. Poon, B. Roizman, and J. D. Baines.** 2008. Temperature-sensitive mutations in the putative herpes simplex virus type 1 terminase subunits pU<sub>L</sub>15 and pU<sub>L</sub>33 preclude viral DNA cleavage/packaging and interaction with pU<sub>L</sub>28 at the nonpermissive temperature. *J Virol* **82**:487-94.
106. **Yang, T. Y., and R. J. Courtney.** 1995. Influence of the host cell on the association of ICP4 and ICP0 with herpes simplex virus type 1. *Virology* **211**:209-17.
107. **Yao, F., and R. J. Courtney.** 1992. Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **66**:2709-16.
108. **Yao, F., and R. J. Courtney.** 1989. A major transcriptional regulatory protein (ICP4) of herpes simplex virus type 1 is associated with purified virions. *J Virol* **63**:3338-44.
109. **Yu, D., and S. K. Weller.** 1998. Herpes simplex virus type 1 cleavage and packaging proteins U<sub>L</sub>15 and U<sub>L</sub>28 are associated with B but not C capsids during packaging. *J Virol* **72**:7428-39.
110. **Zhang, Y., and J. L. McKnight.** 1993. Herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>46 and U<sub>L</sub>47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J Virol* **67**:1482-92.
111. **Zhu, F. X., J. M. Chong, L. Wu, and Y. Yuan.** 2005. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**:800-11.



## **Article 2 : Biochemical analysis of ICP0, ICP4, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 incorporated into extracellular Herpes simplex type 1 virions**

Auteurs : Sandra Loret et Roger Lippé

Publié dans : Journal of General Virology (in press). Published ahead of print December 7, 2011.

### Contribution des auteurs :

Sandra Loret\* : conception, planification et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et rédaction de l'article

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

\* Premier auteur

### Notes sur le texte :

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



**Biochemical Analysis of ICP0, ICP4, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 Incorporated  
into Extracellular Herpes Simplex Type 1 Virions**

Sandra Loret and Roger Lippé\*

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

Running title: Characterization of mature HSV-1 teguments

Word count for the summary: 242

Word count for the main text: 5498

Number of figures: 4

*\*Corresponding author:*

*Dr. Roger Lippé*

*Department of Pathology and Cell Biology*

*University of Montreal*

[Redacted text block containing six lines of blacked-out information]

## SUMMARY

Herpes simplex virus type 1 capsids assemble in the nucleus but acquire their teguments from various cellular compartments. Unfortunately, little is known about their exact arrangement and when they coat the newly produced capsids. The complexity of the virions is further highlighted by our recent proteomics analysis that detected the presence of several novel or controversial components in extracellular HSV-1 virions. The present study probes the localization and linkage to the virus particles of some of these incorporated proteins. We confirm the recently reported tight association of ICP0 with the capsid and show that this property extends to ICP4. We also confirm our proteomics data and show biochemically that U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 are indeed mature virion tegument components that, unlike ICP0 and ICP4, are salt extractable. Interestingly, treatment with N-ethylmaleimide, which covalently modifies reduced cysteines, strongly prevented the release of U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 by salts but did not perturb the interactions of ICP0 and ICP4 with the viral particles. This hints at distinct biochemical properties of the virion constituents and the selective implication of reduced cysteines in its organization and dynamic. Finally, the data revealed by two independent means the presence of ICP0 and ICP4 on intranuclear capsids, consistent with the possibility that they may at least partially be recruited on the viral particles early on. These findings significantly add to our understanding of HSV-1 virion assembly and to the debate about the incorporation of ICP0 and ICP4 in the viral particles.



## INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) virions have a multilayered structure constituted of an icosahedral capsid which protects a DNA genome, a proteinaceous layer called tegument and a host-derived lipid envelope. These constituents are sequentially acquired during the maturation of HSV-1 through three major intracellular compartments: the nucleus, the cytoplasm and the trans-Golgi network (TGN) (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2009; Turcotte et al., 2005). Though the details by which the virus acquires its tegument are still unclear, recent reviews highlight the importance of the tegument during the viral life cycle (Guo et al., 2010; Kelly et al., 2009).

Following viral entry, most of the tegument proteins dissociate from incoming capsids (Kelly et al., 2009; Mettenleiter et al., 2009) and this early release seems important for efficient viral infection. For example, the VP16 protein, coded by the U<sub>L</sub>48 gene, transactivates the viral immediate-early genes and triggers the cascade of viral gene expression necessary for the subsequent stages of the HSV-1 life cycle (Kelly et al., 2009; Roizman et al., 2005; Wysocka & Herr, 2003). In contrast, the U<sub>L</sub>36 and U<sub>L</sub>37 viral proteins remain associated with incoming HSV-1 capsids and contribute to capsid transport toward the nucleus and injection of the viral DNA into the nucleus through the nuclear pores (Dohner et al., 2002; Liashkovich et al., 2011; Ojala et al., 2000; Shanda & Wilson, 2008; Smith & Enquist, 2002; Sodeik et al., 1997; Wolfstein et al., 2006). The presence of a protein within the tegument is therefore not fortuitous and may reflect an early role in the viral life cycle. However, the tegument is also implicated during viral egress (Bjerke & Roller, 2006; Mou et al., 2007; Scholtes et al., 2010; Skepper et al., 2001; Stackpole, 1969) as well as in immune evasion and apoptosis (Hwang et al., 2009; Leopardi et al., 1997; Ogg et al., 2004; Orvedahl et al., 2007; Smiley, 2004; Trgovcich et al., 2002). It additionally forms a bridge between the capsid

proteins and glycoproteins of the viral envelope (Mettenleiter, 2004; Mettenleiter et al., 2006; 2009). Despite the important and multifunctional roles of the tegument, its precise composition has only recently been elucidated by proteomics (Loret et al., 2008). That study confirmed many known virion components but also identified U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 as novel virion proteins. U<sub>L</sub>50 codes for a dUTPase that was also detected by proteomics in the related Pseudorabies virus (PRV) (Kramer et al., 2011) and plays an important role in nucleotide metabolism but is otherwise poorly characterized (Bergman et al., 1998; Bjornberg et al., 1993; Jons & Mettenleiter, 1996). The function of the U<sub>L</sub>55 protein is totally unknown. In contrast, two studies demonstrated the involvement of U<sub>L</sub>7 in the maturation and egress of HSV-1 and PRV and its interaction with the mitochondrial adenine nucleotide translocator 2 (ANT2) (Fuchs et al., 2005; Tanaka et al., 2008). Finally, U<sub>L</sub>23 codes for a viral kinase involved in nucleotide metabolism (Boehmer & Lehman, 1997; Wurth et al., 2001). Interestingly, this kinase has been detected in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), Epstein-Barr virus (EBV) and alcelaphine herpesvirus-1 virions (Bechtel et al., 2005; Dry et al., 2008; Johannsen et al., 2004; Zhu et al., 2005), though it was undetected in the aforementioned PRV proteomics study (Kramer et al., 2011). Further work is clearly needed to define where in the virus these viral proteins reside and what function they have.

ICP0 and ICP4 are extensively studied immediate-early proteins that regulate gene expression and transactivation of early and late viral genes (Everett, 2000; Kalamvoki & Roizman, 2010). Early studies suggested that ICP0 and ICP4 might be packaged into mature HSV-1 particles (Yang & Courtney, 1995; Yao & Courtney, 1989; 1991) but ICP0 was not detected in the virions by immuno-EM (Kalamvoki et al., 2008). More recently, reports from various laboratories reignited the debate about the incorporation of ICP0 and ICP4 into mature virions (Delboy et al., 2010; Elliott et al., 2005; Loret et al., 2008;

Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010; Sedlackova & Rice, 2008). Finally, some studies suggested that ICP0 and ICP4 might be absent on HSV-1 intranuclear capsids (Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010; Yao & Courtney, 1992) despite the presence of the two proteins in the nucleus. Given the role of these proteins, it was thus important to clarify whether these proteins are incorporated in the virions and intranuclear capsids.

The process of tegument acquisition is poorly understood and involves a highly ordered network of protein-protein interactions (Lee et al., 2008; Mettenleiter, 2006; Vittone et al., 2005). Cysteines are often involved given their highly reactive thiol side chains (Bulaj et al., 1998; McCombs & Williams, 1973; Nagahara et al., 2009; Newcomb et al., 1994; Sevier & Kaiser, 2002; Szczepaniak et al., 2011; Yang et al., 2000; Zweig et al., 1979). Interestingly, N-ethylmaleimide (NEM), a small membrane-permeable compound that covalently alkylates reduced cysteines, renders them unavailable for interactions with other molecules. This property has been exploited to study protein-protein interactions in general, the process of viral tegument acquisition during HSV-1 virion maturation and the network of protein-protein interactions that governs this layer (Greber et al., 1996; Meckes & Wills, 2007; 2008; Morcock et al., 2005; Ruyechan, 1988; Yeh et al., 2008). Given the large number of proteins that compose the viral tegument (Loret et al., 2008), the characterization of the role of cysteines in the organization and function of the tegument becomes primordial.

The present work focuses on the HSV-1 virion proteins U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, ICP0 and ICP4. A de-tegumentation assay was used to confirm they are virion components and to analyze their biochemical properties. In addition, pre-treatment of extracellular HSV-1 virions with NEM was employed to examine the importance of reduced cysteines in the organization of these viral molecules. The data show that these four proteins have rather different biochemical characteristics. U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 were both salt-extractable tegument

proteins whose interaction with the virions was strongly affected by NEM. In contrast, ICP0 remained tightly associated with the capsid during biochemical de-tegmentation, as previously reported (Delboy et al., 2010; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010), but this association was completely resistant to NEM. These properties extended to ICP4, suggesting both of these proteins are recruited to capsids via distinct types of interactions than U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23. Finally, the tight association of ICP0 and ICP4 with the capsid prompted us to examine nuclear capsids. Unexpectedly, ICP0 and ICP4 were detected on intranuclear capsids isolated by two independent protocols, a finding that suggests these proteins could at least partially be recruited on the viral particles at an early stage of HSV-1 egress.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** HeLa cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Sigma Aldrich) supplemented with 10% FBS (Mediacorp), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin ; Invitrogen). For nuclei isolation, HeLa cells adapted to culture in suspension were grown at 37°C in Joklik's modified Eagle's medium (JMEM ; Sigma-Aldrich) supplemented with 5% FBS, 0.1 mM MEM non-essential amino acids solution (Invitrogen), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The wild-type HSV-1 strain F, generously provided by Beate Sodeik, was propagated on BHK cells and titrated on Vero cells as described previously (Turcotte et al., 2005). Highly purified extracellular HSV-1 virions were obtained from infected HeLa cells and stored at -80°C in MNT buffer (30 mM MES, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.4) as before (Loret et al., 2008).

### **Western blot and antibodies.**

Proteins samples were separated on 8 or 10% gels by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes and detected with specific primary antibodies and secondary antibodies coupled to HRP by enhanced chemiluminescent (ECL) detection (Loret et al., 2008). Anti-U<sub>L</sub>7 was the courtesy of Y. Nishiyama (1:1,000), anti-U<sub>L</sub>13 was from B. Roizman (1:1,000), anti-U<sub>L</sub>23 was provided of W.C. Summers (1:5,000), anti-U<sub>L</sub>48 (VP16) was offered by H. Browne (1:1,000), anti-gD (DL6) was obtained from R.J. Eisenberg and G.H. Cohen (1:2,000) and anti-HSV-1 Remus, a general HSV-1 polyclonal serum, was from B. Sodeik (1:1,000). Other primary antibodies were purchased from commercial sources, including anti-U<sub>L</sub>19/VP5 (1:1,000; Cedarlane), anti-ICP0 (1:5,000; Abcam), anti-ICP4 (1:1,000; Abcam), anti-ICP8 (1:1,000; Abcam), anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA; 1:500; Chemicon International), anti-lamin A/C

(1:2,500; BD Biosciences) and anti- $\gamma$ -tubulin (1:5,000; Sigma-Aldrich). The secondary antibodies goat anti-mouse or goat anti-rabbit were used at 1:10,000 to 1:20,000 dilutions (Jackson ImmunoResearch). For Western blot quantification, the relative band intensities were measured using ImageJ software (NIH).

**Biochemical de-tegmentation.** Our de-tegmentation method was adapted from Wolfstein et al (2006) with some modifications. Briefly, highly purified extracellular HSV-1 virions were lysed with 2X de-tegmentation buffer (2% Triton X-100, 40 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM EDTA, 20 mM DTT) containing a cocktail of protease inhibitors (CLAP : 8.25  $\mu$ M chymostatin, 1.05 nM leupeptin, 0.38 nM aprotinin and 0.73 nM pepstatin A (Sigma-Aldrich) in the presence of increasing salt concentrations (0.1, 0.5 or 1 M NaCl) for 30 min at 4°C. As control, a “no lysis” sample was incubated in 2X buffer in the presence of 0.1 M NaCl but without Triton X-100. To minimize aggregates and improve protein separation by SDS-PAGE, viral particles were quickly sonicated at 4°C. Capsids were then pelleted by centrifugation (40 min at 100,000 x g at 4°C) through a 20% (w/v) sucrose cushion (top-loaded) in MNT and 10 mM DTT. Finally, the pellets were resuspended in 10  $\mu$ L of MNT while the proteins in the supernatants were precipitated at 95°C for 15 min, centrifuged 3 min at 18,000 x g, resuspended in 10  $\mu$ L of MNT and analyzed by Western blot. When indicated, the extracellular virions were pre-treated with 10 mM of NEM (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C before de-tegmentation.

**Nuclear capsids.** HeLa cells grown in suspension were infected with HSV-1 strain F at 37°C for 8 hours at a multiplicity of infection (MOI) of 5 and the nuclei isolated as previously described (Remillard-Labrosse et al., 2006). They were then broken in lysis buffer (1% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich), 500 U/mL DNase (Roche) and CLAP) for 30 min at 4°C, briefly sonicated and cleared 5

min at 300 x g at 4°C. The supernatant was then filtered through a 0.45 µm filter, top-loaded onto a 35% (w/w) sucrose cushion and the virions pelleted for 1 hour at 100,000 x g at 4°C. The nuclear capsid pellet was finally resuspended in MNT buffer and stored at -80°C.

**Silver staining.** Following electrophoresis, gels were fixed 2 hours in a 5% acetic acid - 50% methanol solution. Gels were then extensively rinsed in distilled water and incubated in 0.02% thiosulfate sodium solution for 1 min. Gels were briefly washed with distilled water and incubated in 0.1% silver nitrate solution for 20 min. The gels were then again briefly washed in distilled water and incubated in reaction buffer (0.04% formaldehyde and 2% carbonate sodium). The reaction was stopped by the addition of 5% acetic acid solution.

**Separation of nuclear A, B and C capsids.** Capsids from the nuclear fraction were isolated as previously described with slight modifications (Bucks et al., 2007; Lamberti & Weller, 1998; Newcomb et al., 2006; Roller et al., 2000; Sheaffer et al., 2000). Approximately  $2.5 \times 10^8$  HeLa were infected with HSV-1 strain F at a MOI of 5. At 24 h post infection, cells were scrapped in ice-cold PBS and pelleted at 300 x g, 10 min at 4°C. Cells were disrupted in NP-40 lysis buffer (1% NP-40 (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT and CLAP) and incubated on ice for 30 min. The nuclei were pelleted from the suspension at low speed. The nuclear pellet was resuspended in MNT, lysed by three cycles of freeze/thaw and briefly sonicated in the presence of CLAP. The nuclear lysate was treated with 500 U/mL DNase at 37°C for 10 min and the debris cleared by low speed centrifugation. Nuclear capsids present in the supernatant were purified by two centrifugation steps. In the first step, capsids were pelleted through a 35% (w/w) sucrose cushion prepared in MNT (SW41 rotor, 100,000 x g for 1 h at

4°C). In the second step, the capsid pellet was carefully resuspended in MNT, layered onto a 20-50% (w/w) linear sucrose gradient (prepared in MNT) and centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4°C in a SW41 rotor. A, B and C capsids bands were visualized as light-scattering bands and collected from the gradient by pipetting and analyzed by Western blot.

**Electron microscopy.** Previously described procedures were used to evaluate sample purity by negative staining (Loret et al., 2008). Briefly, a drop (5 µL) of purified nuclear capsids was deposited on a Formvar-coated and carbonated 150-mesh copper grid (Canemco and Marivac), stained with 2% uranyl acetate (Canemco and Marivac), washed in distilled water, allowed to air dry on filter paper and finally observed with a Philips 300 transmission electron microscope.

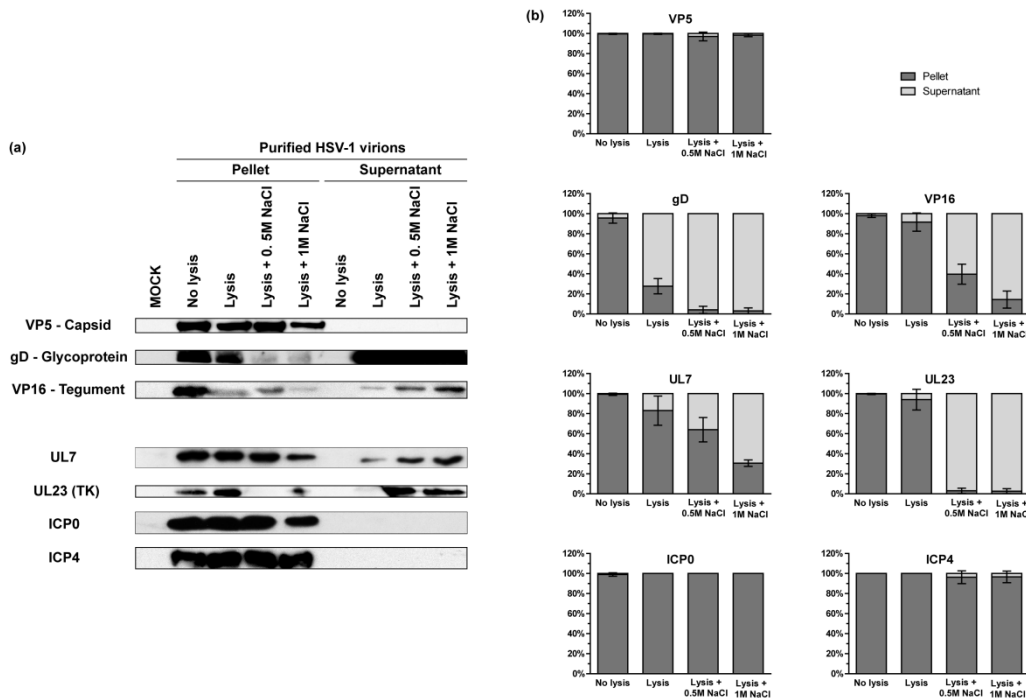


## RESULTS

### Characterization of newly identified HSV-1 extracellular virions components

We recently reported the detection by mass spectrometry of the viral proteins U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50, U<sub>L</sub>55, ICP0 and ICP4 on mature HSV-1 particles (Loret et al., 2008). This is in line with some studies demonstrating the tight association of ICP0 with the capsid and the presence of salt extractable ICP4 in the tegument (Delboy et al., 2010; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010) but in disagreement with another paper (Kalamvoki et al., 2008), thus warranting further study. In addition, the tentative assignation of U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 to the tegument layer remained to be experimentally proven. A biochemical strategy was therefore employed. While envelope proteins are extracted by detergents and tegument proteins are gradually released from viral particles with increasing salt concentrations, capsid-associated proteins are resistant to such treatment (Delboy et al., 2010; Maringer & Elliott, 2010; Ojala et al., 2000; Radtke et al., 2010; Wolfstein et al., 2006). It is thus possible to biochemically distinguish the main components of the virus. Highly purified virions were therefore prepared as previously reported (Loret et al., 2008) and lysed with a non-ionic detergent to remove the viral envelope in the presence of increasing salt concentrations to strip the tegument (0.1, 0.5 or 1 M NaCl). To prevent the release of a tegument by the detergent through a strong covalent disulfide bond with an envelope protein, DTT was present during the de-tegmentation in all buffers to clearly separate each viral layer (envelope, tegument and capsid). Virions were subsequently fractionated through a 20% (w/v) sucrose cushion to dissociate the released viral proteins (supernatant) from those that remained capsid-associated (pellet). As control, the envelope was left intact by omitting the detergent, hence preventing the salt from releasing any tegument. Pellets and supernatants were examined by

Western blot (Fig. 1a) and quantified (Fig. 1b). Markers of the capsid (VP5), tegument (VP16) and envelope glycoprotein D (gD) were first analyzed.



**Figure 1. Western Blot analysis of de-tegumented extracellular HSV-1 virions**  
 (a) Highly purified virions (20  $\mu$ g) were biochemically de-tegumented with or without detergent (“no lysis”) and analyzed by Western blot with antibodies against VP5, gD, VP16, UL7, UL23, ICP0 or ICP4. A mock-infected cell lysate (10  $\mu$ g) was loaded as antibody control. (b) The relative proportion of each protein in the pellet and supernatant was quantified from three independent experiments. For each condition and protein, the sum of the pellet and the supernatant pools was normalized to 100%. The values are the means  $\pm$  SD.

As expected, VP5 was not affected by the detergent and at least  $97 \pm 4$  % of VP5 remained in the capsid pellet even in high NaCl concentrations. In contrast, at least  $72 \pm 8$  % of gD was found in the supernatant irrespective of the salt concentration when the detergent was present. Finally, the tegument protein VP16 was gradually extracted from the virus by increasing salt concentrations in the presence of detergent (up to  $86 \pm 8$  % at 1M salts). These controls behaved as previously reported (Delboy et al.,

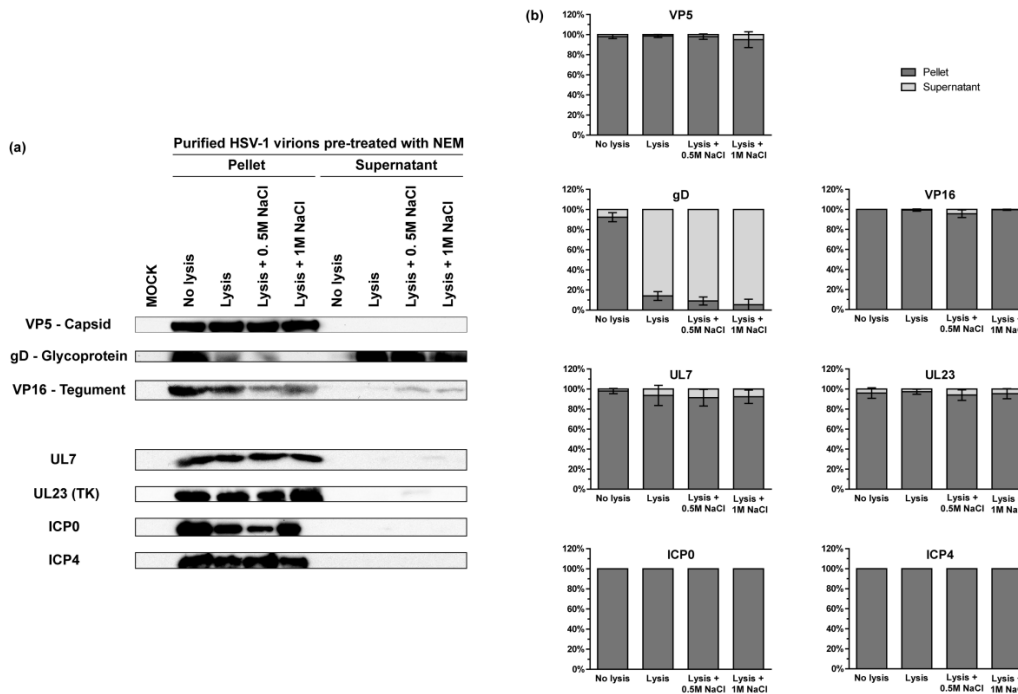
2010; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010; Wolfstein et al., 2006), thus confirming the relevance of the approach.

Given the clear capsid, tegument or glycoprotein fingerprint obtained for well defined virion proteins, we next analyzed our proteins of interest (Fig. 1). Unfortunately, the absence of antibodies for U<sub>L</sub>50 and U<sub>L</sub>55 prevented us from examining these two particular proteins. However, the results revealed that U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 were progressively stripped from the capsids by salts in the presence of detergent (up to  $70 \pm 3$  % of total U<sub>L</sub>7 and  $97 \pm 2$  % of total U<sub>L</sub>23). Unlike previous reports (Delboy et al., 2010; Radtke et al., 2010), ICP4 behaved like the major capsid protein VP5 and was not released from the capsid in high salts conditions ( $97 \pm 6$  % in the pellet). Finally, ICPO was exclusively found in the pellet even in the presence of 1 M salt as previously reported (Delboy et al., 2010; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010). These results strongly indicated that ICPO and ICP4 biochemically behave very differently than U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23.

#### **Effect of NEM on U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23, ICPO and ICP4**

Accumulating evidence suggests that reduced cysteines play a role in virion protein-protein interactions (Meckes & Wills, 2007; 2008; Yeh et al., 2008). NEM is a common tool for studying these interactions given its ability to alkylate reduced cysteines and prevent them from interacting with other residues. Since membrane permeable, it also prohibits the formation of novel irrelevant bonds when added before virion disruption (Meckes & Wills, 2008; Szczepaniak et al., 2011). It was therefore used to probe the importance of reduced cysteines within HSV-1 particles. Highly purified extracellular HSV-1 virions were thus pre-treated with NEM prior to biochemical degumentation. The capsid-associated and free viral proteins were again analyzed by Western Blot for the three control proteins VP5, gD and VP16.

Representative blots as well as the quantification of three independent experiments (Fig. 2) revealed that the VP5 and gD salt extraction patterns were unaltered by NEM. Essentially, all VP5 remained capsid-associated ( $95 \pm 8 \%$ ) while more than  $86 \pm 5 \%$  of gD was released in the supernatant during lysis.



