

*L'illustration de la page de couverture est inspirée de l'œuvre « Le parapluie Revel » de Leonetto Cappiello (1922). Ce dessin symbolise le modèle de protection, conférée par gp180 et ses glycanes, au devant des épitopes vulnérables de gB, gH et gL vis-à-vis de la neutralisation par les Ac.*

## **Remerciements**

*La traversée du désert...voilà une expérience qui peut prendre des couleurs très différentes. Seul, on peut y rencontrer des mirages, des pistes sans issue et un soleil aveuglant. Guidé, on peut y trouver son chemin et déceler au cœur des étendues arides, les plus belles richesses...Une thèse de Doctorat est un parcours périlleux au cours duquel cependant, j'ai toujours été excessivement bien encadrée et épaulée. Cette aide et ces conseils m'ont portée jusqu'à cette présentation aujourd'hui. Pour l'ensemble du soutien apporté par mon promoteur et par mes proches...Merci.*

*Tout particulièrement donc, je tiens à remercier mon promoteur, le Dr Laurent Gillet, pour sa disponibilité ainsi que pour l'optimisme et les encouragements qui m'ont relevée dans les moments difficiles. J'admire son courage, sa conscience du travail et je voudrais lui témoigner toute ma gratitude pour l'aide qu'il m'a accordée. Par son expérience précieuse et par ses réflexions avisées, il m'a guidée pas à pas jusqu'à l'accomplissement de cette étude.*

*Je souhaite également remercier le Professeur Alain Vanderplasschen pour ses conseils, sa clairvoyance et pour la confiance qu'il a placée dans mon travail. De plus, par sa passion communicative pour la science et par son éloquence, il a éveillé chez moi un grand enthousiasme pour la recherche fondamentale. Je tiens à exprimer ma reconnaissance pour cette découverte et pour mon intégration au sein d'une équipe scientifique dynamique et accueillante.*

*Je remercie également les membres de mon comité d'accompagnement, les Professeurs Jacques Piette et Daniel Desmecht pour leurs remarques constructives et leurs encouragements.*

*Cette thèse est le produit de plusieurs collaborations. Aussi je tiens à remercier l'ensemble des scientifiques qui se sont impliqués dans ce travail. En particulier, je suis reconnaissante envers Nicolas Markine-Goriaynoff pour l'encadrement de mon stage en immunologie, envers Christophe Bona pour l'initiation des recherches sur le complément, envers Sieberth Do Nascimento Brito pour sa contribution dans certaines manipulations, envers le Dr J.D. Lambris (University of Pennsylvania, USA) pour son envoi de compstatin. Je remercie encore Katalin de Fays pour la construction du virus délété pour le gène Bo10, le Dr Jan Mast pour ses analyses de microscopie électronique, le Dr. Benjamin Dewals pour ses relectures, le Dr Philip G. Stevenson (University of Cambridge, UK) pour ses corrections précieuses et ses conseils.*

*De très nombreuses personnes au sein du laboratoire ont contribué par leur aide concrète, par leurs avis ou par leur soutien général, à la réalisation de cette thèse. Parmi celles-ci, je voudrais adresser un clin d'œil particulier à ma collègue Céline pour son amitié, sa complicité et le partage de son expérience.*

*Je voudrais également remercier l'ensemble de l'équipe technique pour son appui dans mes recherches. Lorène tout d'abord, pour sa grande disponibilité et sa complaisance devant l'ampleur de mes « exigences en cellules MDBK », Antoine pour sa vigilance qui a compensé quelques-unes de mes distractions mais également Cédric, François, Christine, Dominique et Charles pour leur renfort lors de mes manipulations.*

*Intégrer une équipe de travail aussi stimulante et chaleureuse a donné à ces quatre années de recherches, une qualité particulière. En plus des personnes déjà citées, je voudrais remercier tous les (ex) membres du laboratoire d'immunologie et de virologie qui m'ont accompagnée au cours de cette thèse : Le Professeur Etienne Thiry, Christel, Benjamin, Bérengère, Sophie, Bérénice, Hélène, Muriel, Guillaume, Stalin, Ping, Krzysztof, Maygane, Léonore, Françoise, Elisabeth, Axel, Julien, Alexandra, Damien, Caroline, Fabiana, Ludovic, Angélique, Benoît, Jessica,..., vous tous avec qui j'ai partagé des moments savoureux. Je voudrais aussi formuler un merci tout particulier à Christina pour sa relecture attentive, à Sarah pour son énergie et sa sollicitude, à Sylvie pour le partage de ses connaissances dans des domaines aussi divers que la biologie, la biochimie, l'informatique...mais aussi l'architecture et la gastronomie!*

*J'aimerais enfin accorder une pensée à chacun de mes proches et à l'ensemble de ma famille pour leur soutien. En particulier, j'adresse un immense merci à ma grand-mère, MamyLou, pour son empathie, son aide et son amour pour moi, à mon grand-père, à mes parents pour leur profonde tendresse, à mon frère pour son affection, à mon parrain et à Martine pour leur disponibilité, à ma belle-famille pour ses attentions et sa présence à mes côtés.*

*Mes amis les plus chers m'ont épaulée tout au long de ce parcours. Parmi eux, je tiens à remercier du fond du cœur Julie et Damien, Christelle et Fred pour leur soutien précieux qui m'accompagne depuis toujours, Sarah et Aude pour leur amitié et ces temps de midi partagés qui m'ont beaucoup réconfortée. Merci encore à toi Jean-Christophe pour ton souci et ta générosité, à toi Charlotte pour ta gentillesse, à toi Claire pour ta complicité, à vous tous enfin, qui m'avez donné l'élan et le courage de poursuivre ce travail jusqu'au bout.*

*Et puis, il y a vous deux...Lionel et Norah. Une traversée du désert peut être longue et douloureuse mais il me reste l'indéfinissable bonheur de votre existence sur le bord du chemin. Merci à toi Lio pour ta sincérité, à toi ma petite fille pour tes sourires et pour les moments merveilleux que je découvre à tes côtés.*

*Ce travail a été réalisé grâce au mandat d'Aspirant que le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) m'a octroyé. Je remercie particulièrement cette institution de m'avoir permis de réaliser cette thèse en recherche fondamentale.*

## *Table des matières*

<b>Préambule</b>	2
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	3
1. <b>Les <i>gammaherpesvirinae</i></b>	4
1.1. <b>Nomenclature et classification</b>	4
1.2. <b>Importance des <i>gammaherpesvirinae</i> en médecine vétérinaire et en médecine humaine</b>	5
1.3. <b>Problèmes majeurs du contrôle de l'infection</b>	9
2. <b>L'herpèsvirus bovin 4</b>	12
2.1. <b>Le BoHV-4 en recherche clinique</b>	12
2.1.1. Epidémiologie	12
2.1.2. Spectre d'hôtes <i>in vivo</i>	13
2.1.3. Pathologies et signes cliniques associés au BoHV-4	15
2.1.4. Pathogénie de l'infection chez le bovin	18
2.1.5. Réponse immune	19
2.2. <b>Le BoHV-4 en recherche fondamentale</b>	21
2.2.1. Spectre d'hôtes <i>in vitro</i>	21
2.2.2. Culture virale et effet cytopathogène	22
2.2.3. Cycle de multiplication virale <i>in vitro</i>	22
<i>L'infection productive</i>	22
<i>L'infection latente</i>	24
2.2.4. Biologie Moléculaire	25
<i>Génome viral</i>	25
<i>BAC cloning</i>	28
<i>Glycoprotéines virales</i>	30
- Glycoprotéines conservées	32
- Glycoprotéines additionnelles	38
3. <b>Le gène Bo10 et ses homologues positionnels chez les gammaherpèsvirus</b>	39
3.1. <b>Bo10</b>	39
3.2. <b>EBV gp350/220</b>	39
3.3. <b>KSHV K8.1A</b>	41
3.4. <b>MuHV-4 gp150</b>	42



---

<b>Chapitre 2 : Objectifs</b>	45
<b>Chapitre 3 : Section expérimentale</b>	47
<b>3.1. Etude I :</b>	48
Le gène Bo10 de l'herpèsvirus bovin 4 encode une protéine virale d'enveloppe non essentielle qui oriente le tropisme du virus par une régulation positive et négative.	
<i>“The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a non-essential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects”.</i>	
<b>3.2. Etude II :</b>	64
Un gammaherpèsvirus évade la réponse humorale par la formation d'un bouclier de O-glycans.	
<i>“Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield”.</i>	
<b>3.3. Etude III :</b>	85
Le sérum humain neutralise l'herpèsvirus bovin 4 par un mécanisme inné dépendant des anticorps naturels.	
<i>“Natural antibody-complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum”.</i>	
<b>3.4. Etude IV :</b>	99
L'épissage alternatif permet à un gammaherpèsvirus d'orienter son tropisme.	
<i>“Alternative splicing switches tropism of a gammaherpesvirus”.</i>	
<b>Chapitre 4 : Discussion générale</b>	114
<b>Chapitre 5 : Résumé – Summary</b>	128
<b>Chapitre 6 : Références bibliographiques</b>	135

*Liste des abréviations*

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
A	Adénine
Ac	Anticorps
acide aminé	aa
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AG	Appareil de Golgi
AIHV-1	<i>Alcephaline herpesvirus 1</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
anti-Bo10-c15	<i>Monospecific polyserum against the C-term end of the gp180 protein</i>
ARN/RNA	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
ATCC	<i>American type culture collection</i>
AtHV	<i>Ateline herpesvirus</i>
$\beta$ 1,6GnT	$\beta$ -1,6-Nacétylglucosaminyltransférase
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BCBL	<i>Body cavity based lymphoma</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
BoHV-1	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
BoHV-4	<i>Bovine herpesvirus 4 (Anc. BHV-4)</i>
BOMAC	<i>Bovine macrophage cell</i>
BORF	<i>Bovine herpesvirus 4 ORF</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
C	Cytosine
C2GnT-M	core 2 $\beta$ -1,6-Nacétylglucosaminyltransférase de type mucinique
CBA	<i>Carbohydrate binding agent</i>
CCD	<i>Charged-couple device</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CeHV	<i>Cervid herpesvirus</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHX	Cycloheximide
CMC	Carboxyméthylcellulose
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMS	Cellules mononucléées sanguines
CMV	Cytomégalovirus
CR2	<i>Complement receptor 2</i>
CS	Chondroïtine sulfate
DPOL	<i>DNA polymerase</i>
DTT	Dithiothreitol
dUTPase	dUTP nucléotide hydrolase
E	<i>Early (Syn. <math>\beta</math>)</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>

EBERs	<i>Epstein-Barr virus early RNAs</i>
EBL	<i>Embryonic bovine lung</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
EBOV GP	glycoprotéine GP du virus EBOLA
EBTr	<i>Embryonic bovine trachea</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescence protein</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EHV-2	<i>Equid herpesvirus 2</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	<i>Electron microscopy</i>
épitope gal	Epitope galactose $\alpha$ -1, 3- galactose $\beta$ -1,4-Nacétylglucosamine
exo	Exonucléase alcaline
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGARAT	$\alpha$ -N-formylglycineamide ribonucléotide aminotransférase
FLICE	<i>FADD-like interleukine-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i>
G	Guanine
GAG-	<i>GAG negative</i>
GAG+	<i>GAG positive</i>
GAGs	Glycosaminoglycans
galK	Galactokinase
GAM	<i>Goat anti-mouse</i>
gB/H/L/M/N	Glycoprotéine B/H/L/M/N
gB-NT	Extrémité N-terminale de gB
gp	Glycoprotéine
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GT	$\alpha$ -1,3-galactosyltransférase
GVP	<i>Glycosylated viral polypeptide</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HHV-4	<i>Human herpesvirus 4</i>
HHV-8	<i>Human herpesvirus 8 (Anc. KSHV)</i>
HI	<i>Heat inactivated</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HS	<i>Heparan sulfate</i>
HSV-1	<i>herpesvirus simplex 1</i>
HVA-2	<i>Aotus herpesvirus 2</i>
ICA	<i>Infectious center assay</i>
ICTV	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
IE	<i>Immediate early (Syn. <math>\alpha</math>)</i>
IFI	Immunofluorescence indirecte
Ig	Immunoglobuline
IR	<i>Internal repetition</i>

kDa	Kilo Dalton
KO	<i>Knockout</i>
Kpb	Kilo paires de base
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma herpesvirus</i>
L	<i>Late (Syn. <math>\gamma</math>)</i>
LANA	<i>Latency associated nuclear antigen</i>
LAT	<i>Latency-associated transcript</i>
LCL	<i>Lymphoblastoïd cell line</i>
LCT	<i>Lymphosarcoma calf thymus</i>
LMP	<i>Latent membrane protein</i>
LTP	<i>Long tegument protein</i>
LTR	<i>Left terminal region</i>
LUR	<i>Long unique region</i>
m.o.i.	<i>Multiplicity of infection</i>
Mab	<i>Monoclonal antibody</i>
Man	Mannose
MBL	<i>Mannan-binding lectin</i>
MCP	<i>Major capsid protein</i>
MDBK	<i>Madin Darby bovine kidney</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
miRNA	<i>MicroRNA</i>
MM	Masse moléculaire
MMA	Masse moléculaire apparente
mRNA	ARN messenger
MssDBP	<i>Major single strand DNA binding protein</i>
MuHV-4	<i>Murid herpesvirus 4</i>
NAc	Nacétylglucosamine
neg	<i>PCR negative control</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
Ori	Origine de réplication
Ori lyt	Origine de réplication lytique
OriP	Origine de réplication latente
OvHV-2	<i>Ovine herpesvirus 2</i>
PAA	<i>Phosphonoacetic acid</i>
PAb	<i>Polyclonal antibody</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Paire de base
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEL	<i>Primary effusion lymphoma</i>
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PGNase F	<i>Peptide N-glycosidase F</i>
PH	Domaine homologue de la pleckstrine
pi	<i>Post infection</i>
pK	protéinase K

PK	Protéine kinase
prDNA	<i>polyrepetitive DNA</i>
R	Séquence répétée
RACE	<i>Rapid amplification of 5' complementary DNA ends</i>
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RPMI	<i>Roswell park memorial Institute</i>
RR1	Grande sous-unité de la ribonucléotide réductase
RRs	Petite sous-unité de la ribonucléotide réductase
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RTR	<i>Right terminal region</i>
SaHV-2	<i>Saimiriine herpesvirus 2 (Anc. HVS)</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error on the mean</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIS	<i>Soft imaging system</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SK	Sarcome de Kaposi
STP	<i>Saimiri transformation associated protein</i>
SV40pa	<i>Simian virus 40 pA</i>
T	Thymine
TGX	<i>Tris-glycine-extended</i>
TK	Thymidine kinase
TM	Transmembranaire
TPA	<i>Tetradecanoyl phorbol acetate</i>
TR	<i>Terminal repetition</i>
TS	Thymidilate synthétase
TX-100	Triton X-100
UGD	<i>uracil DNA glycosidase</i>
UI	<i>uninfected cell sample</i>
U <sub>L</sub>	<i>Unique sequence long</i>
U <sub>S</sub>	<i>Unique sequence short</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
v-Bcl-2	<i>Viral B-cell lymphoma 2</i>
VERO	<i>Verda Reno (Rein vert en Esperanto; cellules épithéliales de rein de singe vert)</i>
v-Flip	<i>Viral FLICE inhibitory protein</i>
v-IL10	<i>Viral interleukine 10</i>
vol	<i>Volume</i>
VP	<i>Viral polypeptide</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
VZV	<i>Varicella zoster virus</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	<i>Wild-type</i>

## *Préambule*

La sous-famille des *gammaherpesvirinae* regroupe un ensemble de virus humains et animaux ubiquistes. L'*Eptein Barr virus* (EBV) et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) sont deux gammaherpèsvirus humains qui infectent respectivement plus de 90% (Pearson *et al.*, 1970) et 30% (Verma & Robertson, 2003a) de la population. Alors que l'infection par ces virus reste la plupart du temps asymptomatique, elle peut être à l'origine de différents cancers chez certains individus. Le contrôle de l'infection des gammaherpèsvirus est un défi difficile. En effet, ils sont capables d'établir une infection persistante, une réactivation et une réexcrétion sous forme de virions libres infectieux, en dépit des anticorps (Ac) spécifiques de l'hôte. Les gammaherpèsvirus ont donc évolué pour échapper à la neutralisation par ces Ac. Malgré l'intérêt majeur accordé à l'EBV et au KSHV, leur croissance difficile *in vitro* et l'absence de modèle d'infection *in vivo* accessible, limitent considérablement l'avancée des recherches. Pourtant, définir les mécanismes d'évasion de la réponse humorale est primordial pour contrôler leur infection et mettre au point des essais vaccinaux. L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) constitue un modèle bien défini de l'étude de la biologie de l'infection des gammaherpèsvirus. Aussi, ce travail s'est concentré sur ce virus pour adresser ces questions fondamentales.

Pour étudier l'évasion de la neutralisation par les Ac, une première étape consiste à préciser le rôle des glycoprotéines impliquées dans l'entrée du virus. Chez les gammaherpèsvirus, outre le complexe conservé des glycoprotéines B, H et L (gB, gH, gL), des protéines additionnelles sont également présentes. Parmi celles-ci, la glycoprotéine gp350 de l'EBV lie les récepteurs CD21 des lymphocytes B et constitue une cible de neutralisation pour l'infection de ces cellules (Thorley-Lawson & Poodry, 1982). Cependant, les Ac anti gp350 améliorent l'efficacité de l'infection des cellules épithéliales (Turk *et al.*, 2006). La relation entre la transmission du virus, gp350 et les Ac spécifiques mérite donc d'être investiguée davantage. Tous les gammaherpèsvirus possèdent un homologue du gène codant pour gp350. Chez le BoHV-4, le gène homologue est représenté par Bo10.

Le manuscrit de cette thèse est consacré à la caractérisation du gène Bo10 et à l'étude de ses rôles au cours de l'infection du BoHV-4 *in vitro* et *in vivo*. Cette présentation s'articule autour de deux parties principales : une introduction générale et une partie expérimentale. L'introduction comporte trois chapitres : une présentation succincte de la sous-famille des *gammaherpesvirinae* et du défi que représente le contrôle de leur infection, une synthèse des informations disponibles sur le BoHV-4 et enfin, un résumé des caractéristiques connues des homologues du gène Bo10 au sein des gammaherpèsvirus. A la suite de cette courte revue, les objectifs spécifiques de cette thèse seront énoncés. Sur cette base, quatre études originales seront détaillées au cours de la partie expérimentale. Enfin, une discussion finale analysera l'ensemble des résultats obtenus et présentera brièvement quelques-unes des perspectives qu'ils génèrent.

---

1.

## **Introduction**

---

## 1. Les *gammaherpesvirinae*

### 1.1. Nomenclature et classification

Les *gammaherpesvirinae* représentent avec les *alpha-* et *betaherpesvirinae* l'une des trois sous-familles constituant la famille des *Herpesviridae*. Les *Herpesviridae* comportent plus de 120 virus à ADN de grande taille, regroupés selon des caractéristiques communes (Ackermann, 2004; Davison *et al.*, 2005). Tout d'abord, ces virus présentent une morphologie semblable caractérisée par un ADN double brin linéaire ainsi que de quelques molécules d'ARN (Bresnahan & Shenk, 2000), une nucléocapside de symétrie icosaédrique de 162 capsomères, un tégument composé d'une substance amorphe contenant des protéines avec une activité régulatrice et une enveloppe à partir de laquelle se projettent les glycoprotéines virales (Figure 1). La particule apparaît sphérique avec un diamètre d'environ 150 à 300 nm. De plus, outre cette architecture commune, les *Herpesviridae* partagent aussi des propriétés biologiques spécifiques (Ackermann, 2004). Premièrement, ils possèdent leur propre machinerie enzymatique intervenant dans le métabolisme des acides nucléiques. Deuxièmement, la synthèse de l'ADN et l'assemblage de la capside se déroulent dans le noyau de la cellule infectée. Troisièmement, tous les herpesvirus étudiés à ce jour sont capables de se maintenir à l'état latent chez leur hôte naturel. Enfin, la production de particules virales infectieuses s'accompagne presque systématiquement de la mort cellulaire.

La classification en trois sous-familles fut réalisée à l'origine sur base de critères biologiques tels que l'étendue du spectre d'hôtes, la multiplication *in vitro*, le site de latence *in vivo* (Roizman, 1996). Ainsi, la majorité des cellules infectées par les *alpha-* ou *betaherpesvirinae* supportent une infection lytique tandis que seules quelques cellules spécifiques autorisent la mise en place de l'infection latente. A l'inverse, les *gammaherpesvirinae* semblent initier préférentiellement l'infection latente tandis que l'infection répliquative ne concerne qu'un ensemble mineur de cellules (Ackermann, 2006). Le spectre d'hôtes d'un virus est déterminé par la sensibilité et la permissivité des cellules cibles. Historiquement, l'étendue du spectre d'infection des *gammaherpesvirinae* a été considérée comme étroite. Cependant, le fait que les *gammaherpesvirinae* initient préférentiellement le cycle latent plutôt que l'infection lytique a renforcé cette notion de spectre très étroit et a dès lors introduit un biais (Ackermann, 2006). De plus, parmi les propriétés partagées par la plupart des gammaherpèsvirus, on peut citer leur capacité d'infecter des cellules mononuclées sanguines (CMS) *in vitro* ainsi que leur persistance à l'état latent dans les organes lymphoïdes *in vivo*. L'infection, par ailleurs, est fréquemment associée à des désordres lymphoprolifératifs. Enfin, une autre caractéristique de la sous-famille des *gammaherpesvirinae* est que la plupart des virus ne se répliquent pas facilement, voire pas du tout, en culture de cellules. Cette particularité, ainsi que l'établissement précoce de la



latence, ont considérablement compliqué l'étude des *gammaherpesvirinae* et expliquent pourquoi il persiste encore une certaine confusion ainsi que des informations contradictoires dans la littérature.

La classification est aujourd'hui complétée par des critères moléculaires plus objectifs et a pu être confirmée en grande partie par des analyses phylogénétiques (Davison *et al.*, 2002; McGeoch *et al.*, 1995; McGeoch *et al.*, 2000; McGeoch *et al.*, 2005).

Récemment mise à jour au cours de la période 2002-2005 selon les recommandations de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV; <http://www.ictvonline.org>), la classification de la sous-famille des *gammaherpesvirinae* comporte quatre genres distincts (Table 1) : les *lymphocryptovirus* comportant l'EBV ou *human herpesvirus 4* (HHV-4) et des virus de primates de l'Ancien Monde, les *rhadinovirus* comportant le KSHV ou *human herpesvirus 8* (HHV-8), plusieurs virus de primates de l'Ancien et du Nouveau Monde ainsi que d'autres virus de mammifères, les *Percavirus* (pour **p**erissodactyl et **c**arnivore) dont le prototype est *l'equid herpesvirus 2* (EHV-2) et les *Macavirus* (pour **M**alignant **c**atarrhal fever) dont le prototype est *alcelaphine herpesvirus 1* (AIHV-1). La nouvelle désignation des *Percavirus* et *Macavirus* a pris en compte la caractérisation récente des virus *Bovine herpesvirus 6*, *Caprine herpesvirus 2*, *Suid herpesvirus 3*, *Suid herpesvirus 4* and *Suid herpesvirus 5* ainsi que les spécificités des hôtes naturels (artiodactyles versus périssodactyles) (Chmielewicz *et al.*, 2001; Chmielewicz *et al.*, 2003; Davison *et al.*, 2009).

## 1.2. Importance des *gammaherpesvirinae* en médecine vétérinaire et en médecine humaine

La sous-famille des *gammaherpesvirinae* regroupe un ensemble de virus de mammifères (Table 1) parmi lesquels certains représentent un intérêt majeur pour la médecine humaine ou vétérinaire ainsi que pour la recherche fondamentale. Parmi ceux-ci, l'AIHV-1, l'*ovine herpesvirus 2* (OvHV-2), le BoHV-4, l'EHV-2, le *murid herpesvirus 4* (MuHV-4) ainsi que les virus humains, KSHV et EBV, sont les mieux étudiés.

De manière intéressante, les conséquences des infections par les gammaherpèsvirus ne dépendent pas seulement du virus lui-même mais également des espèces cibles et du type de cellules infectées. Par exemple, alors que les virus AIHV-1 et OvHV-2 (appartenant au genre *Macavirus*) sont parfaitement adaptés à leur hôte naturel respectif, le gnou et le mouton, au point d'être apparemment apathogènes, ils sont capables d'infecter des espèces aussi diverses que les bovins, les suidés mais également les lagomorphes ou encore le rat, le hamster et de provoquer chez ces culs-de-sac épidémiologiques, de profondes dysrégulations du système immunitaire (Russell *et al.*, 2009). Ainsi, ces deux virus provoquent un syndrome souvent léthal, connu sous le nom de « fièvre catarrhale maligne » ou « coryza gangréneux » chez des espèces sensibles comme les bovins. Cette entité clinique, dont le taux de mortalité s'élève à plus de 50%, se caractérise par une fièvre intense et

persistante, des lésions lymphoprolifératives atteignant l'ensemble des muqueuses des tractus respiratoires antérieur et digestif, les vaisseaux sanguins et les organes lymphoïdes. Représenté par 2 formes semblables, la forme africaine (AIHV-1) et la forme européenne (OvHV-2), le coryza gangréneux a été décrit cliniquement chez 33 espèces de ruminants domestiques et sauvages (Metzler & Burri, 1990) et sévit sur l'ensemble des continents (Mushi & Rurangirwa, 1981).

L'EHV-2 (appartenant au genre *Percavirus*) représente également un agent très bien adapté à son hôte naturel. Très prévalent, ce virus se distribue dans le monde entier et a été isolé d'individus sains, comme d'animaux malades, soulevant alors la question controversée de son caractère pathogène. Alors que l'EHV-2 pourrait jouer un rôle de réactivateur d'autres herpesvirus équin, ce virus a été associé à certaines pathologies respiratoires des voies supérieures, à de l'hyperthermie, à une baisse de l'état général et à certaines formes de kératoconjonctivite (Dunowska *et al.*, 2002; Ruszczuk *et al.*, 2004). L'infection par l'EHV-2 n'est pas strictement réduite aux chevaux domestiques puisque ce virus a été isolé chez 2 autres espèces au sein de genre *Equus*: le cheval de Przewalski et le zèbre de montagne (Borchers *et al.*, 1999). De plus, l'infection expérimentale de la souris a permis de mettre en évidence la persistance du virus dans les poumons et les cellules spléniques (Borchers *et al.*, 2002; Rizvi *et al.*, 1997).

Le MuHV-4 (appartenant au genre *Rhadinovirus*) est considéré comme le modèle prototype pour l'étude de la pathogénie des gammaherpèsvirus. Initialement isolé à partir du campagnol roux (*Myodes Glareolus*) (Blaskovic *et al.*, 1980), le MuHV-4 est pourtant communément étudié chez la souris. Malgré la distance phylogénétique significative séparant le campagnol de la souris, une étude récente a démontré que les sites de réplication et de latence étaient comparables au sein de ces deux espèces et a confirmé la valeur du « modèle souris » pour l'étude de la pathogénie des gammaherpèsvirus (Francois *et al.*, 2010). Après une infection intra-nasale, le virus se réplique au niveau des cellules épithéliales du poumon et se propage au niveau des tissus lymphoïdes pour atteindre principalement les lymphocytes B et les macrophages. Ainsi, après la phase aiguë de l'infection mimant le syndrome de la mononucléose infectieuse, le MuHV-4 persiste à l'état latent principalement dans les cellules B mémoires résidant au niveau de la rate et provoque une splénomégalie limitée. (Flano *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2003; Willer & Speck, 2003).

Les deux gammaherpèvirus importants en médecine humaine sont l'EBV et le KSHV. Découvert il y a plus de 50 ans, l'EBV, particulièrement, est l'objet de très nombreuses recherches. Appartenant au genre *lymphocryptovirus*, l'EBV est distribué partout dans le monde et infecte plus de 90% de la population humaine adulte (Andersson, 2000; Henle *et al.*, 1969). A l'origine d'une infection persistante généralement asymptomatique, ce virus peut pourtant provoquer, chez certains hôtes immunodéprimés, de graves pathologies (Thorley-Lawson & Gross, 2004). Au cours de l'infection primaire, l'EBV se réplique dans les cellules épithéliales de l'oropharynx avant de s'établir à l'état latent dans les lymphocytes B. La transmission du virus, qui se réalise principalement par transfert de salive (Hadinoto *et al.*, 2009), peut passer inaperçue ou bien se manifester par le syndrome

de la mononucléose infectieuse (Callan *et al.*, 1996). La phase aiguë de cette pathologie est caractérisée par une lymphadénopathie cervicale, de la fièvre et une pharyngite. Cette phase aiguë se poursuit ensuite par un malaise et une fatigue générale qui peut persister plusieurs mois (Kim & Kopelman, 2005). Par la suite, la défense immunitaire et plus particulièrement les réponses des cellules T CD4+ et CD8+ se mettent en place efficacement, contrôlent la manifestation clinique de l'infection et assurent l'homéostasie entre le virus et son hôte. L'importance de la surveillance assurée par les cellules T de l'hôte est bien illustrée par l'incidence augmentée de lésions lymphoprolifératives chez les patients recevant des thérapies immunosuppressives à la suite de transplantation. Chez ces patients, comme chez les individus atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou d'une malaria chronique, le portage latent de l'EBV peut donner lieu à l'émergence de cancers tels que le lymphome de Burkitt, la maladie d'Hodgkin, le carcinome nasopharyngien (Figure 2), le carcinome gastrique ainsi que d'autres désordres prolifératifs.

*In vitro*, l'EBV infecte facilement les lymphocytes B et provoque presque toujours la transformation de ces cellules en lymphoblastes prolifératifs (LCL) (Diehl *et al.*, 1968; Pope *et al.*, 1968). Le mécanisme de cet effet dépend de l'expression de protéines virales au cours de la latence. Le profil d'expression des gènes à l'origine de cette transformation cancéreuse est appelé « programme de croissance » (« *growth program* »). L'étude de ces cellules LCL a permis de mettre en évidence les gènes, en nombre limité, qui étaient exprimés au cours de l'infection *in vitro*. Ainsi, six protéines nucléaires sont décrites comme étant exprimées dans les LCL : *Epstein Barr nuclear antigen-1*, (EBNA-1), EBNA-2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA-3, EBNA-LP. Quatre protéines de membrane sont également exprimées dans les LCL : *Latent membrane protein 1* (LMP1), LMP2A, LMP2B, BHRF1 et un nombre variable d'ARN non codants (Rowe *et al.*, 2009). Les microARN (miRNA) encodés par l'EBV au sein des cellules LCL peuvent être regroupés en deux clusters. Une étude récente a démontré que le cluster de miRNA situé de manière adjacente au gène BHRF1 potentialisait considérablement les propriétés de transformation des cellules LCL par l'EBV. Selon cette étude, ces miRNA augmentent simultanément l'expansion virale par la prolifération des cellules infectées et réduit l'exposition antigénique du virus en diminuant le niveau d'expression des gènes latents (Feederle *et al.*, 2011). De plus, outre la caractérisation de l'infection de l'EBV au niveau des cellules LCL, l'étude de l'expression des gènes latents de l'EBV au niveau des tissus tumoraux a mis en évidence la complexité du cycle de ce virus *in vivo*. En effet, plusieurs programmes différents de transcription sont utilisés par l'EBV pour mettre en place et maintenir l'infection (Thorley-Lawson & Gross, 2004). Ces programmes se distinguent par l'expression différente des gènes du virus et par le type de cellules hôtes.

L'HHV-8 est également le centre de nombreuses recherches tant fondamentales que cliniques ou épidémiologiques. Isolé il y a une quinzaine d'années à partir de lésions tumorales décrites sous le terme de sarcome de Kaposi (SK), ce virus est maintenant connu pour son caractère oncogène et son implication dans l'émergence de différents sarcomes ainsi que des désordres

lymphoprolifératifs comme la maladie de Castelman ou la *Primary effusion lymphoma* (PEL). Alors que l'infection par le KSHV concerne plus de 30% de la population humaine mondiale (Verma & Robertson, 2003a), c'est surtout en Afrique que les cancers associés à ce virus sont les plus prévalents (Figure 2). En effet, le sarcome de Kaposi est maintenant la tumeur la plus fréquente rencontrée chez les patients souffrant d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Mesri *et al.*, ; Young & Rickinson, 2004). Les voies de transmission de l'HHV-8 ne sont pas encore parfaitement définies et pourraient varier en fonction de la pression d'infection exercée par le virus. Ainsi, dans les pays où la prévalence de l'infection est élevée, une transmission non sexuelle est rapportée (de Sanjose *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 1998). Par contre, dans les régions où la pression d'infection est plus faible, il semble que la voie prédominante de transmission du virus soit les comportements homosexuels (Goudsmit *et al.*, 2000). La transmission de l'HHV-8 au cours de rapports hétérosexuels fait encore l'objet de controverses (Malope *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1996).

Les lésions issues du SK se caractérisent par une grande diversité dans le type cellulaire transformé (Herndier & Ganem, 2001; Regezi *et al.*, 1993) et par une néovascularisation précoce et abondante (Hanahan & Folkman, 1996). Les manifestations évoluent depuis des lésions plates dans le derme vers des plaques oedématisées puis vers des nodules violacés. Au niveau histologique, la signature du SK est représentée par des cellules fusiformes, « spindle cells », présentant pour la plupart des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales (Ensoli *et al.*, 2001; Staskus *et al.*, 1997) et pour une minorité d'entre elles, des marqueurs spécifiques des fibres musculaires lisses (Regezi *et al.*, 1993). Cependant, malgré la présence évidente du virus au sein de ces cellules « spindle cells » transformées, les cibles cellulaires initiales du KSHV sont les lymphocytes B (Ambroziak *et al.*, 1995) comme la plupart des gammaherpèsvirus. Au cours de la latence, le KSHV exprime également un nombre très restreint de gènes: les gènes codant pour la protéine nucléaire associée à la latence (LANA), les protéines v-cyclin et v-FLIP (*viral FLICE inhibitory protein*), les protéines Kaposines A, B, C ainsi que 18 miRNA.

Alors que le potentiel oncogénique des deux gammaherpèsvirus humains est incontestable à l'heure actuelle, l'incidence de ce processus est peut-être sous-estimée. En effet, plusieurs tumeurs humaines, dans lesquelles aucun virus n'est isolé, ont pourtant potentiellement une origine virale (Shimizu *et al.*, 1994; Srinivas *et al.*, 1998). Cet effet désigné sous le terme « *hit and run* » décrit que l'infection par un virus oncogène peut induire une instabilité génétique et/ou une dysrégulation épigénétique à l'origine de l'initiation puis de la maintenance de la transformation de la cellule infectée (Niller *et al.*, 2010; Pagano *et al.*, 2004; zur Hausen, 1999). Par la suite, la perte du génome viral ne change rien à la progression néoplasique suite à l'altération des fonctions cellulaires (Niller *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 1997).

### 1.3. Problème majeur du contrôle de l'infection

Les gammaherpèsvirus représentent l'archétype des virus persistants. Bien adaptés à leur(s) hôte(s) naturel(s), ils ont évolué avec ces derniers pour trouver un équilibre entre pouvoir pathogène et infection à long terme. Cette coévolution leur a permis de développer des stratégies élaborées pour contourner la réponse immunitaire adaptative. En effet, ils sont capables de se maintenir chez un hôte tout au long de sa vie et de se transmettre entre individus en dépit de l'existence de la réponse immunitaire. Ainsi, des individus infectés produisent à la fois des Ac spécifiques et à la fois excrètent des virions infectieux. D'ailleurs, une propriété de nombreux herpèsvirus est leur capacité de surinfection d'un même hôte par plusieurs souches apparentées (Gorman *et al.*, 2006; Muylkens *et al.*, 2009). Ainsi, chez les gammaherpèsvirus, il n'est pas rare qu'un individu immunocompétent, infecté une première fois par l'EBV par exemple, puisse subir une surinfection par une souche un peu différente (Morgan & Khanna, 2007). Ces observations soulignent la difficulté de l'induction d'une immunité naturelle ou vaccinale efficace contre ces virus. Si les mécanismes d'évasion virale de la réponse cellulaire ont fait l'objet de nombreuses études et sont aujourd'hui mieux connus (Stevenson *et al.*, 2009; Tortorella *et al.*, 2000; Yewdell & Hill, 2002), la façon dont ces virus résistent à la neutralisation par les anticorps suscite encore de nombreuses interrogations. Pourtant, induire une production à long terme d'Ac neutralisants est la clé de voûte de toute vaccination anti-virale performante (Burton *et al.*, 2005; Hangartner *et al.*, 2006a).