**Figure 2. Western Blot analysis of de-tegumented extracellular HSV-1 virions treated with NEM**

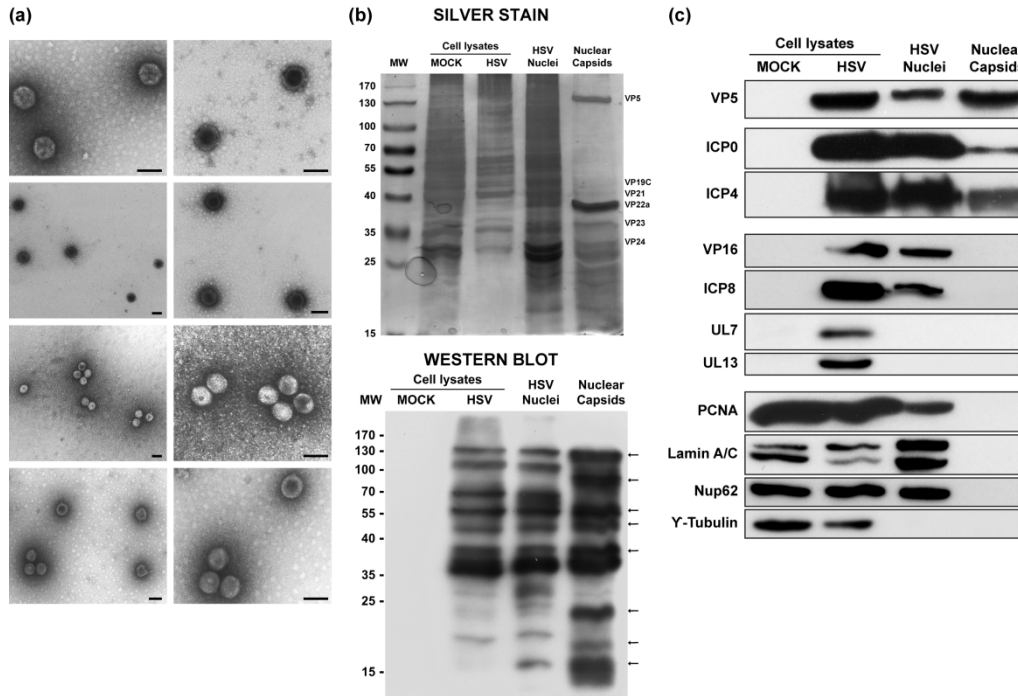
(a) Highly purified virions ( $20 \mu\text{g}$ ) were pre-treated with  $10 \text{ mM}$  NEM prior to biochemical de-tegumented with or without detergent ("no lysis") and analyzed by Western blot as in figure 1. A mock-infected cell lysate ( $10 \mu\text{g}$ ) was once again included as control. (b) The relative distribution of each protein in the pellet and supernatant was quantified from three independent experiments as in figure 1. The values are the means  $\pm$  SD.

In contrast, VP16 was now mostly associated with the capsid pellet ( $> 96\%$  in the pellet) instead of being gradually stripped by salts. These results indicate that NEM altered the organization of VP16 with the virus and favoured the interaction of VP16 with the capsid. We next sought to determine the behaviour of  $U_L7$ ,  $U_L23$ , ICP0 and ICP4 in the presence of NEM (Fig. 2). Interestingly,  $U_L7$  and  $U_L23$  were also affected by NEM and followed the same

pattern as VP16 by remaining in the capsid pellet despite high salts (> 91% for U<sub>L</sub>7 and > 94% for U<sub>L</sub>23), hinting once again at the participation of reduced cysteines in the organization of these two tegument proteins. Surprisingly, NEM did not alter the biochemical behaviour of ICP0 and ICP4. In fact, both remained tightly associated with the capsid, suggesting a type of interaction with the viral particles distinct than for U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23 and VP16.

### **Presence of ICP0 and ICP4 on HSV-1 intranuclear capsids**

Unlike U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23, ICP0 and ICP4 strongly associated with the capsid. This raised the possibility that ICP0 and ICP4 might already be associated with capsids in the nucleus. This is relevant since these proteins, much like VP16 and VP13/14, are present in the nucleus early in infection (Donnelly & Elliott, 2001; Wysocka & Herr, 2003; Yedowitz et al., 2005) where capsid assembly takes place. To explore this possibility, two distinct protocols were employed. In the first case, we took advantage of our previously reported nuclear preparation protocol devoid of cytoplasmic capsids (Remillard-Labrosse et al., 2006). Hence, nuclei purified from infected cells were subsequently lysed and cleared by low-speed centrifugation to remove unbroken nuclei. The nuclear extract was then filtered through a 0.45 µm filter to remove large debris and centrifuged through a 35% (w/w) sucrose cushion to pellet all nuclear capsids. These enriched nuclear capsids were then negatively stained and examined by electron microscopy (EM).

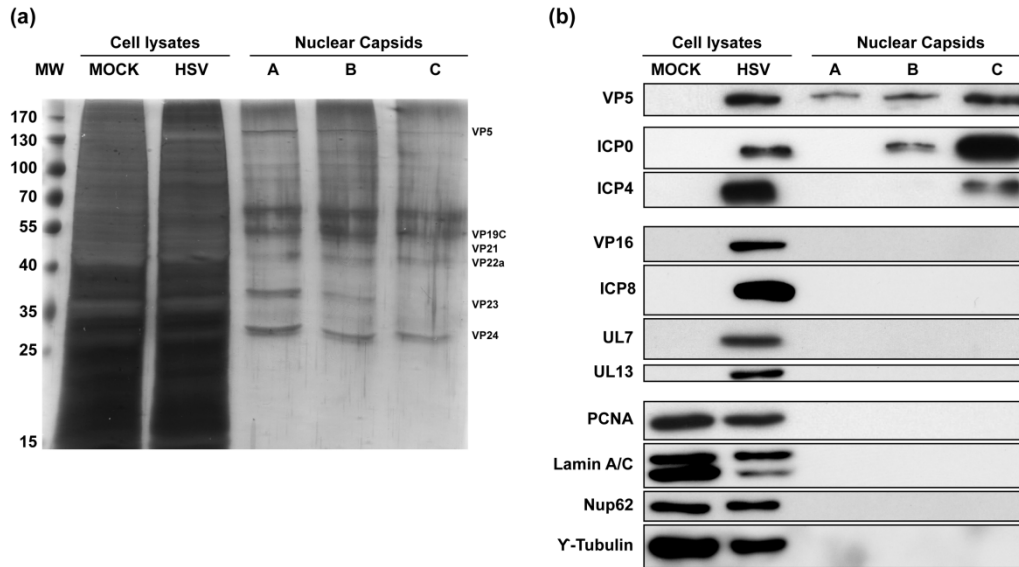


### Figure 3. Evidence for the presence of ICP0 and ICP4 on HSV-1 nuclear capsids

(a) Total nuclear capsids isolated from purified infected nuclei were negatively stained and analyzed by EM. The images show various typical views of the samples. All were naked capsids and exempt of obvious cellular debris, cellular organelles and cytoplasmic enveloped capsids. The bars represent 100 nm. (b) Five micrograms of mock-infected or infected cell lysates, infected nuclei or total nuclear capsids were silver stained (top panel) or analyzed by Western blot with a pan HSV-1 antibody (bottom panel). Note the pattern of major capsid components which are listed on the right of the silver stain. Viral enrichment of the nuclear capsids was also evident by Western blot (see arrows). The molecular weights (MW) of the protein markers are indicated at the left of the gels in kilodaltons (kDa). (c) Total nuclear capsids (100 µg) and infected nuclei (25 µg) were immunoblotted for the viral proteins VP5, ICP0, ICP4, the nuclear viral proteins VP16 and ICP8, the cytoplasmic U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>13 viral teguments, the nuclear host proteins PCNA, lamin A/C and nup62 or the cytoplasmic host protein γ-tubulin. As controls, mock-infected or infected cell lysates (25 µg each) were also included. ICP0 and ICP4 were reproducibly detected on the nuclear capsids.

As shown in figure 3a, the capsid preparations consisted exclusively of naked capsids and no major contamination by cellular debris was observed. To probe the efficacy of this non classical purification method, the nuclear capsids were monitored by silver staining and by Western blot using a pan HSV-1 polyclonal antibody (Figure 3b). The silver stain revealed a protein pattern

consistent with an enriched viral preparation where the main capsid proteins are present (Maringer & Elliott, 2010; Ren et al., 2011; Salmon et al., 1998; Yu & Weller, 1998). Furthermore, the anti-HSV-1 blot highlighted a strong enrichment of numerous viral proteins compared to the infected cell lysate. We also probed VP5 as loading control and several nuclear (host PCNA, lamin A/C, nucleoporin 62, viral VP16 or ICP8), or cytoplasmic (host  $\gamma$ -tubulin, viral U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>13 teguments) markers to examine the potential contamination by host and viral proteins or cytoplasmic viral particles. As expected, all proteins were present in infected cell lysates and the cytoplasmic U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>13 and  $\gamma$ -tubulin were absent in infected nuclei (Fig. 3c). Most important, aside from VP5, all markers were undetectable on nuclear capsids, hinting at the purity of our preparations. In contrast, when probing for ICP0 and ICP4 with antibodies previously shown to be highly specific and non reactive in ICP0<sup>-</sup> and ICP4<sup>-</sup> deletion mutants respectively (Geoffroy et al., 2004), both proteins were consistently detected on intranuclear capsids. To confirm the above findings and to determine which of the nuclear capsids are ICP0 and/or ICP4 positive, a second independent protocol was used to purify the nuclear capsids by classical sucrose gradient sedimentation, which allows to separate A, B and C capsids from one another and from cytoplasmic capsids (Bucks et al., 2007; Lamberti & Weller, 1998; Newcomb et al., 2006; Roller et al., 2000; Salmon et al., 1998; Sheaffer et al., 2000; Tatman et al., 1994). Silver staining of these intranuclear capsids (Fig. 4a) revealed a similar pattern than previously observed (Fig. 3b). Most importantly, Western blots confirmed the presence of ICP0 and ICP4 on C capsids and the absence of nuclear or cytoplasmic contaminants (Fig. 4b), in agreement with our previous findings. Interestingly, ICP0, but not ICP4, was also detectable on B capsids. However, neither protein was present on A capsids, even with prolonged exposures of the blots (data not shown). Taken together, these two independent methods clearly hinted at the presence of ICP0 and ICP4 on intranuclear capsids.



**Figure 4. Selective presence of ICP0 and ICP4 on A, B or C nuclear capsids.**

(a) Five micrograms of mock-infected cells, infected cell lysates or A, B and C capsids were silver stained. Once again, the major capsid components are listed on the right.

(b) Intranuclear A, B and C capsids (25  $\mu$ g) purified by classical sucrose gradient sedimentation were collected and immunoblotted for the viral proteins VP5, ICP0, ICP4, VP16, ICP8, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>13 or the cellular proteins PCNA, lamin A/C, nup62 and  $\gamma$ -tubulin. As controls, mock-infected or infected cell lysates (15  $\mu$ g each) were also included. Note that ICP0 was detected on B and C capsids while ICP4 was only present on C capsids. Nuclear A capsids had no detectable ICP0 and ICP4 proteins even upon longer exposure (data not shown).



## DISCUSSION

### **U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 are salt-extractable tegument proteins**

The experiments presented in this paper biochemically confirm our previous mass spectrometry findings (Loret et al., 2008) that U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 proteins are indeed present in mature extracellular virions. Moreover, these two proteins share properties with the VP16 tegument (Fig. 1), strongly suggesting that U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 are true components of the HSV-1 viral tegument. Based on their similar salt extractability, it would be interesting to know whether U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 are quickly released upon entry and if they share with VP16 an early role upon infection. This is plausible since U<sub>L</sub>7 interacts with the pro-apoptotic mitochondrial protein ANT2, thereby modulating viral propagation (Tanaka et al., 2008). In the same way, an early release of U<sub>L</sub>23 in the cytoplasm would be logical, since this is where nucleotide metabolism occurs and U<sub>L</sub>23 facilitates replication of the viral genome (Coppock & Pardee, 1987; Munch-Petersen et al., 1995). However, these hypotheses need further work to clarify the role of U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 as components of the mature virions.

The biochemical analysis of protein-protein interactions in the virions revealed that the association of U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23 and VP16 with the capsid was modulated by NEM, which prevented their release from the capsids despite high salt concentrations (Fig. 2). The impact of NEM on the tegument is not surprising because VP16, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 contain several cysteine residues (respectively 6, 12 and 5). Thus, NEM alters the organization of the tegument and favours the association of these proteins with the capsid as for U<sub>L</sub>16 and U<sub>L</sub>11 (Meckes & Wills, 2008). Given the presence of DTT throughout our de-tegumentation assay, this NEM phenotype is not due to the alteration of pre-existing or newly formed disulfide bonds but rather highlights the contribution of reduced cysteines in the organization of the tegument. This may be

particularly relevant in the context of the dynamic nature of the tegument during entry and post-entry steps (Meckes & Wills, 2008), its acquisition and maturation at the TGN (Meckes & Wills, 2007) as well as its reported maturation in extracellular viruses (Newcomb & Brown, 2009). Therefore, pre-existing reduced cysteines appear as important determinants for the interaction of U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 with others components of the viral particle and necessary for their release during de-tegmentation. However, the mechanism that governs this phenotype is not clear and it is difficult at this point to define the precise targets on which NEM acts given the multitude of proteins present in the virus, including the potential 49 host proteins previously reported (Loret et al., 2008). Two explanations come to our mind. First, NEM may induce a conformational change that forces these proteins to re-associate with components of the capsid. Alternatively, NEM could block a cysteine exchange reaction that is needed for release of the tegument protein, reminiscent of the exchange reaction reported for the SU and TM proteins of murine leukemia virus (MLV) upon binding to its receptor (Pinter et al., 1997). Only further work will resolve this important issue.

### **Tight association of ICP0 and ICP4 with the HSV-1 capsid**

The present study is consistent with the incorporation of ICP0 and ICP4 in mature virions (Delboy et al., 2010; Elliott et al., 2005; Loret et al., 2008; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010; Sedlackova & Rice, 2008; Yang & Courtney, 1995; Yao & Courtney, 1989; 1991; 1992). Biochemical analysis of these proteins further revealed that they do not behave as U<sub>L</sub>7, U<sub>L</sub>23 and VP16 and were never released from the capsids by detergent and salts (Fig. 1). These results are in agreement with recent studies reporting that ICP0 remains associated with the capsid under high salt conditions (Delboy et al., 2010; Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010). In contrast, the tight association

of ICP4 with the capsid found here contrasts with reports that ICP4 is readily extracted by salts (Delboy et al., 2010; Radtke et al., 2010). This apparent discrepancy may be explained by the different methods employed to achieve de-tegmentation. In fact, many distinct parameters were noted, including MOI, time of harvesting, cell lines, temperature, density cushion, time of centrifugation, sonication and presence of DTT. It thus remains to be seen how these factors individually affect ICP4. In the scenario where ICPO and ICP4 remain associated with the capsid, it would be interesting to know if they partially travel to the nucleus with incoming capsids. This process could ultimately allow these proteins to translocate into the nucleus and quickly transactivate HSV-1 gene expression. Consistent with this idea, a role for ICPO in capsid targeting to the nucleus was recently suggested by Delboy & Nicola (2011).

Though NEM altered the release of VP16, U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 from the capsid by salts, it had no detectable impact on ICPO and ICP4 (Fig. 2). This is rather surprising given the many cysteines present in the two proteins (14 and 15 respectively) Thus, either all cysteines are already involved in intra/inter molecular interactions or the available reduced cysteines do not appear as key players in the interaction of ICPO and ICP4 with the viral particles.

### **ICPO and ICP4 are present on intranuclear HSV-1 capsids**

The strong association of ICPO and ICP4 with the capsid is puzzling and unlike the other tegument proteins analyzed in this study. Given the strong association and the role of ICPO and ICP4 in the nucleus, it raised the possibility they may be recruited, at least partially, to newly assembled capsids before they exit that intracellular compartment. The work presented here is the first evidence that might be the case. Although it is impossible to formally rule out that ICPO and ICP4 are co-purifying contaminants or that the capsids

are not sufficiently pure, we favour the scenario that the two proteins are indeed coating nuclear capsids. First, enriched nuclear preparations isolated by two independent methods were positive by Western blotting with highly specific antibodies. Second, both nuclear capsid preparations were devoid of visible cellular debris (Fig. 3 and data not shown). Third, all the tested potential nuclear and cytoplasmic contamination markers were absent from the samples (Fig. 3 and 4). Finally, we only detected ICP0 and ICP4 on some nuclear capsids and not others. For instance ICP0 was found on B and C capsids but not A capsids, while ICP4 was only present on C capsids. This feature is most consistent with the specific addition of these proteins to some nuclear capsids, rather than simply being non specific contaminants. The data are thus fully consistent with our proposal that these proteins coat nuclear capsids. This seemingly contradicts previous reports (Maringer & Elliott, 2010; Radtke et al., 2010; Yao & Courtney, 1992). However, it is conceivable that lower affinity antibodies and/or amount of loaded sample previously hampered their detection. We thus believe that ICP0 and ICP4 indeed specifically coat some nuclear capsids. It is worth noting that an initial recruitment of ICP0 and ICP4 onto nuclear capsids is fully compatible with the subsequent cytoplasmic recruitment of these two viral proteins in a VP22 and/or ICP27-dependent manner (Elliott et al., 2005; Maringer & Elliott, 2010; Sedlackova & Rice, 2008). This therefore suggests that ICP0 and ICP4 may be recruited to the viral particles at multiple sites.

In conclusion, this study sheds light on the composition of the mature HSV-1 virions and confirms that the two new proteins U<sub>L</sub>7 and U<sub>L</sub>23 identified by mass spectrometry are indeed incorporated into extracellular HSV-1 virions and are bona fide components of the tegument. This biochemical analysis also suggests the implication of reduced cysteines in the organization of the tegument in agreement with its dynamic nature. The data additionally support the presence of the two controversial proteins ICP0 and ICP4 into the mature

extracellular particles and their tight association with the capsid, which is insensitive to thiol-alkylation by NEM. Finally, but not least, we present the first evidence of the presence of ICP0 and ICP4 on purified HSV-1 intranuclear capsids consistent with their partial early recruitment during egress.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank H. Browne (anti-U<sub>L</sub>48), R.J. Eisenberg and G.H. Cohen (anti-U<sub>S</sub>6 gD-DL6), Y. Nishiyama (anti-U<sub>L</sub>7), B. Roizman (anti-U<sub>L</sub>13) and W.C. Summers (anti-U<sub>L</sub>23) for generously providing antibodies. We also thank B. Sodeik for graciously supplying the anti-HSV-1 Remus polyclonal serum and the HSV-1 F strain. We are grateful to K. Radtke and all lab members for their excellent suggestions and critical reading of this manuscript. Special thanks to Ginette Guay, Diane Gingras and Michel Lauzon for their expertise, help and excellent technical support with the electronic microscope. The work in the laboratory is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## REFERENCES

- Bechtel, J. T., Winant, R. C. & Ganem, D. (2005). Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**, 4952-4964.
- Bergman, A.-C., Nyman, P. O. & Larsson, G. (1998). Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1. *FEBS Letters* **441**, 327-330.
- Bjerke, S. L. & Roller, R. J. (2006). Roles for herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>34 and U<sub>S</sub>3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* **347**, 261-276.
- Bjornberg, O., Bergman, A. C., Rosengren, A. M., Persson, R., Lehman, I. R. & Nyman, P. O. (1993). dUTPase from Herpes Simplex Virus Type 1; Purification from Infected Green Monkey Kidney (Vero) Cells and from an Overproducing Escherichia coli Strain. *Protein Expression and Purification* **4**, 149-159.
- Boehmer, P. E. & Lehman, I. R. (1997). Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* **66**, 347-384.
- Bucks, M. A., O'Regan, K. J., Murphy, M. A., Wills, J. W. & Courtney, R. J. (2007). Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and U<sub>L</sub>37 are associated with intranuclear capsids. *Virology* **361**, 316-324.
- Bulaj, G., Kortemme, T. & Goldenberg, D. P. (1998). Ionization-Reactivity Relationships for Cysteine Thiols in Polypeptides. *Biochemistry* **37**, 8965-8972.
- Coppock, D. L. & Pardee, A. B. (1987). Control of thymidine kinase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol* **7**, 2925-2932.
- Delboy, M. G. & Nicola, A. V. (2011). A Pre-Immediate-Early Role for Tegument ICPO in the Proteasome-Dependent Entry of Herpes Simplex Virus. *J Virol* **85**, 5910-5918.
- Delboy, M. G., Siekavizza-Robles, C. R. & Nicola, A. V. (2010). Herpes simplex virus tegument ICPO is capsid associated, and its E3 ubiquitin ligase domain is important for incorporation into virions. *J Virol* **84**, 1637-1640.
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. & Sodeik, B. (2002). Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**, 2795-2809.
- Donnelly, M. & Elliott, G. (2001). Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J Virol* **75**, 2566-2574.
- Dry, I., Haig, D. M., Inglis, N. F., Imrie, L., Stewart, J. P. & Russell, G. C. (2008). Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* **82**, 5390-5397.
- Elliott, G., Hafezi, W., Whiteley, A. & Bernard, E. (2005). Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (U<sub>L</sub>49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICPO. *J Virol* **79**, 9735-9745.
- Everett, R. D. (2000). ICPO, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* **22**, 761-770.
- Fuchs, W., Granzow, H., Klopffleisch, R., Klupp, B. G., Rosenkranz, D. & Mettenleiter, T. C. (2005). The U<sub>L</sub>7 gene of pseudorabies virus encodes a nonessential structural protein which is involved in virion formation and egress. *J Virol* **79**, 11291-11299.
- Geoffroy, M. C., Epstein, A. L., Toublanc, E., Moullier, P. & Salvetti, A. (2004). Herpes simplex virus type 1 ICPO protein mediates activation of adeno-associated virus type 2 rep gene expression from a latent integrated form. *J Virol* **78**, 10977-10986.

- Greber, U. F., Webster, P., Weber, J. & Helenius, A. (1996).** The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J* **15**, 1766-1777.
- Guo, H., Shen, S., Wang, L. & Deng, H. (2010).** Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell* **1**, 987-998.
- Hwang, S., Kim, K. S., Flano, E., Wu, T. T., Tong, L. M., Park, A. N., Song, M. J., Sanchez, D. J., O'Connell, R. M., Cheng, G. & Sun, R. (2009).** Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response. *Cell Host Microbe* **5**, 166-178.
- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D. & Kieff, E. (2004).** Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16286-16291.
- Jons, A. & Mettenleiter, T. C. (1996).** Identification and characterization of pseudorabies virus dUTPase. *J Virol* **70**, 1242-1245.
- Kalamvoki, M., Qu, J. & Roizman, B. (2008).** Translocation and colocalization of ICP4 and ICP0 in cells infected with herpes simplex virus 1 mutants lacking glycoprotein E, glycoprotein I, or the virion host shutoff product of the U<sub>L</sub>41 gene. *J Virol* **82**, 1701-1713.
- Kalamvoki, M. & Roizman, B. (2010).** Role of herpes simplex virus ICP0 in the transactivation of genes introduced by infection or transfection: a reappraisal. *J Virol* **84**, 4222-4228.
- Kelly, B. J., Fraefel, C., Cunningham, A. L. & Diefenbach, R. J. (2009).** Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res* **145**, 173-186.
- Kramer, T., Greco, T. M., Enquist, L. W. & Cristea, I. M. (2011).** Proteomic characterization of pseudorabies virus extracellular virions. *J Virol* **85**, 6427-6441.
- Lamberti, C. & Weller, S. K. (1998).** The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, U<sub>L</sub>32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol* **72**, 2463-2473.
- Lee, J. H., Vittone, V., Diefenbach, E., Cunningham, A. L. & Diefenbach, R. J. (2008).** Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology* **378**, 347-354.
- Leopardi, R., Van Sant, C. & Roizman, B. (1997).** The herpes simplex virus 1 protein kinase U<sub>S</sub>3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7891-7896.
- Liashkovich, I., Hafezi, W., Kuhn, J. M., Oberleithner, H. & Shahin, V. (2011).** Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *J Mol Recognit* **24**, 414-421.
- Loret, S., Guay, G. & Lippe, R. (2008).** Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**, 8605-8618.
- Maringer, K. & Elliott, G. (2010).** Recruitment of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 to the virus particle. *J Virol* **84**, 4682-4696.
- McCombs, R. M. & Williams, G. A. (1973).** Disruption of herpes virus nucleocapsids using lithium iodide, guanidine and mercaptoethanol. *J Gen Virol* **20**, 395-400.
- Meckes, D. G., Jr. & Wills, J. W. (2007).** Dynamic interactions of the U<sub>L</sub>16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *J Virol* **81**, 13028-13036.
- Meckes, D. G., Jr. & Wills, J. W. (2008).** Structural rearrangement within an enveloped virus upon binding to the host cell. *J Virol* **82**, 10429-10435.
- Mettenleiter, T. C. (2002).** Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**, 1537-1547.
- Mettenleiter, T. C. (2004).** Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**, 167-180.



- Mettenleiter, T. C. (2006).** Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* **113**, 163-169.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. & Granzow, H. (2006).** Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**, 423-429.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. & Granzow, H. (2009).** Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**, 222-234.
- Morcock, D. R., Thomas, J. A., Gagliardi, T. D., Gorelick, R. J., Roser, J. D., Chertova, E. N., Bess, J. W., Jr., Ott, D. E., Sattentau, Q. J., Frank, I., Pope, M., Lifson, J. D., Henderson, L. E. & Crise, B. J. (2005).** Elimination of retroviral infectivity by N-ethylmaleimide with preservation of functional envelope glycoproteins. *J Virol* **79**, 1533-1542.
- Mou, F., Forest, T. & Baines, J. D. (2007).** U<sub>3</sub> of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol* **81**, 6459-6470.
- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Jensen, H. K. & Tyrsted, G. (1995).** Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Advances in Enzyme Regulation* **35**, 69-72.
- Nagahara, N., Matsumura, T., Okamoto, R. & Kajihara, Y. (2009).** Protein Cysteine Modifications: (2) Reactivity Specificity and Topics of Medicinal Chemistry and Protein Engineering. *Current Medicinal Chemistry* **16**, 4490-4501.
- Newcomb, W. W. & Brown, J. C. (2009).** Time-dependent transformation of the herpesvirus tegument. *J Virol* **83**, 8082-8089.
- Newcomb, W. W., Homa, F. L. & Brown, J. C. (2006).** Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein U<sub>L</sub>25 is located on the external surface of the capsid near the vertices. *J Virol* **80**, 6286-6294.
- Newcomb, W. W., Homa, F. L., Thomsen, D. R., Ye, Z. & Brown, J. C. (1994).** Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **68**, 6059-6063.
- Ogg, P. D., McDonell, P. J., Ryckman, B. J., Knudson, C. M. & Roller, R. J. (2004).** The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* **319**, 212-224.
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U. & Helenius, A. (2000).** Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 4922-4931.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A. & Levine, B. (2007).** HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23-35.
- Pinter, A., Kopelman, R., Li, Z., Kayman, S. C. & Sanders, D. A. (1997).** Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *J Virol* **71**, 8073-8077.
- Radtke, K., Kieneke, D., Wolfstein, A., Michael, K., Steffen, W., Scholz, T., Karger, A. & Sodeik, B. (2010).** Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog* **6**, e1000991.
- Remillard-Labrosse, G., Guay, G. & Lippe, R. (2006).** Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**, 9741-9753.
- Ren, Y., Bell, S., Zenner, H. L., Lau, S. Y. & Crump, C. M. (2011).** Glycoprotein M is Important for the Efficient Incorporation of Glycoprotein H/L into HSV-1 particles. *J Gen Virol*.

- Roizman, B., Gu, H. & Mandel, G. (2005).** The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle* **4**, 1019-1021.
- Roller, R. J., Zhou, Y., Schnetzer, R., Ferguson, J. & DeSalvo, D. (2000).** Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**, 117-129.
- Ruyechan, W. T. (1988).** N-ethylmaleimide inhibition of the DNA-binding activity of the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein. *J Virol* **62**, 810-817.
- Salmon, B., Cunningham, C., Davison, A. J., Harris, W. J. & Baines, J. D. (1998).** The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J Virol* **72**, 3779-3788.
- Scholtes, L. D., Yang, K., Li, L. X. & Baines, J. D. (2010).** The capsid protein encoded by U(L)17 of herpes simplex virus 1 interacts with tegument protein VP13/14. *J Virol* **84**, 7642-7650.
- Sedlackova, L. & Rice, S. A. (2008).** Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions. *J Virol* **82**, 268-277.
- Sevier, C. S. & Kaiser, C. A. (2002).** Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 836-847.
- Shanda, S. K. & Wilson, D. W. (2008).** U<sub>L</sub>36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. *J Virol* **82**, 7388-7394.
- Sheaffer, A. K., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Gao, M., Weller, S. K. & Tenney, D. J. (2000).** Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 U<sub>L</sub>26 protease into capsids. *J Virol* **74**, 6838-6848.
- Skepper, J. N., Whiteley, A., Browne, H. & Minson, A. (2001).** Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* **75**, 5697-5702.
- Smiley, J. R. (2004).** Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J Virol* **78**, 1063-1068.
- Smith, G. A. & Enquist, L. W. (2002).** Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 135-161.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius, A. (1997).** Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**, 1007-1021.
- Stackpole, C. W. (1969).** Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol* **4**, 75-93.
- Szczepaniak, R., Nellissery, J., Makhov, A. M., Kosinski, A., Conway, J. F. & Weller, S. K. (2011).** Disulfide Bond formation contributes to Herpes Simplex Virus Capsid Stability and Retention of Pentons. *J Virol*.
- Tanaka, M., Sata, T. & Kawaguchi, Y. (2008).** The product of the Herpes simplex virus 1 U<sub>L</sub>7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2. *Virology* **5**, 125.
- Tatman, J. D., Preston, V. G., Nicholson, P., Elliott, R. M. & Rixon, F. J. (1994).** Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* **75 ( Pt 5)**, 1101-1113.
- Trgovcich, J., Johnson, D. & Roizman, B. (2002).** Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma(1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J Virol* **76**, 6974-6986.

- Turcotte, S., Letellier, J. & Lippe, R. (2005).** Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**, 8847-8860.
- Vittone, V., Diefenbach, E., Triffett, D., Douglas, M. W., Cunningham, A. L. & Diefenbach, R. J. (2005).** Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **79**, 9566-9571.
- Wolfstein, A., Nagel, C. H., Radtke, K., Dohner, K., Allan, V. J. & Sodeik, B. (2006).** The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**, 227-237.
- Wurth, C., Thomas, R. M., Folkers, G. & Scapozza, L. (2001).** Folding and self-assembly of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *J Mol Biol* **313**, 657-670.
- Wysocka, J. & Herr, W. (2003).** The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* **28**, 294-304.
- Yang, C. C., Yang, Y. Y., Lin, K. L. & Lin, S. J. (2000).** Different forms of HSV-1 VP22a within purified virion and infected cells. *J Microbiol Immunol Infect* **33**, 141-148.
- Yang, T. Y. & Courtney, R. J. (1995).** Influence of the host cell on the association of ICP4 and ICP0 with herpes simplex virus type 1. *Virology* **211**, 209-217.
- Yao, F. & Courtney, R. J. (1989).** A major transcriptional regulatory protein (ICP4) of herpes simplex virus type 1 is associated with purified virions. *J Virol* **63**, 3338-3344.
- Yao, F. & Courtney, R. J. (1991).** Association of a major transcriptional regulatory protein, ICP4, of herpes simplex virus type 1 with the plasma membrane of virus-infected cells. *J Virol* **65**, 1516-1524.
- Yao, F. & Courtney, R. J. (1992).** Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **66**, 2709-2716.
- Yedowitz, J. C., Kotsakis, A., Schlegel, E. F. & Blaho, J. A. (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.
- Yeh, P. C., Meckes, D. G., Jr. & Wills, J. W. (2008).** Analysis of the interaction between the U<sub>L</sub>11 and U<sub>L</sub>16 tegument proteins of herpes simplex virus. *J Virol* **82**, 10693-10700.
- Yu, D. & Weller, S. K. (1998).** Herpes simplex virus type 1 cleavage and packaging proteins U<sub>L</sub>15 and U<sub>L</sub>28 are associated with B but not C capsids during packaging. *J Virol* **72**, 7428-7439.
- Zhu, F. X., Chong, J. M., Wu, L. & Yuan, Y. (2005).** Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **79**, 800-811.
- Zweig, M., Heilman, C. J., Jr. & Hampar, B. (1979).** Identification of disulfide-linked protein complexes in the nucleocapsids of herpes simplex virus type 2. *Virology* **94**, 442-450.



# Résultats supplémentaires

## Introduction

Les articles 1 et 2 nous ont permis de déterminer précisément la composition protéique des virus extracellulaires et d'examiner plus en détails la localisation de certaines protéines virales incorporées. De plus, l'article 2 nous a révélé la présence d'ICP0 et d'ICP4 sur les capsides nucléaires. Par le fait même, ceci a mis en évidence l'acquisition possible de ces protéines à un stade précoce du cycle viral. En effet, pour devenir un virus mature, la nucléocapside nouvellement formée dans le noyau doit, tout au long du cycle viral, acquérir ses constituants. Cet ajout séquentiel se fait à partir de trois compartiments principaux : le noyau, le cytoplasme et le TGN. Toutefois, ce processus complexe de maturation et d'acquisition du tégument demeure encore flou. De plus, malgré le rôle critique du tégument à différentes étapes de l'infection, la séquence d'addition des protéines qui le composent demeure encore mal définie. Ainsi, dans le but de dresser un portrait plus juste de la morphogenèse d'HSV-1, le contenu protéique des capsides C nucléaires a été analysé. Dans cette section, il sera donc question de l'élaboration d'un protocole d'isolation et de purification des capsides C par cytométrie en flux ainsi que l'analyse de leur composition protéique par spectrométrie de masse. Bien que les résultats présentés dans cette section sont des résultats préliminaires pour lesquels quelques expériences supplémentaires doivent être effectuées afin de valider et de consolider les différentes conclusions tirées, il n'en demeure pas moins que ces résultats sont déjà en très bonne voie pour mener à une prochaine publication d'article. Toujours en alliant, la biologie cellulaire, la virologie et la protéomique, ces données permettent ainsi d'étudier la morphogenèse d'HSV-1 en effectuant une comparaison préliminaire de la composition protéique des capsides C à celle des virus

extracellulaires matures présentée dans l'article 1. Cette analyse offre aussi l'opportunité d'acquérir de nouvelles informations quant aux étapes précoces de la tégumentation.

## Matériel et Méthodes

**Cellules et virus.** Les cellules HeLa adaptées à la culture cellulaire en suspension (HeLa S3) sont cultivées à 37°C dans du milieu JMEM (Joklik's modified Eagle's medium ; Sigma-Aldrich) contenant 5% de sérum fœtal bovin (FBS), 0.1 mM d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. La souche F du virus sauvage d'HSV-1 et le virus mutant HSV-1 K26GFP (souche KOS), qui exprime la protéine VP26 couplée à la GFP (427), ont généreusement été fournis par Beate Sodeik et Phrasant Desai respectivement. Les deux virus ont été amplifiés sur des cellules BHK et titrés sur des cellules Vero tel que décrit précédemment (173).

**Isolation des capsids nucléaires.** Les cellules HeLa S3 sont infectées avec la souche F d'HSV-1 ou le virus HSV-1 K26GFP à 37°C pendant 8 heures à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 et les noyaux infectés sont isolés tel que décrit précédemment (428). Les noyaux sont ensuite lysés pendant 30 min à 4°C dans du MNT (30 mM MES, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.4) contenant 1% d'IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich), 500 U/mL d'ADNase I (Roche) et 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CLAP 1000 X : 8.25 mM de chymostatine, 1.05 µM de leupeptine, 0.38 µM d'aprotinine et 0.73 µM de pepstatine A ; Sigma-Aldrich). Le lysat nucléaire est brièvement soniqué et les débris sont éliminés par une centrifugation à basse vitesse (5 min à 300 x g à 4°C). Le surnageant contenant les capsides nucléaires est ensuite filtré à 0.45 µm avant d'être déposé sur un cousin de sucrose à 35% (w/w) et centrifugé pendant 1 heure à 100,000 x g à 4°C. Le culot contenant les capsides nucléaires est finalement resuspendu dans 100 µL de tampon MNT prétraité 10 min à 37°C à l'ADNase I (60 U/mL) et à l'ARNase A (25 µg/mL). Les échantillons sont conservés à -80°C.

**Microscopie à fluorescence.** 4  $\mu$ L d'une dilution 1 : 200 du mélange homogène de capsides intranucléaires est incubé en présence d'une concentration finale de 1  $\mu$ M de SYTO 13 (Invitrogen) pendant 30 min à 4°C. L'échantillon est ensuite déposé sur une lame de verre auquel est ajouté du Mowiol, puis recouvert d'une lamelle pour compléter le montage permettant ainsi l'observation au microscope à fluorescence. Un contrôle (SYTO 13 seul) est aussi préparé en remplaçant le mélange de capsides nucléaires par du MNT prétraité à l'ADNase I et à l'ARNase A. L'analyse des échantillons par microscopie à fluorescence est réalisée avec un microscope à fluorescence Axiophot (Zeiss) équipé d'un bloc de filtres et d'une caméra Retiga 1300 (Q imaging). Les images sont acquises et analysées par le logiciel d'imagerie Northern Eclipse (Empix imaging) puis traitées et assemblées à l'aide du logiciel Photoshop CS5 (Adobe).

**Détection des billes par cytométrie en flux.** Les billes utilisées pour cet essai sont des microsphères de polystyrène de 800 nm (Estapor), de 200 nm (Polysciences) et de 100 nm (Estapor) diluées 1 :1000. Les billes sont détectées selon les signaux FSC et SSC à l'aide d'un trieur BD FACSAria (BD Biosciences). Les données sont collectées et analysées avec le logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

**Tri par cytométrie en flux.** Une dilution 1 : 500 du mélange de capsides nucléaires marquées avec 1  $\mu$ M de SYTO 13 est analysée et séparée arbitrairement en quatre populations (*No DNA*, *Low DNA*, *High DNA* et *pop X*) selon l'intensité de fluorescence du SYTO 13 et le signal SSC à l'aide d'un trieur BD FACSAria (BD Biosciences) équipé d'un laser à 488 nm. La fluorescence est enregistrée à l'aide d'un filtre passe-haut à 502 nm ainsi qu'un filtre passe-bande 530/30 nm. Le tri est réalisé à basse pression (23 psi) et les capsides



sont conservées à 4°C durant tout le processus. Le logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences) est utilisé pour l'analyse et le tri. Chaque population est finalement concentrée par centrifugation (1 heure à 100,000 x g à 4°C) sur un coussin de sucrose 35% (w/w). Le culot obtenu est resuspendu dans du MNT et conservé à -80°C.

**Microscopie électronique.** La technique de coloration négative, telle que décrite précédemment (429), est utilisée pour caractériser les capsides nucléaires. Brièvement, une goutte (5 µL) de capsides nucléaires est déposée sur une grille cuivrée, préalablement recouverte de Formvar et carbonée (Canemco et Marivac). L'excès de liquide est éliminé avec un papier filtre, puis les échantillons sont contrastés à l'aide d'une solution de 2% d'acétate d'uranyle (Canemco et Marivac). Les grilles sont ensuite lavées à l'eau distillée et séchées à l'air sur un papier filtre. Les échantillons sont finalement observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips 300. La quantification est réalisée en comptant les différents types de capsides présentes dans plusieurs champs d'au moins trois expériences différentes.

**Détection de l'ADN viral par réaction de polymérase en chaîne (PCR).** Pour évaluer la présence d'ADN viral dans les trois populations triées par FACS et contenant des capsides (*No DNA*, *Low DNA* et *High DNA*), un fragment de 669 pb du gène U<sub>L</sub>20 a été amplifié par une méthode conventionnelle de PCR à l'aide d'amorces spécifiques à HSV-1. Les amorces utilisées sont atgacatgcgggatgaccttc (amorce sens) et ttagaacgacgggtgcattc (amorce antisens). Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1.5% coloré au bromure d'éthidium avant d'être exposés aux ultraviolets et photographiés. Le contrôle positif (HSV) utilisé correspond à 100 ng d'ADN extrait de cellules infectées tandis que le contrôle négatif

(MOCK) contient 100 ng d'ADN extrait de cellules non infectées, tous deux amplifiés par PCR tel que décrit ci-dessus.

**Analyse par spectrométrie de masse.** L'échantillon de capsides C isolées par FACS (20  $\mu$ L à 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) est dilué dans 20  $\mu$ L de tampon de Laemmli 2X (Bio-Rad), vortexé une heure et chauffé 5 minutes à 95°C puis centrifugé à 17 000 x g pendant 5 minutes. L'échantillon est séparé par SDS-PAGE sur un mini-gel d'acrylamide de 2.4 cm à gradient (7 à 15%). Suite à l'électrophorèse, le gel est coloré au bleu de Coomassie (Sigma) puis soumis à une excision automatisée avec le robot ProXCISION Proteomics Gel Cutting (PerkinElmer) afin de générer sept bandes. Les protéines contenues dans ces bandes sont soumises à une décoloration, un traitement de réduction puis d'alkylation des cystéines avant de subir une digestion trypsique en gel en utilisant la station robotisée MassPrep (Micromass). Les peptides extraits sont ensuite injectés dans une colonne de dessalage Zorbax C18 (Agilent) puis chromatographiquement séparés sur une colonne capillaire Biobasic C18 Integragit (New Objective) à l'aide d'un système de nano chromatographie en phase liquide à haute performance (nano-HPLC) (1100 series unit ; Agilent). Les peptides élués sont ionisés par électronébulisation (électrospray) lors de leur sortie de la colonne et analysés à l'aide d'un spectromètre de masse Velos LTQ-OrbiTrap (Thermo Fisher). À partir des spectres de masse obtenus, les peptides et les protéines sont identifiés en utilisant les logiciels Mascot (Matrix Science) et X! Tandem qui effectuent leur recherche dans les bases de données complètes et non redondantes fournies par UniProt, soit les bases *Human* et *Human Herpes simplex virus type 1 strain 17*. Finalement, le logiciel Scaffold (Proteome Software Inc.) permet de valider les données protéomiques initiales. Les probabilités d'identification des peptides et des protéines sont calculées à partir de deux algorithmes statistiques, soit PeptideProphet et ProteinProphet (430, 431). Le seuil de probabilité pour

l'identification des peptides et des protéines a été fixé à 95% de façon empirique pour minimiser l'identification de faux-positifs. Toutes les protéines doivent avoir été identifiées par au moins deux peptides uniques.

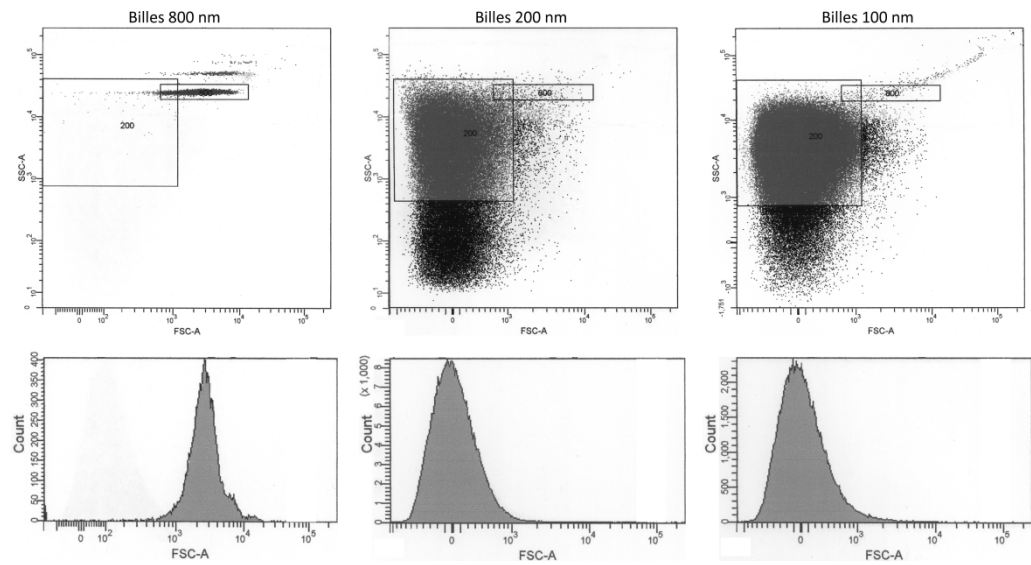
## Résultats

### ► Détection de billes de différentes tailles par cytométrie en flux

À l'heure actuelle, la principale technique de séparation et d'isolation des capsides nucléaires est la sédimentation sur gradient de densité tel que présentée dans l'article 2. Cependant, cette technique ne permet pas une grande pureté des trois types de capsides. En effet, par cette méthode, il a été estimé que les capsides C peuvent être contaminées à 29% par des capsides A et B (330). Ainsi, afin d'améliorer la séparation et surtout la pureté de chaque fraction de capsides nucléaires isolées, nous avons décidé d'utiliser une méthode plus innovatrice et plus précise, soit le tri par cytométrie en flux (FACS) (432, 433). Cependant, étant donné la petite taille des capsides (environ 100 nm) et la limite de détection théorique de l'appareil (environ 500 nm), un premier test s'imposait pour vérifier la faisabilité d'un tel protocole.

Au cours de ce test, nous avons vérifié si le FACS était capable de détecter des particules aussi petites que 100 nm en utilisant des billes de trois tailles différentes, soit 800 nm, 200 nm et 100 nm. Les résultats de cette expérience ont montré que le FACS avait la capacité de détecter les trois tailles de billes (Figure 15). En effet, pour les billes de 800 nm, on a détecté à la fois un signal FSC-A positif représentatif de la taille de la particule et des signaux SSC-A et Count positifs qui ont mis en évidence la détection de particules. Pour les billes de 200 nm et de 100 nm, on a observé un patron similaire dans la mesure où le signal FSC-A était quasiment nul tandis que les signaux SSC-A et Count étaient positifs. Les signaux SSC-A et Count ont confirmé la présence et la détection des particules par le FACS. Toutefois, l'absence de changement de position du pic sur l'axe FSC-A nous a révélé que cet appareil ne pouvait pas

différencier des particules de 200 nm de celles de 100 nm. Cette limitation technique n'a malgré tout affecté en rien la faisabilité de notre expérience puisque toutes les capsides nucléaires avaient une taille d'environ 100 nm.



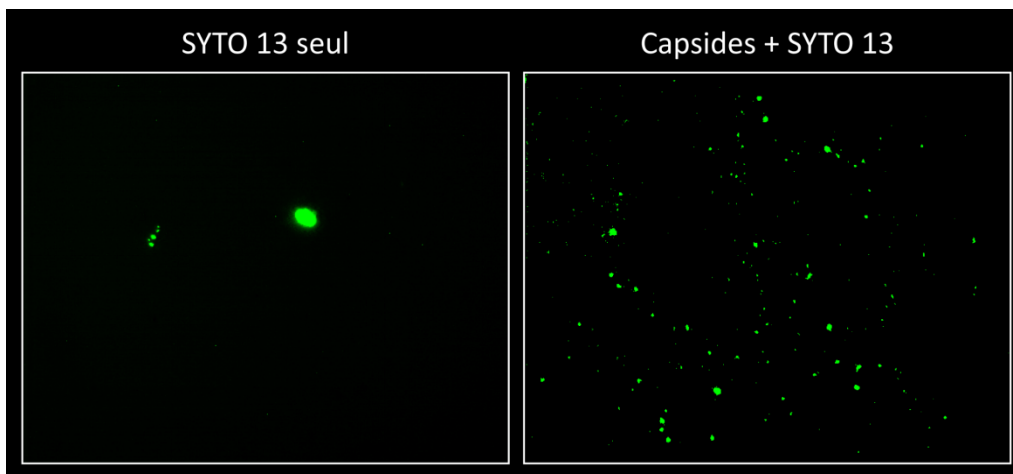
**Figure 15 : Détection de billes par cytométrie en flux**

*La cytométrie en flux a permis la détection de billes de 800 nm, de 200 nm et de 100 nm. Dans les panneaux supérieurs, l'encadré 800 représente la zone de détection des particules de 800 nm tandis que l'encadré 200 représente la zone principale de détection des particules de 200 ou de 100 nm. L'axe FSC-A est représentatif de la taille des particules, l'axe SSC-A correspond à la granulosité de la particule et l'axe Count représente le nombre de particules détectées.*

### ➤ Marquage fluorescent de l'ADN viral

Outre quelques protéines virales impliquées dans la maturation des capsides, l'une des principales caractéristiques qui différencie les trois types de capsides nucléaires (A, B et C) entre elles est leur contenu en ADN. De plus, puisqu'il n'existe pas de protéines virales distinctives impliquées dans la maturation, nous avons décidé d'utiliser un marquage fluorescent de l'ADN viral pour séparer les capsides C matures des deux autres types de capsides nucléaires, soit les capsides A qui ne contiennent pas d'ADN et les capsides B qui n'en contiennent pas ou peu. Pour ce faire, nous avons tout d'abord

procédé à l'isolation de noyaux de cellules infectées contenant les capsides nucléaires grâce à une technique mise au point au sein de notre laboratoire (428). Les noyaux ont ensuite été lysés et centrifugés pour se débarrasser des débris tout en conservant les capsides dans le surnageant. Puis, ce mélange de capsides intranucléaires a été filtré et concentré sur un coussin de sucrose avant d'être mis en présence d'un composé vert fluorescent, appelé SYTO 13, se liant à l'ADN (434). Afin de vérifier la spécificité du marquage entre le SYTO 13 et l'ADN viral, la microscopie à fluorescence a été utilisée. La visualisation de la fluorescence a clairement permis de mettre en évidence un marquage spécifique de l'ADN des capsides par le SYTO 13 (Figure 16).



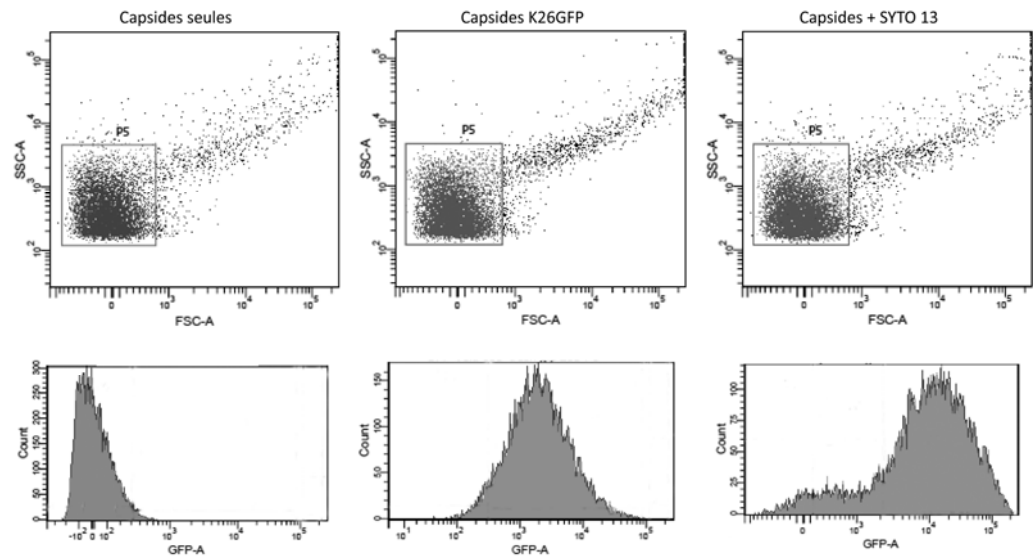
**Figure 16 : Visualisation par microscopie à fluorescence du marquage de l'ADN viral à l'aide du SYTO 13**

*En présence de SYTO 13 seul, on a observé quelques artefacts fluorescents de grande taille tandis qu'en présence des capsides marquées au SYTO 13, de nombreux petits points émettant de la fluorescence et représentant les capsides marquées ont été détectés.*

En effet, en présence de SYTO 13 seulement, on a observé des artefacts fluorescents de grande taille parfois aussi visibles dans l'échantillon contenant des capsides. Cependant, les capsides marquées au SYTO 13 ont révélées de nombreux petits points fluorescents, absents de l'échantillon de SYTO 13 seul, représentant les capsides marquées au SYTO 13.

## ► Détection, isolation et séparation des capsides nucléaires par FACS

Étant donné la spécificité du marquage obtenu par épifluorescence, une première analyse par FACS a été effectuée (Figure 17).