Parmi les gammaherpèsvirus, l'EBV et le KSHV sont les pathogènes humains qui intéressent le plus la recherche actuelle. Aussi, les stratégies vaccinales étudiées jusqu'à présent concernent principalement ces deux virus. Cependant, de nombreuses contraintes rendent difficile le développement d'un vaccin à l'encontre de l'EBV et du KSHV. Parmi celles-ci, leur multiplication *in vitro* extrêmement limitée entrave l'avancée des recherches. Ainsi, l'infection *in vitro* par ces virus étant presque complètement non permissive, il n'est pas encore possible techniquement, de produire du virus à une concentration suffisante que pour permettre des essais vaccinaux, si modestes soient-ils, avec des particules virales tuées ou atténuées (Morgan & Khanna, 2007). Ensuite, étant donné que ces deux pathogènes ont été classés comme carcinogènes de grade I (1997) et que plusieurs de leurs gènes sont capables d'induire la transformation cancéreuse de certaines cellules, le recours à des vaccins vivants atténués ou recombinants comporte des risques conséquents (Morgan & Khanna, 2007). La composition d'un vaccin potentiel devrait dès lors être limitée aux composants viraux non impliqués dans la transformation cancéreuse (I.A.R.C., 1997).

D'autres propriétés des gammaherpèsvirus humains compliquent également le contrôle de leur infection ainsi que les études à leur sujet. Parmi celles-ci, on peut citer: le faible niveau d'antigènes exprimés lors de la latence, la diminution de la présentation des protéines virales de maintenance dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1, le tropisme élargi à différents types

cellulaires et enfin, l'absence de modèle *in vivo* accessible. Ces quatre points sont brièvement abordés ci-dessous.

L'EBV et le KSHV persistent majoritairement sous forme latente chez leur hôte. L'état latent est caractérisé par la présence du génome viral sous la forme d'un épisode et par l'expression réduite des gènes viraux. Par exemple, l'EBV se maintient, entre autres, au sein des cellules B mémoires périphériques et y établit un de ses programmes de latence au cours duquel l'expression génique est restreinte à quelques protéines (Babcock *et al.*, 1998). Par ailleurs, plusieurs gènes latents de l'EBV sont directement liés à la transformation cancéreuse des cellules (Griffin & Karran, 1984) tandis que différents microRNA exprimés eux aussi au cours de la latence, ont montré des fonctions anti-apoptotiques (Nanbo *et al.*, 2002). Concernant le KSHV, des études immunohistochimiques ont révélé qu'alors que presque toutes les cellules issues du sarcome de Kaposi expriment la protéine de latence LANA, encodée par le cadre de lecture ouvert (ORF) 73, seul un nombre restreint exprime les protéines lytiques du KSHV (Katano *et al.*, 2000b). Cette observation suggère que l'infection latente est la principale responsable de la transformation cancéreuse des cellules infectées par le KSHV (Grundhoff & Ganem, 2004). Cependant, de manière générale, les vaccins agissent pour limiter les infections/surinfections et empêcher la réactivation en ciblant les protéines lytiques du virus mais ils sont souvent impuissants à éliminer le virus au cours de son cycle latent. Plusieurs raisons expliquent cet échec. D'une part, l'expression réduite des gènes viraux limite le niveau d'exposition des antigènes. D'autre part, les protéines produites échappent à la surveillance par le système immunitaire (Blake, 2010; Stevenson, 2004). En effet, au cours de la latence, des protéines de « maintenance » sont exprimées. Représentées par la protéine EBNA1 chez l'EBV et la protéine LANA1 encodée par l'ORF73 chez le KSHV, ces protéines sont responsables de la distribution de l'épisode au sein des cellules en division (Ballestas *et al.*, 1999; Hyun *et al.*, 2001; Kapoor & Frappier, 2005; Komatsu *et al.*, 2001; Marechal *et al.*, 1999; Yates *et al.*, 1985). Pour préserver ces protéines de la détection par le système immunitaire, les gammaherpèsvirus ont élaboré des stratégies qui permettent à ces protéines de maintenance d'être exprimées au sein des cellules infectées latentes tout en étant dissimulées de la reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. Par exemple, au sein de la séquence de la protéine EBNA1 existe un domaine qui l'empêche d'une part, d'être processée et présentée dans le CMH de classe I (Levitskaya *et al.*, 1995) et d'autre part, d'être dégradée par le protéasome (Levitskaya *et al.*, 1997). Chez le KSHV, la séquence de LANA1 présente un domaine central acide constitué d'une répétition de glutamine, d'acide glutamique et d'acide aspartique (Blake, 2010). Ce domaine autorégule la traduction de la protéine et bloque la présentation des épitopes T au sein du CMH de classe I (Kwun *et al.*, 2007; Zaldumbide *et al.*, 2007).

Outre la stimulation de la réponse cytotoxique, le contrôle de l'infection virale repose sur la production d'Ac neutralisants. Alors que des tests de neutralisation *in vitro* montrent la capacité d'Ac préformés à bloquer complètement l'infection de plusieurs herpèsvirus, la neutralisation *in vivo* de ces mêmes virus est imparfaite et mal définie (Stevenson *et al.*, 2009). Cette neutralisation *in vivo* est en

effet étroitement dépendante des portes d'entrée du virus. Par exemple, l'infection des cellules B par des virions EBV libres est bloquée par des Ac dirigés contre la glycoprotéine majeure d'enveloppe gp350 (Thorley-Lawson & Geilinger, 1980). Cependant, l'échec d'une vaccination basée sur cette gp350 à réduire le taux de séroconversion envers l'EBV (Sokal *et al.*, 2007), suggère que l'infection des lymphocytes B par les virions libres n'est pas essentielle à la colonisation *in vivo* de l'hôte. L'infection initiale par les virions libres pourrait en effet concerner les cellules épithéliales sans engagement de la gp350 et gagner ensuite secondairement les cellules B par un contact de cellules en cellules (Janz *et al.*, 2000). Une compréhension approfondie du cycle viral *in vivo* et une connaissance précise du tropisme cellulaire est, dès lors, un prérequis essentiel pour le design rationnel d'un vaccin. Malheureusement, la biologie de l'infection *in vivo* des gammaherpèsvirus reste imparfaitement comprise et les différentes approches vaccinales testées jusqu'à présent, sur l'EBV par exemple, reposent sur des présomptions qui ne sont pas tout à fait confirmées (Morgan & Khanna, 2007).

Enfin, il est également difficile d'évaluer l'action d'un vaccin potentiel à l'encontre de l'EBV et du KSHV dans un modèle différent du modèle humain, suite à l'absence de modèle animal accessible supportant l'infection, la réplication et la transmission de ces virus. Les premières infections *in vivo* par l'EBV ont été réalisées chez des singes de l'Ancien Monde : le *common marmoset* ou « ouistiti commun » (*Callithrix jacchus*) (Cox *et al.*, 1996; de-The *et al.*, 1980; Falk *et al.*, 1976) supportant l'infection aiguë et persistante de l'EBV et le *cottontop tamarin* ou « pinché à crête blanche » (*Saguinus oedipus oedipus*) (Cleary *et al.*, 1985; Shope *et al.*, 1973; Shope & Miller, 1975; Young *et al.*, 1989) déclarant des désordres lymphoprolifératifs secondaires à l'infection. Concernant le KSHV, des essais expérimentaux réalisés sur des animaux transgéniques tels que les souris *severe combined immunodeficiency* (SCID) ont permis l'isolement du KSHV latent au sein des rates (Parsons *et al.*, 2006) et une étude récente a montré le succès de l'infection chez le *common marmoset* (*Callithrix jacchus*) par le KSHV (Chang *et al.*, 2009). Cependant, à l'heure actuelle, aucune infection productive par les gammaherpèsvirus humains chez des petits animaux immunocompétents n'a été rapportée (Sakamoto *et al.*, 2010). Par ailleurs, des modèles homologues existent pour des gammaherpèsvirus étroitement apparentés à l'EBV et au KSHV. Ainsi, le *macacine herpesvirus 4* encore nommé *rhesus lymphocryptovirus*, produit un syndrome lymphoprolifératif semblable à celui de l'EBV chez le macaque lors de co-infection avec le *simian immunodeficiency virus* (SIV) (Rivailler *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001a). De la même façon, le *macacine herpesvirus 5* ou *rhesus rhadinovirus*, associé au SIV, produit des symptômes comparables aux désordres tumoraux qu'induit l'infection du KSHV chez les patients immunodéprimés (Damania & Desrosiers, 2001; Mansfield *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999). Bien que pertinents pour l'étude de la pathogénie de l'infection des gammaherpèsvirus humains, le caractère peu accessible de ces modèles limite, là encore, le champ des investigations. Plusieurs études cliniques ont également été réalisées chez l'homme. Cependant, l'immunodépression secondaire à l'infection par l'EBV ou le KSHV pourrait également expliquer les difficultés à mettre au point des tests vaccinaux efficaces chez de tels patients. En effet, pour l'EBV, la

déclaration de désordres lymphoprolifératifs est souvent secondaire à l'affaiblissement des défenses immunitaires. Pour le KSHV, la population la plus concernée est représentée par les individus HIV positifs (Katano *et al.*, 2000a) et les conditions d'immunodépression subséquentes pourraient, là-aussi, interférer avec l'efficacité d'un schéma de vaccination (Sakamoto *et al.*, 2010).

## 2. L'herpèsvirus bovin 4

Le BoHV-4 est un des cinq herpèsvirus de bovins identifiés à ce jour (Roizman & Whitley, 2001; Rovnak *et al.*, 1998). Il a été isolé pour la première fois en 1966, en Hongrie, chez des bovins présentant des symptômes respiratoires et de la conjonctivite (souche Movar 33/63) (Bartha *et al.*, 1966). Il fut classé parmi les herpèsvirus suite à l'observation de sa structure en microscopie électronique (Bartha *et al.*, 1966). A partir de 1966, des souches apparentées à la souche Movar 33/63 d'un point de vue antigénique ou génomique ont été isolées dans de nombreux pays où elles ont reçu différentes dénominations regroupées, dès 1987, sous le nom de BHV-4 (*bovine herpesvirus 4*) (Bartha *et al.*, 1987). Récemment, l'ICTV a adopté la terminologie officielle « BoHV-4 » (Minson, 2000).

Le BoHV-4 a été isolé à partir d'échantillons variés, originaires d'animaux sains comme d'animaux présentant des pathologies diverses telles des endométrites, des avortements, des troubles respiratoires ou digestifs ou encore des problèmes cutanés mammaires (Donofrio *et al.*, 2005). Cependant, peu d'études ont réussi à reproduire expérimentalement une maladie clinique et le rôle du BoHV-4 en tant qu'agent pathogène reste incertain (Thiry, 1989).

### 2.1. Le BoHV-4 en recherche clinique

#### 2.1.1 Epidémiologie

Le virus a été identifié dans de nombreux pays, notamment en Europe, mais aussi en Afrique, en Amérique du Nord et en Asie. L'infection virale est signalée depuis longtemps en Europe. En Belgique, une étude menée en 1987 dénombrait 30 % des exploitations de Wallonie séropositives, contre 15 % en Flandre (Van Malderen, 1987). A la même époque, une autre étude révélait que 38 % des veaux de deux unités d'engraissement possédaient des anticorps dirigés contre le BoHV-4 (van Opdenbosch *et al.*, 1988). Aux Pays-Bas, le virus a pu être détecté dans 4 % des échantillons de lait issus de 54 vaches atteintes de mammite (Wellenberg, 2002). En 1986, une moyenne de 18 % des sera



bovins étaient positifs en Allemagne (Truman *et al.*, 1986). Dans le nord de l'Italie, une enquête épidémiologique en 1985 a mis en évidence que 50 % des exploitations étaient infectées (Luini & Fioni, 1986a; b). En Suisse, en 1986 également, 4 % du bétail était séropositif (Metzler & Wyler, 1986). Plus récemment, une étude menée aux Etats Unis a relevé une prévalence moyenne de 16% d'infection au BoHV-4 dans l'état de Géorgie avec des zones endémiques où la pression d'infection atteint 36% du bétail (Frazier *et al.*, 2002). En Serbie, en 2007, un sondage réalisé à partir d'exploitations isolées a évalué la séroprévalence moyenne du BoHV-4 à 85% (Nikolin *et al.*, 2007). Enfin, une étude réalisée en Turquie a mis en évidence une prévalence du virus variant entre 24% et 69% selon les exploitations (Gur & Dogan). En conclusion, le virus est présent de manière significative depuis de nombreuses années dans plusieurs régions du monde, sans être cependant la cause apparente de problèmes sanitaires importants.

### **2.1.2 Spectre d'hôtes *in vivo***

#### Les ruminants

Les bovins ont toujours été considérés comme les hôtes naturels les plus probables du BoHV-4. Cependant, parmi les ruminants, outre chez le bovin domestique, le BoHV-4 a également été isolé chez le bison américain (souche 66-p-347), le zébu (souche M40) (Moreno-Lopez *et al.*, 1989) et le buffle africain (diverses souches africaines). Par ailleurs, une étude phylogénétique récente a suggéré le buffle africain comme hôte d'origine pour le BoHV-4 avec une cross-transmission secondaire aux bovins (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003a). En ce qui concerne les ruminants sauvages en Belgique et en France, une étude sérologique n'a pas détecté d'animaux séropositifs, ce qui peut laisser présager que ces espèces ne constituent pas des réservoirs du BoHV-4 (Meersschaert *et al.*, 1988).

#### Les félidés

L'isolement du BoHV-4 du lion (Egelhof *et al.*, 1991; Egyed, 2000) et du chat souffrant d'urolithiase (Fabricant *et al.*, 1971a) suggère que le BoHV-4 peut infecter des espèces phylogénétiquement très éloignées des ruminants. L'herpèsvirus isolé du chat par Fabricant *et al.* avait été dénommé herpèsvirus félin 2, mais n'est en fait qu'une souche parmi d'autres de BoHV-4 (Kit *et al.*, 1986). Expérimentalement, l'inoculation du BoHV-4 à des chats a été réussie avec des souches américaines (Kruger *et al.*, 1990) mais pas avec la souche européenne Movar 33/63 (Thiry *et al.*, 1991). Ceci pourrait être expliqué par un manque d'adaptation de cette souche de virus au chat et/ou par une résistance accrue du chat adulte. La souche isolée du lion, inoculée à des chatons nouveau-nés, a provoqué des maladies graves et mortelles, avec conjonctivite, trachéite et pneumonie (Egyed *et al.*,

1997). Ces résultats expérimentaux démontrent la sensibilité du chat au BoHV-4, sans pour autant déterminer s'il est responsable d'infections naturelles.

### Autres espèces animales

La découverte que l'herpèsvirus aotus type 2 (HVA-2) est également une souche de BoHV-4 étend encore le spectre d'espèces présumées réceptives au BoHV-4 (Bublott *et al.*, 1991b). L'isolat provient d'une culture de cellules rénales d'un singe douroucouli (*Aotus trivirgatus*) apparemment sain (Barahona *et al.*, 1973). Le HVA-2 a été entièrement caractérisé (Fuchs *et al.*, 1985). Son génome et ses protéines sont quasi identiques à ceux du BoHV-4; les différences observées sont compatibles avec les variations inter-souches déjà observées (Bublott *et al.*, 1991a; Dubuisson *et al.*, 1991a). Il semble que le virus ne soit ni pathogène ni oncogène pour le douroucouli (Rüger *et al.*, 1980). Cependant, le BoHV-4 n'a pas été utilisé pour des infections expérimentales chez le douroucouli et la sensibilité de ce singe n'est donc pas définitivement établie. Quoiqu'il en soit, une enquête sérologique menée dans différents centres de primates a révélé une séroprévalence anti-BoHV-4 significative (42%) (Barahona *et al.*, 1973). A nouveau, ces résultats doivent être interprétés avec prudence, en considérant la possibilité qu'il s'agisse d'une contamination en phase d'isolement et qu'il existe dans la niche écologique étudiée, un herpèsvirus antigéniquement apparenté provoquant des réactions sérologiques croisées. A ce titre, il faut noter que de plusieurs rhadinovirus ont été détectés ces dernières années chez de nombreux primates (Damania & Desrosiers, 2001; Greensill *et al.*, 2000a; Greensill *et al.*, 2000b; Jenson *et al.*, 2000; Lacoste *et al.*, 2000a; 2001; Lacoste *et al.*, 2000b; Whitby *et al.*, 2003).

Des anticorps dirigés envers le BoHV-4 ont été détectés chez des éléphants d'Asie (*Elephas maximus*) captifs (Metzler *et al.*, 1990). Par ailleurs, une séquence codante pour une ADN polymérase et présentant une haute homologie avec le gène orthologue du BoHV-4 a pu être amplifiée à partir de CMS d'un rhinocéros noir d'un zoo californien (numéros d'accès GenBank : AF287948, Worley *et al.*, non publié). Ceci pourrait traduire l'existence d'un herpèsvirus apparenté au BoHV-4 dans cette niche.

Un certain nombre d'espèces, chez lesquelles le BoHV-4 n'a pas été isolé en conditions naturelles, se sont néanmoins avérées sensibles expérimentalement à la multiplication virale, voire à l'établissement de la latence et à la réactivation virale. Ces espèces doivent donc être incorporées dans le spectre d'hôtes expérimentaux du virus. Citons notamment le cobaye et le lapin (Egyed *et al.*, 1997). Le lapin est par ailleurs considéré comme un modèle expérimental adéquat pour l'étude de la biologie du BoHV-4 (Egyed & Baska, 2003; Lin *et al.*, 2000; Naeem *et al.*, 1991a; Naeem *et al.*, 1990; Naeem *et al.*, 1991b; Osorio *et al.*, 1982; Osorio *et al.*, 1985). Différentes voies d'inoculation ont été testées chez cette espèce comme les voies intraveineuse, utérine (Naeem *et al.*, 1993), vaginale, conjonctivale (Naeem *et al.*, 1990; Osorio *et al.*, 1982) et ont permis l'infection et l'établissement de la latence au niveau des sites spécifiques tels que les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) et la rate. Par ailleurs, la coculture de splénocytes et des cellules épithéliales bovines

permissives induit l'apparition de plages de lyse démontrant le succès de la réactivation virale *ex vivo*. L'inoculation de BoHV-4 par voie intranasale n'est pas idéale chez le lapin suite au puissant réflexe d'éternuement caractéristique de cette espèce. L'inoculation nasale sous anesthésie profonde pourrait contourner ce problème. De plus, le lapin présente plusieurs caractéristiques intéressantes comme animal de laboratoire telles qu'une manipulation aisée, des outils immunologiques disponibles et une taille raisonnable permettant l'obtention de grandes quantités de sérum. Enfin, notons que l'inoculation expérimentale de souris, de hamsters, de rats et de poulets ne produit aucun symptôme (Gibbs & Rweyemamu, 1977).

### 2.1.3 Pathologies et signes cliniques associés au BoHV-4

Le BoHV-4 a été isolé de bovins malades ou de bétail apparemment sain (Egyed, 2000; Thiry *et al.*, 1989; Thiry *et al.*, 1990) Pour cette raison, il a parfois été qualifié de « virus passager » (Moreno-Lopez *et al.*, 1989; Thiry *et al.*, 2000). Parmi les individus malades, le BoHV-4 a été associé à six groupes d'entités cliniques:

Affections oculaires et respiratoires (conjonctivite, rhinite, trachéite, pneumonies): les souches Movar 33/63 et DN599 ont été isolées de cas de kératoconjonctivite ou de maladie respiratoire (Bartha *et al.*, 1967; Mohanty *et al.*, 1971). D'autres souches ont également été isolées d'animaux atteints de pathologies respiratoires (Evermann *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1972). Certains auteurs ont reproduit des symptômes respiratoires accompagnés de fièvre, d'anorexie et d'abattement, par inoculation par voie intranasale d'une souche génitale à des veaux (Castrucci *et al.*, 1987b). Cependant, il faut noter qu'il n'a pas été possible de reproduire expérimentalement des signes cliniques avec la souche Movar 33/63 (Bartha *et al.*, 1967) et que la pneumonie et la conjonctivite, signes observés après inoculation de veaux avec la souche DN599, ne peuvent pas être assignés au rôle unique du BoHV-4 puisque *Pasteurella multocida* était isolée concomitamment (Mohanty *et al.*, 1972).

Affections génitales (orchite, épидидymite, vaginite, avortement, métrite): les deux souches belges, la souche V. test et la souche LVR 140, proviennent respectivement d'animaux présentant de l'orchite et de la métrite *post-partum* (Thiry *et al.*, 1981a; Thiry *et al.*, 1981b; Wellemans, 1984; Wellemans *et al.*, 1983). L'isolement d'autres souches au départ de pathologies génitales a été décrit en Italie (Castrucci *et al.*, 1986) et aux U.S.A (Evermann *et al.*, 1985; Frazier *et al.*, 2001; Frazier *et al.*, 2002; Parks & Kendrick, 1973). En Afrique du Sud, de nombreuses souches de BoHV-4 ont été isolées d'un syndrome appelé « épivag », se caractérisant par de l'épididymite chez les taureaux et de la vaginite chez les vaches (Mare & Van Resenburg, 1961; Theodoridis, 1978; 1985). La réinoculation

expérimentale intratesticulaire de la souche V. test a reproduit des lésions dans le testicule mais de manière inconstante (Dubuisson *et al.*, 1987b). La métrite est observée seule ou associée à des signes cliniques variés dans l'exploitation concernée : diarrhée, mortalité néonatale, signes respiratoires et mammite (Wellemans, 1984). Elle peut être observée chez la génisse (Wellemans & Van Opdenbosch, 1987). Une enquête récente réalisée en Espagne a mis en évidence la présence du BoHV-4 dans 83% des cas d'endométrite aiguë post-partum, associée à une séroconversion anti-BoHV-4. D'autres agents pathogènes tels que *Arcanobacterium pyogenes* and *Streptococcus sp* ont également été isolés chez ces animaux (Monge *et al.*, 2006). Par ailleurs, une autre étude a démontré le tropisme du BoHV-4 pour les cellules endométriales ainsi que la stimulation de sécrétion de prostaglandines induite par cette infection virale. Selon cette étude, le BoHV-4 pourrait se répliquer dans les cellules épithéliales de l'endomètre et s'associer à d'autres facteurs pour le développement de pathologies utérines (Donofrio *et al.*, 2007).

Le BoHV-4 a également été isolé d'avortons, parfois en association avec le virus de la diarrhée virale bovine (Reed *et al.*, 1979; Wellemans & Van Opdenbosch, 1989). Le rôle du BoHV-4 dans l'avortement bovin n'est pas définitivement élucidé bien que des évidences épidémiologiques plaident pour son intervention en Belgique (Wellemans & Van Opdenbosch, 1989). Des taux élevés d'anticorps anti-BoHV-4 sont associés à l'avortement bovin entre 5 et 9 mois de gestation (Czaplicki & Thiry, 1998). Expérimentalement, Kendrick *et al.* ont inoculé une souche de BoHV-4 isolée de cas de métrite à des vaches à différentes périodes de gestation (Kendrick *et al.*, 1976). Deux fœtus sont morts entre 3 et 4 mois de gestation. Aucun signe n'était observé chez les vaches infectées à 7 mois de gestation. Une étude récente, menée en Hongrie, a également suggéré la transmission intra-utérine du BoHV-4 (Egyed *et al.*, 2011). Cependant, les résultats générés au cours de cette étude suscitent quelques discussions puisque les auteurs ont détecté le virus par *polymerase chain reaction* (PCR) sur des jeunes veaux, par ailleurs séronégatifs pour le BoHV-4. Enfin, l'inoculation intra-utérine d'une souche de BoHV-4 isolée d'un avorton bovin à des lapines gravides a provoqué l'avortement de fœtus hémorragiques et une endométrite. Par contre, l'inoculation intraveineuse et intravaginale n'a entraîné dans cette espèce qu'une vulvovaginite légère et de l'endométrite (Naeem *et al.*, 1990).

**Mammite:** Le BoHV-4 a également été impliqué dans des cas de mammites. En effet, le BoHV-4 a été isolé de vaches atteintes de mammite (Kalman *et al.*, 2004; Miyano *et al.*, 2004; Wellenberg *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2000) et sa présence a été détectée dans la fraction cellulaire du lait de vaches issues d'un troupeau ayant un historique sanitaire lié au virus (Donofrio *et al.*, 2000c). Bien que les inoculations intranasales et intramammaires simultanées permettent de reproduire une mammite subclinique dans un certain nombre de cas (Wellenberg *et al.*, 2002), le BoHV-4 n'est probablement pas un pathogène primaire impliqué dans la genèse de mammites. Par

contre, il pourrait jouer un rôle dans l'aggravation des lésions liées à cette pathologie (Kalman *et al.*, 2004).

Lésions cutanées (maladie nodulaire cutanée (*lumpy skin disease*), dermatite pustuleuse mammaire): le BoHV-4 a aussi été isolé de lésions cutanées, notamment de dermatite aiguë pustuleuse mammaire, d'ulcères mammaires et de dermatite interdigitée (Cavirani *et al.*, 1996; Donofrio *et al.*, 2000a; Luini & Fioni, 1986b; Reed *et al.*, 1977). L'inoculation expérimentale peut ne reproduire aucun signe clinique (Osorio & Reed, 1983) ou provoquer une dermatite papuleuse (Cavirani *et al.*, 1990).

Coryza gangreneux: l'isolement du BoHV-4 de cas de coryza gangreneux est probablement dû au tropisme du virus pour les cellules sanguines, qui sont prélevées dans le cadre de tentatives d'isolement de l'agent causal du coryza gangreneux (Liebermann *et al.*, 1967). Mais, il n'existe sans doute pas d'association étiologique entre BoHV-4 et coryza gangreneux.

Atteintes du tractus digestif (glossite, entérite, tumeurs du rumen): aux Etats-Unis, le BoHV-4 a été isolé du tractus digestif, à partir de fèces diarrhéiques (Eugster, 1978/1979). L'inoculation expérimentale de bovins avec une souche isolée de fèces d'une vache diarrhéique n'a pas reproduit de signes cliniques (Osorio *et al.*, 1982). Une souche a été détectée à partir d'une tumeur du rumen (Kaminjolo *et al.*, 1972). D'autres proviennent de glossite ulcéreuse et autres lésions linguales (Cavirani *et al.*, 1990; Luini *et al.*, 1985; Rweyemamu & Loretu, 1973).

Autres signes cliniques: certaines souches de BoHV-4 ont aussi été isolées chez des animaux atteints de pathologies et tableaux cliniques aussi variés que la stomatite vésiculeuse (Evermann & Henry, 1989) l'asthénie (Nakane *et al.*, 2000) ou de diverses néoplasies telles un lymphosarcome (Potgieter & Mare, 1974), un carcinome squameux oculaire (Anson *et al.*, 1982), un lymphome à cellules T (Toho *et al.*, 1985), une tumeur de la vessie (Kaminjolo *et al.*, 1972) ou une tumeur ethmoïdale (Moreno-Lopez *et al.*, 1989). Récemment, plusieurs études expérimentales chez le lapin ont suggéré la possibilité de développement de maladies cardio-vasculaires suite à l'infection par le BoHV-4 (Egyed & Baska, 2003; Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1997)

Le rôle du BoHV-4 dans les maladies des bovins reste donc matière à discussion. Le pouvoir pathogène du BoHV-4 est controversé et semble dépendre en partie des souches utilisées. Peu d'entre elles sont réellement pathogènes, et la majorité n'induit pas ou peu de signes cliniques lors d'infections expérimentales de bovins. Néanmoins, le BoHV-4 est de plus en plus impliqué dans des affections du tractus génital femelle : métrite *post-partum*, vulvovaginite et avortement. Le BoHV-4 pourrait aussi agir en association avec d'autres agents infectieux. Il a notamment été proposé que le BoHV-4 pourrait induire une immunodépression favorisant d'autres infections (Donofrio *et al.*, 2005; Van Opendenbosch

*et al.*, 1984). Par ailleurs, certains rhadinovirus, tel l'AIHV-1, ont la propriété de s'atténuer complètement après quelques passages en culture de cellules (Handley *et al.*, 1995). De la même façon, une atténuation des souches de BoHV-4 au cours de l'amplification en culture de cellules consécutive à l'isolement viral pourrait être une des raisons expliquant l'incapacité fréquente à reproduire des signes cliniques suite à l'inoculation d'épreuve.

## **2.1.4 Pathogénie de l'infection chez le bovin**

### Infection primaire

Le BoHV-4 est régulièrement isolé à la fois du tractus respiratoire supérieur, à partir d'écouvillons nasaux (Castrucci *et al.*, 1987a) et des voies génitales, à partir des exsudats de métrites (Monge *et al.*, 2006; van Opdenbosch *et al.*, 1988; Wellemans, 1984). La transmission par voie nasale a été prouvée de manière expérimentale (Castrucci *et al.*, 1987a; Dubuisson *et al.*, 1989b). L'infection naturelle par voie génitale a été suggérée (Egyed *et al.*, 2011) mais d'autres investigations seraient intéressantes pour confirmer cette hypothèse. D'autres voies d'inoculation ont été utilisées expérimentalement : injections intraveineuses, intradermiques et intratesticulaires (Dubuisson *et al.*, 1989b; Dubuisson *et al.*, 1987b; Osorio & Reed, 1983). La multiplication primaire du virus se déroule vraisemblablement au niveau de la porte d'entrée, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales des muqueuses. Le virus se propagerait ensuite dans l'organisme par le biais des cellules mononucléées infectées (Boerner *et al.*, 1999; Egyed & Bartha, 1998; Osorio & Reed, 1983). La présence d'ADN viral dans le sérum de veaux durant 10 à 30 jours après infection suggère l'existence de virus libre dans le sang (Egyed *et al.*, 1999). La virémie n'est pas toujours détectable et peut réapparaître de façon périodique (Dubuisson *et al.*, 1989c; Egyed *et al.*, 1999). La sensibilité des cellules endothéliales bovines à l'infection par le BoHV-4 (Egyed & Baska, 2003; Lin *et al.*, 1999) suggère le passage du virus des CMS à l'endothélium vasculaire. Des lésions vasculaires avec accumulation de cellules mononucléées ont par ailleurs été mises en évidence chez des lapins infectés par voie intraveineuse par le BoHV-4 (Egyed & Baska, 2003). Le virus se multiplie principalement dans les épithéliums oculaires, respiratoires et génitaux. Ces tissus sont considérés à la fois comme des sites de multiplication primaires et secondaires. Le virus peut y produire des lésions de nécrose cellulaire et être excrété dans les écoulements oculaires, le jetage nasal et les sécrétions génitales.

### Latence et réactivation

Après primo-infection, le BoHV-4 s'installe à l'état latent, comme les autres herpesvirus. De nombreux tissus ou organes ont été proposés comme sites de latence : rate, système nerveux, nœuds

lymphatiques, amygdales, tractus respiratoire supérieur, poumon, moelle osseuse, conjonctive, cornée, vésicule biliaire (Boerner *et al.*, 1999). Cependant, cette longue liste plaide plutôt en faveur d'un ou de quelques types cellulaires ubiquistes, supportant la latence du BoHV-4, plutôt que d'une accumulation de sites différents. Les CMS sont des cellules retrouvées partout dans l'organisme. Parmi les CMS, certains auteurs ont soutenu la thèse d'une latence au sein de la lignée lymphocytaire (Borchers *et al.*, 2002; Egyed *et al.*, 1996) ou de la lignée monocyttaire-macrophagique (cellules non T et non B de la zone marginale de la rate) (Lopez *et al.*, 1996; Osorio & Reed, 1983; Osorio *et al.*, 1985). Par ailleurs, il a été montré que le virus pouvait établir une infection persistante *in vitro* dans une lignée macrophagique bovine (Donofrio & van Santen, 2001). De récents travaux, chez le lapin, ont mis en évidence la présence du BoHV-4 à l'état latent, au sein des cellules monocytaires du courant sanguin ou concentrées au niveau de la rate (Egyed & Bartha, 1998; Fabian & Egyed, 2004).

Le BoHV-4 à l'état latent peut être réactivé à la suite d'un stimulus naturel tel que la parturition, ou expérimental tel qu'un traitement à la dexaméthasone (Dubuisson *et al.*, 1989c; Krogman & McAdaragh, 1982). Il est alors réisolé à partir d'écouvillons nasaux, de PBMC, de culture d'explants de moelle épinière et de ganglion trijumeau.

### 2.1.5 Réponse immune

Le contrôle de l'infection des gammaherpèsvirus est essentiellement assuré par l'immunité à médiation cellulaire et plus particulièrement par les lymphocytes T CD8+ (Hislop & Sabbah, 2008; Means, 2007; Robert E. Means, 2007; Stevenson, 2004; Stevenson *et al.*, 2009). Parallèlement, ces virus ont évolué pour protéger leurs épitopes, tant lytiques que latents, de la reconnaissance par les cellules cytotoxiques. Par exemple, les deux gammaherpèsvirus humains encodent des protéines qui protègent les cellules infectées de la reconnaissance et de l'élimination par les lymphocytes T CD8+. Parmi les gènes majoritairement impliqués dans cette évasion, on peut citer les gènes K3, K5 qui interviennent au cours de l'infection lytique. Lors de la latence, la protéine LANA-1 du KSHV et les protéines virales de l'EBV, interleukine 10 (v-IL10) et EBNA-1, agissent pour diminuer l'expression des antigènes viraux dans le MHC de classe 1 (Means, 2007). Peu d'informations sont actuellement disponibles pour le BoHV-4. Par analogie avec les connaissances acquises pour les autres gammaherpèsvirus, le BoHV-4 pourrait employer des stratégies similaires pour détourner la réponse cytotoxique. Ainsi, au sein du génome du BoHV-4, l'homologue positionnel de K5 du KSHV existe et est représenté par le gène Bo5 encodant le produit *immediate early* (IE) 1 (Chang & Van Santen, 1992; Sun *et al.*, 1999; van Santen, 1991; Zimmermann *et al.*, 2001). Le domaine acide central des « protéines de maintenance » décrit chez les gammaherpèsvirus pour inhiber la présentation des peptides par le CMH de classe 1, est absent chez le BoHV-4 (Blake, 2010) et chez le MuHV-4.

Cependant, une courte séquence de la région centrale encodée par l'ORF73 du MuHV-4 semble responsable de la régulation de la transcription de la protéine et pourrait donc intervenir en *cis* pour l'évasion de la réponse cytotoxique (Bennett *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude sur le produit d'expression de l'ORF73 du *saimiriine herpesvirus 2* (SahV-2) a démontré qu'un motif répété court de 9 acides aminés était suffisant pour réduire la présentation dans le CMH de classe I (Gao *et al.*, 2009). La protéine LANA du BoHV-4 partage, donc vraisemblablement aussi, ces mêmes propriétés.

La réponse humorale induite par le BoHV-4 a été davantage investiguée. L'infection de bovins par ce virus se traduit par une production faible voire nulle d'anticorps neutralisants alors que de hauts titres d'anticorps anti-BoHV-4 peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte (IFI) (Castrucci *et al.*, 1988; Edwards & Newman, 1985; Luther *et al.*, 1971; Mohanty *et al.*, 1972; Sass *et al.*, 1974; Truman *et al.*, 1986; Wellemans *et al.*, 1986). Quand une réponse est observée, les anticorps neutralisants apparaissent entre 22 et 34 jours après la primo-infection (Castrucci *et al.*, 1987a). Cependant, la présence de complément permet une neutralisation plus précoce et augmente considérablement les titres d'anticorps neutralisant le BoHV-4 (Dubuisson *et al.*, 1987a). Aucune réponse secondaire en anticorps neutralisants n'est observée chez des animaux infectés, traités à la dexaméthasone. Ceci suggère que le BoHV-4 n'est neutralisé que par des immunoglobulines (Ig) précoces appartenant probablement à la classe des IgM (Dubuisson *et al.*, 1989c). Une étude de la neutralisation à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des glycoprotéines d'enveloppe du BoHV-4 indique que les domaines protéiques impliqués dans l'attachement et la pénétration sont peu accessibles aux anticorps monoclonaux (Dubuisson *et al.*, 1990). Le test de séroneutralisation ne peut donc pas être utilisé pour identifier une souche du BoHV-4 ou pour détecter des anticorps. Par contre, des techniques comme l'IFI ou l'*Enzyme linked immunoSorbent assay* (ELISA) détectent une séroconversion entre 14 et 20 jours après une infection primaire (Dubuisson *et al.*, 1987a; Edwards & Newman, 1985; Osorio & Reed, 1983). De plus, une réponse secondaire est mise en évidence par ces techniques à la suite de la réactivation virale (Dubuisson *et al.*, 1989c).