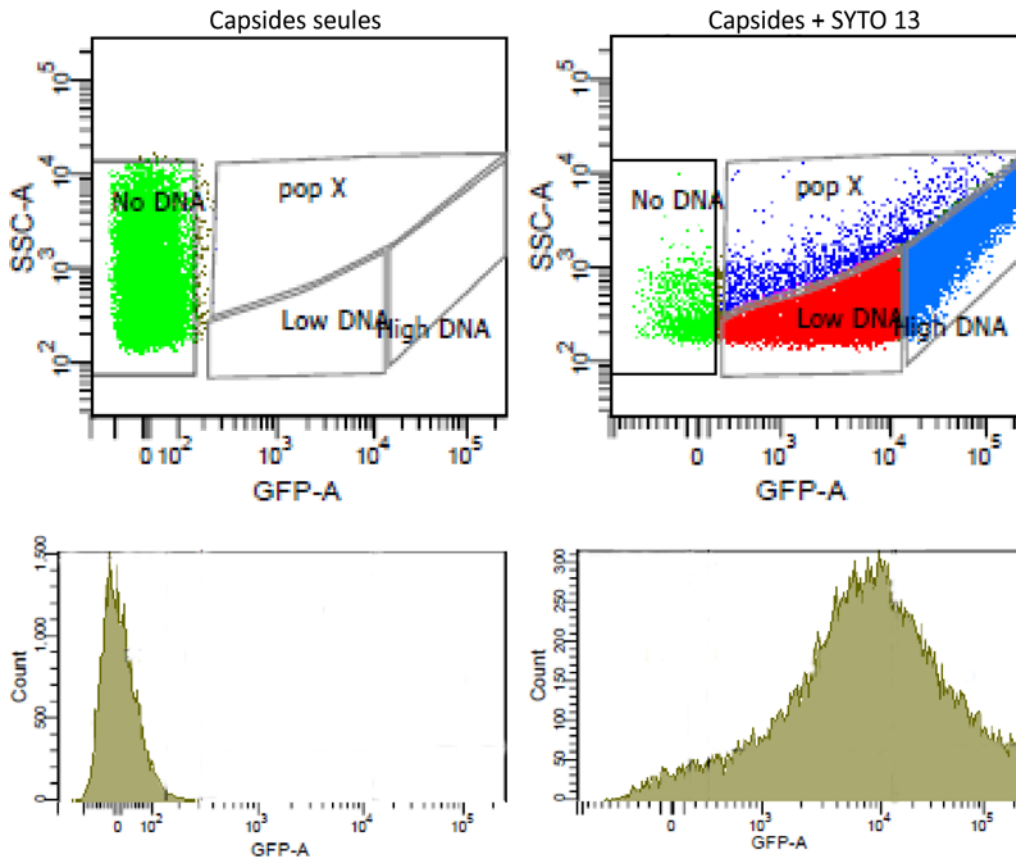


**Figure 17 : Détection des capsides virales par cytométrie en flux**

*Dans les panneaux supérieurs, l'encadré P5 représente la population analysée dans les panneaux inférieurs correspondants. La fluorescence émise par les capsides K26GFP et les capsides marquées au SYTO 13 a pu être détectée par cytométrie en flux.*

Au cours de cette analyse, on a comparé trois types de capsides nucléaires, soit des capsides seules ne contenant aucun marquage fluorescent, des capsides issues d'une infection par un virus mutant exprimant la protéine VP26 couplée à la GFP (K26GFP) et des capsides produites par un virus sauvage marquées au SYTO 13. Pour les trois types de capsides analysées, on a observé des signaux SSC-A et *Count* positifs démontrant ainsi la détection des capsides par le FACS. Les résultats obtenus ont aussi mis en évidence un signal GFP-A nul pour les capsides seules et positif pour les capsides K26GFP et celles marquées au SYTO 13. Puisque que le signal GFP-A représente l'intensité de la fluorescence, ceci a permis de démontrer que le FACS détectait de façon

spécifique le marquage vert fluorescent de la protéine VP26 des capsides K26GFP mais aussi celui de l'ADN des capsides marquées au SYTO 13. Puisque les capsides marquées au SYTO 13 ont aisément été détectées par cytométrie en flux, il nous faut maintenant vérifier la possibilité de discriminer les différents types de capsides nucléaires selon leur contenu en ADN. Pour ce faire, la distribution des capsides en fonction de l'intensité de leur fluorescence a été étudiée. Les résultats obtenus ont révélé un patron fort reproductible mettant en évidence quatre populations (Figure 18).



**Figure 18 : Distribution des capsides nucléaires selon leur intensité de fluorescence**

*L'analyse des capsides nucléaires d'HSV-1 par cytométrie en flux a mis en évidence quatre populations principales : No DNA, Low DNA, High DNA et pop X.*



La première population, nommée *No DNA*, représentait 4.4% des particules totales et n'émettait pas ou très peu de fluorescence (signal GFP nul). Ceci pourrait donc refléter des capsides A puisqu'elles ne contiennent pas d'ADN et ne peuvent donc pas être marquées par le SYTO 13 ou encore des débris et/ou des vésicules et/ou des *L-particles*. La deuxième population (57%), désignée *Low DNA*, a émis un signal intermédiaire de GFP allant de  $10^2$  à  $10^4$  et reflétant probablement une quantité plus ou moins abondante d'ADN. Ceci correspondrait alors plutôt aux capsides B qui peuvent contenir une faible quantité d'ADN et/ou à des capsides C en train d'incorporer leur ADN. La troisième population (3.3%), définie comme *pop X*, ressemblait à la précédente dans la mesure où elle contenait une quantité intermédiaire d'ADN mais un signal SSC-A plus élevé. De plus, le nombre de particules détectées était très faible. Cette population pourrait donc correspondre à des agrégats, des vésicules ou encore des débris. La quatrième et dernière population, désignée *High DNA*, représentait 35.3% des particules détectées et a démontré un fort signal GFP ( $>10^4$ ) caractéristique d'une grande quantité d'ADN. Cette population serait possiblement attribuable à la présence de capsides C. Afin de mieux caractériser les différentes populations identifiées par FACS, un tri a été effectué pour séparer les quatre populations mentionnées précédemment (*No DNA*, *Low DNA*, *High DNA* et *pop X*) et une analyse par EM et par PCR ont été réalisées.

### ➤ Analyse EM, PCR et quantification des capsides C

Dans un premier temps, afin de faire un parallèle entre le pourcentage de particules présentes dans chacune des populations identifiées par FACS et la proportion de capsides A, B et C dans le mélange homogène de capsides intranucléaires injecté dans le FACS, une quantification des différents types de capsides a été effectuée par EM. Lors de cette quantification du mélange de

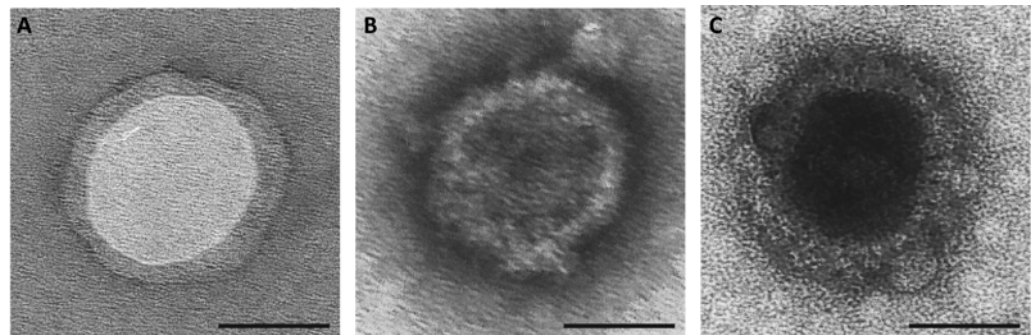
capsides intranucléaires (n = 377), on s'est aperçu qu'il contenait 11% de capsides A, 56% de capsides B et 33% de capsides C (Tableau 2). Ainsi, le pourcentage de capsides A pourrait être attribué à la population *No DNA* (4.4%) ou *pop X* (3.3%). Les pourcentages obtenus pour les capsides B (56%) et C (33%) étaient, quant à eux, très similaires à ceux des populations *Low DNA* (57%) et *High DNA* (35.3%) respectivement identifiées par FACS. Ces résultats ont donc appuyé nos hypothèses, soit que les capsides B pourraient correspondre à la population *Low DNA* et les capsides C à celle nommée *High DNA*.

**Tableau 2 : Quantification des capsides nucléaires**

	Capsides A	Capsides B	Capsides C
<b>EM (n=377)</b>	11%	56%	33%
<b>FACS</b>	No DNA = 4,4% pop X = 3,3%	Low DNA = 57%	High DNA = 35,3%

Dans un deuxième temps, les différentes populations triées par FACS ont été examinées par coloration négative au microscope électronique (Figure 19). La population *No DNA* contenait peu de capsides et celles-ci ressemblaient à celle présentée dans la Figure 19A. On a ainsi observé que le cœur de la capside était blanc et ne contenait donc pas d'ADN, caractéristique des capsides A. La population *Low DNA* contenait un plus grand nombre de capsides que la population précédente et la majorité d'entre elles avaient le centre de la capside grisé, ce qui reflèterait une incorporation partielle de l'ADN, soit des capsides B et/ou des capsides C en cours de formation (Figure 19B). La population *High DNA* contenait, quant à elle, de nombreuses capsides et la majorité d'entre elles possédaient un cœur d'ADN très dense aux électrons (Figure 19C). Cette caractéristique correspondrait aux capsides C

matures. Finalement, la population *pop X* ne contenait que de rares capsides pour la plupart aberrantes, atypiques ou endommagées (et donc non photogéniques) ainsi que des débris. Cette population ne semblerait donc pas correspondre à l'un des types de capsides nucléaires mais plutôt à des débris, des agrégats ou à des artefacts plus ou moins fluorescents ressemblant à ceux parfois observés au microscope à fluorescence même en l'absence de capside (voir Figure 16).

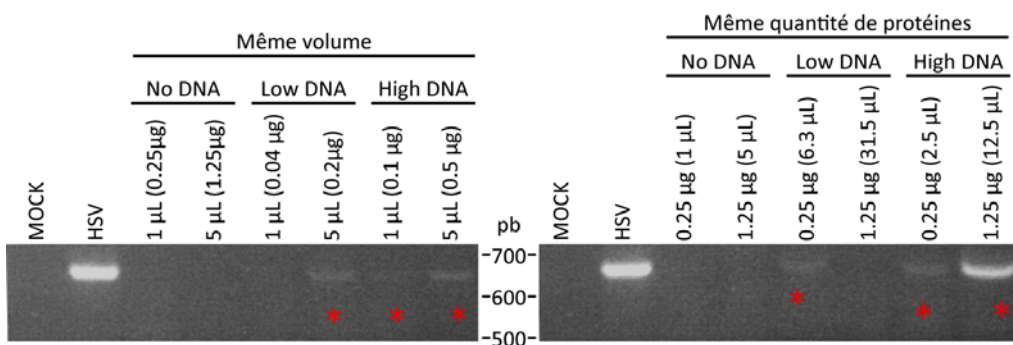


**Figure 19 : Visualisation par coloration négative au microscope électronique des populations *No DNA*, *Low DNA* et *High DNA* obtenues par FACS**

*A – Capside issue de la population No DNA. B – Capside issue de la population Low DNA. C – Capside issue de la population High DNA. Les barres représentent 50nm.*

Pour valider les résultats observés par EM, les trois principales populations contenant des capsides (*No DNA*, *Low DNA* et *High DNA*) ont aussi été analysées par PCR afin de vérifier de façon semi-quantitative la présence d'ADN viral (Figure 20). Puisque le volume et le contenu en protéines différaient pour chacune des populations récoltées par FACS, une amplification par PCR du gène viral U<sub>L</sub>20 a été effectuée sur différents volumes (1 et 5  $\mu$ L) et sur différentes quantités de protéines (0.25 et 1.25  $\mu$ g) pour ces trois populations. Cette analyse a clairement montré que, quelque soit le volume ou la quantité de protéines utilisé, la population *No DNA* ne contenait pas d'ADN ou trop peu pour être amplifié ce qui confirmerait sa correspondance avec les capsides A. Au contraire, la population *High DNA*

présentait un signal croissant qui corrélait avec une augmentation du volume ou de la quantité de protéines confirmant ainsi la présence d'ADN dans cette population. L'analyse par EM et par PCR tendraient donc à associer les capsides C avec la population *High DNA*. Pour la population *Low DNA*, le produit de PCR est détecté avec 5  $\mu\text{L}$  (0.2  $\mu\text{g}$ ) et 0.25  $\mu\text{g}$  (6.3  $\mu\text{L}$ ) mais pas avec 1  $\mu\text{L}$  (0.04  $\mu\text{g}$ ) et 1.25  $\mu\text{g}$  (31.5  $\mu\text{L}$ ). Il semblerait que 1  $\mu\text{L}$  de cette population soit insuffisant pour détecter de l'ADN. Par contre, avec 1.25  $\mu\text{g}$  (31.25  $\mu\text{L}$ ), on s'attendait à détecter de l'ADN puisque l'on en a détecté à 0.25  $\mu\text{g}$  (6.3  $\mu\text{L}$ ). Cette absence de signal est probablement due à la présence d'une trop grande proportion du volume de la population (31.5  $\mu\text{L}$ ) par rapport au volume final du PCR (50  $\mu\text{L}$ ) causant une inhibition de la réaction. La population *Low DNA* contenait de l'ADN mais cette technique semi-quantitative ne nous a pas permis d'affirmer si elle en contenait plus ou moins que la population *High DNA*. Les résultats du PCR jumelés aux caractéristiques observées par EM suggèreraient donc l'association de la population *Low DNA* aux capsides B.



**Figure 20 : Analyse par PCR des populations *No DNA*, *Low DNA* et *High DNA* obtenues par FACS**

La population *No DNA* ne contient pas d'ADN contrairement aux populations *Low DNA* et *High DNA*. Les étoiles rouges indiquent la présence d'une bande d'intensité plus ou moins forte dans le puits désigné.

La population *High DNA*, représentant les capsides C, a aussi été quantifiée par EM afin de vérifier l'enrichissement et la pureté de cet

échantillon qui sera analysé subséquemment par protéomique. Lors de la quantification de cet échantillon (n=167), on a constaté qu'il est constitué à 94% de capsides C, à 2% de capsides A et à 4% de capsides B, soit une contamination par les capsides A et B de seulement 6%. Ce résultat, bien inférieur à celui obtenu lors de la séparation des capsides C par gradient de densité (29%) (330), confirmerait l'efficacité de notre approche par cytométrie en flux quant au développement d'un protocole innovateur permettant la séparation et l'isolation des capsides C nucléaires ainsi que la possibilité d'analyser cet échantillon par spectrométrie de masse étant donné sa pureté.

### ► Protéomique des capsides C obtenues par FACS

Au cours de cette analyse préliminaire par protéomique, seules les capsides C ont été analysées et ce, pour trois raisons principales :

- 1 - une quantité suffisante de capsides et donc de protéines a pu être récupérée (>20 µg) contrairement aux capsides A ;
- 2 - le profil obtenu par FACS était clair puisqu'on se concentrait sur un haut signal GFP (> 10<sup>4</sup>) contrairement aux capsides B pour lesquelles le signal GFP couvrait une large gamme d'intensité de fluorescence ;
- 3 - les capsides C nucléaires sont les prémices des virus matures précédemment analysés par MS/MS (voir article 1).

L'analyse protéomique préliminaire des nucléocapsides C obtenues par FACS nous a révélé la présence de 28 protéines virales (Tableau 3).

**Tableau 3 : Protéines virales détectées par MS/MS  
dans les capsides C nucléaires d'HSV-1**

GÈNE	PROTÉINE	PM (kDa)	NOMBRE D'ACIDES AMINÉS	NOMBRE DE PEPTIDES UNIQUES	POURCENTAGE DE LA PROTÉINE (%)	CAPSIDES C NUCLÉAIRES	VIRUS EXTRACELLULAIRES
<b>Capside</b>							
UL6		74.1	676	-	-	-	+
UL15	Terminase	80.9	735	-	-	-	-
UL17		74.6	703	-	-	-	+
UL18	VP23	34.3	318	12	49,7	+	+
UL19	VP5 / ICP5	149.1	1374	50	44,1	+	+
UL25		62.7	580	2	6,2	+	+
UL26							
	VP24	26.6	247	5	17	+	+
	VP21	37.3	363	-	-	-	-
	COOH term	2.6	25	-	-	-	-
UL26.5	VP22a	31.2	304	-	-	-	-
	COOH term	2.6	25	-	-	-	-
UL28	ICP18.5	85.6	785	-	-	-	-
UL33		14.4	130	-	-	-	-
UL35	VP26	12.1	112	4	40,2	+	+
UL38	VP19C	50.3	465	9	22,6	+	+
			<b>Total</b>	<b>82 peptides</b>		<b>6 protéines</b>	
<b>Tégument</b>							
RL1	ICP34.5	26.2	248	-	-	-	+
RL2	ICP0	78.5	776	-	-	-	+
RS1	ICP4	132.8	1298	7	5,6	+	+
UL4		21.2	199	-	-	-	-
UL7		33.1	296	-	-	-	+
UL11		10.5	96	-	-	-	+
UL13		57.2	518	-	-	-	+
UL14		23.9	219	-	-	-	+
UL16		40.4	373	-	-	-	+
UL21		57.6	535	4	9,7	+	+
UL23	TK	41.0	376	3	8,8	+	+
UL31		34.0	306	3	16,7	+	-
UL36	Large tégument	335.9	3164	-	-	-	+
UL37	ICP32	120.6	1123	2	2,1	+	+
UL41	Vhs	54.9	489	2	6,1	+	+
UL46	VP11/12	78.2	718	3	5,9	+	+
UL47	VP13/14	73.8	693	3	5,8	+	+
UL48	VP16 / ICP25	54.3	490	3	7,8	+	+
UL49	VP22	32.3	301	3	17,6	+	+
UL50	dUTPase	39.1	371	2	4,9	+	+
UL51		25.5	244	3	17,2	+	+
UL55		20.5	186	-	-	-	+
US2		32.5	291	2	9,3	+	+
US3		52.8	481	-	-	-	+
US10		34.1	312	-	-	-	+
US11		17.8	161	-	-	-	-
			<b>Total</b>	<b>40 peptides</b>		<b>13 protéines</b>	

**Tableau 3 (suite) : Protéines virales détectées par MS/MS  
dans les capsides C nucléaires d'HSV-1**

GÈNE	PROTÉINE	PM (kDa)	NOMBRE D'ACIDES AMINÉS	NOMBRE DE PEPTIDES UNIQUES	POURCENTAGE DE LA PROTÉINE (%)	CAPSIDES C NUCLÉAIRES	VIRUS EXTRACELLULAIRES
<b>Enveloppe</b>							
UL1	gL	24.9	224	-	-	-	+
UL10	gM	51.4	473	-	-	-	+
UL20		24.2	222	-	-	-	-
UL22		90.4	838	-	-	-	+
UL27	gB	100.3	904	-	-	-	+
UL34		29.8	275	3	11,3	+	-
UL43		44.9	434	-	-	-	-
UL44	gC	55.0	511	-	-	-	+
UL45		18.2	172	4	35,6	+	+
UL49A	gN	9.2	91	-	-	-	-
UL53	gK	37.6	338	-	-	-	-
UL56		21.2	197	-	-	-	+
US4	gG	25.2	238	-	-	-	+
US5	gJ	9.6	92	-	-	-	-
US6	gD	43.3	394	2	7,6	+	+
US7	gI	41.4	390	4	14,1	+	+
US8	gE	59.1	550	2	5,3	+	+
US8A		16.8	159	-	-	-	-
US9		10.0	90	-	-	-	+
			<b>Total</b>	<b>15 peptides</b>		<b>5 protéines</b>	
<b>Autres</b>							
UL2		36.3	334	-	-	-	-
UL3		25.6	235	-	-	-	-
UL5		98.7	882	-	-	-	-
UL8		79.9	750	-	-	-	-
UL9		94.3	851	-	-	-	-
UL12		67.5	626	2	4,2	+	-
UL24		29.5	269	-	-	-	-
UL29	ICP8	128.4	1196	-	-	-	-
UL30		136.4	1235	-	-	-	-
UL32		64.0	596	-	-	-	-
UL39	ICP6/10	124.1	1137	21	20,1	+	-
UL40		38.0	340	-	-	-	-
UL42		51.2	488	4	9,4	+	-
UL52		114.4	1058	-	-	-	-
UL54	ICP27	55.3	512	-	-	-	-
US1	ICP22	46.5	420	2	4,1	+	-
US12	ICP47	9.8	88	-	-	-	-
			<b>Total</b>	<b>29 peptides</b>		<b>4 protéines</b>	
			<b>CAPSIDE</b>	<b>TÉGUMENT</b>	<b>ENVELOPPE</b>	<b>AUTRES</b>	<b>TOTAL</b>
	Nombre de protéines		6	13	5	4	<b>28</b>
	Pourcentage de protéines		21,4%	46,4%	17,9%	14,3%	<b>100%</b>
	Nombre de peptides uniques		82	40	15	29	<b>166</b>
	Pourcentage de peptides uniques		49,4%	24,1%	9,1%	17,4%	<b>100%</b>

En s'attardant tout d'abord aux composantes de la capside, on s'est aperçu qu'à l'exception d'U<sub>L</sub>6 et d'U<sub>L</sub>17, toutes les protéines qui constituaient la capside mature (VP5, VP19C, VP23, VP24, VP26 et U<sub>L</sub>25) ont été détectées par spectrométrie de masse. De plus, tel qu'attendu, les protéines formant le complexe de la terminase (U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>28 et U<sub>L</sub>33) ainsi que les protéines d'échafaudage VP21 et VP22a, toutes relâchées lors de la maturation des capsides, étaient absentes de notre échantillon.

En ce qui a trait aux protéines du tégument, la protéomique nous a permis d'identifier 13 protéines. Parmi ces protéines, on a retrouvé ICP4, U<sub>L</sub>21, U<sub>L</sub>23, U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>37, U<sub>L</sub>41, U<sub>L</sub>46, U<sub>L</sub>47, U<sub>L</sub>48, U<sub>L</sub>49, U<sub>L</sub>50, U<sub>L</sub>51 et U<sub>S</sub>2. À l'exception d'U<sub>L</sub>31, toutes ces protéines sont présentes dans les virus extracellulaires. Toutefois, on sait qu'U<sub>L</sub>31 est une protéine temporaire nécessaire à l'enveloppement primaire (212, 353, 435). Ceci confirmerait donc son ajout au noyau.

Puisque les capsides C nucléaires sont dépourvues d'enveloppe, on ne s'attendrait donc pas à détecter des protéines associées à l'enveloppe dans notre échantillon. Cependant, cinq de ces protéines ont clairement été décelées, soit U<sub>L</sub>34, U<sub>L</sub>45 ainsi que les glycoprotéines gD, gE et gI. La présence de ces protéines membranaires dans notre échantillon pourrait être due à une contamination par les membranes nucléaires et/ou par celles des différentes organelles de la cellule.

Parmi les autres protéines virales décelées au cours de cette analyse protéomique, on a retrouvé quatre protéines : U<sub>L</sub>12, U<sub>L</sub>39 (ICP6), U<sub>L</sub>42 et U<sub>S</sub>1 (ICP22). La présence de ces protéines pourrait être fortuite ou tout du moins temporaire ou encore tout simplement être des contaminants car aucune d'entre elles n'est incorporée dans les virus extracellulaires.

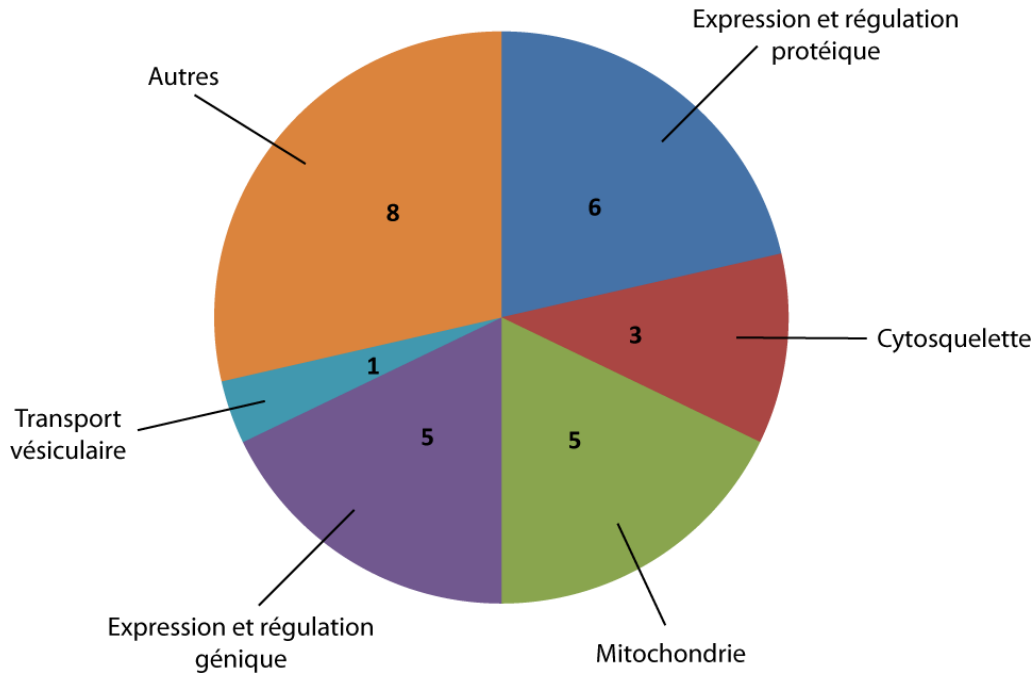
Les protéines cellulaires ont aussi été analysées durant cette étude protéomique et 39 protéines potentiellement associées aux capsides C nucléaires ont été détectées (Tableau 4).



**Tableau 4 : Protéines cellulaires détectées par MS/MS  
dans les capsides C nucléaires d'HSV-1**

NOMS ET FONCTIONS DES PROTÉINES	NOMS ET FONCTIONS DES PROTÉINES
<b>Expression et régulation protéique</b>	<b>Mitochondrie</b>
40S protéine ribosomale S9	ADP/ATP translocase 2
60S protéine ribosomale L7	ATP synthétase mitochondriale alpha
60S protéine ribosomale L18	ATP synthétase mitochondriale beta
60S protéine ribosomale L30	Facteur d'élongation mitochondrial Tu
Facteur d'élongation 1 alpha-1	Protéine 2 du canal voltage dépendant et anion sélectif
Polyubiquitine B	<b>Expression et régulation génique</b>
<b>Cytosquelette</b>	Histone H2A
Actine beta	Histone H2B type 1
Cytokératine 9 de type 1	Histone H3
Cytokératine 10 de type 1	Histone H4
Cytokératine 14 de type 1	Nucléophosmine
Cytokératine 16 de type 1	<b>Autres</b>
Cytokératine 17 de type 1	70kDa protéine membranaire peroxysomale
Cytokératine 1 de type 2	Albumine de sérum
Cytokératine 2 de type 2	Collagène de type 1 alpha2
Cytokératine 5 de type 2	Cystatine A
Cytokératine 6A de type 2	Desmogléine 1
Tubuline alpha	Lipocaline
Tubuline beta	Prolactine
<b>Transport vésiculaire</b>	Séménogéline 1
Rab-1C	Séménogéline 2
	Trypsine 1

Parmi ces protéines, on a identifié 6 protéines associées à l'expression et à la régulation protéique, 3 protéines du cytosquelette, 5 protéines impliquées dans des fonctions mitochondriales, 5 protéines associées à l'expression et la régulation génique, une protéine impliquée dans le transport vésiculaire et 8 autres protéines ayant des fonctions variées, en excluant les contaminants évidents soit les 9 cytokératines, la trypsine et l'albumine de sérum (Figure 21).