L'association du BoHV-4 avec les PBMC et les tissus lymphoïdes dans les infections aiguës et latentes pourrait interférer avec la régulation de la réponse immune cellulaire mais ces effets n'ont pas encore été étudiés (Osorio *et al.*, 1985).



## 2.2. Le BoHV-4 en recherche fondamentale

### 2.2.1. Spectre d'hôtes *in vitro*

Le BoHV-4 se multiplie en cultures de cellules bovines primaires ou continues : cellules primaires de rein, de testicule, de poumon, de peau, de rate, de thyroïde, de trachée embryonnaire, de moelle osseuse fœtale, de lymphosarcome de thymus de veau, ainsi que dans diverses lignées continues d'origine rénale (cellules MDBK pour *Madin Darby bovine kidney*) et pulmonaire (EBL pour *embryonic bovine lung*) (Bartha *et al.*, 1966; Kit *et al.*, 1986; Luther *et al.*, 1971; Parks & Kendrick, 1973; Rweyemamu & Loretu, 1973; Sass *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1972; Storz *et al.*, 1984; Theodoridis, 1985; Thiry *et al.*, 1981b; Truman, 1985). Le BoHV-4 peut établir une infection persistante dans des cellules macrophagiques bovines (BOMAC pour *bovine macrophagic cells*) (Donofrio & van Santen, 2001).

Le BoHV-4 se multiplie également en culture de cellules d'origines diverses : mouton, chèvre, porc, chat, chien, lapin, vison, cheval, dindon, furet, poulet, hamster et singe (Barahona *et al.*, 1973; Bartha *et al.*, 1966; Fabricant *et al.*, 1971b; Gibbs & Rweyemamu, 1977; Kit *et al.*, 1986; Kokles & Pellinghoff, 1987; Luther *et al.*, 1971; Peterson & Goyal, 1988; Rweyemamu & Loretu, 1973; Theodoridis, 1985; Truman, 1985).

Certaines études ont investigué la capacité du BoHV-4 à infecter des cellules humaines (Donofrio *et al.*, 2002; Donofrio *et al.*, 2000b; Egyed, 1998; Gillet *et al.*, 2004) et ont révélé que le BoHV-4 se multipliait dans une lignée primaire de cellules de glioblastome ainsi que dans les lignées cellulaires humaines MRC-5 et WI-38, issues de poumons d'embryon. Par ailleurs, une souche de BoHV-4 recombinante exprimant un gène de résistance à la néomycine a pu établir une infection persistante au sein de cellules provenant d'un rhabdomyosarcome d'origine humaine soumises à la pression de sélection de la néomycine (Donofrio *et al.*, 2000a). Une autre étude a testé 21 lignées cellulaires humaines et a conclu que les lignées d'origine lymphoïde ou myéloïde étaient résistantes à l'infection tandis que les cellules épithéliales et carcinomateuses ou adénocarcinomateuses étaient sensibles mais peu permissives au BoHV-4 (Gillet *et al.*, 2004).

Cette capacité à infecter des cellules d'origines différentes peut être mise en rapport avec le fait que le BoHV-4 reconnaît des structures de type héparan sulfate (HS) comme premiers récepteurs cellulaires (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Comme ces motifs sont présents à la surface de nombreuses cellules de vertébrés, cette propriété contribue à expliquer, en partie, la sensibilité de cellules d'origines très diverses au BoHV-4.

### 2.2.2. Culture virale et effet cytopathogène

La cinétique de production virale extra- et intracellulaire indique que le BoHV-4 présente une croissance lente (Storz *et al.*, 1984). Cette cinétique est différente selon que le virus est produit sur des cellules fraîchement ensemencées ou sur des cellules confluentes (Dubuisson *et al.*, 1988). Ceci s'explique par la dépendance du BoHV-4 vis-à-vis de la phase S du cycle cellulaire (Vanderplasschen *et al.*, 1995). L'effet cytopathogène n'apparaît que 48 à 72 heures après infection et est caractérisé par la présence de cellules arrondies apoptotiques (Pagnini *et al.*, 2004; Sciortino *et al.*, 2000a), dispersées dans le tapis cellulaire (Bartha *et al.*, 1966). La lyse totale est observée après environ 5 jours d'incubation et ce délai varie selon le type de cellules et la multiplicité d'infections utilisés (Castrucci *et al.*, 1986; Dubuisson *et al.*, 1988; Potgieter & Mare, 1974; Storz *et al.*, 1984). Les plages de lyse produites sous carboxyméthylcellulose (CMC) ou agarose ont un contour irrégulier et sont beaucoup plus petites que celles induites par le BoHV-1 (Storz *et al.*, 1984).

### 2.2.3. Cycle de multiplication virale *in vitro*

Les herpèsvirus peuvent établir deux types principaux d'infection : l'infection dite productive et l'infection latente. La compréhension des mécanismes sous-tendus par ces deux types d'infection résulte plus particulièrement de l'étude de certains herpèsvirus dont *l'herpesvirus simplex-1* (HSV-1) et l'EBV. Ces données sont le plus souvent transposables aux autres espèces d'herpèsvirus. Le cycle de multiplication virale sera ici décrit dans le cadre général des herpèsvirus, tout en mentionnant les particularités connues pour le BoHV-4.

#### L'infection productive

Le cycle de multiplication des herpèsvirus est schématisé dans la figure 3. L'attachement du virion à la surface cellulaire résulte de l'interaction entre une ou plusieurs glycoprotéines de

l'enveloppe virale et un ou plusieurs récepteurs cellulaires. L'attachement initial ou attachement de faible affinité implique au moins une interaction avec des structures de type HS (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Après l'attachement initial du virion, survient l'attachement stable où intervient un second récepteur cellulaire encore non identifié pour le BoHV-4.

Suite à l'attachement, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique, libérant la nucléocapside et les protéines de tégument dans le cytoplasme (Roizman, 1996). De plus, alors qu'une étude récente a mis en évidence que l'infection par le MuHV-4 avait lieu par endocytose (Gill *et al.*, 2006), des expériences similaires chez le BoHV-4 ont également démontré que l'entrée du virus se déroulait par un phénomène d'endocytose (Lété C., données non publiées). Une fois la capsid libérée, celle-ci est alors acheminée vers le noyau (Granzow *et al.*, 1997; Sodeik *et al.*, 1997) le long de microtubules de tubuline grâce à un complexe protéique moteur « dynin/dynactin » (Dohner *et al.*, 2002). Au terme du transport intracytoplasmique, la nucléocapside arrive à proximité de l'enveloppe nucléaire. Certaines protéines du tégument peuvent également être transportées vers le noyau où elles initient la transcription du génome viral.

La capsid délivre son ADN dans le noyau au niveau d'un pore nucléaire. Dès son entrée dans le noyau, l'ADN viral se circularise en l'absence de toute synthèse protéique virale (Garber *et al.*, 1993). Cette observation suggère un mécanisme de circularisation sous la dépendance de protéines cellulaires ou de protéines virales de structure (Poffenberger & Roizman, 1985). La transcription de l'ADN viral débute alors dans le noyau. Les gènes des herpèsvirus sont exprimés selon une cascade strictement régulée par différentes protéines virales provenant dans un premier temps des protéines de tégument accompagnant la capsid. Les gènes des herpèsvirus sont décrits en fonction de leur expression dans le temps. Bien qu'arbitraire, cette distinction désigne 3 classes différentes : les gènes  $\alpha$  ou gènes IE, les gènes  $\beta$  ou gènes précoces (E, *early*) et les gènes  $\gamma$  ou gènes tardifs (L, *late*) (Chang & Van Santen, 1992; Dubuisson *et al.*, 1991b; Honess & Roizman, 1974; 1975; Jones & Roizman, 1979).

Dès que l'ADN viral est circularisé dans le noyau, certaines protéines de tégument interagissent avec des composants transcriptionnels de l'hôte de façon à stimuler la transcription des gènes  $\alpha$  par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Les protéines IE1 et IE2 du BoHV-4 sont considérées comme les deux protéines IE majeures du virus (Bermudez-Cruz *et al.*, 1997; 1998; Chang & Van Santen, 1992; van Santen, 1993; Zhang & van Santen, 1995). Une fois produites dans le cytoplasme, certaines protéines  $\alpha$  vont être importées dans le noyau où elles vont réguler la suite des événements transcriptionnels, c'est-à-dire ralentir l'expression des gènes  $\alpha$  et activer l'expression des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ . Les protéines codées par les gènes  $\beta$  atteignent leur pic d'expression dans les 4 à 8 heures suivant l'infection. Elles sont notamment impliquées dans le métabolisme nucléotidique et dans les événements liés à la réplication de l'ADN viral. Le pic d'expression des gènes  $\gamma$  n'est atteint qu'une

fois la réplication de l'ADN viral entamée. On distingue au sein des gènes  $\gamma$ , les gènes  $\gamma_1$  ou tardifs partiels, dont l'expression est augmentée par la synthèse d'ADN viral, et les gènes  $\gamma_2$  ou tardifs réels, dont l'expression est totalement dépendante de la synthèse d'ADN viral (Dubuisson *et al.*, 1991b; Roizman & Sears, 1996; Sullivan *et al.*, 1989). Les protéines de structure (capside, tégument, enveloppe) exprimées par les gènes  $\gamma$  sont produites en grande quantité dans le cytoplasme. Certaines d'entre elles migrent vers le noyau où elles s'assemblent pour former de nouvelles capsides.

La majorité des herpèsvirus sont connus pour réprimer l'expression des gènes cellulaires au cours de l'infection productive (phénomène connu sous le nom de « *host shutoff* ») (Greco *et al.*, 2000). Certains auteurs ont suggéré que l'infection par le BoHV-4 n'affectait pas la synthèse des protéines cellulaires au cours de la réplication virale (Augsburger & Metzler, 1989). Cependant, de récentes observations, obtenues au sein du laboratoire, lors de l'infection de cellules MDBK (modèle d'infection lytique) et de cellules BOMAC (modèle d'infection latente) semblent indiquer le contraire (données non publiées).

La réplication de l'ADN viral circularisé débute au niveau d'une ou plusieurs origines de réplication. Elle se déroule selon le mode des « cercles roulants » (Ackermann, 2004; Jacob *et al.*, 1979). Ceci génère des concatémères, structures complexes composées d'unités génomiques liées bout à bout par des liens covalents. Le clivage et l'encapsidation de l'ADN viral sont les étapes au cours desquelles les intermédiaires de réplication sont clivés en unités génomiques simples et intégrés dans des capsides néoformées. Les capsides sont alors transportées vers la périphérie nucléaire.

Le trajet suivi par les nucléocapsides pour quitter la cellule sous forme de particules virales enveloppées a fait l'objet de multiples discussions. Plusieurs modèles ont été décrits (Mettenleiter & Minson, 2006; Wild *et al.*, 2005). Aujourd'hui, l'explication retenue pour décrire la sortie des virions est la succession d'étapes d'enveloppement et de désenveloppement des nucléocapsides avant leur libération sous forme de virions enveloppés matures dans le milieu extracellulaire (Mettenleiter, 2004; Mettenleiter *et al.*, 2009). La première étape d'enveloppement a lieu dans le noyau par bourgeonnement des capsides néoformées à la surface interne de la membrane nucléaire. Cette première enveloppe temporaire va ensuite fusionner avec la membrane nucléaire externe, larguant ainsi les nucléocapsides nues dans le cytoplasme. Celles-ci vont s'associer aux protéines du tégument et subir l'enveloppement final par bourgeonnement à partir des vésicules golgiennes dont les membranes contiennent les glycoprotéines des virions matures (Browne *et al.*, 1996; Granzow *et al.*, 2001; Masse *et al.*, 1999; Smith, 1980). Les particules virales infectieuses résultantes peuvent soit rester associées à la cellule dans ces vésicules, soit être libérées par exocytose.

### L'infection latente

La latence est observée chez tous les herpèsvirus. Elle consiste en l'installation du virus au sein des cellules, en l'absence de multiplication virale (Figure 3). L'initiation de l'infection latente se déroule comme le début de l'infection productive. Les mécanismes de déclenchement de la latence sont peu connus (Flint *et al.*, 2000). Lorsque l'état latent est établi, la transcription des gènes viraux est sévèrement réduite. La manière dont la cascade de transcription normale est bloquée ou réduite reste un sujet de recherches et de débats. Un faible niveau de transcription des gènes  $\alpha$  ou  $\beta$  peut avoir lieu, mais est insuffisant pour initier une infection productive. Les alphaherpèsvirus n'expriment que les transcrits (LATs pour *latency associated transcripts*) (Jones, 2003) alors que les beta- et gammaherpèsvirus expriment des protéines de latence (Ballestas & Kaye, 2001; Cardin *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 1999). A l'état latent, le génome viral persiste au sein du noyau sous une forme circulaire appelée épisome. Lorsque la cellule infectée latente se divise, l'épisome viral est répliqué en même temps que l'ADN génomique de la cellule. Les copies de cet épisome sont distribuées aléatoirement entre les cellules filles. Chez les rhadinovirus, ce mécanisme implique la protéine LANA ou ses orthologues. Cette protéine est bifonctionnelle : via son extrémité N-terminale, elle se lie à la chromatine cellulaire, tandis que son extrémité C-terminale interagit avec différentes séquences situées au sein des unités de l'ADN polyrépétitif (prDNA) placé aux extrémités du génome (Griffiths *et al.*, 2008). Par cette interaction, elle permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral par différents enzymes cellulaires, ainsi que l'accrochage de l'épisome viral au chromosome cellulaire (Piolot *et al.*, 2001). Lorsque la cellule se divise, cet accrochage permet de distribuer les épisomes aléatoirement entre les cellules filles, mais également d'éviter que ces épisomes ne soient perdus au sein du cytoplasme. La protéine LANA du BoHV-4 présente une taille réduite par rapport à ses homologues chez les autres gammaherpèsvirus ainsi qu'une absence de domaine central acide. Cependant des analyses séquentielles ont montré que les zones où ont été identifiées les principales fonctions de LANA semblent être conservées, même au niveau des plus petites pORF73 (Calderwood *et al.*, 2005; Fowler *et al.*, 2003; Verma & Robertson, 2003b).

L'état de latence peut être interrompu à la suite d'un stimulus exogène. Des changements dans la physiologie cellulaire peuvent conférer à la cellule la permissivité nécessaire à une infection productive. Le génome est alors transcrit plus efficacement et est répliqué; de nouveaux virions sont produits.

Des études récentes ont montré l'existence de miRNA, exprimés durant la latence, au sein des trois sous-familles d'herpèsvirus (Pfeffer *et al.*, 2005). Ces miRNA agissent essentiellement en faveur du maintien de la latence par la modulation des voies apoptotique cellulaire et immunitaire et par répression du cycle viral lytique (Burnside *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008; Umbach *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

#### **2.2.4. Biologie moléculaire :**

### Génome viral

Le génome du BoHV-4 a récemment été entièrement séquencé (Broll *et al.*, 1999b; Zimmermann *et al.*, 2001). La structure du génome du BoHV-4 est de type B (Figure 4). Elle consiste en une molécule d'ADN bicaténaire organisée en une longue séquence unique centrale (LUR) flanquée à ses extrémités par des séquences répétées et non codantes constituant le prDNA.

Le prDNA du BoHV-4 consiste en un nombre, déterminé pour chaque souche, d'unités non codantes réparties aléatoirement aux deux extrémités du LUR (Broll *et al.*, 1999a; Bublot *et al.*, 1990; Ehlers *et al.*, 1985). La taille de ces unités varie de 1450 à 2850 paires de bases (pb) selon les souches (Bublot *et al.*, 1990), mais est relativement constante au sein d'une souche virale. Chaque unité de prDNA contient elle-même 2 types de séquences répétées : l'une de  $\pm 200$  pb, l'autre de 25 pb. Bien que le prDNA ne contienne pas de séquences codantes à proprement parler (Chang & Van Santen, 1992), il contient des séquences jouant un rôle déterminant dans le clivage des concatémères viraux générés lors de la réplication de l'ADN et dans l'encapsidation des unités génomiques monomériques ainsi produites. Ces séquences, appelées *pac-1* et *pac-2*, ont été identifiées chez tous les herpesvirus. Elles sont respectivement réparties aux extrémités 5' et 3' de chaque unité prDNA et consistent pour *pac-1* en une séquence riche en thymine (T), adénosine (A), encadrée de motifs cytosine (C), guanine (G) et en un motif T pour *pac-2* (Broll *et al.*, 1999a). Au vu du mécanisme communément admis d'encapsidation « *headful* » des herpesvirus, plusieurs auteurs ont postulé que le prDNA jouerait le rôle de zone tampon lors de l'encapsidation d'une unité génomique (Broll *et al.*, 1999a; Bublot *et al.*, 1990; Stamminger *et al.*, 1987). Outre ce rôle, il a été démontré pour d'autres gammaherpesvirus que, lors de la latence, le prDNA servait de zone d'ancrage de l'épisome viral au chromosome cellulaire (Collins *et al.*, 2002; Fejer *et al.*, 2003; Grundhoff & Ganem, 2003; Verma & Robertson, 2003b). Enfin, à l'image de celle du SaHV-2, l'origine de réplication latente (*oriP*) du BoHV-4 pourrait se trouver au sein du prDNA (Collins *et al.*, 2002).

Le LUR du BoHV-4 consiste en une séquence de 108.873 pb (déterminée pour la souche 66-p-347) (Zimmermann *et al.*, 2001) (Figure 5). Au sein de cette séquence, les gènes conservés sont regroupés en 5 « blocs » (numérotés de 1 à 5 selon l'orientation 5' vers 3') en fonction des similitudes d'organisation et d'orientation que les ORFs partagent entre les virus d'un même genre ou d'une même sous-famille (Bublot *et al.*, 1992; Bublot *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1996; Neipel *et al.*, 1998; Nicholas, 2000; Simas & Efstathiou, 1998). Les blocs 1, 2 et 4 regroupent les gènes conservés chez tous les *Herpesviridae*. Ces gènes sont dénommés gènes « core » (Davison, 2002). Ils ont été hérités d'un ancêtre commun à tous les herpesvirus et sont impliqués dans l'assemblage de la capsid virale, dans la réplication et l'encapsidation de l'ADN, et dans la sortie de la capsid hors du noyau. Les gènes situés en dehors des blocs 1, 2 et 4, sont des gènes acquis plus récemment lors de l'adaptation

d'un genre ou d'une espèce virale, à une niche biologique particulière. Parmi ceux-ci, les blocs 3 et 5 contiennent des gènes propres aux gammaherpèsvirus. Les zones dites « inter-bloc » (de A à F selon l'orientation 5' vers 3') renferment des gènes uniques à une ou quelques espèces phylogéniquement apparentées. Il s'agit souvent de gènes d'origine cellulaire (Becker, 2000; Holzerlandt *et al.*, 2002) (Lomonte *et al.*, 1995; Raftery *et al.*, 2000). Enfin, le LUR contient également une origine de réplication fonctionnelle (*ori*) qui a été localisée sur base de son homologie positionnelle avec l'origine de réplication lytique (*oriLyt*) d'autres gammaherpèsvirus (Hammerschmidt & Sugden, 1988; Zimmermann *et al.*, 2001).

L'analyse de la séquence LUR du BoHV-4 a révélé l'existence d'au moins 79 ORFs (Table 2). Parmi ces ORFs, 62 sont homologues à des gènes existants chez le SaHV-2 et/ou le HHV-8, alors que 17 semblent être uniques au BoHV-4. Les gènes communs au BoHV-4 et au SaHV-2 ont été nommés « ORF1 » à « ORF79 » (la numérotation se rapporte à celle du gène homologue dans le génome du SaHV-2). Les gènes uniques au BoHV-4 ont été nommés « Bo1 » à « Bo17 » (la numérotation suit l'ordre positionnel dans le génome du BoHV-4 selon l'orientation 5' vers 3'). Ces derniers n'ont pas de véritables équivalents chez le SaHV-2 ni, à l'exception de Bo5, chez d'autres herpèsvirus.

Mis à part les gènes impliqués dans la multiplication virale, un grand intérêt est porté aux gènes viraux participant à la virulence et aux modulations des interactions virus-hôte. Dans ce domaine, la comparaison des génomes du SaHV-2 et d'autres gammaherpèsvirus avec celui du BoHV-4 révèle que le contenu génétique de ce dernier est relativement « pauvre ». Certaines ORFs du SaHV-2, dont bon nombre d'homologues à des gènes cellulaires, sont absentes chez le BoHV-4 : les ORFs 1, 2, 4, 5, 11 à 15, 28, 51, 70, 72 et 74. Les gènes de gammaherpèsvirus homologues à des gènes cellulaires sont souvent impliqués dans la croissance ou la survie cellulaire, dans le métabolisme nucléotidique ou dans l'immuno-évasion. Selon les connaissances actuelles, le génome du BoHV-4 semble dépourvu de gènes codant pour des cytokines ou des récepteurs à cytokines, pour des récepteurs à interleukines (récepteurs couplés aux protéines G) ou pour des récepteurs à chimiokines. Le BoHV-4 ne dispose pas de gène codant pour une cycline D ou pour une protéine régulatrice du complément. Il est également dépourvu des activités déhydrofolate réductase et thymidilate synthase.

Au vu de ce contenu génétique « pauvre », plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation du BoHV-4 comme vecteur d'expression. Des sites d'insertion spécifiques ont été déterminés dans des régions non essentielles du génome, comme par exemple le gène de la thymidine kinase (Donofrio *et al.*, 2002) ou des séquences de la région unique du génome immédiatement adjacentes au prDNA (Gillet *et al.*, 2005a).

A ce jour, le BoHV-4 n'a jamais été associé à des désordres lymphoprolifératifs ou à une capacité transformante comme c'est le cas pour de nombreux autres gammaherpèsvirus. Néanmoins, de plus amples études sont nécessaires pour affirmer que le BoHV-4 n'est pas impliqué dans l'un ou l'autre de ces processus. En effet, il a été montré que le BoHV-4 possédait au moins deux régulateurs potentiels de la survie cellulaire : une v-Bcl-2 (*viral B-cell lymphoma 2*) et une v-FLIP. Ces gènes interviennent dans l'inhibition de l'apoptose cellulaire, une des étapes nécessaires à la transformation cellulaire. Toutefois, deux études ont également montré que le BoHV-4 était capable d'induire l'apoptose de cellules permissives à un stade tardif de l'infection (Gillet *et al.*, 2005b; Pagnini *et al.*, 2004; Sciortino *et al.*, 2000b).

Le BoHV-4 contient 17 gènes uniques (Bo1 à 17) (Zimmermann *et al.*, 2001) (Figure 5). Ces 17 ORFs n'ont pas fait l'objet d'études avancées jusqu'à présent à l'exception du gène Bo17. Le produit d'expression de ce dernier gène est un homologue fonctionnel de la core 2  $\beta$ -1,6-Nacétylglucosaminyltransférase de type mucinique (C2GnT-M) humaine (Vanderplasschen *et al.*, 2000) : une enzyme golgienne appartenant à la famille des  $\beta$ -1,6-Nacétylglucosaminyltransférases ( $\beta$ 1,6GnTs). Tous les membres de cette famille enzymatique sont impliqués dans des processus biologiques majeurs, notamment liés à l'immunité et aux différenciations cellulaires et tissulaires (Fukuda, 2002; Tsuboi & Fukuda, 2001). Une étude récente a montré que le produit d'expression du gène Bo17 était impliqué dans la modification post-traductionnelle de protéines structurales virales sans pour autant être nécessaire à la croissance virale *in vitro* (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004a). Ceci laisse supposer que Bo17 pourrait jouer un rôle clé dans la biologie du BoHV-4 *in vivo*.

L'analyse phylogénique du gène Bo17 a permis d'estimer que son acquisition est survenue il y a approximativement 1,5 millions d'années. Cette observation fait de Bo17 le gène d'herpèsvirus d'origine cellulaire le plus récent décrit à ce jour. D'autre part, cette étude a permis de démontrer que le gène Bo17 a été acquis non pas d'un ancêtre des bovins domestiques, mais bien d'un ancêtre du buffle africain (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003a). Des données récentes ont permis de déterminer que l'espèce d'origine de Bo17 était probablement un ancêtre de la sous-espèce *Syncerus caffer caffer* provenant de l'Afrique de l'Est (Dewals *et al.*, 2006). Ces données peuvent être mises en parallèle avec une étude de Rossiter *et al.* rapportant que 93,6 % des buffles africains sauvages possèdent des anticorps dirigés contre le BoHV-4 et qu'un isolement viral peut être réalisé à partir du sang de 25 % de ces animaux (Rossiter *et al.*, 1989). Cette séroprévalence extrêmement élevée chez les buffles africains pourrait être due à un avantage sélectif conféré par le BoHV-4 aux animaux infectés. Il a en effet été suggéré que les souches africaines de BoHV-4 pourraient protéger les buffles africains infectés contre la forme africaine du coryza gangreneux, une immunopathologie létale provoquée par l'AIHV-1, un rhadinovirus apathogène pour son hôte naturel, le gnou (*Connochaetes taurinus*) (Dewals *et al.*, 2003; Rossiter *et al.*, 1988; Rossiter *et al.*,



1989). L'ensemble de ces données suggère que *Syncerus caffer caffer* devrait être considéré comme l'espèce hôte principale du BoHV-4 (Dewals *et al.*, 2006).

### BAC cloning

Par certains aspects, le BoHV-4 représente un candidat séduisant pour son utilisation en tant que vecteur viral et il constitue un modèle d'étude accessible pour la biologie de l'infection des gammaherpèsvirus. Parmi les quelques caractéristiques qui le distinguent des autres gammaherpèsvirus, on peut citer un génome relativement « pauvre » (Zimmermann *et al.*, 2001b) permettant l'insertion de matériel génétique étranger d'au moins 10,5 kb, une propagation aisée en culture de cellules ainsi qu'un spectre d'hôtes large *in vitro* comme *in vivo* (Thiry *et al.*, 1992a). L'infection expérimentale du lapin est possible et donne un profil clinique asymptomatique semblable à celui observé chez l'hôte naturel (Thiry *et al.*, 1992a). De plus, le BoHV-4 est capable d'établir au sein de certaines cellules, une infection persistante non productive permettant l'expression de transgènes pendant des semaines sans affecter la viabilité des cellules infectées (Gillet *et al.*, 2004).

L'avancée de la recherche tant fondamentale qu'appliquée sur les herpèsvirus requiert souvent des manipulations génétiques telles que l'insertion de transgènes ou la délétion de certaines ORFs. Alors que ces 2 types de modifications peuvent être réalisées par recombinaison homologue en cellules eucaryotes (Gillet *et al.*, 2004; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004a), cette approche est extrêmement longue et laborieuse au regard de la taille importante du génome des herpèsvirus et de leur cinétique de réplication relativement lente (Adler *et al.*, 2003). De plus, avec cette stratégie, l'analyse du génome du virus mutant souhaité n'est possible qu'au terme de la procédure expérimentale, révélant seulement à cette dernière étape, les accidents génétiques tels que des recombinaisons parasites, des délétions ou des réarrangements. D'autre part, la sélection des mutants cibles représente également une manœuvre délicate. Pour pallier l'ensemble de ces contraintes, une nouvelle approche pour la construction d'herpèsvirus mutants a été développée. Le principe de celle-ci est basé sur le clonage du génome viral sous la forme d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) dans des cellules d'*Escherichia coli* (*E.coli*). Suite au travail de Messerle *et al.* (Messerle *et al.*, 1997) qui a permis le clonage de l'entièreté du génome du cytomégalovirus murin en tant que BAC, de nombreux autres herpèsvirus parmi lesquels figure l'EBV (Delecluse *et al.*, 1998), le KSHV (Delecluse *et al.*, 2001) et le MuHV-4 (Adler *et al.*, 2000), ont eux aussi été BAC-clonés. Cette technique permet le maintien du génome viral en tant qu'unité circulaire dans la cellule bactérienne ainsi que sa réplication par le système procaryote. La transfection ultérieure du plasmide BAC au sein de cellules eucaryotes assure ensuite la reconstitution du virion infectieux. Avec cette méthode, la mutagenèse du génome viral au sein des cellules *E.coli* en utilisant les

fonctions des recombinaisons procaryotes est possible et permet des manipulations plus aisées du génome viral.

Afin de générer un virus BAC-cloné, le génome viral doit être inséré au sein d'un vecteur contenant la cassette BAC. Outre des marqueurs de sélection, cette cassette BAC comporte le matériel génétique nécessaire à la réplication du plasmide par le système bactérien et à sa distribution au sein des cellules filles, suite à la division cellulaire. La souche V. test du BoHV-4 a récemment été BAC-clonée au sein du laboratoire (Gillet *et al.*, 2005a). Cet outil a considérablement accéléré les recherches menées sur le BoHV-4 et a ouvert de nouvelles perspectives d'utilisation de ce virus en tant que vecteur d'expression pour des transgènes d'intérêt (Gillet *et al.*, 2009c). Pour mettre au point cet outil, 2 régions non codantes situées aux extrémités de la longue région unique d'ADN ont été sélectionnées pour l'insertion de la cassette BAC, encadrée des sites spécifiques loxP. Chacune des insertions a donné lieu, indépendamment, à des clones BAC BoHV-4 qui se sont maintenus de manière stable en bactéries et qui ont été capables de régénérer des virions infectieux suite à leur transfection en cellules eucaryotes permissives. Ces virions reconstitués se répliquent de manière comparable à la souche sauvage parentale tandis que l'infection de cellules eucaryotes exprimant la recombinaison Cre permet l'excision subséquente de la cassette BAC.

### Glycoprotéines virales

Le processus de glycosylation des protéines de cellules eucaryotes a lieu au niveau des compartiments du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi (AG). La machinerie de glycosylation cellulaire est largement exploitée par les herpèsvirus. Au sein de l'enveloppe virale, il existe des protéines transmembranaires qui sont glycosylées. Deux grandes classes d'oligosaccharides associés aux protéines sont décrites : les glycans O- et N-liés.

Les sucres N-liés se fixent aux résidus asparagines (Asn) de la protéine, au niveau d'une séquence consensus : Asn-X-sérine/thréonine ou plus rarement Asn-X-cystéine. Ils sont constitués d'un noyau pentasaccharidique conservé de trois mannoses (Man) et de deux N-acétylglucosamines (NAc) selon l'agencement Man- $\alpha$ 1,6-(Man- $\alpha$ 1,3)-Man- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\beta$ 1,4-GlcNAc-Asn. Lors de la synthèse des protéines destinées à être N-glycosylées, la partie oligosaccharidique d'un précurseur (le dolichodiphosphate) ancré dans la membrane du RE, est ajoutée en « bloc » sur la chaîne polypeptidique naissante (Figure 6). Cette partie oligosaccharidique subit une maturation progressive au cours de la migration du polypeptide glycosylé au sein des compartiments du RE et de l'AG. Les N-glycans forment des structures branchées généralement volumineuses. Les N-glycans sont subdivisés en 3 sous classes selon le type de structures additionnées au noyau conservé. Ainsi, on distingue, les oligomannoses où seuls des résidus mannoses sont ajoutés au noyau, les sucres « complexes » au niveau desquels des « antennes » sont fixées au noyau et enfin, des structures dites

« hybrides » composées de résidus mannoses et d'antennes selon une répartition précise. Les fonctions des N-glycans sont multiples étant donné qu'ils interviennent dans le folding correct des protéines et qu'ils affectent plusieurs de leurs propriétés telles que la solubilité, l'oligomérisation ou l'antigénicité. Lors de la maturation des glycoprotéines, les N-glycans servent des « tags » reconnus par des enzymes spécifiques pour orienter et ordonner leurs modifications (Helenius & Aebi, 2001).

Contrairement à l'addition en « bloc » des oligosaccharides N-liés sur les polypeptides, l'addition des sucres O-liés se fait de manière séquentielle et ne nécessite pas de séquence consensus. Il n'existerait donc pas de précurseur oligosaccharidique, comme observé pour les N-glycans. L'étape initiale de la O-glycosylation dans les cellules de mammifères est l'attachement covalent du monosaccharide NAc sur les résidus sérine ou thréonine du polypeptide via un lien  $\alpha 1$ . De manière générale, les O-glycans forment des structures avec moins de branchements que celles des N-glycans (Van den Steen *et al.*, 1998). Selon l'action de glycosyltransférases spécifiques, les O-glycans se diversifient par l'ajout de structures nommées « core » 1, 2, 3 ou 4 (Figure 6) selon la nature du monosaccharide et ainsi que celle du lien spécifique (Marth, 1996). Cette biosynthèse a lieu au niveau de l'AG. Les O-glycans interviennent eux aussi dans des processus biologiques multiples. Par exemple, la O-glycosylation est importante pour la formation des molécules de type « mucines » retrouvées en surface de tous les épithéliums tapissés de mucus mais également pour la formation des antigènes du système ABO ou encore pour la régulation du développement ou des fonctions du système hématopoïétique.

Outre ces exemples de rôles spécifiques dans la biologie cellulaire, les O et N-glycans sont extensivement exploités au profit de l'infection virale. Ainsi, la présence des glycans permet à certains virus de se protéger de la neutralisation par les Ac (Burton *et al.*, 2005; Francica *et al.*, ; Wang *et al.*, 2009). A ce titre, les N-glycans représentent des structures volumineuses capables de masquer les épitopes conformationnels des protéines virales (Burton *et al.*, 2005; Knossow & Skehel, 2006). Par contre, leur présence au niveau de petites glycoprotéines pourrait interférer avec les interactions inter-protéiques. A l'inverse, les O-glycans constituant des structures plus petites, ils pourraient être plus adaptés pour encadrer des épitopes linéaires tels que ceux retrouvés au niveau de l'extrémité N-terminale de nombreuses glycoprotéines virales et dissimuler celles-ci.

Les glycoprotéines d'enveloppe des herpèsvirus interviennent dans plusieurs étapes du cycle viral. Elles sont responsables de l'attachement du virus sur son/ses récepteur(s) cellulaire(s) et de sa pénétration dans les cellules sensibles. Elles induisent la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire. Elles sont également impliquées dans l'enveloppement de la capsid virale, dans la sortie du virus et dans la propagation de l'infection virale de cellule à cellule. Enfin, certaines glycoprotéines virales peuvent perturber les voies de signalisation cellulaire (D'Addario *et al.*, 2001) ou encore intervenir dans les processus d'immuno-évasion (Favoreel *et al.*, 2006). On considère

généralement qu'il existe 5 glycoprotéines conservées chez tous les herpèsvirus, ayant sans doute des fonctions biologiques communes: les glycoprotéines gB, gH, gL, gM et gN (Lake *et al.*, 1998). Les autres glycoprotéines traduisent probablement quant à elles des adaptations individuelles aux différentes niches écologiques. Comme les autres virus enveloppés, pour entrer au niveau d'une cellule cible, les herpèsvirus doivent fusionner la membrane lipidique de leur enveloppe avec celle de la cellule. Cependant, à la différence de la plupart des autres virus enveloppés qui utilisent une ou deux glycoprotéines pour atteindre cet effet, l'entrée des herpèsvirus requiert au minimum deux ou trois glycoprotéines conservées ainsi que dans certains cas, des glycoprotéines additionnelles. Alors que les herpèsvirus se fixent à des récepteurs cellulaires variés, ils utilisent une machinerie de fusion virale de base extrêmement conservée. Ce mécanisme de fusion repose sur un noyau formé par gB, gH, gL. Suite à leur importance pour l'infection virale, ces glycoprotéines constituent souvent la cible majeure des Ac neutralisants.