**Figure 21 : Abondance et classification fonctionnelle des protéines cellulaires identifiées par MS/MS dans les capsides C nucléaires d'HSV-1**

*Noter que les contaminants évidents, soit les cytokératines, la trypsine et l'albumine de sérum ont été exclus de ce graphique pour une meilleure représentation des différentes catégories fonctionnelles des protéines cellulaires identifiées dans les capsides C nucléaires d'HSV-1.*

Ces résultats ne sont que la pointe de l'iceberg et une analyse approfondie devra être effectuée. Pour ce faire, des améliorations qui seront abordées dans la discussion devront être apportées pour favoriser la détection des protéines cellulaires potentiellement impliquées dans la morphogenèse d'HSV-1.

## Discussion

Les capsides matures nouvellement formées dans le noyau acquièrent leur tégument à partir de trois compartiments cellulaires principaux : le noyau, le cytoplasme et le TGN. Toutefois, la séquence exacte d'addition et le site d'acquisition des différentes protéines qui composent le tégument demeurent encore mal définis. Ainsi, dans le but de mieux comprendre ces complexes processus, une analyse protéomique préliminaire des capsides C nucléaires a été réalisée.

### ► Validation de la méthode expérimentale

Comme toute étude protéomique, la pureté de l'échantillon est d'une grande importance étant donné la sensibilité de la méthode. Or, actuellement, la principale méthode utilisée pour séparer et isoler les différents types de capsides nucléaires est la sédimentation par gradient de densité. Cette méthode ne permet toutefois pas d'obtenir une préparation de qualité puisque chaque type de capsides est contaminé par un autre (330). Afin d'obtenir une préparation de capsides C purifiées pouvant être analysée par spectrométrie de masse, une méthode innovatrice basée sur l'utilisation de la cytométrie en flux a été développée. Cette méthode consiste à marquer l'ADN viral grâce à un composé vert fluorescent, appelé SYTO 13. Les capsides C qui contiennent une grande quantité d'ADN, dorénavant fluorescent, peuvent alors être sélectionnées par un tri en cytométrie de flux. Les résultats présentés dans cette section ont démontré que la cytométrie en flux est une technique qui permet la détection de particules aussi petites que les capsides (Figure 15). De plus, lorsque couplé à un marquage fluorescent de l'ADN, le FACS peut alors séparer les capsides A, B et C les unes des autres (Figure 18). L'analyse par EM et par PCR appuient ces résultats dans la mesure où chaque

type de capsid e a la morphologie attendue (Figure 19) et que la présence d'ADN reflète le type de capsid e obtenu (Figure 20). Toutefois, étant donné le caractère avant-gardiste de cette méthode de séparation des capsides nucléaires, il serait intéressant de comparer la distribution des capsides isolées via un gradient de densité et marquées au SYTO 13 au patron obtenu lors de cette expérience (Figure 18) afin de vérifier si les profils corrèlent entre eux. L'utilisation du FACS dans la séparation et la purification des capsides nucléaires s'avère toutefois une méthode fort prometteuse au vue des résultats obtenus.

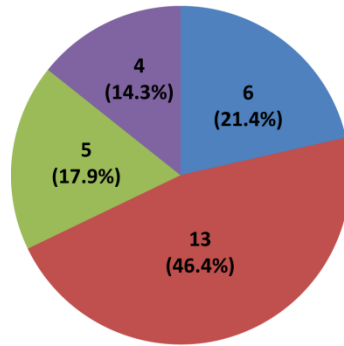
### ➤ Capsides nucléaires et virus extracellulaires

La caractérisation du contenu protéique global des capsides C et sa comparaison avec la composition des virus extracellulaires sont primordiales pour une meilleure compréhension du processus d'acquisition du tégument. En comparant les résultats obtenus dans l'article 1 à ceux exposés dans cette partie, de nouvelles informations concernant la morphogenèse du virus deviennent alors disponibles.

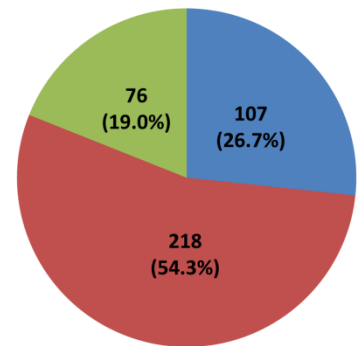
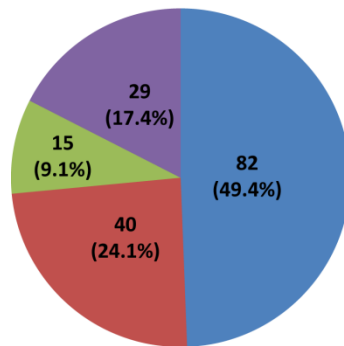
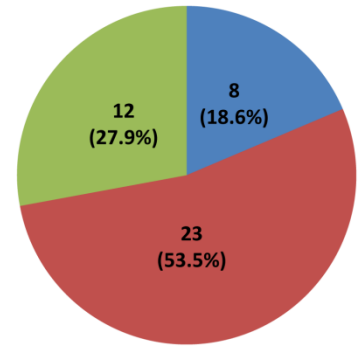
Premièrement, parmi les protéines de la capsid e, on a pu constater qu'à l'exception d'U<sub>L</sub>6 et d'U<sub>L</sub>17, les protéines majeures sont présentes dans les capsides C nucléaires et dans les virions matures. Le nombre de protéines composant la capsid e ainsi que le nombre de peptides qui lui sont associés sont similaires à ceux obtenus lors de l'analyse des virus extracellulaires (Figure 22). L'absence d'U<sub>L</sub>6 et d'U<sub>L</sub>17 au sein des capsides nucléaires peut s'expliquer, d'une part, par leur faible proportion (seulement 12 et 20 copies respectivement par capsid e) et, d'autre part, par une détection plus difficile de ces protéines par MS/MS (91). Néanmoins, étant donnée la présence de la majorité des autres protéines de la capsid e, on peut difficilement douter de

l'absence d'U<sub>L</sub>6 et d'U<sub>L</sub>17. Une validation orthogonale par Western blot devra être effectuée pour confirmer leur présence.

### CAPSIDES C NUCLÉAIRES



### VIRUS EXTRACELLULAIRES



**Figure 22 : Abondance des protéines et des peptides viraux identifiés par MS/MS dans les capsides C nucléaires et les virus extracellulaires d'HSV-1**

Deuxièmement, les protéines du tégument ajoutées au noyau forment le tégument primaire et celui-ci n'a encore jamais été caractérisé. Ainsi, 13 protéines ont été identifiées en tant que tégument primaire parmi les 23 protéines du tégument présentes dans les virus extracellulaires (Figure 22). Cela laisse donc sous-entendre qu'un ajout subséquent de tégument sera nécessaire afin d'obtenir un virus extracellulaire mature. Il est aussi possible que certaines protéines soient perdues lors du passage à travers les membranes nucléaires, comme c'est le cas pour U<sub>L</sub>31 qui est absente des virus extracellulaires, et que d'autres soient acquises de nouveau plus tardivement au cours de l'infection.

La détection d'ICP4 a confirmé les résultats des articles 1 et 2 quant à la présence intrinsèque de cette protéine dans les virus matures et les capsides nucléaires ainsi que son incorporation, au moins en partie, au noyau. Cependant, l'absence d'ICP0 semble être en opposition avec les précédents résultats. Une validation orthogonale par Western blot devra être effectuée pour vérifier ce résultat et ainsi confirmer s'il n'est pas simplement dû à une limitation technique puisqu'aucun peptide n'est détecté. Cette analyse protéomique devra aussi bien entendu être répétée.

La présence de la protéine U<sub>L</sub>37 réitère la possibilité que celle-ci soit acquise en partie au noyau (436). Toutefois, sa partenaire U<sub>L</sub>36 n'a pu être détectée (437). L'association de ces deux protéines aux capsides nucléaires ne fait toutefois pas encore l'unanimité, d'autres résultats devront donc être apportés pour clarifier la controverse entourant ces deux protéines (219, 436, 438-441).

Les quatre protéines U<sub>L</sub>46 (VP11/12), U<sub>L</sub>47 (VP13/14), U<sub>L</sub>48 (VP16) et U<sub>L</sub>49 (VP22), précédemment identifiées sur les virus extracellulaires (voir article 1), ont aussi été détectées sur les capsides nucléaires. Ce large complexe de protéines co-interagissant via U<sub>L</sub>48 (VP16) semble donc être acquis, au moins en partie, au noyau (220, 442, 443). De plus, ces résultats appuient d'autres études qui démontrent la présence d'U<sub>L</sub>48 (VP16) et d'U<sub>L</sub>49 (VP22) sur les virions périnucléaires et donc la nécessité que ces protéines soient acquises au noyau (359, 444).

Les protéines U<sub>L</sub>23 et U<sub>L</sub>50, adressées dans l'article 2, ont été identifiées par protéomique dans l'échantillon de capsides nucléaires. En ce qui concerne U<sub>L</sub>23, même si l'article 2 démontre que cette protéine n'est pas fortement liée à la capsid, il n'empêche que son acquisition peut avoir lieu précocement au cours de l'infection. Pour la protéine U<sub>L</sub>50, malgré qu'une étude approfondie n'ait pu être réalisée dans l'article 2 étant donné l'absence d'anticorps dirigé contre cette protéine, la présence d'U<sub>L</sub>50 sur les capsides

nucléaires constituerait une preuve de son incorporation précoce au cours du cycle viral.

Les protéines U<sub>L</sub>21, U<sub>L</sub>41 (vhs), U<sub>L</sub>51 et U<sub>S</sub>2 ont aussi été détectées sur les capsides nucléaires. Leur présence sur ces capsides n'a toutefois jamais été rapportée auparavant. Ceci met donc en évidence l'éventuelle acquisition de ces protéines au noyau.

Les protéines U<sub>L</sub>12, U<sub>L</sub>39 (ICP6), U<sub>L</sub>42 et U<sub>S</sub>1 (ICP22), probablement incorporées dans le tégument, ont aussi été révélées lors de notre analyse protéomique. Leur présence semble néanmoins temporaire puisqu'aucune de ces protéines n'a été détectée dans les virus extracellulaires. La présence de ces protéines peut aussi refléter leur rôle dans la morphogénèse du virus au noyau. Même si la plupart de ces protéines sont associées à la machinerie de réplication virale, elles pourraient aussi être impliquées dans une étape précoce de la migration du virus, soit lors du transport et du ciblage des capsides au site de bourgeonnement avec la MNI ou lors de la sortie des capsides du noyau via leur passage à travers les membranes nucléaires. On ne peut toutefois pas exclure le fait que ces protéines puissent aussi être tout simplement des contaminants.

Troisièmement, plusieurs peptides associés aux protéines de l'enveloppe (U<sub>L</sub>34, U<sub>L</sub>45, gD, gE et gI) ont aussi été détectés dans notre préparation de capsides nucléaires. Cette observation est surprenante dans la mesure où les capsides nucléaires sont dénuées d'enveloppe. Aucune protéine n'aurait donc dû être identifiée dans cette catégorie. Tel que mentionné précédemment et étant donné la présence de plusieurs protéines de l'enveloppe, il semblerait qu'il y ait une contamination de notre échantillon par des membranes nucléaires et/ou des membranes d'autres organelles cellulaires. En ce qui concerne les membranes nucléaires, il est en effet très probable que lors de la purification, certaines capsides interagissent déjà avec

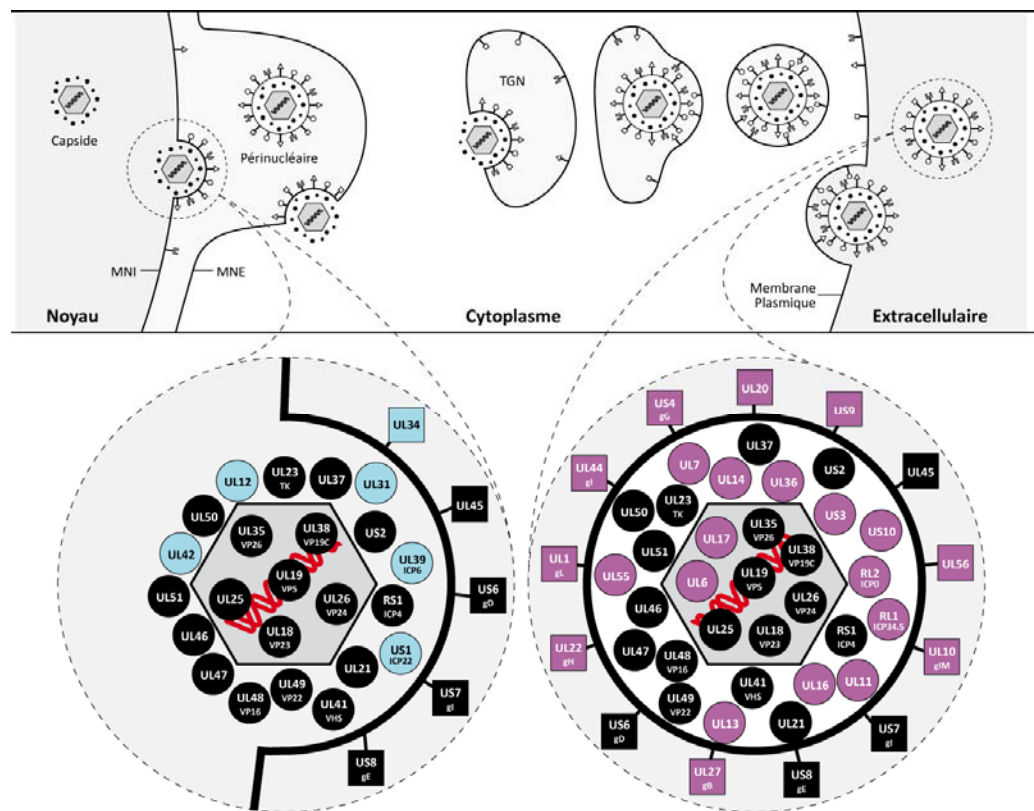
les protéines ancrées à la MNI entraînant ainsi une copurification des capsides et des protéines de la MNI. Pour minimiser cet effet et dissocier les capsides des protéines de la MNI, les particules virales obtenues après le tri par FACS pourraient être traitées avec du détergent et, si cela n'est pas suffisant, différentes concentrations de sels pourraient également être ajoutées au détergent. En ce qui concerne une potentielle contamination via les membranes des différents compartiments cellulaires (RE, Golgi, TGN, MP, etc.), une étude approfondie de la pureté de notre échantillon par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines transmembranaires de ces organelles devrait être effectuée pour déterminer la source de cette contamination et ainsi s'en débarrasser adéquatement.

### ➤ Protéines cellulaires

D'après les résultats préliminaires obtenus, on a pu constater que plusieurs protéines cellulaires extrêmement abondantes, telles que les cytokératines, peuvent camoufler d'autres protéines ayant une réelle implication dans la morphogenèse du virus. Pour favoriser la détection de ces protéines et se débarrasser des protéines potentiellement contaminantes, plusieurs modifications au protocole peuvent être apportées. Par exemple, la présence de l'albumine de sérum révèle une probable contamination par le milieu de culture utilisé. Tout comme pour les virus extracellulaires, un milieu de culture exempt de sérum devra être utilisé au cours de l'infection des cellules. Finalement, la présence de plusieurs protéines associées à des fonctions mitochondriales a clairement démontré la présence d'une contamination extranucléaire. Ainsi, l'application du même protocole à des cellules non infectées suivies de leur analyse par protéomique pourrait aussi nous permettre de comparer les échantillons et de vérifier la spécificité de la présence des différentes protéines cellulaires identifiées.



En résumé, cette section de résultats supplémentaires a dévoilé une méthode innovatrice de séparation et de purification des capsides C nucléaires par FACS. Grâce à ce protocole, ces capsides ont pu être analysées par spectrométrie de masse et ainsi, une première ébauche de la composition protéique des capsides C nucléaires a été dressée et comparée à celle des virus extracellulaires (Figure 23).



**Figure 23 : Comparaison de la composition en protéines virales des capsides C nucléaires avec celle des virions matures d'HSV-1**

*Les protéines colorées en turquoise correspondent aux protéines uniques des capsides C nucléaires, celles en mauve aux protéines uniques aux virus extracellulaires et celles en noires sont communes aux deux intermédiaires viraux. Noter aussi que les protéines de l'enveloppe détectées pour les capsides nucléaires sont associées à la MNI pour faciliter la figure, toutefois celles-ci pourraient provenir d'un autre compartiment tel que discuté précédemment.*

Cette analyse a révélé la présence de 28 protéines virales dont 6 protéines de la capsid, 17 protéines associées au tégument et 5 protéines

associées à l'enveloppe. Toutes ces données nous ont fourni de nombreuses informations quant à l'acquisition du tégument au noyau et à l'implication potentielle des protéines virales dans l'enveloppement primaire des capsides à la MNI. Même si plusieurs améliorations au protocole de purification doivent être apportées et que quelques vérifications doivent être faites pour confirmer certaines protéines, il n'en demeure pas moins que ces résultats sont encourageants et nous amène tout droit vers la publication d'une cartographie protéique complète des capsides C nucléaires.

# DISCUSSION GÉNÉRALE

## Contribution à l'avancement des connaissances

Au cours des siècles, les différentes familles de virus ont développé un large éventail de stratégies pour permettre l'infection des cellules hôtes grâce à l'utilisation de la machinerie cellulaire. L'étude du processus, plutôt complexe, du transport intracellulaire et de la maturation des particules virales, notamment celles d'HSV-1, fait l'objet d'une intense recherche depuis plusieurs décennies. Malgré les connaissances actuelles et les efforts de recherche, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la maturation des capsides et à leur translocation du noyau jusqu'à la MP demeurent encore obscurs. Ce projet de recherche, qui allie la biologie cellulaire, la virologie et la protéomique, a permis d'accumuler des données qui contribuent à l'avancement des connaissances concernant la morphogenèse et la migration d'HSV-1 du noyau jusqu'à la MP.

### ➤ Analyse protéomique des virus extracellulaires

Connaître la composition protéique globale d'HSV-1 est un important pré-requis pour une étude fonctionnelle des protéines qui le composent afin de déterminer leur rôle durant l'infection. L'essor de la protéomique permet désormais de caractériser très rapidement les protéines d'un échantillon complexe tel qu'une particule virale. Plusieurs virus de la famille des *Herpesviridae* ont d'ailleurs été caractérisés par cette méthode dont HCMV, MCMV, EBV, KSHV, RRV, MHV68, AIHV-1 et PRV (411-420). L'article 1 de cette thèse constitue toutefois la première analyse protéomique des virus matures d'HSV-1. Cette étude a contribué à l'élaboration d'un protocole permettant d'obtenir des virus extracellulaires hautement purifiés et à la réalisation d'une

cartographie de la composition protéique globale des virus extracellulaires d'HSV-1. Cette cartographie a d'ailleurs fait la page couverture de *Journal of Virology* en octobre 2008. Parmi les protéines virales identifiées, plusieurs sont communes à différents *Herpesviridae*. Ainsi, HSV-1 possède 36 protéines communes à PRV, 26 à HCMV, 18 à EBV et 11 à KSHV (415, 417, 419, 420). Ces résultats sont consistants avec le fait que les deux *Alphaherpesvirinae* (HSV-1 et PRV) partagent un degré de similarité plus élevé dans les différentes étapes de leur cycle viral contrairement à HCMV, un *Betaherpesvirinae*, ou à EBV et KSHV, deux *Gammaherpesvirinae*. En plus de cette percée dans l'identification des protéines virales qui composent HSV-1, les résultats mettent en évidence l'incorporation de protéines cellulaires dans les virus matures. L'incorporation de protéines cellulaires n'est pas spécifique à HSV-1 puisqu'elle a été observée aussi sur plusieurs autres virus enveloppés dont le VIH, le virus de la vaccine, le virus influenza et le virus de la stomatite vésiculaire (424, 445-448). Les protéines de l'hôte détectées par spectrométrie de masse peuvent être acquise de façon très spécifique et s'avérer cruciale pour certaines étapes du cycle viral mais ces protéines peuvent aussi se lier de façon non spécifique aux virus pendant la purification ou encore même pendant son transport dans la cellule. Notre analyse actuelle ne permet pas d'ailleurs de lever le voile sur la spécificité de l'incorporation. Cependant, il est, à mon avis, raisonnable de penser que toutes ces protéines ne sont pas des contaminants liés de façon non spécifique aux virus puisque plusieurs de ces protéines cellulaires ont aussi été identifiées sur d'autres *Herpesviridae* en utilisant des méthodes de purification et d'analyse différentes. Parmi ces protéines communes, on retrouve la famille des protéines 14-3-3, les annexines, la caséine kinase, l'actine, la cofiline, la cyclophiline, les facteurs d'initiation de la traduction, les chaperonnes, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'ARN hélicase ATP-dépendante (DDX3X) ainsi que de nombreuses petites GTPases telles que les Rab et les Arf. Il est toutefois aussi possible que le virus

incorpore de façon spécifique ou non des protéines telles que celles de la machinerie du transport vésiculaire durant son périple dans la cellule. La découverte de ces protéines virales et cellulaires est tout de même d'un grand intérêt puisque cela fournit de nombreuses pistes sur les facteurs viraux et cellulaires qui pourraient potentiellement être impliqués dans le processus de migration d'HSV-1 à travers la cellule.

### ► Analyse biochimique des nouvelles composantes virales d'HSV-1

L'article 2 est une suite logique du premier article car il permet d'analyser biochimiquement la localisation et la liaison des nouvelles composantes virales, identifiées lors de l'analyse protéomique, aux différentes structures du virus. Parmi les composantes analysées, on retrouve ICP0, ICP4, U<sub>L</sub>7 et U<sub>L</sub>23. Les données recueillies démontrent que ces protéines ont des caractéristiques biochimiques différentes. D'une part, U<sub>L</sub>7 et U<sub>L</sub>23 sont des composantes du tégument extractibles par les sels. De plus, les cystéines libres jouent un rôle dans la relâche de ces protéines tégumentaires. D'autre part, ICP0 et ICP4 sont, quant à elles, des composantes du tégument qui demeurent fortement associées à la capsidie même en présence de sels. De plus, cette interaction n'implique pas les cystéines libres. Même si ces protéines ont été définies comme étant des composantes mineures des virus (449-453), leur faible quantité (nombre de copies par virus) n'est pas nécessairement contradictoire avec une forte association (résistance aux sels) et ne reflète pas non plus une variabilité inhérente à l'approche puisque les résultats sont reproductibles qualitativement et quantitativement. L'analyse approfondie de cette étroite association avec la capsidie a ainsi révélé pour la première fois la présence de ces protéines sur les capsides intranucléaires suggérant un recrutement partiel d'ICP0 et d'ICP4 à un stade précoce de la migration

d'HSV-1. Toutes ces données fournissent une analyse plus détaillée des composantes virales d'HSV-1 tout en révélant les interactions présentes entre les différentes composantes du virus, soit la capsid, le tégument et l'enveloppe ainsi que l'implication des cystéines libres dans la dynamique du tégument. L'étude de ces interactions et de la dynamique du tégument est primordiale pour une meilleure compréhension du cycle viral d'HSV-1 puisque le tégument passe par plusieurs étapes de dissociation/association depuis son entrée dans la cellule jusqu'à sa sortie. Les résultats exposés dans cet article apportent aussi de nouvelles preuves pour clarifier la controverse qui entourent les protéines ICP0 et ICP4 en confirmant leur présence dans les particules virales extracellulaires et en démontrant leur acquisition, au moins en partie, au noyau.

### ➤ Analyse protéomique préliminaire des capsides C nucléaires

La mise en évidence de protéines du tégument acquises au noyau telles qu'ICP0 et ICP4 a clairement influencé la suite de nos recherches. Ainsi, dans le but d'éclaircir le processus de tégumentation, c'est-à-dire d'identifier les premiers téguments ajoutés sur les capsides nouvellement formées dans le noyau, une analyse protéomique préliminaire des capsides C nucléaires a été effectuée. Les résultats supplémentaires de cette thèse décrivent l'élaboration d'une méthode avant-gardiste d'isolation et de purification des capsides C nucléaires basée sur l'utilisation du tri par cytométrie en flux et sur l'analyse préliminaire de ces capsides par spectrométrie de masse. Cette étude démontre l'ajout sur les capsides nucléaires de nombreuses protéines virales tégumentaires dont plusieurs sont incorporées dans les virus matures. Ces observations contribuent à clarifier le processus d'acquisition du tégument et fournissent de l'information quant aux protéines virales et/ou cellulaires qui

pourraient jouer un rôle clef dans le processus d'enveloppement primaire à la MNI ainsi que dans la voie alternative de transport intracellulaire empruntée par HSV-1 via les membranes nucléaires.

## **Perspectives de recherche**

### **➤ Protéomes des différents intermédiaires viraux d'HSV-1**

L'analyse protéomique des virus extracellulaires et des capsides C nucléaires maintenant effectuée, il serait fort intéressant de déterminer la composition protéique des différents intermédiaires du virus (capsides cytoplasmiques lors de l'entrée, capsides associées aux pores nucléaires, capsides intranucléaires A et B, virus périnucléaires, capsides cytoplasmiques relâchées par le noyau, virus associés au TGN, virus enveloppés post-TGN) et de les comparer les unes aux autres afin d'obtenir le protéome complet du virus tout au long de sa migration et de sa maturation.

### **➤ Étude des interactions et de la dynamique du tégument**

La caractérisation des liaisons entre les différentes structures du virion est essentielle pour mieux comprendre le processus d'acquisition du tégument. Diverses études protéomiques et biochimiques par Western blot pourraient être effectuées afin d'analyser le contenu protéique de différents intermédiaires viraux en présence de concentrations croissantes de sels, de tampons à différents pH et/ou de composés chimiques tels que le NEM et/ou le DTT pour étudier plus en détails les interactions capside-tégument, tégument-tégument et tégument-enveloppe. Via l'étude des différents intermédiaires viraux, on pourrait aussi mieux définir l'association du

tégument, en déterminant si les protéines ajoutées sur les capsides nucléaires le sont de façon transitoire ou si elles demeureront présentes tout au long du cycle viral. Dans le même ordre d'idée, il serait bon de savoir s'il existe plusieurs lieux d'addition d'une même protéine car cela pourrait suggérer qu'une protéine joue un (ou plusieurs) rôle(s) selon le compartiment cellulaire où elle se trouve. Le but ultime serait d'établir l'interactome qui relie toutes ces protéines virales.