Une courte revue des connaissances sur les glycoprotéines conservées des herpèsvirus et sur les glycoprotéines additionnelles propres au BoHV-4 est présentée ici. Par ailleurs, concernant les spécificités du BoHV-4, une étude antérieure a identifié sur base de virions purifiés, 29 polypeptides de structures par électrophorèse en gel de polyacrylamide à une dimension (Dubuisson *et al.*, 1989a). Ces polypeptides ont été nommés respectivement GVP (gp) ou VP selon leur profil glycosylé ou non et numérotés de 1 à 29, du plus lourd au plus léger. Dix d'entre eux, décrits au niveau de l'enveloppe virale, sont glycosylés (GVP3, 6, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 21 et 29). De nombreux anticorps monoclonaux ont été produits pour étudier ces protéines structurales (Dubuisson *et al.*, 1992a; Dubuisson *et al.*, 1992b; Dubuisson *et al.*, 1989c). Ces études ont permis la localisation d'épitopes neutralisants dans différents domaines des complexes protéiques (Dubuisson *et al.*, 1989a; Dubuisson *et al.*, 1990). Malgré l'intérêt considérable de ces informations, la plupart des cibles des anticorps monoclonaux (Mab) produits n'ont pas encore été définies avec certitude bien que certains aient été utilisés dans le cadre de ce travail. Dans un souci de clarté, les glycoprotéines du BoHV-4 sont énumérées ici sur base du génome séquencé et des analogies existantes avec les autres herpèsvirus.

### *Glycoprotéines conservées*

La glycoprotéine **gB** est la protéine d'enveloppe la plus conservée au sein des herpèsvirus (Backovic *et al.*, 2009; Heldwein & Krummenacher, 2008; Heldwein *et al.*, 2006; Matsuura *et al.*) et est nécessaire à la fusion virale ainsi qu'à la propagation de cellules en cellules. Cependant, gB seule est insuffisante pour assurer l'entrée du virion libre ou son passage de cellule à cellule. La plupart de herpèsvirus utilisent au moins gH et gL en addition de gB pour ces processus. La seule exception

connue à ce jour est l'exemple de l'EBV puisqu'une étude a montré que la fusion de cellules épithéliales pouvait être assurée par une protéine gB recombinante présentant une extrémité C-terminale tronquée et en l'absence de gH et gL (McShane & Longnecker, 2004). La cristallisation de l'ectodomaine de la gB de l'HSV-1 a permis de définir sa structure tridimensionnelle et de préciser son rôle au cours de l'infection virale (Heldwein *et al.*, 2006). Plus récemment, la définition par cristallographie de la gB de l'EBV a mis en évidence les similitudes partagées par ces deux homologues ainsi que quelques différences dans l'organisation des domaines et dans le profil électrostatique (Backovic *et al.*, 2009). Sur base de ces informations, les caractéristiques majeures de gB sont résumées ici.

La protéine gB est présente au niveau de l'enveloppe virale sous la forme de trimère dont chaque protomère est constitué de 5 domaines distincts disposés selon une architecture complexe. De multiples contacts entre chaque protomère assurent la stabilité de la molécule (Heldwein *et al.*, 2006). Présentant les caractéristiques d'une protéine membranaire de type I, gB possède donc une ancre transmembranaire hydrophobe près de son extrémité C-terminale tandis que l'ectodomaine hydrophile comporte de nombreux sites de N-glycosylation ainsi que le peptide signal (Pertel, 2002). De manière inattendue, gB contient deux domaines homologues de la pleckstrine (PH) arrangés en tandem. Ainsi l'un des deux pourrait interagir au niveau des voies de signalisation cytoplasmiques cellulaires en formant un bouclier pour la fixation des lipides phosphatidylinositol. Le deuxième domaine, situé au niveau de la portion extracellulaire de la protéine, pourrait fixer des lipides ou d'autres molécules partageant des conformations semblables à celles des domaines PH et par conséquent, servir de sites d'interaction avec d'autres protéines (Heldwein & Krummenacher, 2008). Partageant des caractéristiques communes aux glycoprotéines de fusion de classe I et II, gB a récemment été redéfinie comme une glycoprotéine de fusion de classe III, incluant également la glycoprotéine G du *vesicular stomatitis virus* (VSV) (Roche *et al.*, 2007) et celle de la protéine gp64 du baculovirus (Kadlec *et al.*, 2008).

La glycoprotéine gB présente des conformations pré- et post-fusion différentes. Par analogie avec la glycoprotéine G du VSV, il est probable que la forme cristallisée disponible de la protéine corresponde à la conformation dite « post-fusion » (Heldwein & Krummenacher, 2008). Le changement de conformation de gB serait induit par la liaison de celle-ci à son récepteur et permettrait d'une part, de rapprocher l'enveloppe virale et la membrane de la cellule et d'autre part, d'améliorer l'exposition des domaines hydrophobiques nécessaires à l'induction de la fusion. De manière intéressante, la gB de l'EBV est particulièrement riche en domaines hydrophobiques (Backovic *et al.*, 2007b). Cette particularité pourrait expliquer pourquoi elle est capable d'assurer la fusion en l'absence de gH et gL (Backovic *et al.*, 2007a).

Un grand nombre des homologues de gB présents au sein des trois sous-familles d'herpèsvirus possède un site de clivage précis, reconnu par la protéase cellulaire furine (Baghian *et al.*, 2000; Britt & Vugler, 1989; Johannsen *et al.*, 2004; Okazaki, 2007). Dans la particule virale, la plupart des molécules de gB semblent être présentes sous leur forme clivée (Backovic *et al.*, 2007b; Galdiero *et al.*, 2008; Johannsen *et al.*, 2004; Okazaki, 2007). L'impact de ce clivage de gB sur l'infection n'est pas élucidé (Sorem & Longnecker, 2009) puisque ce processus n'a pas d'effet sur la réplication de l'herpèsvirus bovin 1, le virus de la maladie d'Aujeszky ou encore le cytomegalovirus humain mais pourrait diminuer la propagation virale de cellules en cellules (Kopp *et al.*, 1994) (Okazaki, 2007). Une autre étude menée chez l'EBV suggère également que le clivage de gB est requis pour assurer la fonction de fusion de cellules en cellules.

L'extrémité N-terminale de gB (gB-NT) représente une cible pour les Ac chez plusieurs herpèsvirus (Akula *et al.*, 2002; Gillet *et al.*, 2006; Holloway *et al.*, 1998; Ohlin *et al.*, 1993). La base de la neutralisation par ces Ac n'est pas claire. gB-NT de l'herpèsvirus simplex a une fonction de liaison à l'héparine (Laquerre *et al.*, 1998), celle du KSHV fixe les intégrines (Akula *et al.*, 2002) tandis que la neutralisation de gB-NT du MuHV-4 intervient à une étape postérieure à l'attachement (Gillet *et al.*, 2006). Chez le MuHV-4, gB-NT semble couvrir et protéger le complexe gH, gL et dégage celui-ci pour permettre à la fusion d'avoir lieu à l'abri des Ac. La présence de nombreux O-glycans portés par cette gB-NT la protège elle-même de l'accès aux Ac (Gillet & Stevenson, 2007a). La conservation des sites de O-glycosylation au niveau des séquences des gB-NT des gammaherpèsvirus suggère que ce mécanisme d'évasion pourrait être partagé par d'autres virus.

La glycoprotéine gB du BoHV-4 est encodée par l'**ORF8** et est localisée au niveau du second bloc de gènes conservés parmi les gammaherpèsvirus. Cette glycoprotéine, dont la séquence nucléotidique est étroitement apparentée à celle des autres rhadinovirus (Goltz *et al.*, 1994), est longue de 873 acides aminés (aa). Comme ses homologues, elle est incorporée dans la particule virale et présente les caractéristiques d'une glycoprotéine membranaire, de type I (Lomonte *et al.*, 1997b). Un site de clivage par la furine a également été identifié (Goltz *et al.*, 1994). Sur base de western blot réalisés en conditions réductrices ou non, les résultats obtenus ont suggéré que la gB mature résulte du clivage protéolytique d'un précurseur en deux unités glycoprotéiques liées ensemble par des ponts disulfures. Ces deux sous-unités, correspondant aux parties N et C terminales de gB, possèdent de nombreux sites potentiels de O-glycosylation. La digestion de ces polypeptides par une « Peptide N-glycosidase F » (PGNase F), spécifique des N-glycans et une analyse par western blot subséquente ont par ailleurs confirmé que les deux unités glycoprotéiques subissaient des modifications supplémentaires dans l'AG telle que la N-glycosylation (Lomonte *et al.*, 1997b). De plus, la gB-NT du BoHV-4 présente une succession surprenante de sérine-thréonine suggérant également l'addition d'abondants O-glycans. Ainsi, en accord avec la masse moléculaire apparente (MMA) de 210 kDa obtenue par western blot en conditions non réductrices, les deux sous-unités de

gB liées par des ponts disulfures pourraient être processées au niveau de l'appareil de golgi pour former un hétérodimère O et N-glycosylé (Lomonte *et al.*, 1997b). Ces observations confortent les données précédemment décrites par Dubuisson *et al.* qui ont montré l'association covalente des glycoprotéines alors nommées gp10 et gp17 pour former un hétérodimère gp10/gp17 (Dubuisson *et al.*, 1989a).

Les glycoprotéines **gH** et **gL** sont associées en un complexe conservé parmi les herpèsvirus. Ce complexe, avec gB, est requis pour l'entrée virale et la fusion de cellule à cellule (Heldwein & Krummenacher, 2008). Deux études rapportent cependant que l'expression en gène isolé de gH/gL induit la formation de syncytia au niveau des cellules transfectées, en l'absence de toutes autres protéines virales (Cole & Grose, 2003; Kinzler & Compton, 2005). gH/gL sont également des cibles majeures de la neutralisation par les Ac.

La récente cristallisation du complexe gH/gL de l'HSV-2 (Chowdary *et al.*, 2010), de l'EBV (Matsuura *et al.*, 2010) et celle partielle de gH du virus de la maladie d'Aujeszky (Backovic *et al.*, 2010) a permis de définir la structure du complexe et de mieux comprendre son rôle au cours de l'infection. De plus le caractère conservé de ce complexe suggère des propriétés communes avec les autres herpèsvirus (Gillet *et al.*, 2008b; Heldwein & Krummenacher, 2008). gH est une glycoprotéine présentant un large ectodomaine et une ancre transmembranaire unique. A l'inverse, gL est constituée d'une courte séquence peptidique et ne possède pas de région transmembranaire. Il semble donc que la présence de gL à la membrane plasmique de la cellule infectée soit directement liée à son association avec gH (Dubin & Jiang, 1995). Cette dépendance est vraisemblablement réciproque. En effet, gL semble essentielle pour le « folding », la présentation de certains épitopes et l'acheminement correct de gH au niveau des membranes. En l'absence de gL, gH est le plus souvent retenue dans le cytoplasme et n'est pas incorporée dans l'enveloppe virale. Ensemble, gH/gL forment une structure de forme allongée, constituée de quatre domaines disposés selon l'axe longitudinal de la molécule et adoptant des conformations secondaire et tertiaire propres (Matsuura *et al.*, 2010). Le domaine N-terminal est moins bien défini et semble constituer la région la plus mobile de l'hétérodimère (Matsuura *et al.*, 2010).

Le rôle propre de gL est controversé : certains auteurs soutiennent que gL n'agit qu'en tant que protéine chaperonne pour gH (Hutchinson *et al.*, 1992) et qu'en l'absence de cette dernière, gL est larguée dans le milieu extracellulaire. Le rôle précis de gH/gL dans la fusion reste peu clair. Plusieurs études rapportent que gH pourrait avoir un rôle effecteur dans la fusion et agir comme une glycoprotéine de fusion de classe I. Différents peptides de fusion ont été proposés au sein de la séquence de gH de l'HSV (Galdiero *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2005) tandis qu'aucun domaine fusogénique n'a été identifié chez gL suggérant un rôle indirect dans la fusion (Gillet *et al.*, 2008b). Des études récentes ont quant à elles suggéré que le complexe gH/gL agissait essentiellement en tant

que régulateur de l'activation de gB (Chowdary *et al.*, ; Hutt-Fletcher, 2007; Matsuura *et al.*, ; Wu & Hutt-Fletcher, 2007). Des investigations fonctionnelles et structurales plus approfondies sont nécessaires pour préciser le rôle de gH/gL au cours de la fusion (Heldwein & Krummenacher, 2008).

Des études récentes chez le MuHV-4 ont soulevé quelques particularités au niveau du complexe d'entrée gH/gL. Tout d'abord, chez le MuHV-4, à l'inverse d'autres gammaherpèsvirus, un virus mutant délété pour gL est capable d'incorporer gH au niveau de son enveloppe et de demeurer infectieux (Gillet *et al.*, 2007b). Ainsi, gB et gH sont associées constitutivement et indépendamment de gL via des interactions intramembranaires (Gillet & Stevenson, 2007b). Les virions délétés pour gL présentent une atténuation par rapport au virus sauvage et montrent un déficit d'attachement aux fibroblastes. Ce déficit est dû au fait que le complexe gH/gL fixe les glycosaminoglycans (GAGs) de la surface cellulaire alors que gH seule en est incapable (Gillet *et al.*, 2008a; Gillet *et al.*, 2007b). De plus, gH subit un changement de conformation nécessaire à la fusion au sein des endosomes tardifs, suite à la dissociation de gL. Lorsque le virion est délété en gL, il semble que gB et gH adoptent leur conformation secondaire prématurément, induisant alors une libération précoce des capsides et une diminution du pouvoir infectieux (Gillet *et al.*, 2009a; Gillet *et al.*, 2008b). Dès lors une fonction importante de gL pourrait être la régulation de la conformation de gB et gH menant à la fusion des membranes. Ce mécanisme complexe de fusion, médié par gB et gH au sein des endosomes tardifs, pourrait protéger les épitopes essentiels, des anticorps neutralisants.

La machinerie de fusion de l'EBV présente quant à elle un niveau de complexité supplémentaire. En effet, ce virus utilise des mécanismes d'entrée différents au niveau des cellules épithéliales et au niveau des lymphocytes B. Pour ces deux types cellulaires, les composants gB, gH/gL sont nécessaires à la fusion ; cependant l'infection des lymphocytes B requiert une protéine additionnelle, la glycoprotéine gp42, fixant les molécules *human leucocyte antigen* (HLA) de classe II (Hutt-Fletcher, 2007). La glycoprotéine gp42 présente plusieurs sites d'interactions protéiques (Mullen *et al.*, 2002) et se complexe avec l'hétérodimère gH/gL via sa région N-terminale (Kirschner *et al.*, 2006; Kirschner *et al.*, 2009).

Les homologues de gH et gL chez le BoHV-4 ont été caractérisés (Lomonte *et al.*, 1997a). L'**ORF22** encodant gH est composée de 2121 nucléotides et génère une protéine de 706 aa de masse MMA de 81,5 kDa. Seize sites potentiels de N-glycosylation sont présents sur la séquence qui possède un profil d'hydrophobicité caractéristique d'une glycoprotéine de type I. L'**ORF47** encodant gL a une longueur de 420 nucléotides, forme une protéine de 139 aa et possède une MMA de 15,8 kDa. Six sites potentiels de N-glycosylation se retrouvent au sein de la séquence. L'analyse de la structure secondaire de la protéine n'a pas mis en évidence de séquence potentielle d'ancrage. La détection par western blot de ces deux protéines sur viron a mis en évidence deux produits de 110 et 50-65 kDa correspondant respectivement à gH et gL. Un western blot réalisé sur cellules infectées a



mis en évidence un précurseur supplémentaire de gL de 31-35 kDa. La différence entre masses théoriques et masses apparentes s'explique par la N-glycosylation des précurseurs de ces protéines. Les différentes bandes obtenues pour gL pourraient être une conséquence de l'addition de N mais aussi de O-glycans (Lomonte *et al.*, 1997a). Le traitement de ces glycoprotéines à la PGNase F a permis de confirmer la N-glycosylation. La formation du complexe gH/gL, décrit chez les autres herpèsvirus, a également été démontrée pour le BoHV-4 par co-immunoprécipitation des deux glycoprotéines.

**gM et gN** sont deux autres glycoprotéines conservées au sein des herpèsvirus et semblent importantes à différents niveaux du cycle viral dans les trois sous-familles. Peu d'informations sur leur rôle précis sont cependant disponibles. gM est une glycoprotéine de type III contenant de multiples domaines transmembranaires (six à huit) (Dijkstra *et al.*, 1996; Jons *et al.*, 1998; MacLean *et al.*, 1993; May *et al.*, 2008; Osterrieder *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998). Certains auteurs ont suggéré que ces régions transmembranaires pourraient permettre le passage d'ions au travers de la membrane plasmique ou agir comme récepteur multiple pour différents ligands (Singer, 1990). Alors que les gMs chez les alphaherpèsvirus ne sont pas essentielles pour la réplication virale, à l'exception du virus de la maladie de Marek (Tischer *et al.*, 2002), leur absence induit un défaut de croissance (Dijkstra *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 1996; Osterrieder *et al.*, 1996). Chez plusieurs virus de sous-familles différentes comme le cytomégalovirus humain (Krzyzaniak *et al.*, 2007) ou le MuHV-4 (May *et al.*, 2008), gM adresse des signaux de trafic intracellulaire essentiels pour l'assemblage de la particule virale. Chez l'HSV-1 et l'EHV-1, cette glycoprotéine pourrait intervenir dans la pénétration du virus et dans le passage du virus de cellules en cellules (Davis-Poynter *et al.*, 1994; Osterrieder *et al.*, 1996). En conséquence, gM semble jouer des rôles distincts au sein des herpèsvirus. Certaines caractéristiques sont cependant partagées. Ainsi, chez un grand nombre d'herpèsvirus, gM forme un complexe avec d'autres protéines virales dont gN. gN est requise pour l'acheminement de gM vers l'AG ou vers d'autres compartiments lors de l'assemblage puis la sortie des virions (Koyano *et al.*, 2003; Lake *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2005). gM et gN sont liées par un pont disulfure (Jons *et al.*, 1998; Koyano *et al.*, 2003; Mach *et al.*, 2005) tandis que d'autres interactions non covalentes peuvent également intervenir (Mach *et al.*, 2005). Une étude récente chez le VZV a montré que gM était massivement glycosylée et intervenait dans la propagation du virus de cellules en cellules (Yamagishi *et al.*, 2008). De plus, d'autres auteurs ont mis en évidence chez ce même virus que le gène codant pour gM génère 4 transcrits différents par un phénomène d'épissage alternatif et que la gM transmembranaire décrite jusqu'alors dérivait du transcrit non épissé. Selon cette étude, certains acides aminés de la protéine sont indispensables à la formation du complexe avec gN et à son folding correct en surface membranaire (Sadaoka *et al.*, 2010).

Chez le BoHV-4, très peu d'informations sont disponibles sur gM et gN. gM est une protéine de 369 aa encodée par l'**ORF39**. gN elle, est encodée par l'**ORF53** et est composée d'une séquence peptidique de 90 aa.

Outre les 5 glycoprotéines conservées chez tous les herpesvirus, de nombreuses autres existent et peuvent être spécifiques d'une sous-famille, d'un genre voire même d'un virus particulier. Toutes les glycoprotéines du BoHV-4 n'ont pas été caractérisées en détail. Sur base du génome et des éléments décrits pour les autres gammaherpèsvirus, une courte présentation des glycoprotéines additionnelles du BoHV-4 est résumée ici.

### *Glycoprotéines additionnelles*

Outre, gB, gH, gL, gM et gN, trois glycoprotéines additionnelles potentielles sont décrites chez le BoHV-4. Il s'agit de l'**ORF27**, de l'**ORF58** et de l'**ORF51**.

Décrite chez le MuHV-4 mais aussi chez l'EBV et le KSHV, l'**ORF27** est conservée chez les gammaherpèsvirus et encode une protéine massivement glycosylée, exprimée en surface des cellules. Cette glycoprotéine, gp48 chez le MuHV-4, semble directement contribuer à la dissémination du virus depuis les cellules supportant l'infection lytique, vers les cellules non infectées. *In vivo*, un mutant délété pour l'**ORF27** montre une réduction de l'infection lytique au sein des organes cibles (May *et al.*, 2005). Le BoHV-4 possède une **ORF27** encodant une protéine hypothétique de 212 acides aminés. Cette protéine pourrait également intervenir au niveau de la propagation virale de cellules en cellules.

L'**ORF58** du MuHV-4 encode une protéine comportant de multiples domaines transmembranaires dont le rôle semble être étroitement lié à la présence de gp48. En effet, l'absence de gp48 induit la séquestration du produit de l'**ORF58** (p**ORF58**) au sein des compartiments du RE et de l'AG tandis que les deux protéines, ensemble, forment un complexe impliqué dans la propagation virale de cellules en cellules. Le mécanisme d'action de ces deux protéines reste peu clair. Alors que le rôle de p**ORF58** pourrait être simplement le folding correct de gp48, ces produits participent tous deux aux réarrangements de l'actine cellulaire assurant la propagation du virus d'une cellule à l'autre (Gill *et al.*, 2008). L'**ORF58** est identifiée au sein de la séquence du BoHV-4 et encode une protéine hypothétique de 350 aa.

Enfin, l'**ORF51** du MuHV-4, à l'origine de la glycoprotéine d'enveloppe gp150, est l'homologue du gène Bo10 du BoHV-4. Ce dernier représentant le centre des recherches menées au cours de cette thèse, une section particulière lui est consacrée ainsi qu'à ces homologues caractérisés chez les autres gammaherpèsvirus.

### 3. Le gène Bo10 et ses homologues positionnels chez les gammaherpèsvirus

#### 3.1.1. Bo10

Parmi les 17 ORF particulières au BoHV-4, le gène Bo10, anciennement nommé BORFD1, présente des caractéristiques intéressantes. En effet, situé à l'extrémité droite du génome (Figure 5), entre les ORF50 et 52 (Zimmermann *et al.*, 2001b), ce gène représente l'homologue positionnel du gène BLLF1 de l'EBV encodant la glycoprotéine d'enveloppe gp350/220. De plus, constitué de deux exons séparés par un intron, Bo10 encode une succession surprenante de sérines et thréonines constituant des sites potentiels de O-glycosylation. Le BoHV-4 semble exploiter extensivement le processus de glycosylation. En effet, outre l'existence potentielle d'un squelette représenté par Bo10 portant des sucres O-liés, le BoHV-4 possède l'enzyme C2GnT-M produite par le gène Bo17. Alors que Bo17 a fait l'objet de plusieurs études (Dewals *et al.*, 2005; Markine-Goriaynoff, 2001; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003a; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004a; Vanderplasschen *et al.*, 2000) qui ont suggéré son importance pour l'infection du BoHV-4, le gène Bo10 n'avait pas encore fait l'objet de caractérisation avancée et pourrait jouer un rôle clé dans l'évasion de la réponse immune. Tous les gammaherpèsvirus décrits présentent un homologue du gène Bo10. Chez l'EBV, cet homologue est le gène BLLF1. Chez le KSVH, l'homologue est représenté par le gène K8.1 encodant K8.1A, par l'ORF51 chez l'herpèsvirus saimiri et par le gène M7 encodant la glycoprotéine gp150 chez le MuHV-4.

### 3.1.2. EBV gp350/220

Alors que le complexe gB, gH, gL, étroitement conservé au sein de la famille des *Herpesviridae*, constitue un élément clé dans le mécanisme de fusion des gammaherpèsvirus (Herrold *et al.*, 1996; Molesworth *et al.*, 2000; Pertel *et al.*, 1998), d'autres protéines accessoires interviennent également. La fonction de ces dernières reste cependant peu claire. Parmi celles-ci, la glycoprotéine gp350/220 de l'EBV, encodée par le gène BLLF1, est la mieux étudiée. Massivement glycosylée, gp350 présente potentiellement 30 sites de N- et 140 sites de O-glycosylation (Serafini-Cessi *et al.*, 1989). Représentante majeure de l'enveloppe virale, la glycoprotéine gp350/220 est désignée de cette façon suite au phénomène d'épissage alternatif du gène BLLF1, générant une protéine de 350 ou de 220 aa. Ces deux produits possèdent une ancre transmembranaire et constituent le ligand du récepteur au composant C3d du complément, le récepteur CD21 ou CR2 (*complement receptor 2*), présent en surface des lymphocytes B (Fingerth *et al.*, 1984; Nemerow *et al.*, 1987; Nemerow *et al.*, 1985; Tanner *et al.*, 1987). Fortement immunogène, gp350 est une cible pour les Ac neutralisant l'infection des lymphocytes B (Thorley-Lawson & Poodry, 1982). De plus, une protéine gp350 recombinante soluble est capable de saturer les récepteurs CD21 et donc d'inhiber l'infection des cellules CD21 positives (Maruo *et al.*, 2001), démontrant par là, le rôle clé de cette glycoprotéine dans l'adsorption de l'EBV. Par ailleurs, des virus mutants déficients en gp350 sont pauvrement infectieux pour les lymphocytes B (Janz *et al.*, 2000; Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Ces caractéristiques expliquent pourquoi gp350 représente un candidat intéressant pour des stratégies vaccinales ciblées. Cependant, si les Ac anti-gp350 neutralisent l'infection des lymphocytes B, ces mêmes Ac améliorent au contraire l'infection des cellules épithéliales CD21 négatives (Turk *et al.*, 2006). Ce paradoxe est expliqué par la différence entre le mécanisme d'attachement du virus au niveau des lymphocytes B et au niveau des cellules épithéliales (Hutt-Fletcher, 2007).

Au niveau des lymphocytes B, les multiples molécules de gp350/220 de l'enveloppe virale agrègent les récepteurs CD21 au niveau de la membrane plasmique, provoquant ensuite l'endocytose du virus puis sa fusion avec l'enveloppe de l'endosome à faible Ph (Hutt-Fletcher, 2007; Nemerow & Cooper, 1984; Tanner *et al.*, 1987). En surface des lymphocytes B, la portion extracellulaire du récepteur CD21 est constituée d'une répétition de courtes séquences consensus donnant au récepteur une certaine flexibilité (Weisman *et al.*, 1990). Le processus d'attachement positionne initialement l'EBV à approximativement 50 nm de la surface cellulaire (Nemerow & Cooper, 1984). Cependant, la partie flexible du récepteur CD21 ainsi que la possibilité d'un changement d'attachement de gp350 à gp220 pourraient contribuer à rapprocher le virus de la membrane cellulaire (Hutt-Fletcher, 2007). Le CD21 est également associé à différents complexes protéiques impliqués dans les voies de signalisation cellulaires (Sinclair & Farrell, 1995; Sugano *et al.*, 1997). L'agrégation des CD21 pourrait de plus déclencher un signal déterminant l'endocytose de virions attachés.

Au contraire, l'infection des cellules épithéliales est indépendante des récepteurs CD21. Au moins trois mécanismes d'attachement différents ont été proposés pour l'infection des cellules épithéliales (Hutt-Fletcher, 2007). Le premier repose sur la fixation d'IgA anti-gp350 au récepteur basolatéral des cellules (Sixbey & Yao, 1992), le deuxième implique les glycoprotéines gH, gL pouvant servir de ligands potentiels (Molesworth *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 2000), le troisième suppose l'interaction entre une autre glycoprotéine de membrane encodée par l'ORF BMRF2 et des intégrines (Tugizov *et al.*, 2003).

L'exposition de la gp350 en surface du virus semble avoir un effet inhibiteur pour l'infection des cellules épithéliales tandis que des Ac anti-gp350 améliorent l'efficacité de cette même infection (Turk *et al.*, 2006). Cet effet n'est pas expliqué par la liaison des récepteurs Fc des Ac anti gp350 mais peut être bien par le déplacement de gp350 en surface de l'enveloppe suite à la fixation des Ac. La salive de patients EBV séropositifs produit le même effet qui peut être reversé par la déplétion de la salive en Ac. L'interprétation donnée de ces résultats est que la présence de gp350/220 en abondance en surface du virus pourrait empêcher l'accès d'autres protéines essentielles à la surface cellulaire (Hutt-Fletcher, 2007). De plus, la coculture de lymphocytes B et de cellules épithéliales améliore significativement l'efficacité de l'infection de ces cellules épithéliales par l'EBV (Imai *et al.*, 1998). L'investigation de ce phénomène a suggéré un transfert du virus des lymphocytes B en l'absence d'infection ou d'internalisation du virus, vers les cellules épithéliales (Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Les auteurs de cette étude ont également suggéré que l'interaction de gp350/220 avec le récepteur CD21 pourrait dégager des composants de l'enveloppe virale nécessaires à la fusion.

### 3.1.3. KSHV K8.1.A.

L'ORF K8.1 du KSHV est située entre l'ORF K8 et l'ORF52, selon une position semblable à celle identifiée pour le gène BLLF1 de l'EBV. La caractérisation de la transcription de ce gène par isolement de l'ARN de cellules de « lymphome associé aux cavités du corps » (BCBL) stimulées par du tétradécanoyl phorbol acetate (TPA), a permis d'identifier différents transcrits. En effet, un phénomène d'épissage alternatif ainsi que l'existence de plusieurs sites donneurs d'épissage génèrent trois transcrits différents. Le premier, désigné par le terme K8.1  $\gamma$  (Raab *et al.*, 1998) correspond au transcrit non épissé. L'analyse de la séquence a révélé la présence d'un peptide signal potentiel au niveau de l'extrémité N-terminale ainsi que 5 sites de N-glycosylation potentiels. Cependant, aucune séquence correspondant à une ancre transmembranaire n'a été mise en évidence (Chandran *et al.*, 1998). Les deux autres transcrits sont générés suite à un phénomène d'épissage alternatif dépendant du même site accepteur d'épissage mais de deux sites donneurs distincts. Selon les études, ces transcrits sont nommés K8.1A et K8.1B (Chandran *et al.*, 1998) ou respectivement K8.1  $\beta$  et K8.1 $\alpha$  (Raab *et al.*,

1998). Les deux transcrits possèdent les mêmes extrémités N et C-terminales et encodent une région transmembranaire potentielle générée par l'épissage ainsi que de nombreuses sérine/thréonine, sites potentiels de O-glycosylation (Raab *et al.*, 1998).

L'ADN complémentaire (cDNA) nettement prédominant est K8.1A (K8.1  $\beta$ ). Ce cDNA encode un produit de 228 aa d'une masse moléculaire prédite de 25 kDa, possède quatre sites de N-glycosylation (Zhu *et al.*, 1999) et présente les caractéristiques d'une glycoprotéine de type I. Le cDNA le plus court, K8.1B (K8.1 $\alpha$ ) subit par l'épissage une délétion respectant le cadre de lecture (Chandran *et al.*, 1998). Ce cDNA génère un produit de 167 aa d'une masse moléculaire prédite de 18,6 kDa, présente trois sites de N-glycosylation et constitue lui-aussi une glycoprotéine membranaire de type I. La production d'un Ac monoclonal spécifique de la séquence commune des deux produits a permis la mise en évidence de deux glycoprotéines de masses moléculaires apparentes de 42-64 kDa ou de 35-37 kDa à partir de cellules BCBL infectées (Wu *et al.*, 2000). L'incorporation de glucosamine radioactive a révélé que ces deux glycoprotéines étaient fortement glycosylées. Il est probable que le produit de 42-64 kDa dérive du transcrit K8.1A et celui de 35-37 kDa de K8.1B (Wu *et al.*, 2000). Une autre étude a démontré que ces deux glycoprotéines étaient associées à l'enveloppe virale et que la forme K8.1A purifiée à partir de cellules BCBL infectées était prédominante. Par ailleurs, la digestion par différentes glycosidases a révélé que ces protéines contenaient de nombreux sucres O- et N-liés (Zhu *et al.*, 1999). Fortement immunogènes, les glycoprotéines K8.1 A et B sont massivement reconnues par les sera de patients KSHV positifs et peuvent servir de marqueurs sérologiques pour diagnostiquer l'infection (Chandran *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Raab *et al.*, 1998).

De nombreuses études se sont penchées sur le ou les rôle(s) joué(s) par K8.1A au cours de l'infection virale et ont mis en évidence l'implication de cette protéine dans des mécanismes divers. Plusieurs observations ont suggéré que K8.1A intervenait dans les évènements précoces de l'attachement du KSHV. En effet, même si cette glycoprotéine d'enveloppe n'est pas essentielle pour l'infection de cellules 293T (Luna *et al.*, 2004), plusieurs études ont démontré qu'elle interagissait avec les HS de la surface des cellules épithéliales (Wang *et al.*, 2001b) et que l'héparine soluble bloquait l'infection des cellules endothéliales (Birkmann *et al.*, 2001). Si ces résultats montrent une implication de K8.1A dans l'attachement du virus, cela ne signifie pas pour autant que cette protéine est essentielle pour cette étape. En effet, l'utilisation d'une protéine recombinante K8.1A soluble ou d'Ac monoclonaux dirigés contre K8.1A, ne permet pas d'inhiber l'infection des cellules endothéliales. Cette donnée suggère une certaine redondance dans les mécanismes d'attachement du KSHV (Birkmann *et al.*, 2001). De plus, des études récentes ont démontré que K8.1A pouvait activer des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies « *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2* » ou encore l'induction de l'expression d'interféron  $\beta$  (Sharma-Walia *et al.*, 2005; Sharma-Walia *et al.*, 2004).

Malgré les nombreuses études consacrées au gène K8.1 du KSHV, les fonctions de ce dernier restent à préciser davantage. Ainsi, parmi les questions à éclaircir, il serait intéressant de comprendre pourquoi le virus a développé un phénomène d'épissage alternatif ainsi que de déterminer les rôles respectifs des différents produits dérivés de K8.1.

### 3.1.4. MuHV-4 gp150

Le MuHV-4 représente un modèle plus accessible pour étudier les fonctions et caractéristiques des glycoprotéines virales. L'homologue positionnel de BLLF1 et K8.1 chez le MuHV-4 est représenté par le gène M7 encodant la glycoprotéine gp150. Comme ses orthologues, cette protéine est incorporée dans l'enveloppe virale et présente les caractéristiques d'une glycoprotéine de type I. Avec une masse moléculaire prédite est de 47,4 kDa, elle montre pourtant une MMA de 150 kDa. Cette différence est probablement expliquée par une glycosylation massive. En effet, l'analyse de la séquence peptidique de gp150 a révélé 3 sites potentiels de N-glycosylation et 98 sites potentiels de O-glycosylation (Stewart *et al.*, 1996). Fortement immunogène, gp150 avait été proposée comme cible potentielle pour les Ac neutralisants (Stewart *et al.*, 1996). Cependant, si une vaccination avec gp150 semble inhiber l'infection lytique, cette stratégie ne permet pas d'éliminer le virus et n'induit qu'une faible réduction de la quantité de virus à l'état latent (Stewart *et al.*, 1999). Des investigations plus récentes ont démontré que gp150 représentait une cible immunodominante (Gillet *et al.*, 2007c) mais que les Ac générés à son encontre n'étaient pas neutralisants. Au contraire, ces mêmes Ac semblent faciliter l'infection des cellules macrophagiques par leur liaison aux récepteurs Fc présents au niveau de ces cellules (Rosa *et al.*, 2007). Une étude *in vivo* réalisée chez la souris avec un virus recombinant délété pour le gène M7, a mis en évidence que l'infection des cellules épithéliales par le MuHV-4 était un processus complexe, dépendant de plusieurs étapes successives au cours desquelles intervenait gp150. Cette étude a montré que la colonisation de l'hôte infecté était relativement indépendante de gp150 et a suggéré une possible intervention de gp150 dans la libération des virions néo-formés par interaction avec les GAGs de la surface cellulaire (de Lima *et al.*, 2004). Alors que gp150 n'interagit qu'avec une affinité faible avec les GAGs, le phénotype du mutant délété pour gp150 a souligné l'importance de cette interaction (de Lima *et al.*, 2005; Gillet *et al.*, 2007a; Gillet *et al.*, 2008a; Gillet *et al.*, 2009b). En effet, alors que l'infection par le MuHV-4 est étroitement dépendante des HS, le mutant délété pour gp150 n'est plus soumis à cette même dépendance. La prévention assurée par gp150 vis-à-vis d'une infection indépendante des héparans sulfate (HS) pourrait contribuer à l'évasion des Ac.

---

2.

**Objectifs**

---



## Objectifs

Les données de la littérature décrites lors de l'introduction ont souligné d'une part, l'importance que les gammaherpèsvirus constituent pour la médecine humaine et vétérinaire et d'autre part, la difficulté du contrôle de leur infection. En effet, ces virus ont co-évolué avec leur hôte pour échapper à la neutralisation par les Ac spécifiques. Cependant, la clé du succès de toute vaccination anti-virale repose, entre autres, sur la formation à long terme d'Ac neutralisants (Hangartner *et al.*, 2006b). A cette fin, préciser comment agissent les différentes glycoprotéines des gammaherpèsvirus impliquées dans l'entrée, constitue une première étape importante. Tous les gammaherpèsvirus encodent une glycoprotéine accessoire, homologue de la glycoprotéine gp350 de l'EBV. Ces glycoprotéines intervenant souvent dans l'attachement viral, elles constituent potentiellement des cibles de la neutralisation par les Ac.