### ➤ Rôle du tégument dans la sortie nucléaire d'HSV-1

L'analyse protéomique préliminaire des capsides C nucléaires a permis d'identifier plusieurs protéines formant le tégument primaire de ces nucléocapsides matures. Toutefois, l'implication de ces protéines ainsi que leur rôle respectif n'a pas encore été élucidé. Plusieurs interrogations sont encore à résoudre afin de relier, s'il y a lieu, ces protéines identifiées sur les capsides C et leur implication active dans les mécanismes utilisés par HSV-1 pour sortir du noyau. Différents mutants de délétion des protéines U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34 et U<sub>S</sub>3 ont d'ailleurs été très étudiés pour observer l'effet de ces protéines sur le processus de transport du virus à travers les membranes nucléaires (332, 353, 368-370, 454, 455). En effet, tandis que les mutants de délétion d'U<sub>L</sub>31 et d'U<sub>L</sub>34 entraînent une accumulation nucléaire des capsides et une diminution de la production de virus, l'absence d'U<sub>S</sub>3 mène plutôt à défaut dans l'étape de fusion avec la MNE et à l'accumulation de virus périnucléaires. De récentes observations sur PRV ont aussi mis en évidence, grâce à la sélection de virus infectieux ne contenant pas U<sub>L</sub>34, que les protéines du tégument peuvent jouer des rôles encore méconnus (456). En effet, ces virus sélectionnés ont alors la capacité de contourner les étapes d'enveloppement et de dé-enveloppement au noyau en dégradant les membranes nucléaires. Toutefois, cela se fait au détriment d'un nouveau rôle attribué au tégument,



soit la discrimination entre les capsides nucléaires matures et immatures ainsi que leur sélection en vue de leur translocation dans le cytoplasme pour effectuer leur future maturation. Ces observations sur les nouveaux rôles possibles des protéines du tégument dans la sortie nucléaire démontrent l'importance de connaître les protéines virales et cellulaires qui composent le tégument primaire afin comprendre la capacité d'HSV-1 à modifier le noyau de la cellule hôte à son avantage.

### ► Effet de l'infection sur le protéome cellulaire

Un autre aspect important à étudier est l'analyse des changements induits par le virus sur le protéome cellulaire. En effet, en réponse à l'infection, la cellule hôte initie une panoplie de mécanismes de défense pour empêcher l'expression des gènes viraux et inhiber la réplication du virus. De son côté, HSV-1 induit la dégradation de protéines cellulaires spécifiques dont plusieurs sont impliquées dans la réponse antivirale pour ainsi faire pencher la balance en faveur de sa réplication. L'analyse du protéome cellulaire suite à une infection nous fournirait des informations précieuses quant à la réponse de la cellule hôte face au virus, à l'impact du virus sur la machinerie cellulaire et au contenu protéique du cytoplasme (enrichissement ou diminution de certaines protéines). Ceci constituerait alors une source d'informations non négligeable concernant les protéines cellulaires potentiellement pertinentes à l'infection par HSV-1. Les modifications du protéome cellulaire induites par le virus pourraient aussi être analysées à différentes heures après l'infection.

### ► Rôles des protéines cellulaires incorporées dans les virus

Les précédentes perspectives de recherche offrent une description de la composition protéique des virus, des interactions entre les protéines virales

et des effets de l'infection sur le protéome cellulaire. Aucun de ces futurs travaux ne s'attarde toutefois à démontrer l'importance de l'incorporation des protéines cellulaires dans les virus. En tant que parasite intracellulaire obligatoire, il est normal que les virus exploitent plusieurs fonctions de la machinerie de leur hôte pour mener à bien leur cycle viral et leur propagation et par le fait même, que certains incorporent des protéines cellulaires pour faciliter leur réplication (406, 408, 409). Toutefois, les protéines incorporées par les virus sont souvent seulement inventoriées et la raison de leur présence dans les virions n'est que rarement analysée de façon plus approfondie. Or, ces connaissances sont d'un grand intérêt puisqu'elles nous aideraient à déterminer la contribution des protéines cellulaires incorporées dans les virus au cours de leur cycle de réplication virale et à étudier les interactions hôte-pathogène. Même si plusieurs des protéines identifiées dans HSV-1 ne semblent pas être incorporées de façon aléatoire puisqu'elles sont observées aussi chez d'autres *Herpesviridae* (411-420) et même dans d'autres familles de virus (406, 409, 445-448), il n'en demeure pas moins que toutes ces protéines ne sont probablement pas impliquées de façon directe dans le processus de maturation du virus. Certaines pourraient, en effet, se lier de façon plus ou moins spécifique aux virions. D'ailleurs, il a déjà été démontré que l'absence de VP22 dans PRV est compensée par une augmentation de la quantité d'actine incorporée (457). La présence de protéines cellulaires, même si elles n'ont pas un rôle direct dans la maturation d'HSV-1, pourraient aussi être un excellent indicateur du parcours suivi par HSV-1 au sein de la cellule. À ce sujet, on pense entre autres aux protéines impliquées dans le transport vésiculaire, soit les petites GTPases (Rab et Arf). Étant donné leur importance, les protéines cellulaires incorporées dans HSV-1 font d'ailleurs actuellement l'objet d'un nouveau projet dans notre laboratoire. En utilisant de petits ARNs d'interférence (pARNi) qui empêchent l'expression des protéines cellulaires, il est alors possible d'évaluer l'impact de cette inhibition sur la relâche virale et

d'identifier les protéines qui influencent significativement la production virale. Toutefois, puisqu'il est possible, avec une telle méthode, qu'un effet sur la maturation du virus soit causé par la perte de fonction normale de la protéine de l'hôte ciblée et non pas par la perte de la protéine incorporée dans le virus mature, un essai a aussi été mis au point pour distinguer ces deux possibilités. Ainsi, grâce à la production de virus dépourvus de la protéine d'intérêt à partir de cellules traitées au pARNi, il est désormais possible d'utiliser ces virus pour infecter de nouveau des cellules traitées ou non au pARNi et ainsi déterminer si c'est la fraction incorporée dans le virus ou la fraction cellulaire d'une protéine qui a un impact majeur sur la réplication du virus.



## CONCLUSIONS

Au cours de cette thèse, on a, d'une part, pris conscience de l'importance des maladies causées par HSV-1 mais aussi de l'absence de traitement curatif contre ce virus. D'autre part, on a découvert que les propriétés biologiques et la complexité de ce virus sont des caractéristiques qui rendent son étude fascinante. Ainsi, notre désir de mieux comprendre ce virus pour lutter contre les maladies qui lui sont associées nous a incontestablement amenés à étudier le cycle de réplication d'HSV-1.

À la lueur des résultats découlant des travaux de recherche exposés dans cette thèse intitulée caractérisation de la migration d'HSV-1 par protéomique, on peut clairement affirmer que notre objectif principal, soit la caractérisation du processus complexe de maturation d'HSV-1 grâce à une approche multidisciplinaire alliant la biologie cellulaire, la virologie et la protéomique a été atteint. Premièrement, par une approche protéomique, le contenu protéique de deux intermédiaires viraux, soit les virus extracellulaires et les capsides C nucléaires, a pu être déterminé et comparé. Deuxièmement, une analyse biochimique a permis d'analyser les interactions et la dynamique sous-jacentes au tégument. Troisièmement, la mise en évidence de l'acquisition de protéines du tégument au noyau sur les capsides nucléaires clarifie le processus complexe de tégumentation.

Toutes ces découvertes ont aussi ouvert de nouvelles voies à explorer. En effet, l'analyse protéomique d'autres intermédiaires viraux nous permettrait de dresser le protéome complet du virus durant sa migration. La caractérisation des interactions et de la dynamique du tégument nous aiderait, quant à elle, à élucider le processus de tégumentation ainsi que le rôle du tégument dans la sortie nucléaire afin de clarifier les mécanismes relatifs au passage des capsides à travers les deux membranes nucléaires. L'étude de

l'effet de l'infection sur le protéome cellulaire favoriserait aussi notre compréhension de la réponse de l'hôte face au virus et contribuerait à déterminer le rôle des protéines cellulaires incorporées dans les virions ainsi que leur contribution durant le cycle viral.

Finalement, les résultats présentés dans cette thèse jumelés à une constante progression de nos connaissances fondamentales en recherche et à l'essor des technologies telles que la cytométrie en flux et la spectrométrie de masse ont permis de recueillir des informations pertinentes et indispensables à une meilleure compréhension du cycle viral d'HSV-1. Malgré ces efforts, toutes les pièces du puzzle ne sont pas encore assemblées. Il va sans dire que la recherche sur HSV-1 doit se poursuivre afin de permettre la découverte de nouveaux médicaments antiviraux capable d'éliminer définitivement le virus (458-461), le développement d'un vaccin antiherpétique sécuritaire et efficace (109, 462, 463) de même que la conception de vecteurs viraux oncolytiques pour le traitement de différents cancers (31, 464-468).

## Bibliographie

1. **Ebers G.** *Ebers papyrus, the greatest Egyptian medical document.* 1937.
2. **Roizman B, Whitley RJ.** *The nine ages of herpes simplex virus.* Herpes. 2001 Mar;8(1):23-7.
3. **Wildy P.** *Herpes: history and classification.* In: Kaplan AS, ed. *The herpes-viruses* New York: Academic Press; 1973.
4. **Garzetti A.** *From Tiberius to the Antonines. A history of the roman empire AD 14-192.* LTD MaC, editor. London: Taylor & Francis; 1974.
5. **Shakespeare W.** *Romeo and Juliet.* Act I, Scene IV. 1597-1599.
6. **Astruc J.** *De morbis venereis libri sex.* 1738.
7. **Willan R.** *On cutaneous diseases.* Published by Kimber and Conrad; 1809.
8. **Gruter W.** *Das herpesvirus, seine atilogische und klinische bedeutung.* Munch Med Wschr. 1924;71:1058.
9. **Doerr R.** In: *Handbuck der Virusforschung (Doerr R, Hallauer C, eds).* Vienna: Springer. 1938.
10. **Burnet FM, Williams SW.** *Herpes simplex: new point of view.* Med J Aust. 1939 Aust;1:637-40.
11. **Rowe WP, Hartley JW, Waterman Sea.** *Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids.* Proc Soc Exp Biol Med. 1956;92:418-24.
12. **Smith MG.** *Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease.* Proc Soc Exp Biol Med. 1956;92:424-30.
13. **Smith MG, Lennette EH, Reames HR.** *Isolation of the virus of herpes simplex and the demonstration of intranuclear inclusions in a case of acute encephalitis.* Am J Pathol. 1941;17:55-68.
14. **Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P.** *Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease.* Proc Soc Exp Biol Med. 1957;94:4-12.
15. **Weller TH, Stoddard MB.** *Intranuclear inclusion bodies in cultures of human tissue inoculated with varicella vesicle fluid.* J Immunol. 1952;68:311-9.
16. **Schneweis KE, Nahmias AJ.** *Antigens of herpes simplex virus types 1 and 2 – immunodiffusion and inhibition passive hemagglutination studies.* Z Immunitaetsforsch Exp Klin Immunol. 1971;141:471-87.
17. **Furlong D, Swift H, Roizman B.** *Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core.* J Virol. 1972 Nov;10(5):1071-4.
18. **Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, et al.** *Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy.* The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology. 1981;16(4):201-17.
19. **Wildy P, Watson DH.** *Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1963;27:25-47.
20. **Hayward GS, Jacob RJ, Wadsworth SC, Roizman B.** *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):4243-7.
21. **Kieff E, Liebowitz D.** *Epstein-Barr virus and its replication.* In: *Field's Virology, 2nd edn, volume 2 (Fields BN, Knipe DM, Chanock R et al., eds).* New York: Raven Press; 1990.

22. **Mocarski ES, Roizman B.** *Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA.* Cell. 1982;31(1):89-97.
23. **Sheldrick P, Berthelot N.** *Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1975;39 Pt 2:667-78.
24. **Gibson W, Roizman B.** *Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2.* J Virol. 1972;10(5):1044-52.
25. **Spear PG, Roizman B.** *Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion.* J Virol. 1972;9(1):143-59.
26. **Honess RW, Roizman B.** *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):1347-65.
27. **Honess RW, Roizman B.** *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins.* J Virol. 1974 Jul;14(1):8-19.
28. **Fields BN, Knipe DM, Howley PM.** *Fields' virology.* 5th. Philadelphia: Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
29. **Friedman GK, Pressey JG, Reddy AT, Markert JM, Gillespie GY.** *Herpes Simplex Virus Oncolytic Therapy for Pediatric Malignancies.* Mol Ther. 2009;17(7):1125-35.
30. **Markert JM, Liechty PG, Wang W, Gaston S, Braz E, Karrasch M, et al.** *Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre-and Post-tumor Resection for Recurrent GBM.* Mol Ther. 2008;17(1):199-207.
31. **Todo T.** *Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses.* Front Biosci. 2008;13:2060-4.
32. **Watanabe D.** *Medical application of herpes simplex virus.* J Dermatol Sci. 2010 Feb;57(2):75-82.
33. **Huraux JM.** *Traité de virologie médicale.* Estem; 2003.
34. **Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al.** *The order Herpesvirales.* Arch Virol. 2009;154(1):171-7.
35. **Pellett PE, Roizman B.** *Fields Virology.* 5th Edition. 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106 USA <http://www.LWW.com>; Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
36. **Fatahzadeh M, Schwartz RA.** *Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management.* J Am Acad Dermatol. 2007 Nov;57(5):737-63; quiz 64-6.
37. **Swearingen JA, Ailor SK.** *Herpes simplex virus: it's more than a cold sore.* Mo Med. 2007 Mar-Apr;104(2):144-8.
38. **Arvin AM, Campadelli-Fiume G.** *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis.* Cambridge University Press; 2007.
39. **Whitley RJ, Roizman B.** *Herpes simplex virus infections.* Lancet. 2001 May 12;357(9267):1513-8.
40. **Labetoulle M, Kucera P, Ugolini G, Lafay F, Frau E, Offret H, et al.** *Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Aug;41(9):2600-6.
41. **Liesegang TJ.** *Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance.* Cornea. 2001 Jan;20(1):1-13.
42. **Birmanns B, Reibstein I, Steiner I.** *Characterization of an in vivo reactivation model of herpes simplex virus from mice trigeminal ganglia.* J Gen Virol. 1993 Nov;74 ( Pt 11):2487-91.
43. **Shulman JD.** *Recurrent herpes labialis in US children and youth.* Community Dent Oral Epidemiol. 2004 Dec;32(6):402-9.



44. **Whitley RJ, Soong SJ, Linneman C, Jr., Liu C, Pazin G, Alford CA.** *Herpes simplex encephalitis. Clinical Assessment.* JAMA. 1982 Jan 15;247(3):317-20.
45. **Baringer JR.** *Herpes simplex infections of the nervous system.* Neurol Clin. 2008 Aug;26(3):657-74, viii.
46. **Whitley RJ.** *Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults.* Antiviral Res. 2006 Sep;71(2-3):141-8.
47. **Simmons A.** *Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection.* J Infect Dis. 2002 Oct 15;186 Suppl 1:S71-7.
48. **Murakami S, Mizobuchi M, Nakashiro Y, Doi T, Hato N, Yanagihara N.** *Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle.* Ann Intern Med. 1996 Jan 1;124(1 Pt 1):27-30.
49. **Furuta Y, Fukuda S, Chida E, Takasu T, Ohtani F, Inuyama Y, et al.** *Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy.* J Med Virol. 1998 Mar;54(3):162-6.
50. Société Alzheimer Canada - <http://www.alzheimer.ca/>. 2011.
51. **Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA.** *Tau proteins and neurofibrillary degeneration.* Brain Pathol. 1991 Jul;1(4):279-86.
52. **Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al.** *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies.* Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 3;1739(2-3):198-210.
53. **Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF.** *Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques.* J Pathol. 2009 Jan;217(1):131-8.
54. **Hilla JM, Zhaob Y, Clementa C, Neumann DM, Lukiwa WJ.** *HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling.* NeuroReport. 2009;20(16):1500-5.
55. **Kriesel JD, Ricigliano J, Spruance SL, Garza HH, Jr., Hill JM.** *Neuronal reactivation of herpes simplex virus may involve interleukin-6.* J Neurovirol. 1997 Dec;3(6):441-8.
56. **Maccioni RB, Rojo LE, Fernandez JA, Kuljis RO.** *The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease.* Ann N Y Acad Sci. 2009 Feb;1153:240-6.
57. **Benetti L, Roizman B.** *Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9411-6.
58. **Cheng SB, Ferland P, Webster P, Bearer EL.** *Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell.* PLoS ONE. 2011;6(3):e17966.
59. **Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM.** *Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide.* Biochemistry. 2000 May 23;39(20):5988-94.
60. **Wozniak MA, Frost AL, Itzhaki RF.** *Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1.* J Alzheimers Dis. 2009;16(2):341-50.
61. **Evans AS, Kaslow RA.** *Viral infections of humans: epidemiology and control, 4th edition.* Plenum Medical Book Co.; 1997.
62. **Jacobs RF.** *Neonatal herpes simplex virus infections.* Semin Perinatol. 1998 Feb;22(1):64-71.
63. **Mammette A.** *Virologie médicale.* Presses universitaires de Lyon; 2002.
64. **Severson JL, Tying SK.** *Relation between herpes simplex viruses and human immunodeficiency virus infections.* Arch Dermatol. 1999 Nov;135(11):1393-7.

65. **Wasserheit JN.** *Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases.* Sex Transm Dis. 1992 Mar-Apr;19(2):61-77.
66. **Barnabas RV, Wasserheit JN, Huang Y, Janes H, Morrow R, Fuchs J, et al.** *Impact of Herpes Simplex Virus Type 2 on HIV-1 acquisition and progression in an HIV vaccine trial (the Step Study).* J Acquir Immune Defic Syndr. 2011 Apr 5.
67. **Celum C, Levine R, Weaver M, Wald A.** *Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble.* Bull World Health Organ. 2004 Jun;82(6):447-53.
68. **Corey L, Wald A, Celum CL, Quinn TC.** *The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2004 Apr 15;35(5):435-45.
69. **Sacks SL, Griffiths PD, Corey L, Cohen C, Cunningham A, Dusheiko GM, et al.** *Introduction: Is viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes?* Antiviral Res. 2004 Aug;63 Suppl 1:S3-10.
70. **Wald A, Corey L.** *How Does Herpes Simplex Virus Type 2 Influence Human Immunodeficiency Virus Infection and Pathogenesis?* Journal of Infectious Diseases. 2003 May 15, 2003;187(10):1509-12.
71. **Holmes KK.** *Sexually transmitted diseases.* McGraw-Hill Medical; 2008.
72. **Mertz KJ, Trees D, Levine WC, Lewis JS, Litchfield B, Pettus KS, et al.** *Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group.* J Infect Dis. 1998 Dec;178(6):1795-8.
73. **Horbul JE, Schmechel SC, Miller BR, Rice SA, Southern PJ.** *Herpes simplex virus-induced epithelial damage and susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in human cervical organ culture.* PLoS ONE. 2011;6(7):e22638.
74. **Schacker T.** *The role of HSV in the transmission and progression of HIV.* Herpes. 2001 Jul;8(2):46-9.
75. **Schacker T, Ryncarz AJ, Goddard J, Diem K, Shaughnessy M, Corey L.** *Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men.* JAMA. 1998 Jul 1;280(1):61-6.
76. **Ghosh S, Selby MJ, Peterlin BM.** *Synergism between Tat and VP16 in trans-activation of HIV-1 LTR.* J Mol Biol. 1993 Dec 5;234(3):610-9.
77. **Celum CL.** *The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus.* Herpes. 2004 Apr;11 Suppl 1:36A-45A.
78. **Diaz J-J, Due Dodon M, Schaerer-Uthurralt N, Simonin D, Kindbeiter K, Gazzolo L, et al.** *Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein.* Nature. [10.1038/379273a0]. 1996;379(6562):273-7.
79. **Golden MP, Kim S, Hammer SM, Ladd EA, Schaffer PA, DeLuca N, et al.** *Activation of Human Immunodeficiency Virus by Herpes Simplex Virus.* Journal of Infectious Diseases. 1992 September 1, 1992;166(3):494-9.
80. **Margolis DM, Ostrove JM, Straus SE.** *HSV-1 activation of HIV-1 transcription is augmented by a cellular protein that binds near the initiator element.* Virology. 1993 Jan;192(1):370-4.
81. **Margolis DM, Rabson AB, Straus SE, Ostrove JM.** *Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes.* Virology. 1992;186(2):788-91.
82. **Palu G, Benetti L, Calistri A.** *Molecular basis of the interactions between herpes simplex viruses and HIV-1.* Herpes. 2001 Jul;8(2):50-5.
83. **Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Cheymol G, Walker MJ, Hoffman BB.** *Pharmacologie intégrée.* Mosby International, 1997; 1999.

84. **Duan J, Liuzzi M, Paris W, Lambert M, Lawetz C, Moss N, et al.** *Antiviral activity of a selective ribonucleotide reductase inhibitor against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in vivo.* *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jul;42(7):1629-35.
85. **Kleymann G, Fischer R, Betz UA, Hendrix M, Bender W, Schneider U, et al.** *New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease.* *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):392-8.
86. **Spector FC, Liang L, Giordano H, Sivaraja M, Peterson MG.** *Inhibition of herpes simplex virus replication by a 2-amino thiazole via interactions with the helicase component of the UL5-UL8-UL52 complex.* *J Virol.* 1998 Sep;72(9):6979-87.
87. **Crute JJ, Grygon CA, Hargrave KD, Simoneau B, Faucher AM, Bolger G, et al.** *Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease.* *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):386-91.
88. **Villarreal EC.** *Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections.* *Prog Drug Res.* 2001;Spec No:185-228.
89. **Focher F, Verri A, Spadari S, Manservigi R, Gambino J, Wright GE.** *Herpes simplex virus type 1 uracil-DNA glycosylase: isolation and selective inhibition by novel uracil derivatives.* *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 ( Pt 3):883-9.
90. **Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, et al.** *The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process.* *Antiviral Res.* 1998;40(1-2):85-94.
91. **Sandri-Goldin RM.** *Alpha herpesviruses: molecular and cellular biology.* Caister Academic Press; 2006.
92. **Lachmann R.** *Herpes simplex virus latency.* *Expert Rev Mol Med.* 2003 Dec;5(29):1-14.
93. **Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ.** *Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence.* *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):541-62.
94. **Efstathiou S, Preston CM.** *Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency.* *Virus Res.* 2005 Aug;111(2):108-19.
95. **Knipe DM, Cliffe A.** *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection.* *Nat Rev Microbiol.* 2008 Mar;6(3):211-21.
96. **Clavé D, Archambaud M, Grosjean J, Pasquier C.** *Bactériologie et virologie pratique.* De Boeck Université; 2009.
97. **Lycke E, Hamark B, Johansson M, Krotochwil A, Lycke J, Svennerholm B.** *Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study.* *Arch Virol.* 1988;101(1-2):87-104.
98. **Mellerick DM, Fraser NW.** *Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state.* *Virology.* 1987 Jun;158(2):265-75.
99. **Fraser JW.** *Molecular biology of latent HSV-1.* In C. Lopez and Roizman B (ed.), *Human herpesvirus infections: Pathogenesis, diagnosis, and treatment.*: Raven Press, New York; 1986.
100. **Rock DL, Fraser NW.** *Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice.* *Nature.* 1983 Apr 7;302(5908):523-5.
101. **Preston CM.** *Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency.* *J Gen Virol.* 2000 Jan;81(Pt 1):1-19.
102. **Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM, Knipe DM.** *Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1;102(44):16055-9.

103. **Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM, Efstathiou S.** *Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro.* J Virol. 2001 Apr;75(8):3885-95.
104. **Wagner EK, Devi-Rao G, Feldman LT, Dobson AT, Zhang YF, Flanagan WM, et al.** *Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons.* J Virol. 1988 Apr;62(4):1194-202.
105. **Farrell MJ, Dobson AT, Feldman LT.** *Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 1;88(3):790-4.
106. **Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL.** *Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression.* Biochim Biophys Acta. 2010 Mar-Apr;1799(3-4):246-56.
107. **Kramer MF, Jurak I, Pesola JM, Boissel S, Knipe DM, Coen DM.** *Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia.* Virology. 2011 Sep 1;417(2):239-47.
108. **Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT.** *RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons.* Science. 1987 Feb 27;235(4792):1056-9.
109. **Weller SK, D. SKWP.** *Alphaherpesviruses: Molecular Virology.* Caister Academic Press; 2011.
110. **Wagner EK, Flanagan WM, Devi-Rao G, Zhang YF, Hill JM, Anderson KP, et al.** *The herpes simplex virus latency-associated transcript is spliced during the latent phase of infection.* J Virol. 1988 Dec;62(12):4577-85.
111. **Henderson G, Jaber T, Carpenter D, Wechsler SL, Jones C.** *Identification of herpes simplex virus type 1 proteins encoded within the first 1.5 kb of the latency-associated transcript.* J Neurovirol. 2009 Sep;15(5-6):439-48.
112. **Mador N, Panet A, Latchman D, Steiner I.** *Expression and splicing of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 in neuronal and non-neuronal cell lines.* J Biochem. 1995 Jun;117(6):1288-97.
113. **Perng GC, Jones C.** *Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle.* Interdiscip Perspect Infect Dis. 2010;2010:262415.
114. **Jaber T, Henderson G, Li S, Perng GC, Carpenter D, Wechsler SL, et al.** *Identification of a novel herpes simplex virus type 1 transcript and protein (AL3) expressed during latency.* J Gen Virol. 2009 Oct;90(Pt 10):2342-52.
115. **Shen W, Sa e Silva M, Jaber T, Vitvitskaia O, Li S, Henderson G, et al.** *Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis.* J Virol. 2009 Sep;83(18):9131-9.
116. **Cui C, Griffiths A, Li G, Silva LM, Kramer MF, Gaasterland T, et al.** *Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs.* J Virol. 2006 Jun;80(11):5499-508.
117. **Jurak I, Griffiths A, Coen DM.** *Mammalian alphaherpesvirus miRNAs.* Biochim Biophys Acta. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):641-53.
118. **Martínez MA.** *RNA interference and viruses: current innovations and future trends.* Caister Academic Press; 2010.
119. **Skalsky RL, Cullen BR.** *Viruses, microRNAs, and host interactions.* Annu Rev Microbiol. 2010;64:123-41.
120. **Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR.** *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs.* Nature. 2008 Aug 7;454(7205):780-3.

121. **Umbach JL, Nagel MA, Cohrs RJ, Gilden DH, Cullen BR.** *Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia.* J Virol. 2009 Oct;83(20):10677-83.
122. **Rij RPV.** *Antiviral Rnai: Concepts, Methods, and Applications.* Humana Press; 2011.
123. **Boss IW, Renne R.** *Viral miRNAs: tools for immune evasion.* Curr Opin Microbiol. 2010 Aug;13(4):540-5.
124. **Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.** *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet. 2008 Feb;9(2):102-14.
125. **Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ.** *Micromanagement of the immune system by microRNAs.* Nat Rev Immunol. 2008 Feb;8(2):120-30.
126. **Cullen BR.** *RNAi the natural way.* Nature genetics. 2005;37(11):1163-6.
127. **Krause PR, Croen KD, Straus SE, Ostrove JM.** *Detection and preliminary characterization of herpes simplex virus type 1 transcripts in latently infected human trigeminal ganglia.* J Virol. 1988 Dec;62(12):4819-23.
128. **Chen SH, Kramer MF, Schaffer PA, Coen DM.** *A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus.* J Virol. 1997 Aug;71(8):5878-84.
129. **Mador N, Goldenberg D, Cohen O, Panet A, Steiner I.** *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line.* J Virol. 1998 Jun;72(6):5067-75.
130. **Tang S, Bertke AS, Patel A, Wang K, Cohen JI, Krause PR.** *An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 5;105(31):10931-6.
131. **Tang S, Patel A, Krause PR.** *Novel less-abundant viral microRNAs encoded by herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating ICP34.5 and ICPO mRNAs.* J Virol. 2009 Feb;83(3):1433-42.
132. **Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, et al.** *Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript.* Science. 2000 Feb 25;287(5457):1500-3.
133. **Thompson RL, Sawtell NM.** *HSV latency-associated transcript and neuronal apoptosis.* Science. 2000 Sep 8;289(5485):1651.
134. **Thompson RL, Sawtell NM.** *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival.* J Virol. 2001 Jul;75(14):6660-75.
135. **Peng W, Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C.** *The gene that encodes the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript influences the accumulation of transcripts (Bcl-x(L) and Bcl-x(S)) that encode apoptotic regulatory proteins.* J Virol. 2003 Oct;77(19):10714-8.
136. **Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Bacq-Calberg CM, Dusart J.** *Microbiologie.* De Boeck; 2003.
137. **Laycock KA, Lee SF, Brady RH, Pepose JS.** *Characterization of a murine model of recurrent herpes simplex viral keratitis induced by ultraviolet B radiation.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991 Sep;32(10):2741-6.
138. **Sawtell NM, Thompson RL.** *Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia.* J Virol. 1992 Apr;66(4):2150-6.
139. **Segal AL, Katcher AH, Brightman VJ, Miller MF.** *Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle.* J Dent Res. 1974 Jul-Aug;53(4):797-803.

140. **Cai W, Schaffer PA.** *A cellular function can enhance gene expression and plating efficiency of a mutant defective in the gene for ICPO, a transactivating protein of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 1991 Aug;65(8):4078-90.
141. **Loiacono CM, Taus NS, Mitchell WJ.** *The herpes simplex virus type 1 ICPO promoter is activated by viral reactivation stimuli in trigeminal ganglia neurons of transgenic mice.* J Neurovirol. 2003 Jun;9(3):336-45.
142. **Wysocka J, Herr W.** *The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch.* Trends Biochem Sci. 2003 Jun;28(6):294-304.
143. **van Leeuwen H, Okuwaki M, Hong R, Chakravarti D, Nagata K, O'Hare P.** *Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT.* J Gen Virol. 2003 Sep;84(Pt 9):2501-10.
144. **Amelio AL, Giordani NV, Kubat NJ, O'Neil J E, Bloom DC.** *Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICPO transcriptional permissiveness at early times postexplant.* J Virol. 2006 Feb;80(4):2063-8.
145. **Kosz-Vnenchak M, Jacobson J, Coen DM, Knipe DM.** *Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons.* J Virol. 1993 Sep;67(9):5383-93.
146. **Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA.** *Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system.* Adv Virus Res. 1999;51:237-347.
147. **Penfold ME, Armati P, Cunningham AL.** *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):6529-33.
148. **Tomishima MJ, Smith GA, Enquist LW.** *Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons.* Traffic. 2001 Jul;2(7):429-36.
149. **Miranda-Saksena M, Boadle RA, Aggarwal A, Tijono B, Rixon FJ, Diefenbach RJ, et al.** *Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons.* J Virol. 2009 Apr;83(7):3187-99.
150. **Feierbach B, Bisher M, Goodhouse J, Enquist LW.** *In vitro analysis of transneuronal spread of an alphaherpesvirus infection in peripheral nervous system neurons.* J Virol. 2007 Jul;81(13):6846-57.
151. **Antonine SE, Smith GA.** *Two modes of herpesvirus trafficking in neurons: membrane acquisition directs motion.* J Virol. 2006 Nov;80(22):11235-40.
152. **McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, et al.** *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1.* J Gen Virol. 1988;69(Pt 7):1531-74.
153. **McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Brauer DH.** *Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1.* Nucleic Acids Res. 1986;14(4):1727-45.
154. **Roizman B, Knipe D.** *Herpes simplex viruses and their replication.* 2001.
155. **Cameron CE, Götte M, Raney KD.** *Viral Genome Replication.* Springer; 2009.
156. **Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM.** *Herpes simplex virus.* Front Biosci. 2002 Mar 1;7:d752-64.
157. **DePamphilis ML.** *DNA replication in eukaryotic cells.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996.

158. **Weller SK, Spadaro A, Schaffer JE, Murray AW, Maxam AM, Schaffer PA.** *Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis.* Mol Cell Biol. 1985 May;5(5):930-42.
159. **Stow ND, McMonagle EC.** *Characterization of the TRS/IRS origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1.* Virology. 1983 Oct 30;130(2):427-38.
160. **Sciences PotNAo.** *Genetic Engineering of Viruses and Viral Vectors.* National Academies Press; 1996.
161. **Zhou Z, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon F, Chiu W.** *Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å.* Science. 2000;288:877 - 80.
162. **Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ, Chiu W.** *Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid.* Cell. 1989;56(4):651-60.
163. **Newcomb W, Trus B, Booy F, Steven A, Wall J, Brown J.** *Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes.* J Mol Biol. 1993;232:499 - 511.
164. **Bowman BR, Baker ML, Rixon FJ, Chiu W, Quijcho FA.** *Structure of the herpesvirus major capsid protein.* EMBO J. 2003 Feb 17;22(4):757-65.
165. **Zhou ZH, He J, Jakana J, Tatman JD, Rixon FJ, Chiu W.** *Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids.* Nat Struct Biol. 1995;2(11):1026-30.
166. **Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, et al.** *The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid.* J Virol. 2001 Nov;75(22):10923-32.
167. **Trus BL, Cheng N, Newcomb WW, Homa FL, Brown JC, Steven AC.** *Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 2004 Nov;78(22):12668-71.
168. **Cardone G, Winkler DC, Trus BL, Cheng N, Heuser JE, Newcomb WW, et al.** *Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography.* Virology. 2007 May 10;361(2):426-34.
169. **Thurlow JK, Murphy M, Stow ND, Preston VG.** *Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids.* J Virol. 2006 Mar;80(5):2118-26.
170. **Ogasawara M, Suzutani T, Yoshida I, Azuma M.** *Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA.* J Virol. 2001 Feb;75(3):1427-36.
171. **Mettenleiter T.** *Herpesvirus assembly and egress.* J Virol. 2002;76:1537 - 47.
172. **Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H.** *Herpesvirus assembly: an update.* Virus Res. 2009 Aug;143(2):222-34.
173. **Turcotte S, Letellier J, Lippe R.** *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress.* J Virol. 2005 Jul;79(14):8847-60.
174. **Guo H, Shen S, Wang L, Deng H.** *Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress.* Protein Cell. 2010 Nov;1(11):987-98.
175. **Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ.** *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1.* Virus Res. 2009 Nov;145(2):173-86.
176. **Skepper JN, Whiteley A, Browne H, Minson A.** *Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway.* J Virol. 2001 Jun;75(12):5697-702.

177. **Morrison EE, Wang YF, Meredith DM.** *Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument.* J Virol. 1998 Sep;72(9):7108-14.
178. **Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC.** *Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment.* J Virol. 2009 Feb;83(4):1660-8.
179. **Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al.** *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport.* Mol Biol Cell. 2002 Aug;13(8):2795-809.
180. **Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ, Sodeik B.** *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro.* Traffic. 2006 Feb;7(2):227-37.
181. **Smiley JR.** *Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase?* J Virol. 2004 Feb;78(3):1063-8.
182. **Paladino P, Mossman KL.** *Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response.* J Interferon Cytokine Res. 2009 Sep;29(9):599-607.
183. **Mossman KL, Smiley JR.** *Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication.* J Virol. 2002 Feb;76(4):1995-8.
184. **Tanaka M, Sata T, Kawaguchi Y.** *The product of the Herpes simplex virus 1 UL7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2.* Virol J. 2008;5:125.
185. **Ogg PD, McDonnell PJ, Ryckman BJ, Knudson CM, Roller RJ.** *The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members.* Virology. 2004 Feb 20;319(2):212-24.
186. **Yamauchi Y, Kiriya K, Kubota N, Kimura H, Usukura J, Nishiyama Y.** *The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 is required for efficient nuclear transport of the alpha transducing factor VP16 and viral capsids.* J Virol. 2008 Feb;82(3):1094-106.
187. **Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H.** *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes.* Curr Opin Microbiol. 2006 Aug;9(4):423-9.
188. **Mettenleiter TC.** *Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle.* Vet Microbiol. 2006 Mar 31;113(3-4):163-9.
189. **Shanda SK, Wilson DW.** *UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules.* J Virol. 2008 Aug;82(15):7388-94.
190. **Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Tanaka M, Sata T, Nishiyama Y, et al.** *Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31.* J Virol. 2006 Feb;80(3):1476-86.
191. **Pasdeloup D, Beilstein F, Roberts AP, McElwee M, McNab D, Rixon FJ.** *Inner tegument protein pUL37 of herpes simplex virus type 1 is involved in directing capsids to the trans-Golgi network for envelopment.* J Gen Virol. 2010 Sep;91(Pt 9):2145-51.
192. **Smith GA, Enquist LW.** *Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of Mammalian cells.* Annu Rev Cell Dev Biol. 2002;18:135-61.
193. **Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A.** *Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.* J Cell Biol. 1997;136(5):1007-21.
194. **Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B.** *The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane.* J Virol. 2000;74(3):1355-63.



195. **Roberts AP, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon FJ, Padeloup D.** *Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 2009 Jan;83(1):105-16.
196. **Roizman B, Gu H, Mandel G.** *The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus.* Cell Cycle. 2005 Aug;4(8):1019-21.
197. **Schlegel EF, Blaho JA.** *A conserved carboxy-terminal domain in the major tegument structural protein VP22 facilitates virion packaging of a chimeric protein during productive herpes simplex virus 1 infection.* Virology. 2009 May 10;387(2):449-58.
198. **Mukhopadhyay A, Lee GE, Wilson DW.** *The amino terminus of the herpes simplex virus 1 protein Vhs mediates membrane association and tegument incorporation.* J Virol. 2006 Oct;80(20):10117-27.
199. **Murphy MA, Bucks MA, O'Regan KJ, Courtney RJ.** *The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids.* Virology. 2008 Jul 5;376(2):279-89.
200. **Stylianou J, Maringer K, Cook R, Bernard E, Elliott G.** *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 May;83(10):5204-18.
201. **Desai P, Sexton GL, Huang E, Person S.** *Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures.* J Virol. 2008 Nov;82(22):11354-61.
202. **O'Regan KJ, Bucks MA, Murphy MA, Wills JW, Courtney RJ.** *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 Feb 5;358(1):192-200.
203. **O'Regan KJ, Murphy MA, Bucks MA, Wills JW, Courtney RJ.** *Incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 into the virus particle is independent of interaction with VP16.* Virology. 2007 Dec 20;369(2):263-80.
204. **Hwang S, Kim KS, Flano E, Wu TT, Tong LM, Park AN, et al.** *Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response.* Cell Host Microbe. 2009 Feb 19;5(2):166-78.
205. **Leopardi R, Van Sant C, Roizman B.** *The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):7891-6.
206. **Orvedahl A, Alexander D, Talloczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al.** *HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein.* Cell Host Microbe. 2007 Mar 15;1(1):23-35.
207. **Trgovcich J, Johnson D, Roizman B.** *Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma(1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1.* J Virol. 2002 Jul;76(14):6974-86.
208. **Bergman AC, Nyman PO, Larsson G.** *Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1.* FEBS Lett. 1998 Dec 18;441(2):327-30.
209. **Cook WJ, Wobbe KK, Boni J, Coen DM.** *Regulation of neighboring gene expression by the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene.* Virology. 1996 Apr 1;218(1):193-203.
210. **Everett RD, Parsy ML, Orr A.** *Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICPO that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes.* J Virol. 2009 May;83(10):4963-77.
211. **Kattenhorn LM, Korbel GA, Kessler BM, Spooner E, Ploegh HL.** *A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae.* Mol Cell. 2005 Aug 19;19(4):547-57.

212. **Mou F, Wills E, Baines JD.** *Phosphorylation of the UL31 protein of herpes simplex virus 1 by the US3 encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids.* J Virol. 2009 May;83(10):5181-91.
213. **Sagou K, Imai T, Sagara H, Uema M, Kawaguchi Y.** *Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis.* J Virol. 2009 Jun;83(11):5773-83.
214. **Schlieker C, Korbelt GA, Kattenhorn LM, Ploegh HL.** *A deubiquitinating activity is conserved in the large tegument protein of the herpesviridae.* J Virol. 2005 Dec;79(24):15582-5.
215. **Tanaka M, Nishiyama Y, Sata T, Kawaguchi Y.** *The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of UL41 and ICPO.* Virology. 2005 Oct 25;341(2):301-12.
216. **Morimoto T, Arii J, Tanaka M, Sata T, Akashi H, Yamada M, et al.** *Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2.* Journal of virology. 2009;83(22):11624.
217. **Lee JH, Vittone V, Diefenbach E, Cunningham AL, Diefenbach RJ.** *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1.* Virology. 2008 Sep 1;378(2):347-54.
218. **Mettenleiter T.** *Budding events in herpesvirus morphogenesis.* Virus Res. 2004;106:167 - 80.
219. **Coller KE, Lee JI, Ueda A, Smith GA.** *The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins.* J Virol. 2007 Nov;81(21):11790-7.
220. **Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL, Diefenbach RJ.** *Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 2005 Aug;79(15):9566-71.
221. **McLauchlan J, Rixon FJ.** *Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope.* The Journal of general virology. 1992;73:269.
222. **Rixon FJ, Addison C, McLauchlan J.** *Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells.* J Gen Virol. 1992;73(Pt 2):277-84.
223. **Szilagyi JF, Cunningham C.** *Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle.* J Gen Virol. 1991;72(Pt 3):661-8.
224. **Roizman B, Furlong D.** *The replication of herpesviruses.* In: Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, editors. Comprehensive virology. ed. New York: Plenum Press; 1974. p. 229-403.
225. **Newcomb WW, Brown JC.** *Time-dependent transformation of the herpesvirus tegument.* J Virol. 2009 Aug;83(16):8082-9.
226. **Meckes DG, Jr., Wills JW.** *Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus.* J Virol. 2007 Dec;81(23):13028-36.
227. **Meckes DG, Jr., Wills JW.** *Structural rearrangement within an enveloped virus upon binding to the host cell.* J Virol. 2008 Nov;82(21):10429-35.
228. **Yeh PC, Meckes DG, Jr., Wills JW.** *Analysis of the interaction between the UL11 and UL16 tegument proteins of herpes simplex virus.* J Virol. 2008 Nov;82(21):10693-700.
229. **Meckes DG, Jr., Marsh JA, Wills JW.** *Complex mechanisms for the packaging of the UL16 tegument protein into herpes simplex virus.* Virology. 2010 Mar 15;398(2):208-13.

230. **van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G, van Meer G.** *The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei.* Virology. 1994;200(2):831-6.
231. **Komuro M, Tajima M, Kato K.** *Transformation of Golgi membrane into the envelope of herpes simplex virus in rat anterior pituitary cells.* Eur J Cell Biol. 1989;50(2):398-406.
232. **Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y, et al.** *Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1.* J Virol. 2008 Jun;82(11):5198-211.
233. **Farnsworth A, Johnson DC.** *Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-cell spread.* J Virol. 2006 Apr;80(7):3167-79.
234. **Remillard-Labrosse G, Lippe R.** *Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN.* Communicative & Integrative Biology. 2009 Sept-Oct;2(5):434-6.
235. **Remillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G, Lippe R.** *Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane.* Traffic. 2009 Aug;10(8):1074-83.
236. **Johnson DC, Baines JD.** *Herpesviruses remodel host membranes for virus egress.* Nat Rev Microbiol. 2011 May;9(5):382-94.
237. **Mettenleiter TC.** *Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread.* Virus Res. 2003 Apr;92(2):197-206.
238. **Aghaie A, Pourfatollah AA, Bathaie SZ, Moazzeni SM, Khorsand Mohammad Pour H, Sharifi Z.** *Inactivation of virus in intravenous immunoglobulin G using solvent/detergent treatment and pasteurization.* Hum Antibodies. 2008;17(3-4):79-84.
239. **Seymour, Stanton, Block.** *Disinfection, sterilization, and preservation.* 5th edition. Wilkins LW, editor. Philadelphia: Lea & Febiger; 2001.
240. **Heldwein EE, Krummenacher C.** *Entry of herpesviruses into mammalian cells.* Cell Mol Life Sci. 2008 Jun;65(11):1653-68.
241. **Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR.** *Understanding HSV-1 entry glycoproteins.* Rev Med Virol. 2007 May-Jun;17(3):205-15.
242. **Spear PG.** *Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry.* Cell Microbiol. 2004 May;6(5):401-10.
243. **Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J, Roizman B.** *Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane.* J Virol. 2007 Jan;81(2):800-12.
244. **Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, et al.** *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 12;104(24):10187-92.
245. **Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, et al.** *Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase.* J Virol. 2009 Apr;83(7):3115-26.
246. **Wright CC, Wisner TW, Hannah BP, Eisenberg RJ, Cohen GH, Johnson DC.** *Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB.* J Virol. 2009;83(22):11847-56.
247. **Farnsworth A, Goldsmith K, Johnson DC.** *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 Aug;77(15):8481-94.

248. **Farnsworth A, Wisner TW, Johnson DC.** *Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD.* J Virol. 2007 Jan;81(1):319-31.
249. **Johnson DC, Wisner TW, Wright CC.** *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment.* J Virol. 2011 May;85(10):4910-26.
250. **Avitabile E, Lombardi G, Campadelli-Fiume G.** *Herpes simplex virus glycoprotein K, but not its syncytial allele, inhibits cell-cell fusion mediated by the four fusogenic glycoproteins, gD, gB, gH, and gL.* J Virol. 2003 Jun;77(12):6836-44.
251. **Avitabile E, Lombardi G, Gianni T, Capri M, Campadelli-Fiume G.** *Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression.* J Virol. 2004 Aug;78(15):8015-25.
252. **Melancon JM, Fulmer PA, Kousoulas KG.** *The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment.* Virol J. 2007;4:120.
253. **Browne H, Baxter V, Minson T.** *Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1.* J Gen Virol. 1993;74(Pt 12):2813-7.
254. **Forrester AJ, Sullivan V, Simmons A, Blacklaws BA, Smith GL, Nash AA, et al.** *Induction of protective immunity with antibody to herpes simplex virus type 1 glycoprotein H (gH) and analysis of the immune response to gH expressed in recombinant vaccinia virus.* J Gen Virol. 1991;72(Pt 2):369-75.
255. **Johnson RM, Lancki DW, Sperling AI, Dick RF, Spear PG, Fitch FW, et al.** *A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I.* J Immunol. 1992;148(4):983-8.
256. **Mikloska Z, Cunningham AL.** *Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes.* J Gen Virol. 1998;79(Pt 2):353-61.
257. **Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R.** *Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery.* Nat Rev Microbiol. 2011 May;9(5):369-81.
258. **Koyama AH, Uchida T.** *The mode of entry of herpes simplex virus type 1 into Vero cells.* Microbiol Immunol. 1987;31(2):123-30.
259. **Nicola AV, Straus SE.** *Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus.* J Virol. 2004 Jul;78(14):7508-17.
260. **Nicola AV, Hou J, Major EO, Straus SE.** *Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway.* J Virol. 2005 Jun;79(12):7609-16.
261. **Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE.** *Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells.* J Virol. 2003 May;77(9):5324-32.
262. **Wittels M, Spear PG.** *Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway.* Virus Res. 1991;18(2-3):271-90.
263. **Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH.** *Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 2005 Jun;79(11):6655-63.
264. **Spear PG, Longnecker R.** *Herpesvirus entry: an update.* J Virol. 2003 Oct;77(19):10179-85.

265. **Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, et al.** *The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell.* Rev Med Virol. 2007 Sep-Oct;17(5):313-26.
266. **Sedy JR, Spear PG, Ware CF.** *Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members.* Nat Rev Immunol. 2008 Nov;8(11):861-73.
267. **Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC.** *Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread.* J Virol. 1998;72(7):6119-30.
268. **Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear PG.** *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):1211-22.
269. **Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG.** *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):1090-8.
270. **Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG.** *Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans.* J Cell Biol. 1992;116(5):1273-81.
271. **Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D, Koshy TI.** *Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus.* Adv Exp Med Biol. 1992;313:341-53.
272. **WuDunn D, Spear PG.** *Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate.* J Virol. 1989;63(1):52-8.
273. **Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH.** *Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry.* Virology. 2000;275(1):1-8.
274. **Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG.** *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family.* Cell. 1996;87(3):427-36.
275. **Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Wiley DC, Eisenberg RJ, Cohen GH.** *Structure-based analysis of the herpes simplex virus glycoprotein D binding site present on herpesvirus entry mediator HveA (HVEM).* J Virol. 2002 Nov;76(21):10894-904.
276. **Whitbeck JC, Peng C, Lou H, Xu R, Willis SH, Ponce de Leon M, et al.** *Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry.* J Virol. 1997;71(8):6083-93.
277. **Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG.** *Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor.* Science. 1998;280(5369):1618-20.
278. **Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Lopez M, Campadelli-Fiume G.** *Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB).* J Virol. 2000;74(8):3909-17.
279. **Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, et al.** *A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus.* Virology. 1998;246(1):179-89.
280. **Martinez WM, Spear PG.** *Structural Features of Nectin-2 (HveB) Required for Herpes Simplex Virus Entry.* J Virol. 2001 November 15, 2001;75(22):11185-95.
281. **Krummenacher C, Rux AH, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Lou H, Baribaud I, et al.** *The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full*

affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. *J Virol.* 1999;73(10):8127-37.

282. **Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, et al.** A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 1999;99(1):13-22.

283. **O'Donnell CD, Kovacs M, Akhtar J, Valyi-Nagy T, Shukla D.** Expanding the role of 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology.* 2010 Feb 20;397(2):389-98.

284. **Tiwari V, O'Donnell C, Copeland RJ, Scarlett T, Liu J, Shukla D.** Soluble 3-O-sulfated heparan sulfate can trigger herpes simplex virus type 1 entry into resistant Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Gen Virol.* 2007 Apr;88(Pt 4):1075-9.

285. **Tiwari V, Clement C, Xu D, Valyi-Nagy T, Yue BY, Liu J, et al.** Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J Virol.* 2006 Sep;80(18):8970-80.

286. **Fusco D, Forghieri C, Campadelli-Fiume G.** 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 Jun 28;102(26):9323-8.

287. **Turner A, Bruun B, Minson T, Browne H.** Glycoproteins gB, gD, and gH/gL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol.* 1998;72(1):873-5.

288. **Pertel PE, Fridberg A, Parish ML, Spear PG.** Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gB, gD, and gH-gL Requires a gD Receptor but Not Necessarily Heparan Sulfate. *Virology.* 2001 Jan 5;279(1):313-24.

289. **Jackson JO, Longnecker R.** Reevaluating herpes simplex virus hemifusion. *J Virol.* 2010 Nov;84(22):11814-21.

290. **Subramanian RP, Geraghty RJ.** Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 20;104(8):2903-8.

291. **Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH, Eisenberg RJ.** 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 Nov 20;104(47):18718-23.

292. **Luxton GW, Haverlock S, Collier KE, Antinone SE, Pincetic A, Smith GA.** Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 19;102(16):5832-7.

293. **Radtke K, Kieneke D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, Scholz T, et al.** Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1000991.

294. **Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A.** Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4922-31.

295. **Batterson W, Furlong D, Roizman B.** Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol.* 1983;45(1):397-407.

296. **Newcomb WW, Booy FP, Brown JC.** Uncoating the herpes simplex virus genome. *J Mol Biol.* 2007 Jul 20;370(4):633-42.

297. **Pasdeloup D, Blondel D, Isidro AL, Rixon FJ.** Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol.* 2009 Jul;83(13):6610-23.

298. **Shahin V, Hafezi W, Oberleithner H, Ludwig Y, Windoffer B, Schillers H, et al.** *The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure.* J Cell Sci. 2006 Jan 1;119(Pt 1):23-30.
299. **Jovasevic V, Liang L, Roizman B.** *Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus.* Journal of virology. 2008;82(7):3311.
300. **La Boissiere S, Hughes T, O'Hare P.** *HCF-dependent nuclear import of VP16.* EMBO J. 1999;18(2):480-9.
301. **LaBoissiere S, O'Hare P.** *Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells.* J Virol. 2000;74(1):99-109.
302. **Stern S, Tanaka M, Herr W.** *The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16.* Nature. 1989 Oct 19;341(6243):624-30.
303. **Narayanan A, Nogueira ML, Ruyechan WT, Kristie TM.** *Combinatorial transcription of herpes simplex virus and varicella zoster virus immediate early genes is strictly determined by the cellular coactivator HCF-1.* J Biol Chem. 2005 Jan 14;280(2):1369-75.
304. **Wilson AC, Cleary MA, Lai JS, LaMarco K, Peterson MG, Herr W.** *Combinatorial control of transcription: the herpes simplex virus VP16-induced complex.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1993;58:167-78.
305. **Whitley RJ.** *Herpes Simplex Viruses.* 2. Fields BN, Knipe DM, editors. New York: Raven Press; 1990.
306. **Pizer LI, Tedder DG, Betz JL, Wilcox KW, Beard P.** *Regulation of transcription in vitro from herpes simplex virus genes.* J Virol. 1986 Dec;60(3):950-9.
307. **Leopardi R, Michael N, Roizman B.** *Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box.* J Virol. 1995;69(5):3042-8.
308. **Faber SW, Wilcox KW.** *Association of the herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with specific nucleotide sequences in DNA.* Nucleic Acids Res. 1986 Aug 11;14(15):6067-83.
309. **Elgadi MM, Hayes CE, Smiley JR.** *The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts.* J Virol. 1999 Sep;73(9):7153-64.
310. **Smiley JR, Elgadi MM, Saffran HA.** *Herpes simplex virus vhs protein.* Methods Enzymol. 2001;342:440-51.
311. **Esclatine A, Taddeo B, Evans L, Roizman B.** *The herpes simplex virus 1 UL41 gene-dependent destabilization of cellular RNAs is selective and may be sequence-specific.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 9;101(10):3603-8.
312. **Esclatine A, Taddeo B, Roizman B.** *The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 28;101(52):18165-70.
313. **Flint SJ.** *Splicing and the regulation of viral gene expression.* Curr Top Microbiol Immunol. 1981;93:47-79.
314. **Hardy WR, Sandri-Goldin RM.** *Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect.* J Virol. 1994;68(12):7790-9.
315. **Lindberg A, Kreivi JP.** *Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27.* Virology. 2002 Mar 1;294(1):189-98.
316. **Sandri-Goldin RM.** *Properties of an HSV-1 regulatory protein that appears to impair host cell splicing.* Infect Agents Dis. 1994 Apr-Jun;3(2-3):59-67.