Malgré l'intérêt majeur accordé aux gammaherpèsvirus humains, leur croissance difficile *in vitro* et l'absence de modèle d'infection accessible *in vivo*, limitent considérablement l'investigation de leurs mécanismes d'immunoévasion. Représentant un modèle d'étude bien établi de la biologie de l'infection des gammaherpèsvirus, le BoHV-4 nous permet d'adresser plus facilement ces questions fondamentales. L'objectif de ce travail fut donc de mettre en évidence le rôle du gène Bo10, homologue du gène encodant la glycoprotéine gp350 de l'EBV, au cours du cycle viral.

Quatre études originales ont été menées autour de cette thématique. Par analogie avec gp350 et ses orthologues, le premier but de ce travail fut d'investiguer une fonction de Bo10 dans l'attachement du virus et dans l'orientation de son tropisme. Ensuite, le rôle de ce gène dans l'évasion de la neutralisation par les Ac spécifiques a été étudié. Dans ce contexte, ce travail s'est intéressé à l'importance des glycanes pour l'infection virale et a analysé les interactions que ces glycanes entretiennent avec le système immunitaire. Une troisième partie a exploré la capacité de neutralisation du BoHV-4 par les Ac naturels du sérum humain et a investigué les composants viraux cibles de cette neutralisation. Enfin, sur base des informations disponibles pour le KSHV, une dernière étude, en cours, s'est attachée à caractériser plus en détails, le profil de transcription du gène Bo10.

---

3.

## **Section expérimentale**

---

## *Préambule*

Les gammaherpèsvirus constituent l'archétype des virus persistants et représentent un intérêt majeur pour la communauté scientifique. Ils ont développé un cycle d'infection élaboré, leur permettant d'échapper à la neutralisation par les Ac spécifiques de l'hôte. Pour améliorer le contrôle de leur infection, il est nécessaire de connaître avec précision les détails de leur mécanisme d'entrée au sein des cellules cibles. Les gammaherpèsvirus, comme les herpèsvirus en général, utilisent un complexe de fusion conservé, composé des glycoprotéines gB, gH, gL. Cependant, des protéines accessoires sont présentes également et leur rôle dans la biologie de l'infection reste imprécis. Parmi ces glycoprotéines additionnelles, figure la glycoprotéine majeure de l'enveloppe de l'EBV, gp350/220. Représentant une cible de la neutralisation de l'infection des lymphocytes B, gp350 est proposée comme un candidat potentiel pour des stratégies vaccinales anti-EBV. Cependant, les Ac anti-gp350 augmentent l'efficacité de l'infection des cellules épithéliales. Aussi, les interactions entre cette glycoprotéine, les Ac et les cellules cibles méritent d'être éclaircies davantage. Le gène Bo10 du BoHV-4 est l'orthologue du gène à l'origine de gp350. La caractérisation de celui-ci constitue un modèle accessible pour l'étude de gp350 et de ses homologues, au sein des gammaherpèsvirus.

---

## 3.1.

**Le gène Bo10 de l'herpèsvirus bovin 4 encode une protéine virale d'enveloppe non essentielle qui oriente le tropisme du virus par une régulation positive et négative**

*« The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a non-essential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects »*

---

*Journal of Virology*, (2011), 85 (2), 1011-102

Machiels B., Lete C., de Fays K., Mast J., Dewals B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A., Gillet, L.

# The Bovine Herpesvirus 4 Bo10 Gene Encodes a Nonessential Viral Envelope Protein That Regulates Viral Tropism through both Positive and Negative Effects<sup>∇</sup>

Bénédicte Machiels,<sup>1</sup> Céline Lété,<sup>1</sup> Katalin de Fays,<sup>1</sup>† Jan Mast,<sup>2</sup> Benjamin Dewals,<sup>1</sup> Philip G. Stevenson,<sup>3</sup> Alain Vanderplasschen,<sup>1</sup> and Laurent Gillet<sup>1\*</sup>

*Immunology-Vaccinology (B43b), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium<sup>1</sup>; Department Biocontrôle, Research Unit Electron Microscopy, Veterinary and Agrochemical Research Centre, VAR-CODA-CERVA, Groeselenberg 99, B-1180 Ukkel, Belgium<sup>2</sup>; and Division of Virology, Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, CB21QP, United Kingdom<sup>3</sup>*

Received 20 May 2010/Accepted 28 October 2010

**All gammaherpesviruses encode a glycoprotein positionally homologous to the Epstein-Barr virus gp350 and the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K8.1. In this study, we characterized the positional homologous glycoprotein of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4), encoded by the Bo10 gene. We identified a 180-kDa gene product, gp180, that was incorporated into the virion envelope. A Bo10 deletion virus was viable but showed a growth deficit associated with reduced binding to epithelial cells. This seemed to reflect an interaction of gp180 with glycosaminoglycans (GAGs), since compared to the wild-type virus, the Bo10 mutant virus was both less infectious for GAG-positive (GAG<sup>+</sup>) cells and more infectious for GAG-negative (GAG<sup>-</sup>) cells. However, we could not identify a direct interaction between gp180 and GAGs, implying that any direct interaction must be of low affinity. This function of gp180 was very similar to that previously identified for the murid herpesvirus 4 gp150 and also to that of the Epstein-Barr virus gp350 that promotes CD21<sup>+</sup> cell infection and inhibits CD21<sup>-</sup> cell infection. We propose that such proteins generally regulate virion attachment both by binding to cells and by covering another receptor-binding protein until they are displaced. Thus, they regulate viral tropism both positively and negatively depending upon the presence or absence of their receptor.**

Many viruses use a single glycoprotein for both cell binding and membrane fusion. Herpesviruses are more complex. Three proteins—gB, gH, and gL—form a core fusion machinery conserved in the *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammaherpesvirinae* subfamilies (21). Most herpesviruses also encode at least one additional receptor-binding protein that is more specific for a given virus subfamily. For example, herpes simplex virus first attaches to cells by gB or gC binding to the heparan sulfate moieties of the cell surface proteoglycans. gD must then bind for fusion to occur (47).

Our understanding of gammaherpesvirus glycoprotein functions is more limited. This is due to the fact that the human gammaherpesviruses Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) show limited lytic growth *in vitro*. Nevertheless, understanding how viral glycoproteins function is important for vaccination and for the development of neutralizing antibodies. While gB, gH, and gL are probably the key partners of the gammaherpesvirus membrane fusion machinery (22, 39, 41), the function of accessory entry proteins is less clear. EBV gp350/220 is a highly glycosylated membrane protein that adopts its 2 differently sized forms

by alternative splicing (23). It is the most abundant protein in the virion envelope, binds to complement receptor 2 (CD21) on B cells (40, 49), and is a target for antibodies that neutralize B cell infection (53). Soluble recombinant gp350 can also inhibit EBV infection of CD21-positive (CD21<sup>+</sup>) cells (36). EBV lacking gp350/220 is poorly infectious for B cells (24, 46) yet infects CD21-negative (CD21<sup>-</sup>) epithelial cells better than the wild-type virus does (46). Virions treated with some antibodies against gp350/220 also show enhanced epithelial cell infection (54). The KSHV positional homolog of gp350/220, K8.1, also has 2 alternatively spliced forms (5). Both bind to cell surface heparan sulfate (HS) (2) and are thought to be involved in the initial steps of virion attachment. However, as for EBV gp350/220, K8.1 is dispensable for viral entry (33).

The difficulties of manipulating EBV and KSHV make related animal gammaherpesviruses important tools for deducing viral gene functions and their place in pathogenesis. Two of the best-established experimental models are provided by murid herpesvirus 4 (MuHV-4) and bovine herpesvirus 4 (BoHV-4). BoHV-4 infects healthy cattle worldwide and cattle with a variety of diseases (50). It readily propagates in cell culture and replicates in a broad range of host species both *in vitro* and *in vivo*. Recent viral genome sequencing (60) and bacterial artificial chromosome (BAC) cloning (12) have enhanced its value as an experimental model.

The positional homologs of K8.1 are M7 in MuHV-4, encoding gp150, and Bo10 in BoHV-4. The MuHV-4 gp150 is part of a multiprotein entry complex (19) and an immunodominant virion antibody target (14). However, gp150-specific an-

\* Corresponding author. Mailing address: Immunology-Vaccinology (B43b), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium. Phone: 32-4-366 42 60. Fax: 32-4-366 42 61. E-mail: L.Gillet@ul.ac.be.

† Present address: Department of Neurology, Université Catholique de Louvain Mont-Godinne, B-5530 Yvoir, Belgium.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 10 November 2010.

tibodies do not neutralize. Instead, they strongly enhance Fc receptor-dependent infection (42). While gp150 seems to bind only weakly to glycosaminoglycans (GAGs) (6), the gp150<sup>-</sup> virus phenotype provides strong functional evidence for an important interaction (6, 10, 11, 15). While wild-type (WT) MuHV-4 infection is highly dependent on HS, gp150 knock-outs are hardly dependent on HS at all, suggesting that a gp150-GAG interaction relieves a constitutive gp150-mediated inhibition of virion binding. The GAG-independent binding is presumably protected by gp150, thereby providing a mechanism of efficient virion release and antibody evasion. However, further studies are needed to determine whether this kind of binding regulation is a general feature of gammaherpesvirus biology.

The BoHV-4 Bo10 seems to be more closely related to the KSHV K8.1 than to the MuHV-4 M7. Sequence analysis shows that BoHV-4 Bo10 gene potentially comprises two exons that would together encode a protein with a length similar to that of K8.1 (30). In this study, Bo10 gene expression was characterized, and virus lacking this gene was produced, allowing us to analyze Bo10 gene function in the context of viral replication. Our results showed that Bo10 encodes a viral envelope protein involved in virion attachment. They suggested further that Bo10 regulates another viral binding interaction to make it essentially dependent on GAG.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and virus.** Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells (ATCC CCL-22), embryonic bovine trachea (EBTr) cells (ATCC CCL-44), CHO-K1 (ATCC CCL-61), and the glycosaminoglycan (GAG)-deficient mutant CHO-K1-pgs-A745 (ATCC CRL-2242) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), 2% penicillin-streptomycin (Invitrogen), and 1% nonessential amino acids (Invitrogen). Bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared as described elsewhere (17) and cultured in RPMI GlutaMax medium containing 10% FCS, 2% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 1% essential amino acids (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. The BoHV-4 V. test strain initially isolated from a case of orchitis (51) and a derived recombinant strain, called V. test EGFP *Xho* I (EGFP stands for enhanced green fluorescent protein) (hereafter called WT eGFP) (16), were used throughout.

**Determination of Bo10 kinetic class of transcription.** The experiments determining the kinetic class of transcription of Bo10 were performed as described elsewhere (34). Briefly, subconfluent monolayers of MDBK cells were infected with BoHV-4 V. test strain at a multiplicity of infection (MOI) of 1 PFU/cell. Four hours before infection, cycloheximide (CHX) (100  $\mu$ g/ml) or phosphonoacetic acid (PAA) (300  $\mu$ g/ml) was added to the culture medium to inhibit *de novo* protein synthesis or viral DNA polymerase activity, respectively. Eighteen hours after infection, cytoplasmic RNA was extracted, purified, and treated for reverse transcription-PCR (RT-PCR). The cDNA products were amplified by PCR using primers specific for Bo5 encoding BoHV-4 major immediate-early transcript (IE) (57), ORF21 encoding thymidine kinase expressed as an early gene (E) (27), ORF22 encoding glycoprotein H (gH) expressed as a late gene (L) (31) and Bo10-specific primers (Bo10 23-43 [5'-TCATACATTCAAATTGCAT GC-3'] and Bo10 839-818 [5'-CATTGAATGAGAACAACACG-3']).

**Production of rabbit polyclonal anti-Bo10 antibodies.** Anti-Bo10-c15 polyclonal mono-specific antibodies were produced by Sigma Genosys (Pampisford, United Kingdom). On day 0, equal volumes of diluted bovine serum albumin (BSA)-conjugated peptide (1 mg/ml) and Freund's complete adjuvant were emulsified and injected subcutaneously into the rabbits at three different sites (200  $\mu$ g/rabbit). On days 14, 28, 42, 56, and 70, each rabbit was immunized again with 100  $\mu$ g of peptide (1 mg/ml) emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Serum samples were collected on day 77.

**Western blotting.** Cells or virions were lysed and denatured by heating (95°C, 5 min) in SDS-PAGE sample buffer (31.25 mM Tris-HCl [pH 6.8], 1% [wt/vol] SDS, 12.5% [wt/vol] glycerol, 0.005% [wt/vol] bromophenol blue, 2.5% [vol/vol] 2-mercaptoethanol). Proteins were resolved by electrophoresis on Mini-

PROTEAN TGX (Tris-glycine extended) precast 7.5% resolving gels (Bio-Rad) in SDS-PAGE running buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% [wt/vol] SDS) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P transfer membrane with 0.45  $\mu$ m pore size; Millipore). The membranes were blocked with 3% nonfat milk in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (PBS-0.1% Tween 20), and then incubated with anti-Bo10-c15 rabbit antibodies or anti BoHV-4 polyserum in the same buffer. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody (PAb) (Dako Corporation), followed by washing in PBS-0.1% Tween 20, development with enhanced chemiluminescence (ECL) substrate (GE Healthcare), and exposure to X-ray film.

**5' RACE.** The 5' end of the Bo10 mRNA was mapped by rapid amplification of cDNA ends (RACE) (5'/3' RACE kit second generation; Roche Diagnostics). The RACE primers were Bo10 900-878 (5'-TCATAATAAATTATATCCCTG AC-3') for cDNA synthesis and Bo10 839-818 (5'-CATTGAATGAGAACAACA CACG-3') for PCR amplification [paired with a primer matching the 5' poly(A) cDNA tail added by terminal deoxynucleotide transferase]. Both gene-specific primers were in exon 2, which encodes the amino acids recognized by the anti-Bo10-c15 immune serum. The PCR product was sequenced to locate the 5' poly(A) tail.

**Production of a BoHV-4 Bo10 deletion and revertant strains.** A BoHV-4 V. test strain deleted for nucleotides 43 to 608 of the Bo10 gene (Bo10 Del) was produced by homologous recombination (34). The restriction fragment EcoRI-B (containing Bo10) of the V. test strain genome was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), resulting in pGEM-T Easy/EcoRI-B. This vector was then digested with HindIII and religated, resulting in pGEM-T Easy/EcoRI-B *Hin*DIII. An enhanced green fluorescent protein (eGFP) expression cassette was then produced by PCR using the forward primer 5'-GCATGCACGCGTAATC AATTACGGGGTCATTAG-3' with SphI-MluI sites (in italic type) and nucleotides 15 to 35 of the pEGFP-C1 vector (Clontech) (GenBank accession number U55763) and the reverse primer 5'-ITCGAACGCGTTAAGATACATTGATG AG-3' with MluI-NspV sites (in italic type) and nucleotides 1640 to 1624 of pEGFP-C1. A modified version of the pEGFP-C1 vector in which most of the multiple cloning site had been deleted by digestion with BglII and BamHI was used as template. The PCR product was cloned into the pGEM-T Easy vector by TA cloning (Promega). The eGFP cassette released by NspV and SphI digestion was then cloned into pGEM-T Easy/EcoRI-B *Hin*DIII, resulting in pGEM-T Easy/EcoRI-B *Hin*DIII del Bo10 in which most of the Bo10 gene is replaced by the eGFP expression cassette. The latter plasmid was digested by MscI and XmnI, and the resulting fragment was used to generate the Bo10 Del V. test strain by homologous recombination in EBTr cells. Finally, a revertant strain (Bo10 Rev) was produced based on the same approach using the MscI-XmnI fragment of the pGEM-T Easy/EcoRI-B *Hin*DIII vector as the recombination cassette.

**Southern blotting.** Southern blot analysis of viral DNA digested with HindIII was performed (12) with probes corresponding to the entire Bo10 open reading frame (ORF) (exon I-intron-exon II) or to the deleted part of the V. test Bo10 ORF or the eGFP ORF.

**Virus purification.** BoHV-4 strains grown on MDBK cells were purified as follows. Virions were harvested from infected MDBK cell supernatants by ultracentrifugation (100,000  $\times$  g, 2 h); infected-cell debris was then removed by low-speed centrifugation (1,000  $\times$  g, 10 min). Virions were then centrifuged through a 20 to 50% (wt/vol) potassium tartrate gradient in PBS (100,000  $\times$  g, 2 h). Virions were recovered from the gradient, washed, and concentrated in PBS (100,000  $\times$  g, 2 h).

**Virion digestion with proteinase K.** Purified virions resuspended in PBS were subjected to proteinase K (Sigma) treatment (final concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in the presence or absence of Triton X-100 (Sigma) (0.1% [vol/vol]) for 1 h at 56°C before Western blotting.

**Growth curves.** The growth kinetics of mutant and revertant viruses were compared to those of the WT virus. Cell cultures were infected at a multiplicity of 0.05 (multistep assay) or 5 (one-step assay). After 1 h of adsorption, the cells were washed and then overlaid with minimal essential medium (MEM) containing 5% FCS. Supernatants of infected cultures and/or infected cells were harvested at successive intervals, and the amount of infectious virus was determined by plaque assay on MDBK cells (12).

**Indirect immunofluorescence staining of adherent cells.** Cells were fixed in PBS containing 4% (wt/vol) paraformaldehyde (Merck) for 10 min on ice and then for 20 min at 20°C. After the cells were washed with PBS, they were permeabilized in PBS containing 0.1% (wt/vol) saponin (Sigma) at 37°C for 10 min. Immunofluorescence staining (incubation and washes) was performed in PBS containing 10% FCS (vol/vol) and 0.1% (wt/vol) saponin. Samples were incubated at 37°C for 45 min with mouse monoclonal antibody MAb 35 raised

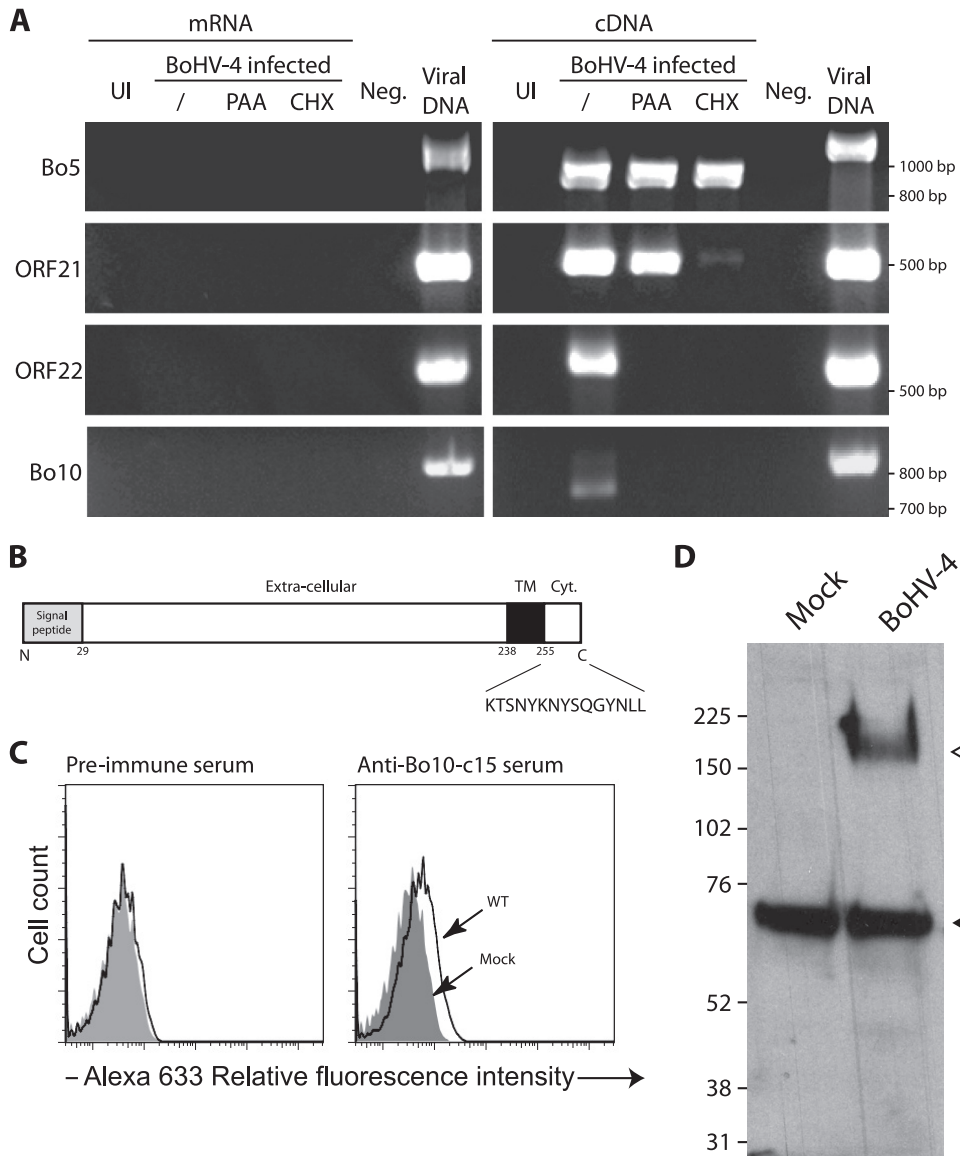


FIG. 1. The Bo10 gene is expressed as a late gene and encodes a 180-kDa protein. (A) Determination of Bo10 kinetic class of transcription. MDBK cells were mock infected or infected with BoHV-4 V. test strain in the absence (/) or presence of CHX or PAA. Twenty-four hours postinfection, expression of immediate-early Bo5, early ORF21, and late ORF22 and Bo10 was studied using an RT-PCR approach as described in Materials and Methods. mRNA and cDNA represent PCR products generated when reverse transcriptase was omitted from the reaction mixtures and RT-PCR products, respectively. Amplification of viral genomic DNA is provided as control. UI and Neg. represent uninfected cell samples and PCR negative controls, respectively. The locations of the marker sizes (in base pairs) are indicated to the right of the gel. (B) Predicted product of expression of BoHV-4 Bo10 gene. Signal peptide and transmembrane (TM) regions were identified with SignalP and TMHMM software programs, respectively (<http://www.expasy.ch/tools/>). The sequence of the peptide used for rabbit immunization is shown below the map. Cyt., intracytoplasmic region. (C) Immunization with Bo10-c15 peptide elicited antibody response against the peptide. The anti-peptide antibody responses were determined for two immunized rabbits by indirect immunofluorescence staining of permeabilized cells and FACS analysis as described in Materials and Methods. (D) Detection of specific BoHV-4 protein by the anti-Bo10-c15 serum. MDBK cells were left uninfected or infected with the WT V. test strain of BoHV-4 (1 PFU/cell). Forty-eight hours later, cells were scraped off the plate, and Western blotting was carried out as described in Materials and Methods. The positions of molecular mass (MM) standards (in kilodaltons) are shown to the left of the gel. The open and filled triangles indicate the specific 180-kDa protein and a background band, respectively.

against BoHV-4 gB. After three washes, samples were incubated at 37°C for 30 min with Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse (GAM) IgG (2 µg/ml; Invitrogen). Fluorescence was then visualized with a Leica TCS/SP microscope and a Leica DC300F charge-coupled-device (CCD) camera system.

**Plaque size.** MDBK cells grown on coverslips were infected with BoHV-4 and then overlaid with MEM containing 10% FCS and 0.6% (wt/vol) carboxymethyl-cellulose (CMC) (medium viscosity) (Sigma) in order to obtain isolated plaques (34). At successive intervals after infection, the plaques were stained by indirect

immunofluorescence staining using MAb 35. Images were captured with a Leica TCS/SP microscope and a CCD camera system (DC 300F, IM50, version V1.20; Leica). For each virus, 30 plaques were measured, and the plaque area was determined with AnalySIS 3.2 software (Soft Imaging System).

**Transmission electron microscopy.** Cells were washed with PBS and fixed directly in the dish in cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. The cells were then scraped off and prepared for electron microscopy. Epon blocks and sections were prepared as described elsewhere



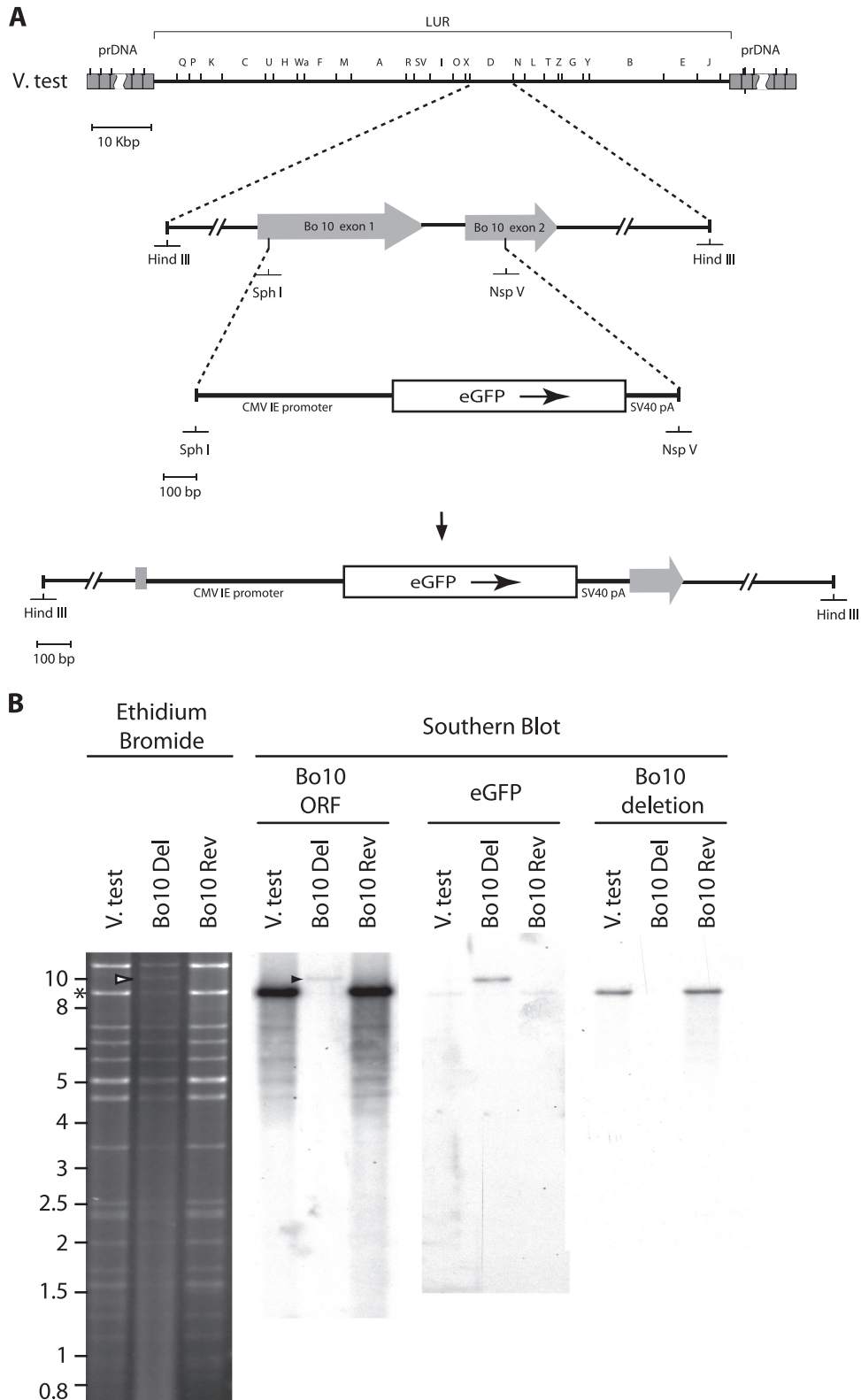


FIG. 2. Production of a recombinant BoHV-4 strain deleted for Bo10. Using the BoHV-4 V. test strain as the parental strain, a recombinant BoHV-4 strain deleted for Bo10 and a derived revertant strain were produced by homologous recombination. (A) Recombination cassettes were constructed. The HindIII restriction map of the entire BoHV-4 V. test strain is shown at the top. Letters were assigned to the different restriction fragments according to their lengths, as described by Bublot et al. (4a). Most of Bo10 exons 1 and 2 were replaced by an eGFP expression cassette as described in Materials and Methods. prDNA, polyreplicative DNA; CMV IE promoter, cytomegalovirus immediate-early promoter; SV40 pA, simian virus 40 pA. (B) Bo10 Del and Bo10 Rev strains were then characterized by a combined restriction endonuclease and Southern blotting approach. The DNA of the parental strain V. test and the derived recombinant strains Bo10 Del and Bo10 Rev were analyzed by HindIII restriction and further tested by Southern blotting using probes corresponding to the entire V. test Bo10 ORF or to the eGFP ORF or to the deleted part of the V. test Bo10 ORF. The asterisk and arrows indicate the restriction fragments containing the entire Bo10 and eGFP ORFs, respectively. Marker sizes (in kilobase pairs) are indicated on the left.



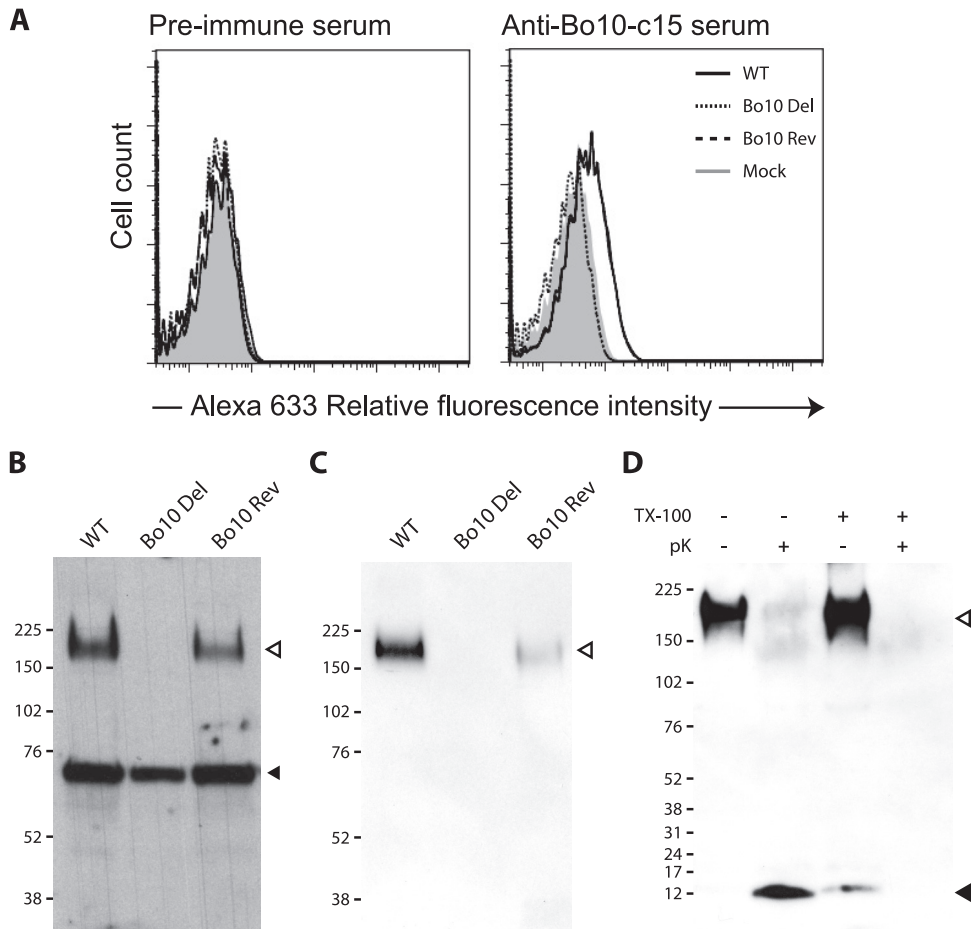


FIG. 3. gp180 detection in infected cells and virions. (A) MDBK cells were either mock infected or infected with the WT, Bo10 Del, or Bo10 Rev virus strain (1 PFU/cell). At 24 h postinfection, the cells were fixed and stained with either preimmune serum or anti-Bo10-c15 serum for FACS analysis as described in Materials and Methods. Alexa 633, Alexa Fluor 633. (B and C) Detection of specific BoHV-4 protein by the anti-Bo10-c15 serum. Infected MDBK cells (48 h, 1 PFU/cell) (B) or purified virions ( $5 \times 10^5$  virions per lane) (C) were subjected to Western blotting with anti-Bo10-c15 serum as described in Materials and Methods. The position of a MM standard is shown. Open and filled triangles indicate the specific 180-kDa protein and a background band, respectively. (D) BoHV-4 WT purified virions ( $5 \times 10^5$  virions per lane) were treated with proteinase K (pK) in the presence (+) or absence (-) of Triton X-100 (TX-100) (0.1% [vol/vol]) and then subjected to Western blotting with anti-Bo10-c15 serum as described in Materials and Methods. The open and filled triangles indicate the specific 180-kDa protein and the protected C-terminal end of gp180, respectively. The positions of MM standards (in kilodaltons) are shown to the left of the gels in panels B to D.

(37). Sections were analyzed using a Technai Spirit transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands), and electron micrographs were taken using a bottom-mounted 4,000- by 4,000-pixel Eagle camera (FEI).

**Enzymatic digestion of GAGs from cellular surface.** Adherent cells were washed two times with PBS and then incubated in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% BSA containing either heparinase II (5 U/ml) (Sigma) or chondroitinase ABC (5 U/ml) (Sigma) for 2 h at 37°C.

**Sodium chlorate.** Sulfation was inhibited by sodium chlorate treatment (1, 26, 43). MDBK cells were cultured in MEM supplemented with 10% FCS, 2% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 1% essential amino acids (Invitrogen), and different concentrations (0 to 100 mM) of sodium chlorate. In some experiments, 10 mM sodium sulfate was added to replenish sulfate to the cells. After overnight culture, cells were processed for virus infectivity.

**Flow cytometry.** Cells exposed to eGFP<sup>+</sup> viruses were washed in PBS and analyzed directly for green channel fluorescence (13). For intracellular staining, cells were fixed in 1% paraformaldehyde (30 min at room temperature) and then permeabilized with 0.1% saponin. The cells were incubated (1 h, 4°C) with either anti-Bo10-c15 rabbit antibodies or BoHV-4 gp8-specific MAb 103 (8) followed by Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rabbit PAb or Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse PAb (Invitrogen). The cells were then washed and analyzed in a FACSaria cell sorter (Becton Dickinson).

**Silver staining.** Samples were electrophoresed on NuPAGE Novex 4 to 12% precast Bis-Tris polyacrylamide gels (Invitrogen) before silver staining (Silver-Express silver staining kit; Invitrogen).

**RESULTS**

**Bo10 is expressed as a late gene during BoHV-4 infection.** We first wanted to know how the Bo10 gene (GenBank accession number Z84818) was transcribed during BoHV-4 infection. The Bo10 gene is predicted to contain an intron (30), with the spliced mRNA encoding a 273-amino-acid (aa) protein with a signal sequence and membrane anchor. We used RT-PCR with primers spanning the putative intron to look for evidence of splicing. cDNA from BoHV-4-infected MDBK cells gave rise to a 738-bp PCR product (Fig. 1A), corresponding to the expected size of the spliced mRNA. (An unspliced PCR product would be 816 bp.) No product was seen with mock-

infected cells. DNA sequencing confirmed that the 738-bp product was from Bo10 with a splice as predicted (data not shown).

Next, CHX and PAA were used to identify the kinetic class of Bo10 transcription. Bo10 expression was prevented by both CHX and PAA, indicating that it is a late gene. Bo5 (868 bp), ORF21 (499 bp), and ORF22 (564 bp) were used as controls; the results presented in Fig. 1A confirmed that they are immediate-early, early, and late genes, respectively. The absence of contaminant viral DNA in the mRNA preparations was confirmed by a lack of PCR product without reverse transcriptase. The size of the Bo5 RT-PCR product was also consistent with its known mRNA splicing (868 bp rather than 1,140 bp).

**Detection of a BoHV-4 protein encoded by Bo10.** Bo10-specific polyclonal antibodies were generated by immunizing rabbits with a bovine serum albumin-conjugated peptide (KTSNYKNYSQGYNLL) from the C-terminal cytoplasmic tail of the predicted Bo10 gene product (Fig. 1B). To confirm that the serum recognized a viral gene product, we performed indirect immunofluorescence staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of MDBK cells either mock infected or infected with WT virus. Figure 1C shows positive albeit weak recognition of the WT virus-infected cells.

To identify the protein recognized by the anti-Bo10-c15 serum, Western blotting was performed on MDBK cells infected with WT virus. A protein with an apparent molecular mass (MM) of 180 kDa, hereafter called gp180, was detected under reducing conditions (Fig. 1D). No such protein was detected in mock-infected cells. The predicted MM of the Bo10 gene product is 24.9 kDa, so this result suggested that either the mRNA includes additional exons or that the protein runs aberrantly on SDS-polyacrylamide gels or that it undergoes extensive posttranslational modification. 5' RACE identified the 5' Bo10 AUG as that predicted by the sequence with GenBank accession number Z84818. Extensive glycosylation seemed the most likely explanation for the high MM of the Bo10 gene product. This hypothesis can be related to the sporadic detection of some proteins with MMs ranging from 63 kDa to 180 kDa, which likely represent some glycosylation intermediates (data not shown). It is noteworthy that this serum detected a cellular background band in both mock- and BoHV-4-infected cells that did not interfere with gp180 detection.

**Bo10 is a structural protein that is nonessential for BoHV-4 replication *in vitro*.** To establish the functional importance of Bo10 in virus replication, a mutant virus and revertant were produced (Fig. 2) as described in Materials and Methods. In the mutant, most of Bo10 exons 1 and 2 was replaced by an eGFP expression cassette (Fig. 2A and B). The predicted molecular structures of the recombinant strains were confirmed by restriction mapping and Southern blotting (Fig. 2B). The mutated region was also checked by DNA sequencing (data not shown) and found to be correct.

To confirm a lack of gp180 in cells infected with the Bo10 Del virus, we performed indirect immunofluorescence and Western blotting with the anti-Bo10-c15 serum. As seen in Fig. 3A and B, both approaches confirmed that the mutant did not express gp180. By analogy with the positional homologs of other viruses, gp180 would be expected to be a virion component. To test this hypothesis, we purified virions on tartrate gradients before Western blotting. As with infected cells, we observed a band at 180 kDa for both WT and Bo10 Rev

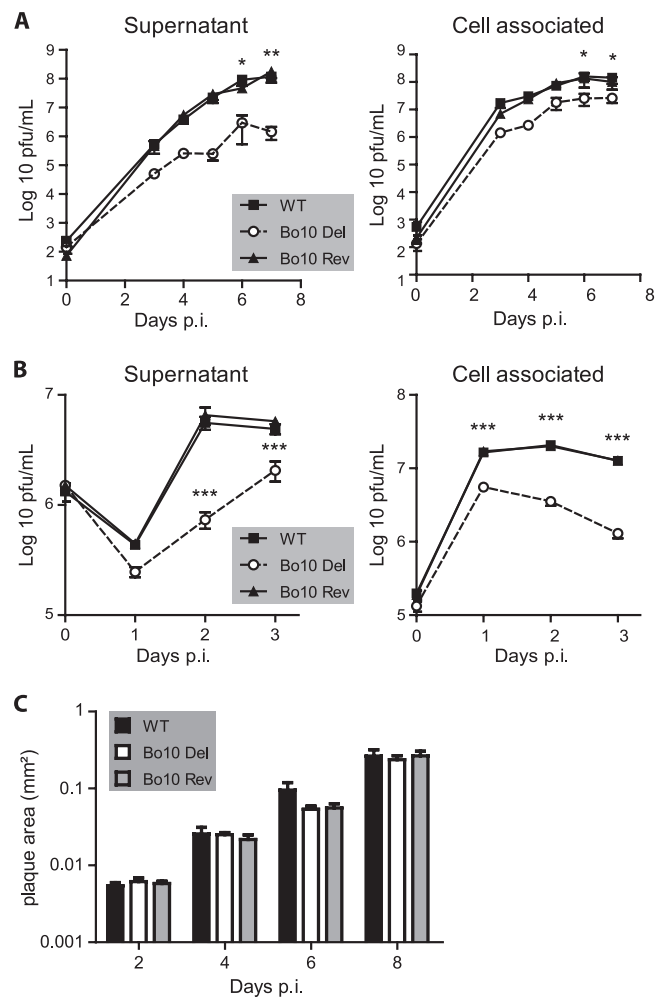


FIG. 4. Effect of Bo10 deletion on BoHV-4 replication *in vitro*. (A and B) MDBK cells grown in 6-well cluster dishes were infected at an MOI of 0.05 in a multistep assay (A) or at an MOI of 5 in a one-step assay (B) as described in Materials and Methods with BoHV-4 wild-type V. test, Bo10 Del, and Bo10 Rev. Supernatant of infected cultures and infected cells were harvested at different times (days) postinfection (p.i.), and the amount of infectious virus was determined by plaque assay on MDBK cells. For supernatants, time zero p.i. is retitration of the inoculum to ensure that similar amounts of virus were put on the cells. Plaques were visualized by immunofluorescence staining as described in Materials and Methods. The data presented are the averages  $\pm$  standard errors of the means (SEMs) (error bars) for triplicate measurements. The data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni posttests. Statistical significance is indicated as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) Bo10 deletion has no effect on BoHV-4 plaque size. MDBK cells grown on coverslips were infected with BoHV-4 wild type V. test, Bo10 Del, and Bo10 Rev strains and then overlaid with MEM containing CMC as described in Materials and Methods. At successive intervals after infection, plaques were revealed by indirect immunofluorescence staining using MAb 35 (recognizing gB) and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG as the primary and secondary antibodies, respectively. The pictures of plaques were captured with a CCD camera and analyzed with AnalySIS 3.2 software (Soft Imaging System) in order to determine plaque area. Each value presented is the average  $\pm$  SEM (error bars) for the measurement of 30 plaques. The data were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests, and no significant difference was observed.

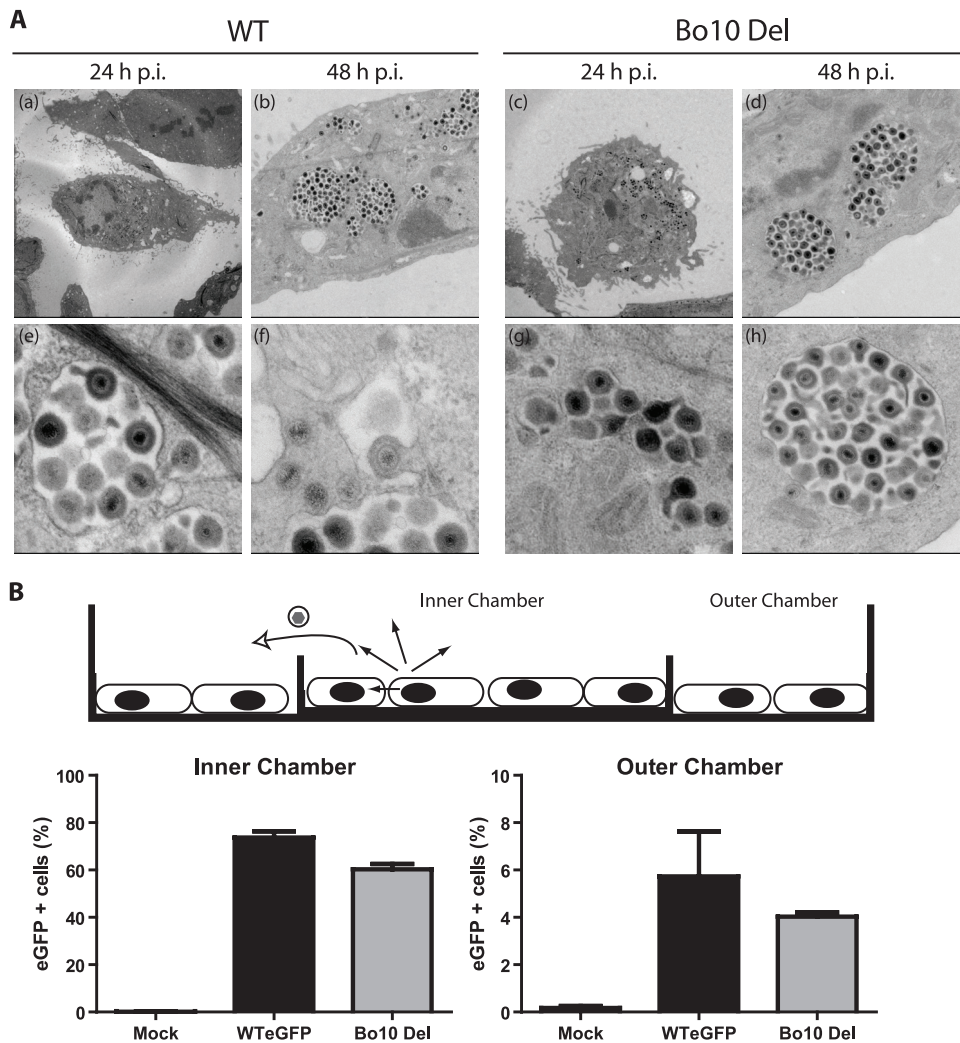


FIG. 5. The Bo10 deletion phenotype is not associated with a virion release deficit. (A) Electron microscopy of virus-infected cells. MDBK cells were infected (24 or 48 h; 1 PFU/cell) with WT or Bo10 Del virus as indicated. The pictures shown are representative of at least 10 sections per sample. For each time point, two different pictures at different magnifications are provided. (B) Fluid-phase virus spread. A total of  $2 \times 10^5$  infected MDBK cells (MOI of 0.5) or  $2 \times 10^5$  uninfected MDBK cells were seeded either on a 6-cm-diameter dish or in a 3.5-cm-diameter dish placed inside the first one. The cells were therefore separated by a physical barrier but connected by medium so that virus could not spread directly from the infected to the uninfected population but only via their common supernatant. After 48 h, the cells were harvested and analyzed for eGFP expression (eGFP + cells, eGFP-expressing cells). The data presented are the averages plus SEMs (error bars) for triplicate measurements and were analyzed by *t* test. The values for the WT eGFP and Bo10 Del virus strains were not significantly different.

virions. In Fig. 3C, the cellular protein recognized by the Bo10 antiserum (Fig. 3B) was lacking, consistent with virion purification. To demonstrate that gp180 is in the viral envelope, we treated purified virions with proteinase K in the presence or absence of Triton X-100. A protected fragment was observed only without detergent, consistent with gp180 being a type I transmembrane protein. The weak band observed with Triton X-100 suggested only some nonspecific protein degradation and did not affect the conclusion that gp180 is a component of the BoHV-4 virion envelope.

In order to address the role of Bo10 in BoHV-4 lytic infection, one-step and multistep growth assays were performed with WT, Bo10 Del, and Bo10 Rev viruses on MDBK cells. The Bo10 Del virus grew to lower titers than WT or Bo10 Rev virus did in both single-step and multistep growth assays (Fig.

4A and B). The growth deficit was similar in supernatant and cell-associated virus fractions. Plaque sizes under semisolid medium were similar, suggesting that cell-to-cell virus spread was intact (Fig. 4C). Taken together, these results indicated that the Bo10 gene encodes a viral envelope protein that is not essential for BoHV-4 replication *in vitro* but that the absence of Bo10 impaired infection by cell-free virions.

**The Bo10 deletion phenotype is not associated with a detectable deficit in virion release.** Because deletion of MuHV-4 gp150, one of the best-characterized positional homologs of Bo10, is associated with poor virion release (6), one possible explanation for the observed growth deficit of the Bo10 Del virus was poor virion release from infected cells. However, electron microscopy (Fig. 5A) did not show Bo10 Del virions piled up on the plasma membrane as it had for MuHV-4.



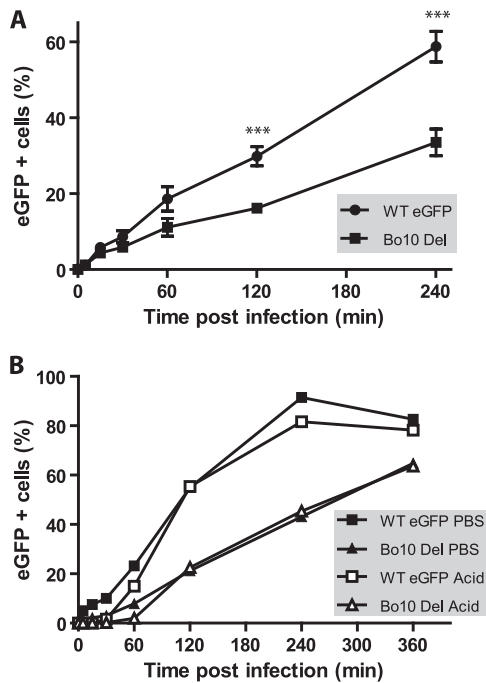


FIG. 6. Infectivity assays with Bo10 Del BoHV-4 mutant. (A) MDBK cells were exposed to eGFP-expressing (eGFP+) wild-type virus (WT eGFP) or Bo10 Del BoHV-4 strain (0.5 PFU/cell) for the times indicated and then washed with PBS and cultured overnight. Viral infection was assayed 18 h later by flow cytometry for eGFP expression. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for triplicate measurements. The data were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. The values for WT eGFP-infected cells were significantly different ( $P < 0.001$ ) from the values for the Bo10 Del strain as indicated (\*\*\*). (B) MDBK cells were exposed to WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 strain (0.5 PFU/cell) for the times indicated and then washed either with PBS (pH 7.4) or with isotonic (pH 3) buffer (acid wash). Viral infection was assayed by measuring eGFP expression 18 h later as for panel A.

We also conducted an experiment similar to that performed by de Lima et al. (6) to demonstrate the release deficit of gp150-deficient MuHV-4 (Fig. 5B). MDBK cells were seeded on either side of a separating barrier (a small “inner chamber” dish inside a larger “outer chamber”). Only the cells in the inner chamber were infected. After 2 h, the infected cells were washed with PBS, and medium was added to cover both monolayers and the divide between them. Thus, virus could spread from cell to cell within the infected population but could reach the uninfected population only via fluid-phase spread. In contrast to what was observed for MuHV-4, there was no difference in the spread of the WT and Bo10 Del viruses. A release deficit seemed therefore unlikely to account for the reduced growth of the Bo10 Del virus.

**Kinetics of Bo10-deficient virion uptake.** It was also possible that Bo10 Del replication deficit could be due to impaired virus binding. We tested this by incubating MDBK cells with eGFP-expressing WT virus or Bo10 Del BoHV-4 virus (0.5 PFU/cell) for various times before washing the input virus off with PBS. The number of infected cells (eGFP+) was determined by flow cytometry 18 h later (Fig. 6A). It should be noted that in plaque assays of virus stocks, the viral inoculum was not removed so as to minimize any undertitering of Bo10-deficient

viruses due to slow attachment. When the viral inoculum was removed, it was clear that the Bo10 Del virus was slower to attach than the WT virus. The deficit was equivalent whether the cells were washed with PBS (pH 7.4) to remove unbound virions or with acid (pH 3) (Fig. 6B) to also inactivate any virions that had not penetrated the plasma membrane. (BoHV-4 enters MDBK cells through endocytosis [C. L  t  , unpublished data].) Thus, Bo10 Del virions appeared to be impaired in cell binding.

**GAG interaction in BoHV-4 Bo10 Del infection.** By analogy with HHV-8 K8.1 envelope glycoprotein, BoHV-4 gp180 could be involved in GAG interaction. Therefore, we tested the GAG dependence of WT virus and Bo10 Del BoHV-4 infections. As the Bo10 Del strain shows impaired binding, it was not possible to have equivalent percentages of eGFP-positive cells after 18 h of infection (one round of infection). We therefore present our results as the percentage of maximal infection with each virus. Compared to the WT virus, Bo10 Del viruses were approximately 10-fold-more resistant to inhibition by soluble heparin (Fig. 7A). Heparinase treatment of cells similarly inhibited WT virus infection much more than Bo10 Del infection (Fig. 7B). In contrast, removing chondroitin sulfate did not affect MDBK infection by either WT or Bo10 Del viruses (Fig. 7B). Together, these results suggested that the defect of gp180-deficient BoHV-4 was in GAG binding.

The specificity of GAG-protein interactions often depends on sulfation (20, 55). To clarify whether GAG sulfation is differentially required for WT or Bo10 Del virus infection, we treated MDBK cells with the reversible sulfation inhibitor sodium chlorate (1) (Fig. 7C). This did not affect cell viability as analyzed by propidium iodide exclusion (data not shown) but substantially reduced MDBK infection by WT BoHV-4. Bo10 Del virions were significantly less affected. Importantly, for both strains, the phenomenon was reversed by the addition of exogenous (10 nM) sodium sulfate (Fig. 7D). It is noteworthy that exogenous sodium sulfate increased MDBK infection by WT eGFP compared to no treatment but did not affect MDBK infection by the Bo10 Del strain ( $P < 0.01$ ). This phenomenon possibly reflects better binding of the WT eGFP virions when sulfation of heparan sulfate is increased. These results established that GAG sulfation is critical for WT BoHV-4 infection and that Bo10 Del BoHV-4 is substantially less affected.

Since the BoHV-4 gp8 has been shown to bind heparinlike moieties (56), a possible explanation for the Bo10 Del phenotype was decreased gp8 expression. However, immunofluorescence staining showed that MDBK cells infected with either the WT or Bo10 Del virus strain expressed similar levels of gp8 (Fig. 7E).

**Enhanced infection of GAG-deficient cells by the BoHV-4 Bo10 Del strain.** We further explored the apparently decreased GAG dependence of Bo10-deficient BoHV-4 by infecting CHO-K1 fibroblasts competent or not competent for GAG expression (Fig. 8A). Bo10 Del viruses infected GAG+ CHO cells similarly to WT virus but infected GAG- CHO cells much better.

To discriminate between cell binding and penetration, we incubated CHO GAG+ and CHO GAG- cells with eGFP-expressing WT or Bo10 Del BoHV-4 (1 PFU/cell) for various times before PBS or acid washing. The number of infected cells (eGFP+) was determined by flow cytometry 18 h later (Fig. 8B). (The titers of the virus inputs were determined on MDBK

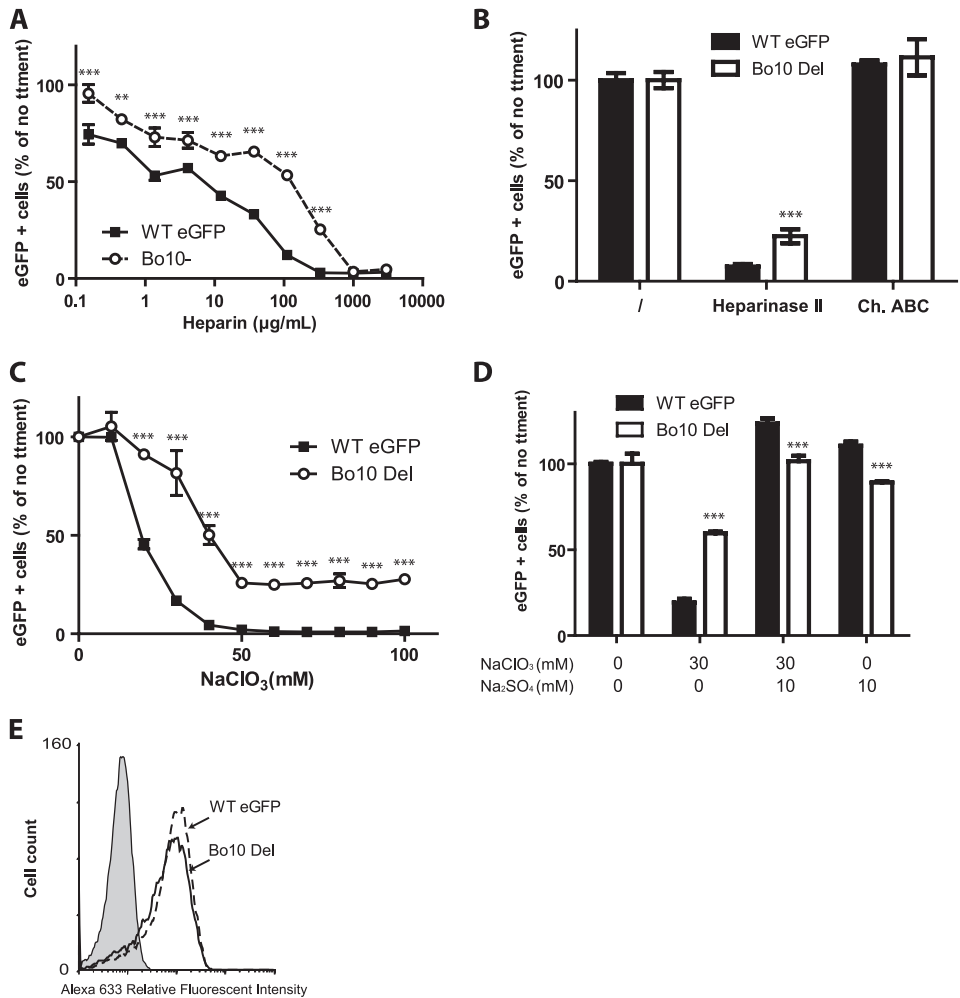


FIG. 7. gp180 is one of the BoHV-4 proteins interacting with heparan sulfate (HS). (A) WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 virions were preincubated with increasing amounts of soluble heparin for 2 h at 37°C. Viruses and heparin were then added to MDBK cells (MOI of 0.5 PFU/cell). Eighteen hours later, viral eGFP expression was assayed by flow cytometry. Each value is expressed as a percentage of the eGFP expression with untreated virus (no treatment [no ttment]). The data presented are the averages ± SEMs (error bars) for triplicate measurements and were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. Statistical significance was indicated as follows: \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (B) Cell surface HS or chondroitin sulfate (CS) was enzymatically removed from MDBK cells after treatment with heparinase II or chondroitinase ABC (Ch. ABC), respectively. WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 was then added for 2 h on ice before extensive PBS washing to remove unbound virions. Eighteen hours later, viral eGFP expression was assayed by flow cytometry. Each value is expressed as a percentage of eGFP expression with untreated cells shown in the leftmost pair of bars. The data presented are the averages ± SEMs (error bars) for six measurements and were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. Heparinase II treatment of the cells resulted in a significantly lower level of infection by the Bo10 Del virus than by the WTeGFP virus ( $P < 0.001$ ), as indicated (\*\*\*). (C and D) Sulfation inhibition causes less entry of Bo10 Del virions than of WT virions. MDBK cells were cultured overnight in the presence of indicated amounts of sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3$ ). The cells were then infected with WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 strain (MOI of 0.5 PFU/cell). Eighteen hours later, viral eGFP expression was assayed by flow cytometry. Each value is expressed as a percentage of the eGFP expression with untreated cells. The data presented are the averages ± SEMs (error bars) for four measurements and were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. Statistical significance is indicated as follows: \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) Addition of sodium sulfate (10 mM) restores WT eGFP and Bo10 Del infectivity. MDBK cells were cultured overnight with the indicated concentrations of sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3$ ) and/or sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). The cells were then infected with WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 strain (MOI of 0.5 PFU/cell). Eighteen hours later, viral eGFP expression was assayed by flow cytometry. Each value is expressed as a percentage of the eGFP expression with untreated cells. The data presented are the averages ± SEMs for triplicate measurements and were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. Statistical significance is indicated as follows: \*\*\*,  $P < 0.001$ . (E) MDBK cells were left uninfected (filled histogram) or infected (1 PFU/cell) with either the WT eGFP or Bo10 Del strain of BoHV-4. Each population was then analyzed by flow cytometry for BoHV-4 gp8 (MAb 103) expression as described in Materials and Methods.

cells, as CHO cells are not permissive for BoHV-4.) In contrast to CHO GAG<sup>+</sup> cells, the mutant virus entered CHO GAG<sup>-</sup> cells better than the WT virus did. The ~6 h for which the mutant virions remained susceptible to acid washing was comparable to the time taken for WT virions infecting CHO

GAG<sup>+</sup> cells to become acid wash resistant. Thus, the better infection of CHO GAG<sup>-</sup> cells by Bo10 Del virions appeared to reflect better cell binding, rather than better penetration.

*In vivo*, BoHV-4 infects monocytes, which are however relatively GAG deficient (28). We therefore compared the

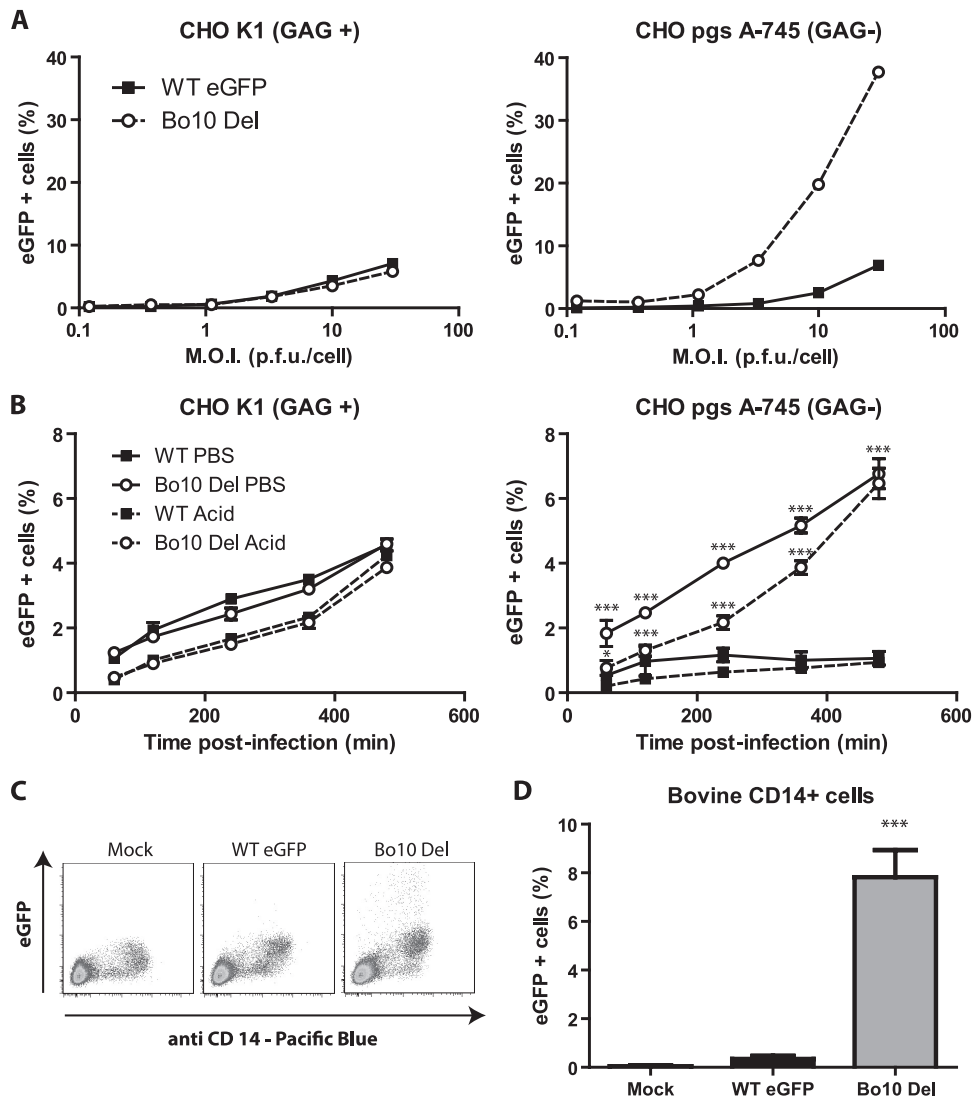


FIG. 8. Bo10 deletion increases BoHV-4 entry in GAG-deficient (GAG<sup>-</sup>) cells. (A) CHO-K1 cells (CHO GAG<sup>+</sup>) and the GAG-deficient derivative CHO-pgsA-745 (CHO GAG<sup>-</sup>) were infected at the indicated MOI with the WT eGFP or Bo10 Del strain of BoHV-4. Twenty-four hours later, viral eGFP expression was assayed by flow cytometry. (B) CHO GAG<sup>+</sup> and CHO GAG<sup>-</sup> cells were exposed to WT eGFP or Bo10 Del BoHV-4 strain (3 PFU/cell) for the times indicated and then washed either with PBS (pH 7.4) or with isotonic (pH 3) buffer (acid wash). Viral infection was assayed by measuring eGFP expression 18 h later as for panel A. The data presented are the averages  $\pm$  SEMs (error bars) for three measurements. For the same treatment, WT eGFP and Bo10 del BoHV-4 strains were compared by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. Statistical significance is indicated as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C and D) Bovine PBMC were isolated on Ficoll gradient and then left uninfected or infected with the WT eGFP or Bo10 Del strain of BoHV-4 (1 PFU/cell). (C) Twenty-four hours later, the cells were analyzed by flow cytometry for CD14 and viral eGFP expression as described in Materials and Methods. The data presented in panel D are the averages  $\pm$  SEMs for six measurements and were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni posttests. Statistical significance is indicated as follows: \*\*\*,  $P < 0.001$ .

capacity of WT or Bo10 Del viruses to infect those cells *ex vivo*. While WT viruses infected bovine CD14<sup>+</sup> cells very poorly, Bo10 Del viruses infected them much better (Fig. 8C and D).

**Comparison of structural proteins of the different strains.** In view of the impaired capacity of Bo10 Del BoHV-4 to infect GAG<sup>+</sup> cells, its enhanced capacity to infect GAG-deficient cells could potentially have been due in part to undertitration of virus stocks. However, immunoblots of virion lysates (Fig. 9A) showed that Bo10 Del and WT eGFP virus stocks had equivalent protein contents for a given titer. We were also not

able to see any difference in particle counts by electron microscopy (EM) on equivalent virus stocks.

Some minor differences in proteins at 70 to 90 kDa were detected between WT and Bo10 Del virus stocks. Additional silver staining established that all the bands present in WT and Bo10 Rev stocks were also present in the Bo10 Del stock. Thus, while minor but systematic quantitative differences were hard to exclude, in our experience, the variation observed was no greater than the variation seen normally between different stocks of the same virus. Such differences can result from minor contamination of virion stocks with infected-cell debris.

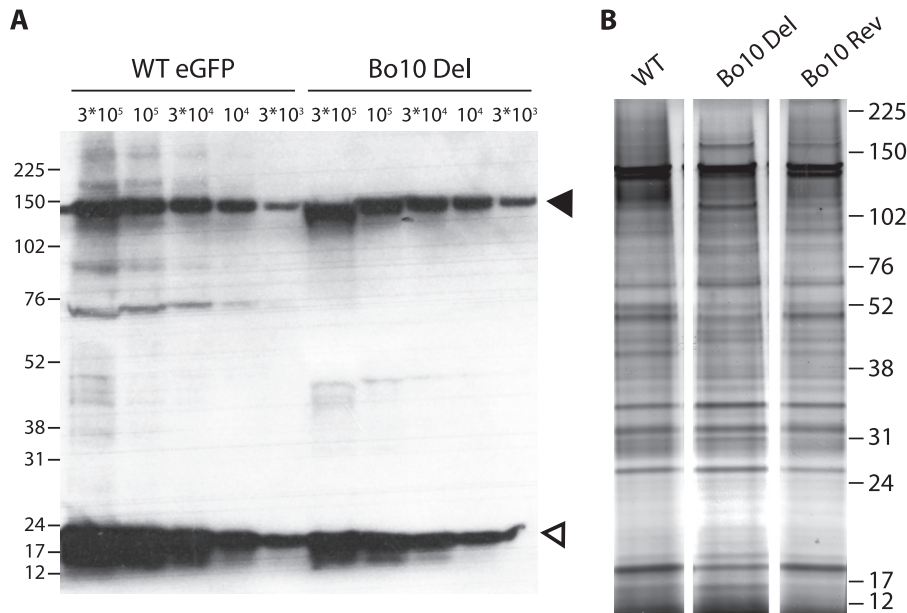


FIG. 9. Comparison of the structural proteins of the different strains. (A) WT eGFP and Bo10 Del concentrated stocks were compared for protein content by immunoblotting with anti-BoHV-4 rabbit polyserum. The black and white triangles indicate bands corresponding to VP7 and VP24 proteins, respectively; the two bands probably correspond to ORF25 and ORF65 encoding major capsid protein and capsid protein, respectively.  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ . (B) Tartrate-purified virions were loaded onto 4 to 12% Bis-Tris polyacrylamide gels and silver stained. The positions of molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated to the left of the gel in panel A and to the right of the gel in panel B.

Possibly, it can also result from protein degradation. Certainly, it seemed clear that the enhanced infection of GAG-deficient cells by Bo10 Del BoHV-4 could not be attributed to an increased virus input relative to the WT virus.

### DISCUSSION

In this study, we characterized the BoHV-4 Bo10 gene, a positional homolog of the EBV gp350 and KSHV K8.1 genes. Our results showed that Bo10 is expressed as a late gene and encodes a 180-kDa protein. A Bo10 mutant virus was viable but showed a growth deficit. This was not associated with a defect in cell-cell spread or viral release. Instead, gp180-deficient virions appeared slower than the WT virions to attach to GAG<sup>+</sup> cells. Bo10 disruption also reduced the normal dependence of BoHV-4 on GAGs for efficient infection, such that gp180-deficient virions were more resistant to inhibition by soluble heparin and showed enhanced infection of GAG-deficient cells. Several hypotheses could explain these observations. One hypothesis is that some additional modifications on other structural proteins were induced by the Bo10 deletion. However, by analogy with MuHV-4 gp150, we propose that BoHV-4 gp180 regulates virion attachment to cells by covering a GAG-independent cell-binding epitope until displaced from that site by interaction with GAGs. Though the Bo10 Del virions would not necessarily bind more readily. Indeed, the cellular ligand might not become optimally available until heparan sulfate (HS) or other cellular ligand is engaged. For example, if gp180 binding signals to infected cells, it might lead to receptor recruitment/capping.

A possible rationale for this arrangement would be for gp180 to protect an otherwise vulnerable virion entry protein from

antibody. Herpesviruses are generally transmitted from immunologically primed hosts as cell-free virions and so need to avoid neutralization by the host antibody response. The MuHV-4 gp150/BoHV-4 gp180 mechanism could allow key epitopes to be revealed only at the cell surface or even after endocytosis, thereby restricting the opportunities for neutralizing antibodies to bind. A very low affinity GAG interaction may be important for this, because it would help to avoid triggering by soluble GAGs. This seems to apply to gp150 and gp180, as neither binds to GAG<sup>+</sup> cells as an Fc fusion protein (data not shown). A requirement for high avidity would limit gp150/gp180 displacement to after attachment, for example after BoHV-4 GAG binding via gp8. One prediction would be that BoHV-4 antibodies specific for the covered epitope should neutralize gp180-deficient virions but not the WT virions.

If BoHV-4 gp180 has to be displaced from its inhibitory site to reveal GAG-independent entry epitopes, this raises the question as to how BoHV-4 normally infects GAG-deficient cells. *In vitro*, this is generally inefficient (Fig. 8). However, *in vivo* BoHV-4 is readily recovered from monocytes (3, 9, 32) that are naturally HS deficient (6, 28). Direct cell-cell spread is a possible infection route, as observed for other herpesviruses (7, 35), that could be less dependent on GAG due to a lower need to attach cell-free virions. It is also possible that BoHV-4 produces gp180-deficient virions *in vivo* from some specific cell types, much as EBV from epithelial cells is more B cell tropic (4), perhaps by not splicing the Bo10 mRNA. BoHV-4 could also access GAG-deficient cells by transfer from the surfaces of GAG<sup>+</sup> cells, similar to the epithelial infection route proposed for EBV (46). Finally, gp180-specific antibodies could make WT virions free of HS dependence by patching gp180 in the virus envelope as proposed for gp350/220 (54).