317. **Mulvey M, Arias C, Mohr I.** Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *J Virol.* 2007 Apr;81(7):3377-90.
318. **Mulvey M, Poppers J, Sternberg D, Mohr I.** Regulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation by different functions that act during discrete phases in the herpes simplex virus type 1 life cycle. *J Virol.* 2003 Oct;77(20):10917-28.
319. **Mohr I.** Neutralizing innate host defenses to control viral translation in HSV-1 infected cells. *Int Rev Immunol.* 2004 Jan-Apr;23(1-2):199-220.
320. **Cassady KA, Gross M, Roizman B.** The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol.* 1998;72(11):8620-6.
321. **Quinlan MP, Chen LB, Knipe DM.** The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell.* 1984 Apr;36(4):857-68.
322. **Lehman IR, Boehmer PE.** Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *Journal of Biological Chemistry.* 1999 October 1, 1999;274(40):28059-62.
323. **Jacob RJ, Morse LS, Roizman B.** Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J Virol.* 1979 Feb;29(2):448-57.
324. **Ben-Porat T, Rixon FJ.** Replication of herpesvirus DNA. IV: analysis of concatemers. *Virology.* 1979;94(1):61-70.
325. **Boehmer PE, Lehman IR.** Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:347-84.
326. **Boehmer PE, Nimonkar AV.** Herpes virus replication. *IUBMB Life.* 2003 Jan;55(1):13-22.
327. **Catalano CE.** Viral genome packaging machines: genetics, structure, and mechanism. *Landes Bioscience/Eurekah.com;* 2005.
328. **Homa FL, Brown JC.** Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol.* 1997;7(2):107-22.
329. **Trus BL, Booy FP, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL, Thomsen DR, et al.** The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. *J Mol Biol.* 1996;263(3):447-62.
330. **Roos WH, Radtke K, Kniesmeijer E, Geertsema H, Sodeik B, Wuite GJ.** Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 16;106(24):9673-8.
331. **Sherman G, Bachenheimer SL.** Characterization of intranuclear capsids made by ts morphogenic mutants of HSV-1. *Virology.* 1988 Apr;163(2):471-80.
332. **Chang YE, Van Sant C, Krug PW, Sears AE, Roizman B.** The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J Virol.* 1997;71(11):8307-15.
333. **Wills E, Scholtes L, Baines JD.** 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 Nov;80(21):10894-9.
334. **Trus BL, Newcomb WW, Cheng N, Cardone G, Marekov L, Homa FL, et al.** Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell.* 2007 May 25;26(4):479-89.



335. **Cockrell SK, Sanchez ME, Erazo A, Homa FL.** *Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation.* J Virol. 2009 Jan;83(1):47-57.
336. **Lamberti C, Weller SK.** *The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments.* J Virol. 1998 Mar;72(3):2463-73.
337. **Chang YE, Poon AP, Roizman B.** *Properties of the protein encoded by the UL32 open reading frame of herpes simplex virus 1.* J Virol. 1996;70(6):3938-46.
338. **Yang K, Baines JD.** *Proline and tyrosine residues in scaffold proteins of herpes simplex virus 1 critical to the interaction with portal protein and its incorporation into capsids.* J Virol. 2009 Aug;83(16):8076-81.
339. **Yang K, Wills E, Baines JD.** *The putative leucine zipper of the UL6-encoded portal protein of herpes simplex virus 1 is necessary for interaction with pUL15 and pUL28 and their association with capsids.* J Virol. 2009 May;83(9):4557-64.
340. **Beard PM, Baines JD.** *The DNA cleavage and packaging protein encoded by the UL33 gene of herpes simplex virus 1 associates with capsids.* Virology. 2004 Jul 1;324(2):475-82.
341. **Beard PM, Taus NS, Baines JD.** *DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells.* J Virol. 2002 May;76(10):4785-91.
342. **Higgs MR, Preston VG, Stow ND.** *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 Jul;89(Pt 7):1709-15.
343. **Beilstein F, Higgs MR, Stow ND.** *Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL33.* J Virol. 2009 Sept;83(17):8938-45.
344. **Jacobson JG, Yang K, Baines JD, Homa FL.** *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 Dec;80(24):12312-23.
345. **Yang K, Baines JD.** *The putative terminase subunit of herpes simplex virus 1 encoded by UL28 is necessary and sufficient to mediate interaction between pUL15 and pUL33.* J Virol. 2006 Jun;80(12):5733-9.
346. **Mettenleiter TC, Minson T.** *Egress of alphaherpesviruses.* J Virol. 2006 Feb;80(3):1610-1; author reply 1-2.
347. **Darlington RW, Moss LH, 3rd.** *Herpesvirus envelopment.* J Virol. 1968 Jan;2(1):48-55.
348. **Epstein MA.** *Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells.* J Cell Biol. 1962 Mar;12:589-97.
349. **Leuzinger H, Ziegler U, Schraner E, Fraefel C, Glauser D, Heid I, et al.** *Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways.* J Virol. 2005;79:13047-59.
350. **Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, et al.** *Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells.* J Virol. 2005 Jan;79(2):1071-83.
351. **Stackpole CW.** *Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature.* J Virol. 1969;4(1):75-93.
352. **Granzow H, Klupp B, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter T.** *Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study.* J Virol. 2001;75:3675-84.
353. **Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD.** *Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids.* J Virol. 2002 Sep;76(17):8939-52.

354. **Booy FP, Trus BL, Newcomb WW, Brown JC, Conway JF, Steven AC.** *Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus).* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(12):5652-6.
355. **Heymann JB, Cheng N, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Steven AC.** *Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy.* Nat Struct Biol. 2003 May;10(5):334-41.
356. **Mears WE, Rice SA.** *The herpes simplex virus immediate-early protein ICP27 shuttles between nucleus and cytoplasm.* Virology. 1998 Mar 1;242(1):128-37.
357. **Taylor TJ, Knipe DM.** *C-terminal region of herpes simplex virus ICP8 protein needed for intranuclear localization.* Virology. 2003 May 10;309(2):219-31.
358. **Van Sant C, Hagglund R, Lopez P, Roizman B.** *The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8815-20.
359. **Naldinho-Souto R, Browne H, Minson T.** *Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions.* J Virol. 2006 Mar;80(5):2582-4.
360. **Forest T, Barnard S, Baines JD.** *Active intranuclear movement of herpesvirus capsids.* Nat Cell Biol. 2005 Apr;7(4):429-31.
361. **Feierbach B, Piccinotti S, Bisher M, Denk W, Enquist LW.** *Alpha-Herpesvirus Infection Induces the Formation of Nuclear Actin Filaments.* PLoS Pathog. 2006 Aug 18;2(8).
362. **Lyman MG, Enquist LW.** *Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton.* J Virol. 2009 Mar;83(5):2058-66.
363. **Park R, Baines JD.** *Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B.* J Virol. 2006 Jan;80(1):494-504.
364. **Mou F, Forest T, Baines JD.** *US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells.* J Virol. 2007 Jun;81(12):6459-70.
365. **Mou F, Wills EG, Park R, Baines JD.** *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 Aug;82(16):8094-104.
366. **Reynolds AE, Liang L, Baines JD.** *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 Jun;78(11):5564-75.
367. **Simpson-Holley M, Colgrove RC, Nalepa G, Harper JW, Knipe DM.** *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 Oct;79(20):12840-51.
368. **Klupp BG, Granzow H, Fuchs W, Keil GM, Finke S, Mettenleiter TC.** *Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Apr 24;104(17):7241-6.
369. **Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ.** *U(l)31 and u(l)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids.* J Virol. 2001 Sep;75(18):8803-17.
370. **Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J, DeSalvo D.** *Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment.* J Virol. 2000 Jan;74(1):117-29.
371. **Smith JD.** *An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus.* Intervirology. 1980;13(5):312-6.

372. **Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Diefenbach E, Holland DJ, Boadle RA, Armati PJ, et al.** *Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain.* J Virol. 2002 Apr;76(7):3282-91.
373. **Luxton GW, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Schober JM, Smith GA.** *The Pseudorabies Virus VP1/2 Tegument Protein Is Required for Intracellular Capsid Transport.* J Virol. 2006 Jan;80(1):201-9.
374. **Gershon AA, Sherman DL, Zhu Z, Gabel CA, Ambron RT, Gershon MD.** *Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network.* J Virol. 1994;68(10):6372-90.
375. **Bernhard OK, Diefenbach RJ, Cunningham AL.** *New insights into viral structure and virus-cell interactions through proteomics.* Expert Rev Proteomics. 2005 Aug;2(4):577-88.
376. **Roberts KL, Baines JD.** *Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins.* J Virol. 2010 Oct;84(19):9889-96.
377. **Crump CM, Yates C, Minson T.** *Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4.* J Virol. 2007 Jul;81(14):7380-7.
378. **Pawliczek T, Crump CM.** *Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression.* J Virol. 2009 Nov;83(21):11254-64.
379. **Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, et al.** *Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies.* J Virol. 2007 Oct;81(20):11468-78.
380. **Foster TP, Chouljenko VN, Kousoulas KG.** *Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K.* J Virol. 2008 Jul;82(13):6310-23.
381. **Foster TP, Kousoulas KG.** *Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress.* J Virol. 1999;73(10):8457-68.
382. **Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC.** *The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress.* J Virol. 1997;71(7):5639-46.
383. **Melancon JM, Luna RE, Foster TP, Kousoulas KG.** *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 Jan;79(1):299-313.
384. **Johnson DC, Huber MT.** *Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread.* J Virol. 2002 Jan;76(1):1-8.
385. **Dingwell KS, Johnson DC.** *The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions.* Journal of virology. 1998 November 1, 1998;72(11):8933-42.
386. **Johnson DC, Webb M, Wisner TW, Brunetti C.** *Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread.* J Virol. 2001 Jan;75(2):821-33.
387. **Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T, Browne HM.** *Alpha herpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins.* Journal of General Virology. 2004 December 1, 2004;85(12):3517-27.
388. **Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G, Roizman B.** *The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress.* Journal of virology. 1991 December 1, 1991;65(12):6414-24.
389. **Ruyechan WT, Morse LS, Knipe DM, Roizman B.** *Molecular Genetics of Herpes Simplex Virus II. Mapping of the Major Viral Glycoproteins and of the Genetic Loci Specifying the Social Behavior of Infected Cells.* Journal of virology. 1979 February 1, 1979;29(2):677-97.

390. **Bzik DJ, Fox BA, Deluca NA, Person S.** *Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: Mutations affecting rate of virus entry and cell fusion.* *Virology.* 1984;137(1):185-90.
391. **Tognon M, Guandalini R, Romanelli MG, Manservigi R, Trevisani B.** *Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1.* *Virus Research.* 1991;18(2-3):135-50.
392. **Sanders PG, Wilkie NM, Davison AJ.** *Thymidine Kinase Deletion Mutants of Herpes Simplex Virus Type 1.* *Journal of General Virology.* 1982 December 1, 1982;63(2):277-95.
393. **Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H, Pearson A.** *Conserved Residues in the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Are Important for Dispersal of the Nucleolar Protein Nucleolin.* *Journal of virology.* 2010 January 1, 2010;84(1):109-18.
394. **Spear PG, Keller JM, Roizman B.** *Proteins Specified by Herpes Simplex Virus : II. Viral Glycoproteins Associated with Cellular Membranes* *Journal of virology.* 1970 February 1, 1970;5(2):123-31.
395. **Gibson W, Roizman B.** *Proteins specified by herpes simplex virus X. Staining and radiolabeling properties of B capsid and virion proteins in polyacrylamide gels.* *J Virol.* 1974;13(1):155-65.
396. **Spear PG, Roizman B.** *The proteins specified by herpes simplex virus. I. Time of synthesis, transfer into nuclei, and properties of proteins made in productively infected cells.* *Virology.* 1968;36(4):545-55.
397. **Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B.** *Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains.* *J Virol.* 1974;14(3):640-51.
398. **Brown SM, MacLean AR.** *Herpes simplex virus protocols.* Totowa, N.J.: Humana Press; 1998.
399. **Howes EL, Clark EA, Smith E, Mitchison NA.** *Mouse Hybrid Cell Lines produce Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 1.* *Journal of General Virology.* 1979 July 1, 1979;44(1):81-7.
400. **Koga J, Chatterjee S, Whitley RJ.** *Studies on herpes simplex virus type 1 glycoproteins using monoclonal antibodies.* *Virology.* 1986;151(2):385-9.
401. **Ackermann M, Braun DK, Pereira L, Roizman B.** *Characterization of herpes simplex virus 1 alpha proteins 0, 4, and 27 with monoclonal antibodies.* *Journal of virology.* 1984 October 1, 1984;52(1):108-18.
402. **Coriell LL, Rake G, Blank H, Scott TFM.** *ELECTRON MICROSCOPY OF HERPES SIMPLEX.* *Journal of Bacteriology.* 1950 January 1, 1950;59(1):61-8.
403. **Morgan C, Rose HM, Mednis B.** *Electron Microscopy of Herpes Simplex Virus.* *Journal of virology.* 1968 May 1, 1968;2(5):507-16.
404. **Szilagy J, Cunningham C.** *Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle.* *The Journal of general virology.* 1991;72:661-8.
405. **Spear PG.** *Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells.* *J Virol.* 1976;17(3):991-1008.
406. **Maxwell KL, Frappier L.** *Viral proteomics.* *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007 Jun;71(2):398-411.
407. **Thomas JJ, Bakhtiar R, Siuzdak G.** *Mass spectrometry in viral proteomics.* *Acc Chem Res.* 2000 Mar;33(3):179-87.
408. **Zheng J, Sugrue RJ, Tang K.** *Mass spectrometry based proteomic studies on viruses and hosts – A review.* *Analytica Chimica Acta.* 2011;702(2):149-59.

409. **Zhou S, Liu R, Zhao X, Huang C, Wei Y.** *Viral proteomics: The emerging cutting-edge of virus research.* Sci China Life Sci. 2011 Jun;54(6):502-12.
410. **Hoffmann ED, Stroobant V.** *Spectrométrie de masse: cours et exercices corrigés.* Dunod; 2005.
411. **Baldick CJ, Jr., Shenk T.** *Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles.* J Virol. 1996 Sep;70(9):6097-105.
412. **Bechtel JT, Winant RC, Ganem D.** *Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* J Virol. 2005 Apr;79(8):4952-64.
413. **Bortz E, Whitelegge JP, Jia Q, Zhou ZH, Stewart JP, Wu TT, et al.** *Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions.* J Virol. 2003 Dec;77(24):13425-32.
414. **Dry I, Haig DM, Inglis NF, Imrie L, Stewart JP, Russell GC.** *Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1.* J Virol. 2008 Jun;82(11):5390-7.
415. **Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weickel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, et al.** *Proteins of purified Epstein-Barr virus.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 16;101(46):16286-91.
416. **Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, et al.** *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions.* J Virol. 2004 Oct;78(20):11187-97.
417. **Kramer T, Greco TM, Enquist LW, Cristea IM.** *Proteomic characterization of pseudorabies virus extracellular virions.* J Virol. 2011 Jul;85(13):6427-41.
418. **O'Connor CM, Kedes DH.** *Mass spectrometric analyses of purified rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins.* J Virol. 2006 Feb;80(3):1574-83.
419. **Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al.** *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome.* J Virol. 2004 Oct;78(20):10960-6.
420. **Zhu FX, Chong JM, Wu L, Yuan Y.** *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* J Virol. 2005 Jan;79(2):800-11.
421. **Adamczyk-Poplawska M, Markowicz S, Jagusztyn-Krynicka EK.** *Proteomics for development of vaccine.* Journal of Proteomics. 2011;74(12):2596-616.
422. **Ahn NG, Wang AH.** *Proteomics and genomics: perspectives on drug and target discovery.* Curr Opin Chem Biol. 2008 Feb;12(1):1-3.
423. **Bhattacharya S, Osman H.** *Novel targets for anti-retroviral therapy.* Journal of Infection. 2009;59(6):377-86.
424. **Downard KM, Morrissey B, Schwahn AB.** *Mass spectrometry analysis of the influenza virus.* Mass Spectrometry Reviews. 2009;28(1):35-49.
425. **Grandi G.** *Genomics, proteomics, and vaccines.* Wiley; 2004.
426. **Lewis JK, Chiang J, Siuzdak G.** *Monitoring Protein-Drug Interactions with Mass Spectrometry and Proteolysis Protein Mass Mapping as a Drug Assay.* 1999;4(3):46-8.
427. **Desai P, Person S.** *Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid.* J Virol. 1998;72(9):7563-8.
428. **Remillard-Labrosse G, Guay G, Lippe R.** *Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro.* J Virol. 2006 Oct;80(19):9741-53.
429. **Loret S, Guay G, Lippe R.** *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions.* J Virol. 2008 Sep;82(17):8605-18.

430. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. *Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.* Anal Chem. 2002 Oct 15;74(20):5383-92.
431. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. *A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.* Anal Chem. 2003 Sep 1;75(17):4646-58.
432. Brussaard CP. *Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry.* Appl Environ Microbiol. 2004 Mar;70(3):1506-13.
433. Brussaard CP, Marie D, Bratbak G. *Flow cytometric detection of viruses.* J Virol Methods. 2000 Mar;85(1-2):175-82.
434. Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CF, 3rd. *Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems.* Cytometry A. 2010 Mar;77(3):294-301.
435. Chang YE, Roizman B. *The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix.* J Virol. 1993;67(11):6348-56.
436. Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW, Courtney RJ. *Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids.* Virology. 2007 May 10;361(2):316-24.
437. Klupp BG, Fuchs W, Granzow H, Nixdorf R, Mettenleiter TC. *Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein.* J Virol. 2002 Mar;76(6):3065-71.
438. Abaitua F, O'Hare P. *Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein.* J Virol. 2008 Jun;82(11):5234-44.
439. Desai P, Sexton GL, McCaffery JM, Person S. *A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation.* J Virol. 2001 Nov;75(21):10259-71.
440. Desai PJ. *A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells.* J Virol. 2000;74(24):11608-18.
441. Klupp BG, Granzow H, Mundt E, Mettenleiter TC. *Pseudorabies virus ul37 gene product is involved in secondary envelopment.* J Virol. 2001;75(19):8927-36.
442. Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC. *The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions.* J Virol. 2002 Jul;76(13):6729-42.
443. Fuchs W, Granzow H, Mettenleiter TC. *A pseudorabies virus recombinant simultaneously lacking the major tegument proteins encoded by the UL46, UL47, UL48, and UL49 genes is viable in cultured cells.* J Virol. 2003 Dec;77(23):12891-900.
444. Padula ME, Sydnor ML, Wilson DW. *Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space.* J Virol. 2009 May;83(10):4757-65.
445. Krauss O, Hollinshead R, Hollinshead M, Smith GL. *An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles.* J Gen Virol. 2002 Oct;83(Pt 10):2347-59.
446. Moerdyk-Schauwecker M, Hwang SI, Grzelishvili VZ. *Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach.* Virol J. 2009;6:166.
447. Ott DE. *Cellular proteins detected in HIV-1.* Rev Med Virol. 2008 May-Jun;18(3):159-75.
448. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P. *Cellular proteins in influenza virus particles.* PLoS Pathog. 2008 Jun;4(6):e1000085.

449. **Elliott G, Hafezi W, Whiteley A, Bernard E.** *Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0.* J Virol. 2005 Aug;79(15):9735-45.
450. **Sedlackova L, Rice SA.** *Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions.* J Virol. 2008 Jan;82(1):268-77.
451. **Yao F, Courtney RJ.** *A major transcriptional regulatory protein (ICP4) of herpes simplex virus type 1 is associated with purified virions.* J Virol. 1989 Aug;63(8):3338-44.
452. **Yao F, Courtney RJ.** *Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1.* J Virol. 1992 May;66(5):2709-16.
453. **Yang TY, Courtney RJ.** *Influence of the host cell on the association of ICP4 and ICP0 with herpes simplex virus type 1.* Virology. 1995 Aug 1;211(1):209-17.
454. **Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N, Mettenleiter TC.** *The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions.* J Virol. 2002 Jan;76(1):364-78.
455. **Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC.** *Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product.* J Virol. 2000 Nov;74(21):10063-73.
456. **Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC.** *Nuclear envelope breakdown can substitute for primary envelopment-mediated nuclear egress of herpesviruses.* J Virol. 2011 Aug;85(16):8285-92.
457. **del Rio T, DeCoste CJ, Enquist LW.** *Actin Is a Component of the Compensation Mechanism in Pseudorabies Virus Virions Lacking the Major Tegument Protein VP22.* Journal of virology. 2005 July 1, 2005;79(13):8614-9.
458. **Billaud G, Thouvenot D, Morfin F.** *Drug targets in herpes simplex and Epstein Barr Virus infections.* Infect Disord Drug Targets. 2009 Apr;9(2):117-25.
459. **De Clercq E.** *Emerging antiviral drugs.* Expert Opin Emerg Drugs. 2008 Sep;13(3):393-416.
460. **Opstelten W, Neven AK, Eekhof J.** *Treatment and prevention of herpes labialis.* Can Fam Physician. 2008 Dec;54(12):1683-7.
461. **Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC.** *Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections.* Expert Rev Anti Infect Ther. 2009 Jun;7(5):559-68.
462. **Dasgupta G, Chentoufi AA, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L.** *New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield.* Expert Rev Vaccines. 2009 Aug;8(8):1023-35.
463. **Rupp R, Bernstein DI.** *The potential impact of a prophylactic herpes simplex vaccine.* Expert Opin Emerg Drugs. 2008 Mar;13(1):41-52.
464. **Campadelli-Fiume G, De Giovanni C, Gatta V, Nanni P, Lollini P-L, Menotti L.** *Rethinking herpes simplex virus: the way to oncolytic agents.* Reviews in Medical Virology. 2011;21(4):213-26.
465. **Liu TC, Kirn D.** *Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses.* Gene Ther. 2008;15(12):877-84.
466. **Marconi P, Argnani R, Berto E, Epstein AL, Manservigi R.** *HSV as a vector in vaccine development and gene therapy.* Hum Vaccin. 2008 Mar-Apr;4(2):91-105.
467. **Shen Y, Nemunaitis J.** *Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment.* Cancer Gene Ther. 2006;13(11):975-92.
468. **Varghese S, Rabkin SD.** *Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy.* Cancer Gene Ther. 2002;9(12):967-78.





## Annexe

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

GÈNE	PROTÉINE	GÈNE	PROTÉINE
R <sub>1</sub> 1	ICP34.5, facteur de neurovirulence	U <sub>1</sub> 34	
R <sub>1</sub> 2	ICP0, E3 ubiquitine ligase	U <sub>1</sub> 35	VP26, petite protéine de la capsid
R <sub>5</sub> 1	ICP4	U <sub>1</sub> 36	ICP1/2, VP1/2, large protéine du tégument
U <sub>1</sub> 1	gL	U <sub>1</sub> 37	ICP32
U <sub>1</sub> 2	Uracyl-ADN-glycosylase, UDG	U <sub>1</sub> 38	VP19C, sous-unité du triplexe de la capsid
U <sub>1</sub> 3		U <sub>1</sub> 39	ICP6, sous-unité de la ribonucléotide réductase
U <sub>1</sub> 4		U <sub>1</sub> 40	Sous-unité de la ribonucléotide réductase
U <sub>1</sub> 5	Sous-unité du complexe primase-hélicase	U <sub>1</sub> 41	vhs
U <sub>1</sub> 6	<i>Portal</i>	U <sub>1</sub> 42	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase
U <sub>1</sub> 7		U <sub>1</sub> 43	
U <sub>1</sub> 8	Sous-unité du complexe primase-hélicase	U <sub>1</sub> 44	gC
U <sub>1</sub> 9	OriBP, protéine de liaison à l'origine de réplication	U <sub>1</sub> 45	
U <sub>1</sub> 10	gM	U <sub>1</sub> 46	VP11/12
U <sub>1</sub> 11	Protéine myristoylée	U <sub>1</sub> 47	VP13/14
U <sub>1</sub> 12	Exonucléase alcaline	U <sub>1</sub> 48	VP16, ICP25, $\alpha$ -TIF
U <sub>1</sub> 12.5		U <sub>1</sub> 49	VP22
U <sub>1</sub> 13	Protéine kinase sérine/thréonine	U <sub>1</sub> 49.5	gN, U <sub>1</sub> 49A
U <sub>1</sub> 14		U <sub>1</sub> 50	dUTPase
U <sub>1</sub> 15	Sous-unité du complexe de la terminase	U <sub>1</sub> 51	
U <sub>1</sub> 16		U <sub>1</sub> 52	Sous-unité du complexe primase-hélicase
U <sub>1</sub> 17	Protéine d'empaquetage de l'ADN	U <sub>1</sub> 53	gK
U <sub>1</sub> 18	VP23, sous-unité du triplexe de la capsid	U <sub>1</sub> 54	ICP27
U <sub>1</sub> 19	VP5, ICP5, protéine majeure de la capsid	U <sub>1</sub> 55	
U <sub>1</sub> 20		U <sub>1</sub> 56	
U <sub>1</sub> 21		U <sub>5</sub> 1	ICP22
U <sub>1</sub> 22	gH	U <sub>5</sub> 2	
U <sub>1</sub> 23	Thymidine kinase, TK	U <sub>5</sub> 3	Protéine kinase sérine/thréonine
U <sub>1</sub> 24		U <sub>5</sub> 4	gG
U <sub>1</sub> 25	Protéine d'empaquetage de l'ADN	U <sub>5</sub> 5	gJ
U <sub>1</sub> 26	Protéines d'échafaudage VP21 et VP24 (protéase)	U <sub>5</sub> 6	gD
U <sub>1</sub> 26.5	Pré-VP22a et VP22a, protéines d'échafaudage	U <sub>5</sub> 7	gI
U <sub>1</sub> 27	gB	U <sub>5</sub> 8	gE
U <sub>1</sub> 28	ICP18.5, sous-unité du complexe de la terminase	U <sub>5</sub> 8.5	
U <sub>1</sub> 29	ICP8	U <sub>5</sub> 9	
U <sub>1</sub> 30	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase	U <sub>5</sub> 10	
U <sub>1</sub> 31		U <sub>5</sub> 11	Protéine de liaison à l'ARN
U <sub>1</sub> 32	Protéine d'empaquetage de l'ADN	U <sub>5</sub> 12	ICP47
U <sub>1</sub> 33	Sous-unité du complexe de la terminase		