TABLE 1. Comparison of the different gammaherpesvirus K8.1 homologs

Characteristic	Lymphocryptovirus HHV-4 <sup>a</sup>	Rhadinoviruses <sup>a</sup>			
		HHV-8	MuHV-4	SaHV-2	BoHV-4
Gene name	BLLF1	K8.1	M7	ORF51	Bo10
Protein name	gp350	K8.1 A	gp150	ORF51	gp180
Protein characteristics <sup>b</sup>					
Length (no. of aa)	886	228	483	269	273
Protein type	Type I	Type I	Type I	Type I	Type I
Predicted mass (kDa) <sup>c</sup>	90	22.2	47.4	27.7	25
Observed mass (kDa)	350 (52)	68–72 (59)	150 (48)	52 (38)	180
Glycosylation <sup>d</sup>					
N-glycosylation sites	30 potential sites (confirmed) <sup>e</sup> (45)	4 potential sites (confirmed) (58)	3 potential sites	7 potential sites (confirmed) (38)	7 potential sites
O-glycosylation sites	140 potential sites (confirmed) (45)	12 potential sites (confirmed) (58)	98 potential sites	34 potential sites	123 potential sites
Presence in virion	Yes (25)	Yes (29)	Yes (48)	Yes (38)	Yes
Neutralizing antibody target	Yes for B cell infection (53), no for epithelial cells (54)	Yes (in heterologous model) (44)	No (14) (immunodominant protein –immunological decoy) (14)	No (polyserum) (38)	No (polyserum)
Deleted strain viability	Viable (24)	Viable (33)	Viable (6)		Viable
Putative function in virus entry					
Attachment of virion	Attachment of virion to B cell receptor CR2/CD21 (49)	Attachment of virion to heparan sulfate (2)		Attachment of virion to heparan sulfate (38)	
Triggering cell entry			Triggers GAG <sup>+</sup> cell entry through GAG interaction (6, 10)		Triggers GAG <sup>+</sup> cell entry through GAG interaction
Inhibition of virus entry	Inhibits virus entry in CD21- cells (46)		Inhibits virus entry in GAG <sup>-</sup> cells (6, 10)		Inhibits virus entry in GAG <sup>-</sup> cells

<sup>a</sup> HHV-4 and HHV-8, human herpesvirus 4 and 8, respectively; MuHV-4, murid herpesvirus 4; SaHV-2, saimiriine herpesvirus 2; BoHV-4, bovine herpesvirus 4.

<sup>b</sup> When 2 forms of the protein exist, only the characteristics of the predominant form are reported.

<sup>c</sup> Predicted with the Compute pI/Mw tool on the ExPaSy proteomics server.

<sup>d</sup> Predicted with NetNGlyc 1.0 and NetOGlyc 3.1 servers.

<sup>e</sup> (confirmed), that type of glycosylation has been experimentally confirmed.

gp180 restricting GAG-independent virion binding could also be a mechanism of virion release. This appeared to operate for MuHV-4 by infected cells having decreased GAG expression (6). Herpesviruses could also do this by releasing GAG-binding glycoprotein fragments (10, 40, 43), including the BoHV-4 gp8 (8). This could explain why we did not detect a release deficit of gp180-deficient virions.

It is intriguing why the various gp180 positional homologs of different gammaherpesviruses are so diverse. Nevertheless, they all appear to be type I transmembrane proteins and have a heavily O-glycosylated stalk (Table 1). Our results suggest further that they are also related in function. Thus, they seem both to bind to a receptor and to block infection of cells that do not express this receptor (6, 48; this study). Therefore, we hypothesize that these proteins provide a glycan shield independent of cell binding (51) that could help to protect vulnerable virion epitopes as reported for the MuHV-4 gB N-terminal domain (18). Thus, their diversity could to a degree reflect immune selection. In conclusion, BoHV-4 Bo10 encodes a 180-kDa viral envelope protein that contributes to virus entry being dependent on GAG. We hypothesize that it acts by hiding a critical cell-binding epitope on virions until displaced by GAG, as proposed for MuHV-4 gp150. We hypothesize that

all these homologs have an important role in regulating gammaherpesvirus tropism through both positive and negative effects.

#### ACKNOWLEDGMENTS

B.M., C.L., B.D., and L.G. are Research Fellow, Research Fellow, Postdoctoral Researcher, and Research Associate of the “Fonds de la Recherche Scientifique-Fonds National Belge de la Recherche Scientifique” (FRS-FNRS), respectively. P.G.S. is a Wellcome Trust Senior Clinical Fellow (GR076956MA). This work was supported by the following grants: starting grant (D-09/11) and GLYVIR ARC of the University of Liège and scientific impulse grant of the FRS-FNRS (grant F.4510.10).

#### REFERENCES

- Baerle, P. A., and W. B. Huttner. 1986. Chlorate—a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**:870–877.
- Birkmann, A., K. Mahr, A. Ensser, S. Yaguboglu, F. Titgemeyer, B. Fleckenstein, and F. Neipel. 2001. Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J. Virol.* **75**:11583–11593.
- Boerner, B., W. Weigelt, H. J. Buhk, G. Castrucci, and H. Ludwig. 1999. A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. *J. Virol. Methods* **83**:169–180.
- Borza, C. M., and L. M. Hutt-Fletcher. 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* **8**:594–599.



- 4a. **Bublout, M., M. F. Van Bresseem, E. Thiry, J. Dubuisson, and P. P. Pastoret.** 1990. Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. *J. Gen. Virol.* **71**:133–142.
5. **Chandran, B., C. Bloomer, S. R. Chan, L. Zhu, E. Goldstein, and R. Horvat.** 1998. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology* **249**:140–149.
6. **de Lima, B. D., J. S. May, and P. G. Stevenson.** 2004. Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *J. Virol.* **78**:5103–5112.
7. **Dingwell, K. S., C. R. Brunetti, R. L. Hendricks, Q. Tang, M. Tang, A. J. Rainbow, and D. C. Johnson.** 1994. Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J. Virol.* **68**:834–845.
8. **Dubuisson, J., I. Koromyslov, P. P. Pastoret, and E. Thiry.** 1992. Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells: identification of a 135K glycoprotein involved in viral attachment. *J. Gen. Virol.* **73**:189–194.
9. **Fabian, K., R. Ivanics, M. Terenyi, and L. Eged.** 2005. Detection of bovine herpesvirus 4 in CD11b+ leukocytes of experimentally infected rabbits. *Acta Vet. Hung.* **53**:265–273.
10. **Gillet, L., H. Adler, and P. G. Stevenson.** 2007. Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS One* **2**:e347.
11. **Gillet, L., S. Colaco, and P. G. Stevenson.** 2008. The murid herpesvirus-4 gH/gL binds to glycosaminoglycans. *PLoS One* **3**:e1669.
12. **Gillet, L., V. Daix, G. Donofrio, M. Wagner, U. H. Koszinowski, B. China, M. Ackermann, N. Markine-Goriaynoff, and A. Vanderplasschen.** 2005. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J. Gen. Virol.* **86**:907–917.
13. **Gillet, L., J. S. May, S. Colaco, and P. G. Stevenson.** 2007. Glycoprotein L disruption reveals two functional forms of the murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein H. *J. Virol.* **81**:280–291.
14. **Gillet, L., J. S. May, S. Colaco, and P. G. Stevenson.** 2007. The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS One* **2**:e705.
15. **Gillet, L., J. S. May, and P. G. Stevenson.** 2009. In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murid herpesvirus-4 infection. *J. Gen. Virol.* **90**:602–613.
16. **Gillet, L., F. Minner, B. Detry, F. Farnir, L. Willems, M. Lambot, E. Thiry, P. P. Pastoret, F. Schynts, and A. Vanderplasschen.** 2004. Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Virol.* **78**:2336–2347.
17. **Gillet, L., H. Schroeder, J. Mast, M. Thirion, J. C. Renaud, B. Dewals, and A. Vanderplasschen.** 2009. Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Vet. Res.* **40**:51.
18. **Gillet, L., and P. G. Stevenson.** 2007. Antibody evasion by the N terminus of murid herpesvirus-4 glycoprotein B. *EMBO J.* **26**:5131–5142.
19. **Gillet, L., and P. G. Stevenson.** 2007. Evidence for a multiprotein gamma-2 herpesvirus entry complex. *J. Virol.* **81**:13082–13091.
20. **Habuchi, H., O. Habuchi, and K. Kimata.** 2004. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj. J.* **21**:47–52.
21. **Heldwein, E. E., and C. Krummenacher.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:1653–1668.
22. **Herrold, R. E., A. Marchini, S. Fruehling, and R. Longnecker.** 1996. Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo. *J. Virol.* **70**:2049–2054.
23. **Hutt-Fletcher, L. M.** 2007. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* **81**:7825–7832.
24. **Janz, A., M. Oezel, C. Kurzeder, J. Mautner, D. Pich, M. Kost, W. Hammerschmidt, and H. J. Delecluse.** 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J. Virol.* **74**:10142–10152.
25. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Ihanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:16286–16291.
26. **Karger, A., U. Schmidt, and U. J. Buchholz.** 2001. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J. Gen. Virol.* **82**:631–640.
27. **Kit, S., M. Kit, H. Ichimura, R. Crandell, and S. McConnell.** 1986. Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res.* **4**:197–212.
28. **Kolset, S. O.** 1987. Proteoglycans in normal and neoplastic monocytes. *Exp. Cell Res.* **168**:318–324.
29. **Li, M., J. MacKey, S. C. Czajak, R. C. Desrosiers, A. A. Lackner, and J. U. Jung.** 1999. Identification and characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 virion glycoprotein. *J. Virol.* **73**:1341–1349.
30. **Lomonte, P., M. Bublout, V. van Santen, G. M. Keil, P. P. Pastoret, and E. Thiry.** 1995. Analysis of bovine herpesvirus 4 genomic regions located outside the conserved gammaherpesvirus gene blocks. *J. Gen. Virol.* **76**:1835–1841.
31. **Lomonte, P., P. Filee, J. R. Lyaku, M. Bublout, P. P. Pastoret, and E. Thiry.** 1997. Analysis of the biochemical properties of, and complex formation between, glycoproteins H and L of the gamma2 herpesvirus bovine herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.* **78**:2015–2023.
32. **Lopez, O. J., J. A. Galeota, and F. A. Osorio.** 1996. Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle. *Microb. Pathog.* **21**:47–58.
33. **Luna, R. E., F. Zhou, A. Baghian, V. Chouljenko, B. Forghani, S. J. Gao, and K. G. Kousoulas.** 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein K8.1 is dispensable for virus entry. *J. Virol.* **78**:6389–6398.
34. **Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, O. A. Karlsen, L. Haarr, F. Minner, P. P. Pastoret, M. Fukuda, and A. Vanderplasschen.** 2004. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to translational modifications of structural proteins. *J. Gen. Virol.* **85**:355–367.
35. **Marsh, M., and A. Helenius.** 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**:729–740.
36. **Maru, S., L. Yang, and K. Takada.** 2001. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **82**:2373–2383.
37. **Mast, J., C. Nanbru, T. van den Berg, and G. Meulemans.** 2005. Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Vet. Pathol.* **42**:559–565.
38. **Means, R. E.** 2004. Characterization of the herpesvirus saimiri Orf51 protein. *Virology* **326**:67–78.
39. **Molesworth, S. J., C. M. Lake, C. M. Borza, S. M. Turk, and L. M. Hutt-Fletcher.** 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.* **74**:6324–6332.
40. **Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson, and N. R. Cooper.** 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol.* **61**:1416–1420.
41. **Pertel, P. E.** 2002. Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *J. Virol.* **76**:4390–4400.
42. **Rosa, G. T., L. Gillet, C. M. Smith, B. D. de Lima, and P. G. Stevenson.** 2007. IgG Fc receptors provide an alternative infection route for murine gammaherpesvirus-68. *PLoS One* **2**:e560.
43. **Safaiyan, F., S. O. Kolset, K. Prydz, E. Gottfridsson, U. Lindahl, and M. Salmivirta.** 1999. Selective effects of sodium chlorate treatment on the sulfation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **274**:36267–36273.
44. **Sakamoto, K., H. Asanuma, T. Nakamura, T. Kanno, T. Sata, and H. Katanano.** 2010. Immune response to intranasal and intraperitoneal immunization with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in mice. *Vaccine* **28**:3325–3332.
45. **Serafini-Cessi, F., N. Malagolini, M. Nanni, F. Dall'Olivo, G. Campadelli-Figma, J. Tanner, and E. Kieff.** 1989. Characterization of N- and O-linked oligosaccharides of glycoprotein 350 from Epstein-Barr virus. *Virology* **170**:1–10.
46. **Shannon-Lowe, C. D., B. Neuherl, G. Baldwin, A. B. Rickinson, and H. J. Delecluse.** 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:7065–7070.
47. **Spear, P. G., and R. Longnecker.** 2003. Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.* **77**:10179–10185.
48. **Stewart, J. P., N. J. Janjua, S. D. Pepper, G. Bennion, M. Mackett, T. Allen, A. A. Nash, and J. R. Arrand.** 1996. Identification and characterization of murine gammaherpesvirus 68 gp150: a virion membrane glycoprotein. *J. Virol.* **70**:3528–3535.
49. **Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff.** 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**:203–213.
50. **Thiry, E., M. Bublout, J. Dubuisson, M. F. Van Bresseem, A. S. Lequarre, P. Lomonte, A. Vanderplasschen, and P. P. Pastoret.** 1992. Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet. Microbiol.* **33**:79–92.
51. **Thiry, E., P. P. Pastoret, C. Dessy-Doizé, C. Hanzen, and C. M. Calberg-Bacq.** 1981. Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet. Rec.* **108**:426.
52. **Thorley-Lawson, D. A., and C. M. Edson.** 1979. Polypeptides of the Epstein-Barr virus membrane antigen complex. *J. Virol.* **32**:458–467.
53. **Thorley-Lawson, D. A., and C. A. Poodry.** 1982. Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J. Virol.* **43**:730–736.
54. **Turk, S. M., R. Jiang, L. S. Chesnokova, and L. M. Hutt-Fletcher.** 2006. Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *J. Virol.* **80**:9628–9633.
55. **Turnbull, J., A. Powell, and S. Guimond.** 2001. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* **11**:75–82.
56. **Vanderplasschen, A., M. Bublout, J. Dubuisson, P. P. Pastoret, and E. Thiry.** 1993. Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology* **196**:232–240.

57. **van Santen, V. L.** 1991. Characterization of the bovine herpesvirus 4 major immediate-early transcript. *J. Virol.* **65**:5211–5224.
58. **Wu, L., R. Renne, D. Ganem, and B. Forghani.** 2000. Human herpesvirus 8 glycoprotein K8.1: expression, post-translational modification and localization analyzed by monoclonal antibody. *J. Clin. Virol.* **17**:127–136.
59. **Zhu, L., V. Puri, and B. Chandran.** 1999. Characterization of human herpesvirus-8 K8.1A/B glycoproteins by monoclonal antibodies. *Virology* **262**: 237–249.
60. **Zimmermann, W., H. Broll, B. Ehlers, H. J. Buhk, A. Rosenthal, and M. Goltz.** 2001. Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine *Rhadinovirus*, and identification of an origin of DNA replication. *J. Virol.* **75**:1186–1194.

## *Préambule*

Au cours de la première étude, nous avons mis en évidence que le gène Bo10 encode une glycoprotéine d'enveloppe de 180 kDa (gp180). Tous les homologues étudiés de gp350 représentent des protéines transmembranaires de type I, comportant de nombreux sites potentiels de O-glycosylation dans leur séquence. Le partage de ces caractéristiques suggère une fonction commune pour tous les homologues de gp350 au sein des gammaherpèsvirus. Les résultats obtenus chez le BoHV-4 au cours de la première étude ont démontré que gp180 est non essentielle à la réplication virale. Cependant, cette protéine est impliquée dans le processus d'attachement du virus, via une interaction avec les GAGs de la surface des cellules épithéliales. Ces données ont suggéré une régulation du tropisme viral par gp180, en fonction de la présence ou non des GAGs cellulaires. Ce mécanisme d'entrée complexe pourrait être une méthode subtile de protection des épitopes vulnérables impliqués dans l'entrée du virus. En effet, la liaison de gp180 aux GAGs pourrait déplacer gp180 de son site inhibiteur et permettre aux glycoprotéines, alors révélées, d'induire la fusion. Cette hypothèse a été investiguée au cours d'une deuxième étude.

**Un gammaherpèsvirus évade la réponse humorale par la formation d'un bouclier  
de O-glycans**

*“Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield”*

---

*Submitted for publication*

Machiels B., Lété C., Guillaume A., Mast J., Stevenson P.G., Vanderplasschen A., Gillet L.

## ***Abstract***

All gammaherpesviruses encode a major glycoprotein homologous to the Epstein-Barr virus gp350. These glycoproteins are often involved in cell binding, and some provide neutralization targets. However, the capacity of gammaherpesviruses for long-term transmission from immune hosts implies that *in vivo* neutralization is incomplete. In this study, we used Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) to determine how its gp350 homolog - gp180 - contributes to virus replication and neutralization. A lack of gp180 had no impact on the establishment and maintenance of BoHV-4 latency, but markedly sensitized virions to neutralization by immune sera. Antibody had greater access to gB, gH and gL on gp180-deficient virions, including neutralizing epitopes. Gp180 appears to be highly O-glycosylated, and removing O-linked glycans from virions also sensitized them to neutralization. It therefore appeared that gp180 provides part of a glycan shield for otherwise vulnerable viral epitopes. Interestingly, this O-glycan shield could be exploited for neutralization by lectins. The conservation of O-glycosylation sites in all gp350 homologs suggests that this is a general evasion mechanism that may also provide a therapeutic target.

### *Author summary*

Herpesvirus transmission between immune hosts implies some kind of antibody evasion. However, the underlying molecular mechanisms remain largely unknown. All gammaherpesviruses encode a major glycoprotein homologous to the Epstein-Barr virus (EBV) gp350. Gp350 binds EBV to B cells and provides a neutralization target. However, despite its immunogenicity, EBV carriers remain infectious. Here we show that the gp350 homolog of the related Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4), gp180, and its O-glycans shield some otherwise vulnerable viral epitopes. Extensive O-glycosylation is common to all gammaherpesvirus gp350 homologs, suggesting that this evasion mechanism is also widespread.

## *Introduction*

Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV) are DNA tumor viruses that provide risk factors for Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Kaposi's Sarcoma and post-transplant lymphoproliferative disease [1,2]. EBV infection has also been associated with multiple sclerosis [3,4]. Healthy carriers consistently shed virus in saliva [5], and this infects naïve individuals [6,7], despite being exposed to virus-specific antibody [8,9]. This lack of neutralization contrasts completely with non-persistent mucosal infections such as that of poliovirus [10,11], and implies that gammaherpesviruses have evolved specific evasion mechanisms.

Neutralizing antibodies generally target epitopes involved in virion binding or membrane fusion [12]. Targeting of the gB/gH/gL [13,14,15,16] fusion machinery [17,18] seems to be limited by a paucity of good targets [19] and poor immunogenicity [20]. Therefore most studies have looked at binding. The EBV gp350 is an abundant component of the virion envelope that binds to CD21 on B cells [21,22] and is a target for antibodies that neutralize B cell infection [23]. However, while EBV lacking gp350 is poorly infectious for B cells [24,25], it infects CD21-negative epithelial cells better than the wild-type [25], and these may provide a primary target for virions entering naive hosts. Epithelial infection can even be enhanced by gp350-specific antibodies [26]. Therefore the relationship between EBV transmission, gp350, and gp350-specific antibodies needs further exploration, particularly as gp350 is a candidate EBV vaccine [27,28].

Our understanding of EBV and KSHV is limited by their narrow species tropisms. Related viruses are therefore an important source of information. Two of the best established experimental models are provided by Murid herpesvirus 4 (MuHV-4) [29] and Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) [30,31]. Their homologs of gp350 are gp150 in MuHV-4 [32], encoded by M7, and gp180 in BoHV-4 [33], encoded by Bo10. While these proteins are diverse in sequence, they seem to be related in function, being involved in both binding to cellular receptor and in blocking the infection of cells that do not express this receptor [25,32,33]. It has been proposed that the receptor interaction displaces them to reveal other glycoproteins involved in entry. Thus a non-essential glycoprotein [24,32,33] could hide from neutralization some critical epitopes on the surface of cell-free virions.

To date, the *in vivo* function of gp350 homologs has only been investigated with MuHV-4. Surprisingly, gp150-deficient viruses showed only a transient lag in lytic replication *in vivo* and established normal levels of latency [32]. Gp150 is the most immunogenic MuHV-4 glycoprotein. However, anti-gp150 antibodies do not neutralize. Instead they play a predominant role in driving Fc receptor-dependent infection [20]. Gp150 is unusual in not having an obvious cell-binding role. In contrast, BoHV-4 gp180 deficient mutant display a binding deficit [33]. Therefore this protein may be

more closely analogous to gp350 and the KSHV K8.1. Here we investigated the consequences of gp180 deletion for BoHV-4 *in vivo* cycle and neutralization. An important gp180 function seemed to be to block the binding to virions of antibodies that would otherwise neutralize.



## Results

**Generation of a Bo10 nonsense BoHV-4 mutant.** We previously described a BoHV-4 strain in which the entire Bo10 ORF was replaced by an eGFP expression cassette [33]. Since expression cassettes can cause *in vivo* attenuation, we also generated a second Bo10 mutant virus, in which stop codons terminated Bo10 translation 7 amino acids before the end of its predicted signal sequence without any associated deletion (Fig 1a). Southern blots of viral DNA (Fig 1b) confirmed the expected genomic structures. The expected mutations were further confirmed by DNA sequencing. Immunoblotting with an anti-Bo10-c15 rabbit polyserum [33] established that the mutant virions lacked gp180 (Fig 1c).

**Dissemination of Bo10- mutants *in vivo*.** To investigate the importance of Bo10 *in vivo*, we used the rabbit model. In one experiment we infected rabbits with WT, Bo10 Del or Bo10 Rev strains ( $10^8$  PFU). In a second experiment, rabbits received WT or Bo10 stop strains ( $10^7$  PFU). No rabbits showed clinical disease or noticeable pathology at necropsy 64 days post-inoculation. Host colonization was assayed by quantitative PCR of DNA from PBMC over time (Fig 2a and b) and from the spleen at 64 days post-inoculation (Fig 2c and d). The Bo10 mutants showed no deficit. We further recovered virus by co-cultivating spleen cells of the WT and Bo10 STOP infected rabbits with permissive cells. Viral plaques were observed in all samples (Fig 2e). Therefore Bo10-deficient mutants remained capable of host colonization.

**Increased susceptibility of Bo10- BoHV-4 to serum neutralization.** We previously proposed that gp180 might help to protect virions against antibody [33]. This function might not be measured by standard pathogenesis assays, because intra-host dissemination is likely to depend mainly on cell/cell virus spread and latency-associated cell proliferation. We therefore further compared the sensitivity of BoHV-4 WT, Bo10 Del, Bo10 Rev and Bo10 STOP strains to neutralization by BoHV-4 immune sera (Fig 3). WT and Bo10 Rev virions were poorly neutralized. Bo10 Del and Bo10 STOP virions were neutralized much better. In particular, complete neutralization was now possible. Thus gp180 seemed to limit virion neutralization.

**Bo10 sequence variation.** In order to understand how protection by gp180 might work, we first compared different Bo10 DNA sequences [34]. All showed consensus splice donor and acceptor sites that have been shown to be functional in the BoHV-4 V.test strain, generating gp180 [33]. Nucleotide sequences comparison revealed that, across the entire open reading frames, there was up to 15% divergence between these strains (Table 1). On the amino acid level, the percentage of divergence even rose to 39% between American-european and African strains. Interestingly, most of this variation was located in the N-terminal half of the protein ectodomain (Fig 4a). Such a level of divergence is

remarkably high. For example, gB, gH and gL diverge by less than 2% between KSHV strains [35]; gB diverges by less than 2% between OHV-2 strains [36]; and between the BoHV-4 strains ORF71 varied by only 5%.

Despite the Bo10 diversity, all gp180s were extremely rich in serine and threonine residues, which accounted for 54.3 +/- 0.6 % of each mature ectodomain (Fig 4a). Asparagine residues accounted for a further 8.0 +/- 0.6 %. Therefore a conserved feature seemed likely to be O- and N-linked glycosylation. This was supported by predictive analysis (Fig 4a-c) [37].

**Gp180 is O-glycosylated.** The Bo10 gene product of BoHV-4 V.test has 132 and 7 potential O- and N-glycosylation sites respectively (Fig 4). It has an apparent molecular mass (MM) of 180 kDa [33]. As the predicted MM of the Bo10 gene product is 24.9 kDa, we hypothesized that it undergoes extensive glycosylation [33]. To test this hypothesis, we digested virion lysates with glycanases. We remove high mannose, hybrid and complex N-glycans [38] with PNGase F. We removed O-glycans successively with sialidase A,  $\beta$ 1-4 Galactosidase and O-glycanase. While PNGase F did not affect the apparent MM of gp180 (Fig 5a), removing O-glycans reduced it to approximately 20 kDa, consistent with its predicted unglycosylated MM. Therefore gp180 is extensively O-glycosylated.

**Glycans protect BoHV-4 against neutralization.** To test whether O-glycans protect BoHV-4 from neutralization, we removed N- and/or O-glycans from intact virions and tested their susceptibility to neutralization. Virion infectivity was preserved. As previously observed for other viral species [39,40,41], removing N-glycans increased virion susceptibility to neutralization by immune serum (Fig 5b). Removing O-glycans had a similar effect, while removing both N- and O-glycans had an additive effect (Fig 5b). Therefore BoHV-4 seems to use both N- and O-linked glycans to limit its neutralization.

**Altered antigenicity of BoHV-4 lacking gp180.** Our subsequent analysis focused on the identification of the neutralizing epitopes hidden by gp180. The MuHV-4 gp150 potentially associates with gB, gH and gL [42] to form a multiprotein entry complex. We therefore focused on antibodies raised against the BoHV-4 gB, gH and gL. As with MuHV-4 [32], infected cell surfaces provide a means of probing antigenic differences between BoHV-4 glycoprotein mutants. We compared cells infected by the WT, Bo10 Del, Bo10 Rev and Bo10 STOP BoHV-4 strains, and found greater accessibility of gB, gH/L and gL by some monoclonal antibodies on those infected by Bo10 Del or Bo10 STOP BoHV-4 strains. Thus, mAbs 29 and 35 (recognizing gB), mAb 16 (recognizing gL) and mAb 33 (recognizing the gH/gL complex) stained Bo10 mutants infected cells better than WT (Fig 6a). This result was not due to differences in protein expression, as permeabilized cells gave similar staining with each virus (Fig 6a).

We then analyzed WT and Bo10 Del virions by immunogold labeling with mAb 35 raised against gB. While binding of gold particles was observed with both strains (Fig 6b and c), there were

statistically more particles on Bo10 Del virions than on WT virions ( $p < 0.001$ ). This difference did not reflect greater gB content in Bo10 del virions, since immunoblotting on the same viral preparations with the same antibody showed equivalent signal between the mutant and the WT (Fig 6d). Increased accessibility of some epitopes on Bo10 mutant virions was confirmed by immunofluorescence (Fig 6e) of virions bound to cell surfaces. The cells were scanned by confocal microscopy with settings unchanged between different viruses stained with the same antibody. While WT and Bo10 STOP virions still stained, glow pseudo-color analysis established that the staining was stronger when Bo10 was deleted. Together these results established a greater accessibility of some gB, gL and gH/L epitopes on Bo10 mutant virions than on WT or Bo10 Rev, consistent with gp180 hiding key epitopes from neutralization.

**Increased susceptibility of Bo10- BoHV-4 to gL directed neutralization.** We next tested whether mAbs recognizing Bo10 mutants better (Fig 6) could also neutralize them better than WT or Bo10 Rev virions. While mAbs 29, 35 (anti-gB) and 33 (anti-gH/L) did not neutralize any strain (data not shown), mAb 16 (anti gL) neutralized the Bo10 mutants better (Fig 7a). However, it was not possible to achieve complete neutralization as it had been with immune sera (Fig 7b). Therefore gL is likely to be only 1 of several neutralization targets protected by gp180. However, it was clearly one such target, establishing that the reduction in gL accessibility by gp180 was functionally important.

**Gp180 O-glycans can be a target for neutralization.** While O-glycans help BoHV-4 to evade neutralizing antibodies, they can potentially be targeted by carbohydrate binding agents, as proposed for other viruses. Gp180 is not essential for BoHV-4 replication, but they could still compromise virus entry by steric hindrance. We therefore tested the capacity of jacalin, an O-glycan-specific lectin, to inhibit BoHV-4 infection (Fig 8a). Inhibition was evident for WT and Bo10 Rev virions, whereas Bo10 deleted virions were relatively resistant. Therefore O-glycan-directed neutralization was possible for BoHV-4 and appeared to target mainly gp180.

## *Discussion*

Persistent viruses must evade multiple arms of the host immune response to maintain infectivity [46,47]. Gammaherpesviruses are archetypal persistent viruses, and their cytotoxic T cell evasion mechanisms are well-known [48,49,50]. Much less is known about how they evade neutralizing antibodies. Gammaherpesviruses all share a major glycoprotein homologous to EBV gp350. EBV remains infectious despite the presence of anti-gp350 antibodies in serum and saliva [51,52,53,54]. Moreover immunization with gp350 fails to reduce either infection rates or virus shedding [27,28]. We still have much to learn about the interplay between gp350, gp350-specific antibodies and EBV host entry. For example, the inhibition of B cell infection by gp350-specific antibodies [53,55] could have limited relevance to host entry, or even promote it by enhancing epithelial infection [26], while antibodies to the MuHV-4 gp150 strongly enhance infection via IgG Fc receptors [56]. Here we showed that BoHV-4 gp180 is dispensable for establishment and maintenance of latency *in vivo* (Fig 2), but drastically reduced the susceptibility of BoHV-4 virions to neutralization immune serum (Fig 3). Gp180 seemed to hide at least partially several different epitopes on gB, gH and gL (Fig 6), which included neutralization targets (Fig 7). Therefore gp180 provides a glycan shield for some vulnerable entry epitopes. Since extensive O-glycosylation is a common feature of gammaherpesvirus gp350 homologs, this evasion mechanism may be widely shared.

The substantial gp180 divergence between different BoHV-4 strains (Table 1, Fig 4a) remains to be explained. It is possible that much of the protein does not require a very specific amino acid sequence for its function. Similarly, a key feature of the gp350 homologs of different gammaherpesviruses may simply be that they are type I transmembrane proteins with extensive O-glycosylation [33] (Fig 5a). Such an importance of glycans for immune evasion, demonstrated here for BoHV-4, has also been hypothesized for gp350 [57]. Similarly, the HIV gp120 [58] uses N-linked glycans to provide a "silent face" protected against most antibodies [41]. Thus while neutralization is possible [59,60], this and other mechanisms ensure that it is difficult. The Ebola virus glycoprotein (EBOV GP) - again involved in virus binding [61] and a major target for vaccine design - is also extensively glycosylated and in this way partially protected against antibody [62]. As with gp180, different filoviruses show huge glycoprotein diversity but retain the basic protein organization and opportunity for extensive glycosylation [62]. The key difference with BoHV-4 is that gp180 protects other virion glycoproteins in trans, rather than simply protecting itself in cis.

Another unusual feature of gp180 was the importance of O-linked glycans for its evasion. Most protection against antibody seems to involve N-linked glycans [41,63]. O-linked glycans have also been shown to protect MuHV-4 gB N-terminal ectodomain against antibody [64] and N-terminal O-glycans have been observed in Herpes Simplex virus gC [65], but these are relatively small linear

structures. Because N-linked glycans are relatively bulky, they may be less suited to protecting small glycoprotein domains while still allowing protein / protein interactions. It seems with gp180 that protection by O-linked glycans can also be "scaled up" for more extensive protection. Because gp180 is likely to be part of a multi-protein complex, N-glycans alone may be insufficient to provide complete protection without also disrupting important protein / protein interactions. Another consideration is that glycans can on occasion be targeted by the immune response [66]. In this context, glycan diversity might be useful for a virus, and providing such diversity is a potential function of the BoHV-4 Bo17 gene, which encodes a mucin-type beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase [67].

While glycans offer mainly protection in the natural setting, they can also be artificially targeted for neutralization by carbohydrate binding agents (CBAs) [68]. Evading CBAs would require a virus to compromise its glycan shield, thereby promoting neutralization by antibody [69].

## ***Material and Methods***

**Ethics Statement.** The experiments, maintenance and care of rabbits complied with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (CETS n° 123). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Liège, Belgium (Permit Number: 1035). All efforts were made to minimize suffering.

**Cells and Virus.** Madin-Darby bovine kidney (MDBK) (ATCC CCL-22) and EBL-NLS-Cre [30] cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle Medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) and 1% non Essential amino acids (Invitrogen). Bovine Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared as described elsewhere [71] and cultured in RPMI Glutamax Medium containing 10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 1% Essential amino acids (Invitrogen), 1 mM Sodium pyruvate, 25 mM HEPES and 50 µM 2-mercaptoethanol. The BoHV-4 V. test strain initially isolated from a case of orchitis [72], the BoHV-4 Bo10 Del and Bo10 Rev strains [33] and the derived recombinant strain cloned as an Bacterial Artificial Chromosome (BAC) [30], were used throughout.

**Antibodies and reagent.** We used a rabbit monospecific polyserum raised against the C-term end of the Bo10 encoded protein (anti-Bo10-c15) [33]. Four mouse monoclonal antibodies (mAbs) raised against BoHV-4 were used in the present study [73]. Mabs 16 and 33 recognize gL and the heterodimer gH/gL, respectively (C. Lete, unpublished results). Mabs 29 and 35 recognize gB [74] (C. Lete, unpublished results). The O-glycan specific lectin (jacalin) was purchased from vector laboratories.

**Production of a BoHV-4 Bo10 STOP strain.** We disrupted the BoHV-4 V.test Bo10 coding sequence (genomic coordinates 65844 to 66743) by introducing stop codons into the coding sequence for the Bo10 signal peptide (Bo10 STOP). BoHV-4 recombinants were produced using BAC cloning and prokaryotic recombination technologies as described before [30]. The V. test BAC G plasmid was used as parental plasmid [30]. The BoHV-4 V. test Bo10 STOP was produced using a two step galactokinase (*galK*) positive/negative selection in bacteria [75]. The first recombination process (*galK* positive selection) consisted to introduce the *galK* gene into the Bo10 coding sequence (genomic coordinate 65908) resulting in the V. test BAC G Bo10 *galK* plasmid. Recombination was achieved using the Bo10 *galK* cassette. It consisted of the *galK* gene flanked by 50-bp sequences corresponding to Bo10 regions (65859-65908 and 65958-65909 of the BoHV-4 V.test strain genome). This cassette was produced by PCR using *pgalK* vector [75] as template and Bo10-fwd-*galK* 5' agatctgcatacattcaaatgcatgcttttatattcagcctcgctgCCTGTTGACAATTAATCATCGGCA 3' and Bo10-rev-*galK* 5' atacggtggtgatgtgctggtgctgtgctggcagttaacccatataTCAGCACTGTCCTGCTCCTT

3' as forward and reverse primers, respectively (*galK* sequences are indicated in capital letters, Bo10 start codon is in bold). The second recombination process (*galK* negative selection) consisted to replace the *galK* sequence by a Bo10 STOP cassette to generate the BoHV-4 V.test Bo10 STOP plasmid. The Bo10 STOP cassette consisted of a synthetic double strand DNA corresponding to genomic coordinates 65844 to 65979 with the introduction (genomic coordinate 65909) of 36 nucleotides coding for in-frame STOP codons and restriction sites (Fig 1a). These 36 nucleotides do not insert STOP codons in any of the 5 other frames of the genome. Reconstitution of infectious virus from BAC plasmids was obtained by transfection in MDBK cells. To excise the BAC cassette, reconstituted viruses were propagated in EBL-NLS-Cre cells expressing Cre recombinase to generate the corresponding excised strain.

**Southern blot.** Southern blot analysis [71] of viral DNA digested with *Bam*HI was performed with probe corresponding to genomic coordinates 65339 to 67426 of the BoHV-4 V.test genome.

**Virus purification.** BoHV-4 strains grown on MDBK cells were purified as follows. Virions were harvested from infected MDBK cell supernatants by ultracentrifugation (100,000 x *g*, 2 h); infected-cell debris was then removed by low-speed centrifugation (1,000 x *g*, 10 min). Virions were then centrifuged through a 20 to 50 % (w/v) potassium tartrate gradient in PBS (100,000 x *g*, 2 h). Virions were recovered from the gradient and finally washed and concentrated in PBS (100,000 x *g*, 2 h).

**Western Blot.** Virions were lysed and denatured by heating (95°C, 5 min) in SDS-PAGE sample buffer (31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 12.5% (w/v) glycerol, 0.005% (w/v) Bromophenol Blue, 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol). Proteins were resolved by electrophoresis on Mini-PROTEAN TGX (Tris-Glycine eXtended) precast 7.5% resolving gels (Bio-Rad) in SDS-PAGE running buffer (25mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P transfer membrane, 0.45 μM pore size, Millipore). The membranes were blocked with 3% non-fat milk in PBS/0.1% Tween-20, and then incubated with anti-Bo10-c15 rabbit antibodies or mAb 35 in the same buffer. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG pAb or goat anti-mouse IgG pAb (Dako Corporation), followed by washing in PBS/0.1% Tween-20, development with ECL substrate (GEHealthcare) and exposure to X-ray film.

**Animals.** Specific-pathogen-free New-Zealand white rabbits were used throughout this study. Rabbits were inoculated intravenously with purified stocks of the different viral strains. At the end of the experiment, rabbits were euthanized and a necropsy examination was performed during which the spleen was collected.

**Isolation of peripheral blood mononuclear cells and preparation of spleen cell suspension.** Blood samples were collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) density gradient as described previously [76]. Immediately after euthanasia, spleen was removed and half-part of it was homogenized using a tissue grinder (VWR), passed through a stainless steel sieve and washed in FCS-free MEM before further analyses.

**Viral genome detection by Real time-PCR.** DNA was purified from the spleen and PBMC using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Real-time PCR was performed as described elsewhere [77]. A 103 bp fragment corresponding to BoHV-4 ORF8 was amplified with the forward primer 8startfw (5'-CAAATAGTTCATTAGCTGCCTCTCC-3') and the reverse primer 8middlerev (5'-TCATCAGTAACAGTTGGAATAGTGG-3') in the presence of the fluorescent probe 5'-FAM-AACACGTCAACA AGCAAGCCATCCACTG-TAMRA-3'. pGEM-T easy containing BoHV-4 gB ORF was used to establish standard curves. PCR amplifications and fluorescence reactions were carried out in a iCycler system (Bio-Rad) under the following conditions: initial activation of the *Taq* polymerase (Bio-Rad) at 94°C for 5 min followed by 50 cycles at 94°C for 1 min, 50 cycles at 51°C for 30 sec and 50 cycles at 72°C for 1 min.

**Virus detection by infectious centre assay.** Viral detection in spleen cell suspension was assayed by infectious centre assay (ICA) as follows.  $5 \cdot 10^5$  MDBK cells grown in 6 well cluster dishes (Becton Dickinson) were co-cultured for 7 days at 37°C with spleen cells in MEM containing 10% FCS, 2% PS, 0.6% CMC and  $5 \cdot 10^{-5}$ M of  $\beta$ -mercaptoethanol (Merck). Cells were then fixed and stained with mAb 35 for indirect immunofluorescent detection of intracellular viral antigen as described previously [33]. Fluorescence was then visualized with a TE2000-S Nikon and a Leica DC300F CCD camera system.

**Oligosaccharide digestion.** All reagents were obtained from New England BioLabs. For SDS-PAGE analysis, samples were denatured in Glycoprotein Denaturing Buffer (0.5% SDS, 40 mM DTT) for 10 min at 100°C and then digested for 3 h at 37°C with 250 NEB units PNGase F and/or 250 NEB units of neuraminidase,  **$\beta$ 1-4 Galactosidase, O-glycanase** in G7 reaction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.5) with 1% NP-40. Reactions were stopped by the addition of Laemmli sample buffer and proteins were analyzed by immunoblotting as described below. For neutralization assays, N- or O-linked glycans were removed with the same enzymes, but without reduction or denaturation. Thus, intact virions were incubated with the different enzymes (3 h, 37°C) in PBS/5% fetal calf serum buffered to pH 6.

**Flow cytometry.** For cell surface staining, cells infected by the different virus strains (2 PFU/cell, 36h) were washed in PBS and analyzed directly for green channel fluorescence [64]. For intracellular staining, cells were fixed in 1% paraformaldehyde (30 min at room temperature) and then



permeabilized with 0.1% saponin. Cells were incubated (1 h, 4°C) with the different mAbs specific for BoHV-4 glycoproteins followed by Alexa 633-conjugated goat anti-mouse pAb (Invitrogen). Cells were then washed and analyzed on a FACS Aria cytometer (Becton Dickinson).

**Immunogold labeling of virions.** Copper grids of 400 mesh (Agar Scientific Ltd) were incubated for 10 min with 2 % Alcian blue 8G solution (Gurr Microscopy Materials, BHD) to add positive charges. After washing, purified virions ( $10^8$  PFU/ml) were adsorbed to the grids for 10 min. Non-specific interactions were blocked by incubation of the grids for 15 min in PBS containing 0.1 % (w/v) cold water fish skin gelatin (CWFG, Aurion) and 5 % (w/v) goat serum (Invitrogen). This solution was also used for further incubation and washes. Immunogold labeling was performed by incubation of the grids with mAb 35 as primary antibody for 60 min at room temperature. After washing with PBS and incubation in PBS 0.1 % CWFG 5 % goat serum for 5 min, the grids were incubated with Goat anti-mouse IgG-10 nm gold labeled conjugate (diluted 1:50, BBIInternational) as secondary antibody for 60 min at RT. A final incubation step was performed in 2 % uranyl acetate solution for 10 sec (Agar Scientific). Immunogold stained virions were observed using a transmission electron microscope (FEI, Tecnai Biotwin). Micrographs of virion were acquired for at least 20 individual virions per strain.

**Indirect immunofluorescent staining of bound virions.** Infected cells (20 PFU/cell, 2h, 4°C) were fixed in PBS containing 2 % (w/v) paraformaldehyde (Merck) for 30 min on ice. Immunofluorescent staining (incubation and washes) was performed in PBS containing 10 % FCS (v/v). Samples were incubated at RT for 45 min with the different mAbs raised against BoHV-4 glycoproteins. After three washes, samples were incubated at RT for 45 min with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (2 µg/ml; Invitrogen). Images were acquired on a Leica TCS SP confocal laser scanning microscope with settings specific for Alexa Fluor 488 (excitation, 488 nm; recording, 493-560 nm). Acquisition settings (PMT voltage and offset) were kept identical between slides stained with the same antibodies.

## *Acknowledgments*

B.M., C.L. and L.G. are Research Fellow, Research Fellow and Research Associate of the “Fonds de la Recherche Scientifique - Fonds National Belge de la Recherche Scientifique” (F.R.S. - FNRS), respectively. P. G. S. is a Wellcome Trust Senior Clinical Fellow (GR076956MA). This work was supported by the following grants: starting grant (D-09/11) and GLYVIR ARC of the University of Liège and scientific impulse grant of the F.R.S. – FNRS n° F.4510.10. We are grateful to Cédric Delforge, Lorène Dams and François Massart for excellent technical assistance.

## References

1. Thorley-Lawson DA, Gross A (2004) Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350: 1328-1337.
2. Verma SC, Robertson ES (2003) Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett* 222: 155-163.
3. Salvetti M, Giovannoni G, Aloisi F (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22: 201-206.
4. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, et al. (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204: 2899-2912.
5. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA (2009) The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* 5: e1000496.
6. Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM (1976) Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* 294: 1355-1359.
7. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA (1985) A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35: 35-42.
8. Desgranges C, de-The G (1978) Presence of Epstein-Barr virus specific IgA in saliva of nasopharyngeal carcinoma patients: their activity, origin and possible clinical value. *IARC Sci Publ*: 459-469.
9. Sarid O, Anson O, Yaari A, Margalith M (2001) Epstein-Barr virus specific salivary antibodies as related to stress caused by examinations. *J Med Virol* 64: 149-156.
10. Buisman AM, Abbink F, Schepp RM, Sonsma JA, Herremans T, et al. (2008) Preexisting poliovirus-specific IgA in the circulation correlates with protection against virus excretion in the elderly. *J Infect Dis* 197: 698-706.
11. Ogra PL, Karzon DT, Righthand F, MacGillivray M (1968) Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *N Engl J Med* 279: 893-900.
12. Burton DR (2002) Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* 2: 706-713.
13. Heldwein EE, Krummenacher C (2008) Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 1653-1668.
14. Chandran B (2010) Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *J Virol* 84: 2188-2199.
15. Hutt-Fletcher LM (2007) Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 81: 7825-7832.
16. Pertel PE (2002) Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *J Virol* 76: 4390-4400.
17. Miller N, Hutt-Fletcher LM (1988) A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol* 62: 2366-2372.
18. Gill MB, Gillet L, Colaco S, May JS, de Lima BD, et al. (2006) Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 87: 1465-1475.
19. Gillet L, Gill MB, Colaco S, Smith CM, Stevenson PG (2006) Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein B presents a difficult neutralization target to monoclonal antibodies derived from infected mice. *J Gen Virol* 87: 3515-3527.
20. Gillet L, May JS, Colaco S, Stevenson PG (2007) The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS One* 2: e705.
21. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61: 1416-1420.
22. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50: 203-213.

23. Thorley-Lawson DA, Poodry CA (1982) Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J Virol* 43: 730-736.
24. Janz A, Oezel M, Kurzeder C, Mautner J, Pich D, et al. (2000) Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74: 10142-10152.
25. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7065-7070.
26. Turk SM, Jiang R, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM (2006) Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *J Virol* 80: 9628-9633.
27. Sokal EM, Hoppenbrouwers K, Vandermeulen C, Moutschen M, Leonard P, et al. (2007) Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis* 196: 1749-1753.
28. Cox C, Naylor BA, Mackett M, Arrand JR, Griffin BE, et al. (1998) Immunization of common marmosets with Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340: effect on viral shedding following EBV challenge. *J Med Virol* 55: 255-261.
29. Nash AA, Dutia BM, Stewart JP, Davison AJ (2001) Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 569-579.
30. Gillet L, Daix V, Donofrio G, Wagner M, Koszinowski UH, et al. (2005) Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol* 86: 907-917.
31. Zimmermann W, Broll H, Ehlers B, Buhk HJ, Rosenthal A, et al. (2001) Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol* 75: 1186-1194.
32. de Lima BD, May JS, Stevenson PG (2004) Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *J Virol* 78: 5103-5112.
33. Machiels B, Lete C, de Fays K, Mast J, Dewals B, et al. (2010) Bovine Herpesvirus-4 Bo10 gene encodes a non-essential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *J Virol*.
34. Dewals B, Thirion M, Markine-Goriaynoff N, Gillet L, de Fays K, et al. (2006) Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J Gen Virol* 87: 1509-1519.
35. Shin YC, Jones LR, Manrique J, Lauer W, Carville A, et al. (2010) Glycoprotein gene sequence variation in rhesus monkey rhadinovirus. *Virology* 400: 175-186.
36. Dunowska M, Letchworth GJ, Collins JK, DeMartini JC (2001) Ovine herpesvirus-2 glycoprotein B sequences from tissues of ruminant malignant catarrhal fever cases and healthy sheep are highly conserved. *J Gen Virol* 82: 2785-2790.
37. Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153-164.
38. Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH, Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* 180: 195-204.
39. Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, et al. (1984) A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1779-1783.
40. Aguilar HC, Matreyek KA, Filone CM, Hashimi ST, Levroney EL, et al. (2006) N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *J Virol* 80: 4878-4889.
41. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, et al. (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-312.
42. Gillet L, Stevenson PG (2007) Evidence for a multiprotein gamma-2 herpesvirus entry complex. *J Virol* 81: 13082-13091.

43. Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, et al. (2002) The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* 76: 7306-7321.
44. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1369-1373.
45. Machiels B, Gillet L, Nascimento Brito SD, Drion P, Delforge C, et al. (2007) Natural antibody-- complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum. *Microbes Infect* 9: 1530-1537.
46. Lavine JS, Poss M, Grenfell BT (2008) Directly transmitted viral diseases: modeling the dynamics of transmission. *Trends Microbiol* 16: 165-172.
47. Villarreal LP, Defilippis VR, Gottlieb KA (2000) Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology* 272: 1-6.
48. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL (2000) Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18: 861-926.
49. Yewdell JW, Hill AB (2002) Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol* 3: 1019-1025.
50. Stevenson PG, Simas JP, Efstathiou S (2009) Immune control of mammalian gamma-herpesviruses: lessons from murid herpesvirus-4. *J Gen Virol* 90: 2317-2330.
51. Hoffman GJ, Lazarowitz SG, Hayward SD (1980) Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2979-2983.
52. Miller G, Heston L, Hoffman G (1982) Neutralization of lymphocyte immortalization by different strains of Epstein-Barr virus with a murine monoclonal antibody. *Infect Immun* 37: 1028-1031.
53. Sashihara J, Burbelo PD, Savoldo B, Pierson TC, Cohen JI (2009) Human antibody titers to Epstein-Barr Virus (EBV) gp350 correlate with neutralization of infectivity better than antibody titers to EBV gp42 using a rapid flow cytometry-based EBV neutralization assay. *Virology* 391: 249-256.
54. Moutschen M, Leonard P, Sokal EM, Smets F, Haumont M, et al. (2007) Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* 25: 4697-4705.
55. Miller G, Niederman JC, Stitt DA (1972) Infectious mononucleosis: appearance of neutralizing antibody to Epstein-Barr virus measured by inhibition of formation of lymphoblastoid cell lines. *J Infect Dis* 125: 403-406.
56. Rosa GT, Gillet L, Smith CM, de Lima BD, Stevenson PG (2007) IgG fc receptors provide an alternative infection route for murine gamma-herpesvirus-68. *PLoS One* 2: e560.
57. Szakonyi G, Klein MG, Hannan JP, Young KA, Ma RZ, et al. (2006) Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol* 13: 996-1001.
58. Johnson WE, Desrosiers RC (2002) Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* 53: 499-518.
59. Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, et al. (2010) Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329: 856-861.
60. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, et al. (2010) Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329: 811-817.
61. Lee JE, Saphire EO (2009) Neutralizing ebolavirus: structural insights into the envelope glycoprotein and antibodies targeted against it. *Curr Opin Struct Biol* 19: 408-417.
62. Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, Oswald WB, Burton DR, et al. (2008) Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 454: 177-182.
63. Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, et al. (2010) Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 84: 11905-11915.
64. Gillet L, Stevenson PG (2007) Antibody evasion by the N terminus of murid herpesvirus-4 glycoprotein B. *EMBO J* 26: 5131-5142.

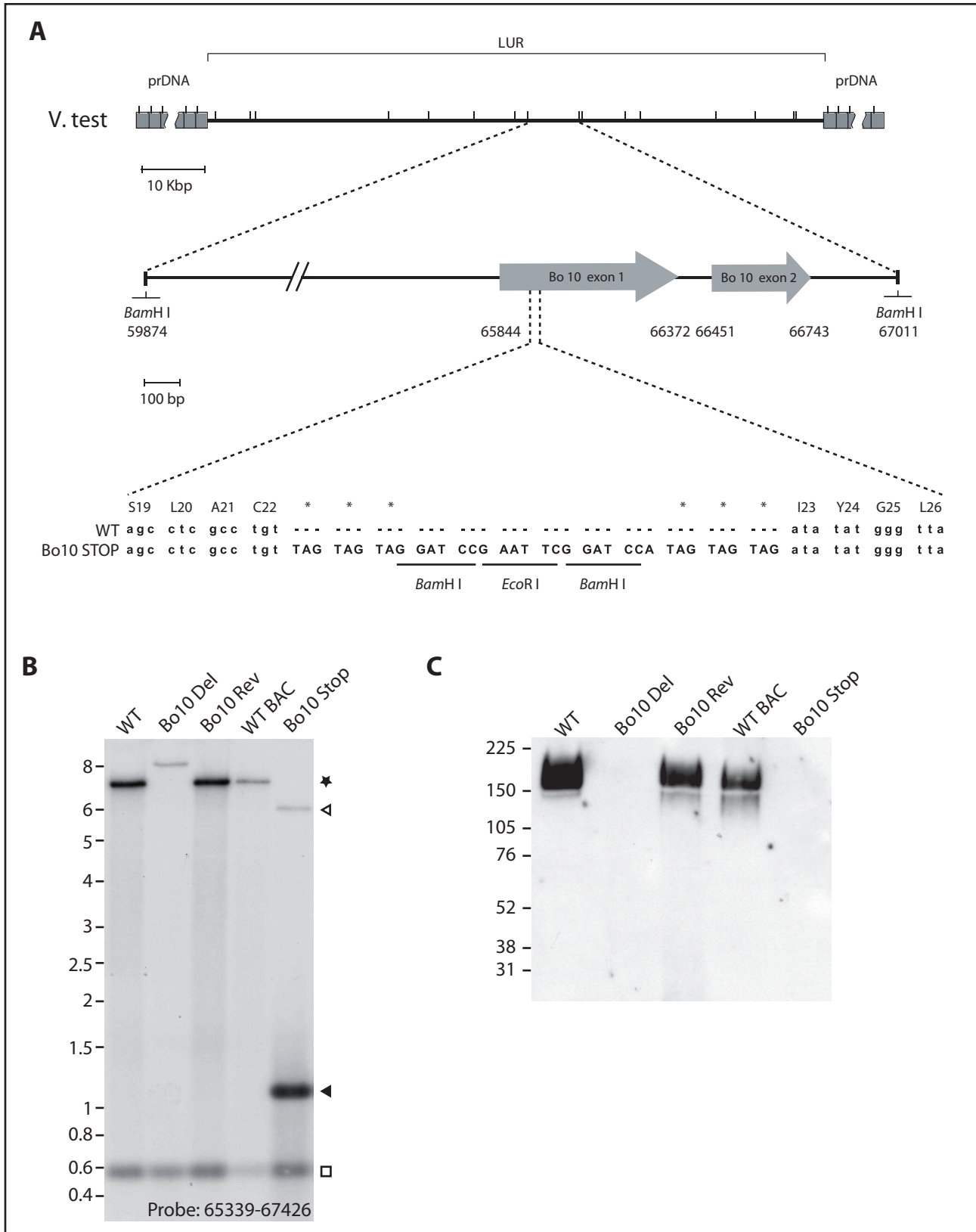
65. Biller M, Mardberg K, Hassan H, Clausen H, Bolmstedt A, et al. (2000) Early steps in O-linked glycosylation and clustered O-linked glycans of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C: effects on glycoprotein properties. *Glycobiology* 10: 1259-1269.
66. Doores KJ, Fulton Z, Hong V, Patel MK, Scanlan CN, et al. (2010) A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17107-17112.
67. Vanderplasschen A, Markine-Goriaynoff N, Lomonte P, Suzuki M, Hiraoka N, et al. (2000) A multipotential beta -1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine herpesvirus type 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5756-5761.
68. Balzarini J (2007) Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol* 5: 583-597.
69. Balzarini J (2005) Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *Lancet Infect Dis* 5: 726-731.
70. Astronomo RD, Burton DR (2010) Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov* 9: 308-324.
71. Gillet L, Schroeder H, Mast J, Thirion M, Renauld JC, et al. (2009) Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Vet Res* 40: 51.
72. Thiry E, Pastoret PP, Dessy-Doizé C, Hanzen C, Calberg-Bacq CM (1981) Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet rec* 108: 426.
73. Dubuisson J, Thiry E, Bublot M, Sneyers M, Boulanger D, et al. (1989) Production and characterization of monoclonal antibodies to bovid herpesvirus-4. *Vet Microbiol* 19: 305-315.
74. Lomonte P, Filee P, Lyaku JR, Bublot M, Pastoret PP, et al. (1997) Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 71: 3332-3335.
75. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33: e36.
76. Dewals B, Boudry C, Farnir F, Drion PV, Vanderplasschen A (2008) Malignant catarrhal fever induced by alcelaphine herpesvirus 1 is associated with proliferation of CD8+ T cells supporting a latent infection. *PLoS ONE* 3: e1627.
77. Boudry C, Markine-Goriaynoff N, Delforge C, Springael JY, de Leval L, et al. (2007) The A5 gene of alcelaphine herpesvirus 1 encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor that is non-essential for the induction of malignant catarrhal fever in rabbits. *J Gen Virol* 88: 3224-3233.
78. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
79. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.

**TABLE 1. Bo10 sequences divergences among BoHV-4 strains <sup>a,b</sup>.**

	V.test	LVR140	MOVAR	66p347	DN599	108	130	Buf	M40
V.test		0	0	1	1	14	14	11	11
LVR140	0		0	1	1	14	14	11	10
MOVAR	0	0		1	1	14	14	11	10
66p347	1	1	1		1	15	15	11	11
DN599	1	1	1	0		14	14	11	10
108	39	39	39	39	39		0	8	12
130	39	39	39	39	39	0		8	12
Buf	33	33	33	33	33	14	14		10
M40	31	31	31	31	31	19	19	19	

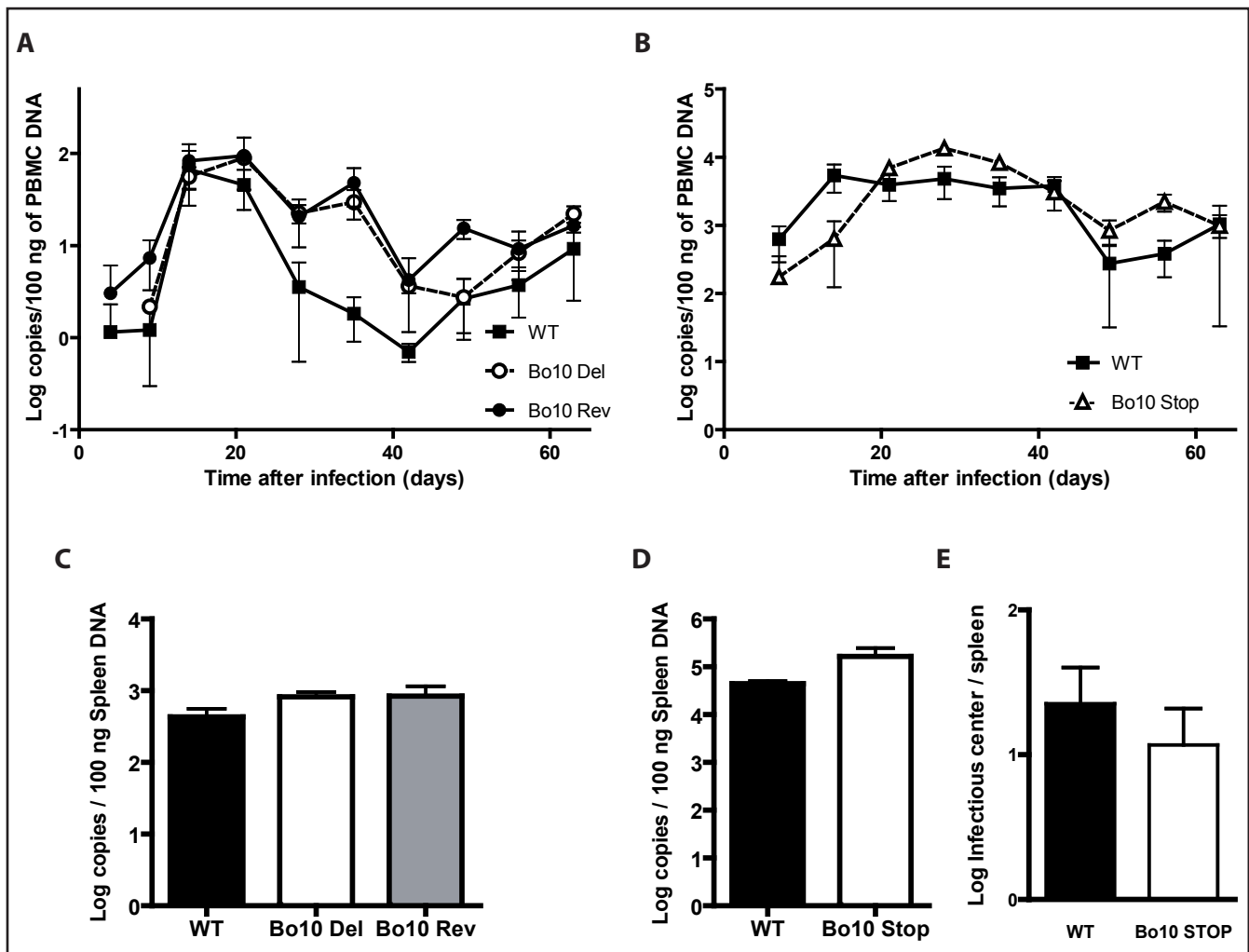
<sup>a</sup> Values above and below the diagonal refer to percentages of nucleotide and amino acid sequences divergences, respectively.

<sup>b</sup> Percentages of sequences similarities were determined using CLUSTALw.

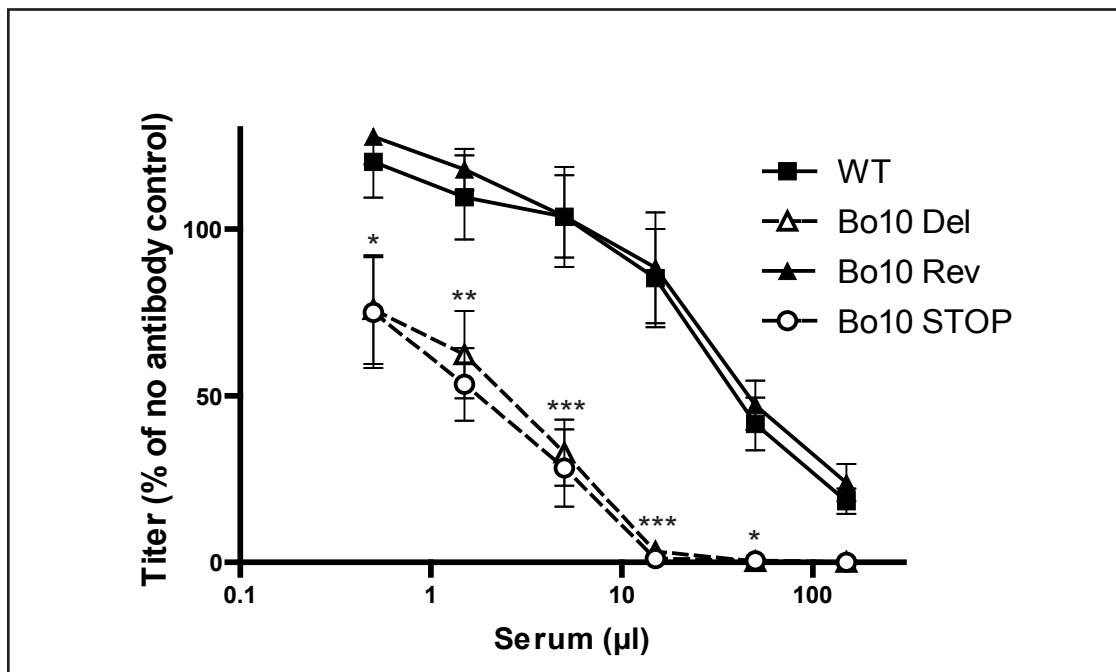


**Figure 1. Generation of a Bo10 STOP BoHV-4 mutant.** **A.** Schematic representation of the strategy followed to produce the recombinant BoHV-4 strain. The Bo10 STOP BoHV-4 mutant was derived from a cloned BoHV-4 BAC by galK-counterselection method. The Bo10 coding sequence was disrupted by inserting stop codons near the end of the coding sequence for its predicted signal peptide (Bo10 STOP). The mutation incorporated two BamHI and one EcoRI restriction sites. **B.** Verification of the molecular structure. Viral DNA was digested with BamHI, resolved by agarose gel electrophoresis, and hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled probe, corresponding to nucleotides 65339-67426 of the BoHV-4 V.test strain genome. Star shows the restriction fragment that contains the WT Bo10 gene. The Bo10 Del fragment is higher due to eGFP insertion [33]. The 7,137-bp wild-type (WT) band becomes 6044-bp (open arrow) for the Bo10-STOP mutant. Black arrow show the remaining 1113-bp fragment. The square shows the 555bp fragment (nucleotides 67011-67566 of the BoHV-4 V.test strain genome) recognized in all five strains. Marker sizes in Kbp are indicated on the left. **C.** Detection of the Bo10 encoded gp180 protein by the anti-Bo10-c15 serum. Purified virions (5\*10<sup>5</sup> virions per lane) were subjected to western blotting with anti-Bo10-c15 serum as described in the Methods. The position of a molecular mass (MM) standard (in kDa) is shown on the left.



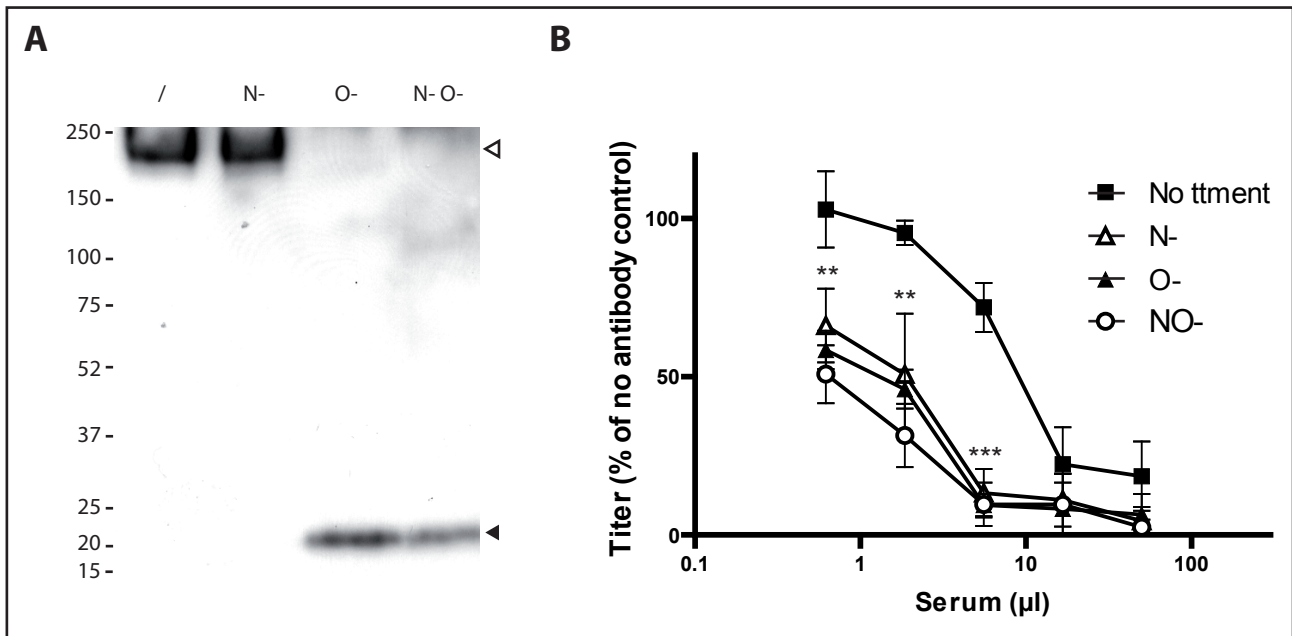


**Figure 2. In vivo persistence of Bo10- mutants.** Groups consisting of 3 rabbits were mock-infected or infected with 108 PFU of BoHV-4 WT V. test, Bo10 Del and Bo10 Rev strains (A and C) or infected with 107 PFU of BoHV-4 WT V.test and Bo10 Stop strains (B, D and E). A-D. Real-Time PCR relative quantification of BoHV 4 genomes. DNA was extracted from the PBMC (A and B) at the different times post-inoculation and from the spleen (C and D) 64 days post-inoculation. Data are expressed as the number of BoHV-4 ORF8 gene copies per 100ng of total DNA. The data presented are the average  $\pm$  SEMs. In A and B, the data were analyzed by 2ways ANOVA and Bonferroni posttests, in C and D, the data were analyzed by 1way ANOVA and Bonferroni posttests. No significant difference was observed. E. Splens from the different rabbits were analyzed individually for reactivable BoHV-4 by infectious-center assay. The data presented are the average  $\pm$  SEMs and were analyzed by 1way ANOVA and Bonferroni posttests. No significant difference was observed.

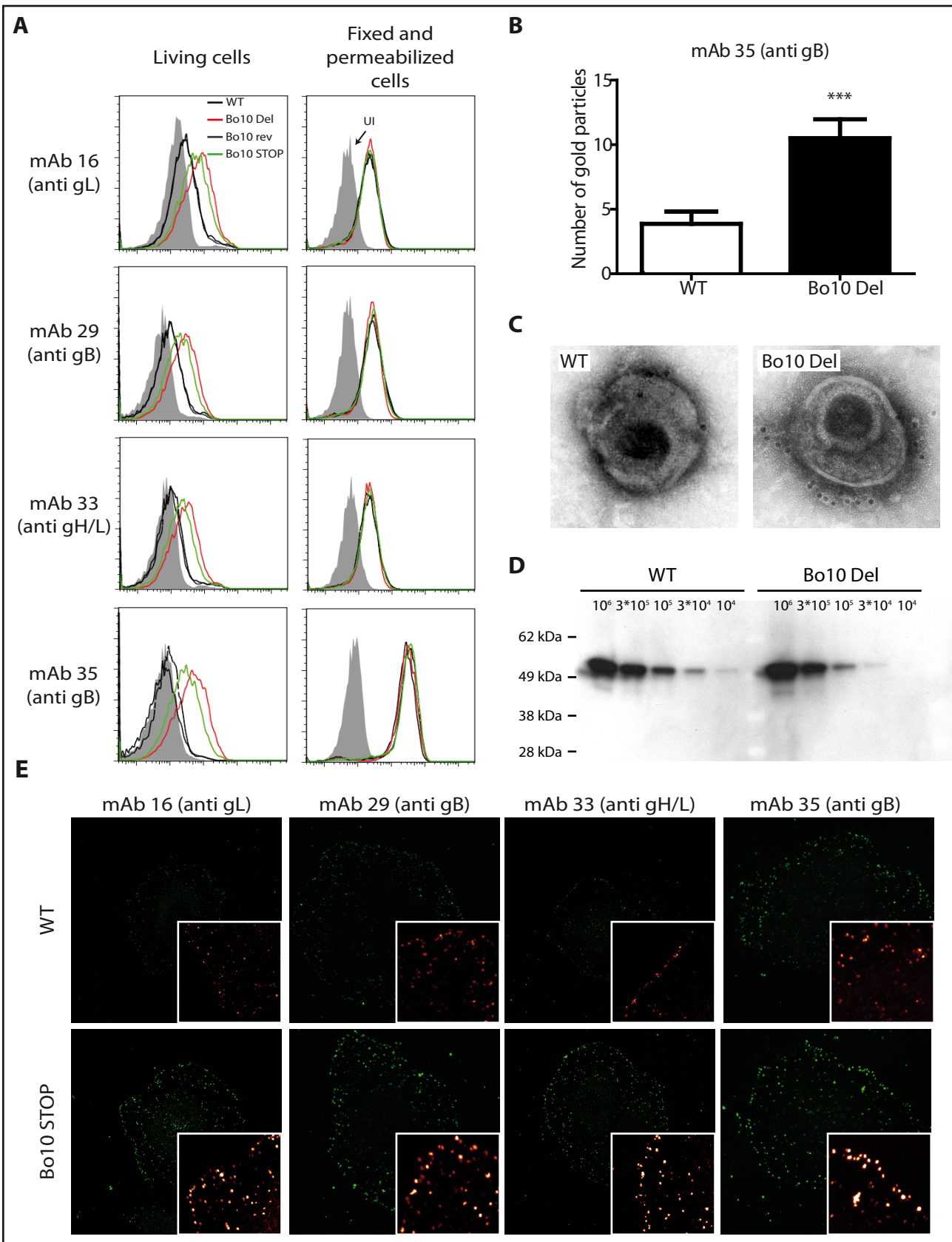


**Figure 3. Neutralization of the BoHV-4 Bo10 mutants.** BoHV-4 WT V.test, Bo10 Del, Bo10 Rev and Bo10 STOP virions were incubated with sera of 4 different rabbits infected with BoHV-4 V.test strain. After incubation (2h, 37°C) the viruses were plaque assayed for infectivity on MDBK cells. BoHV-4 titers are expressed relative to virus without antibody. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for 4 measurements and were analyzed by 2way ANOVA and Bonferroni posttests, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

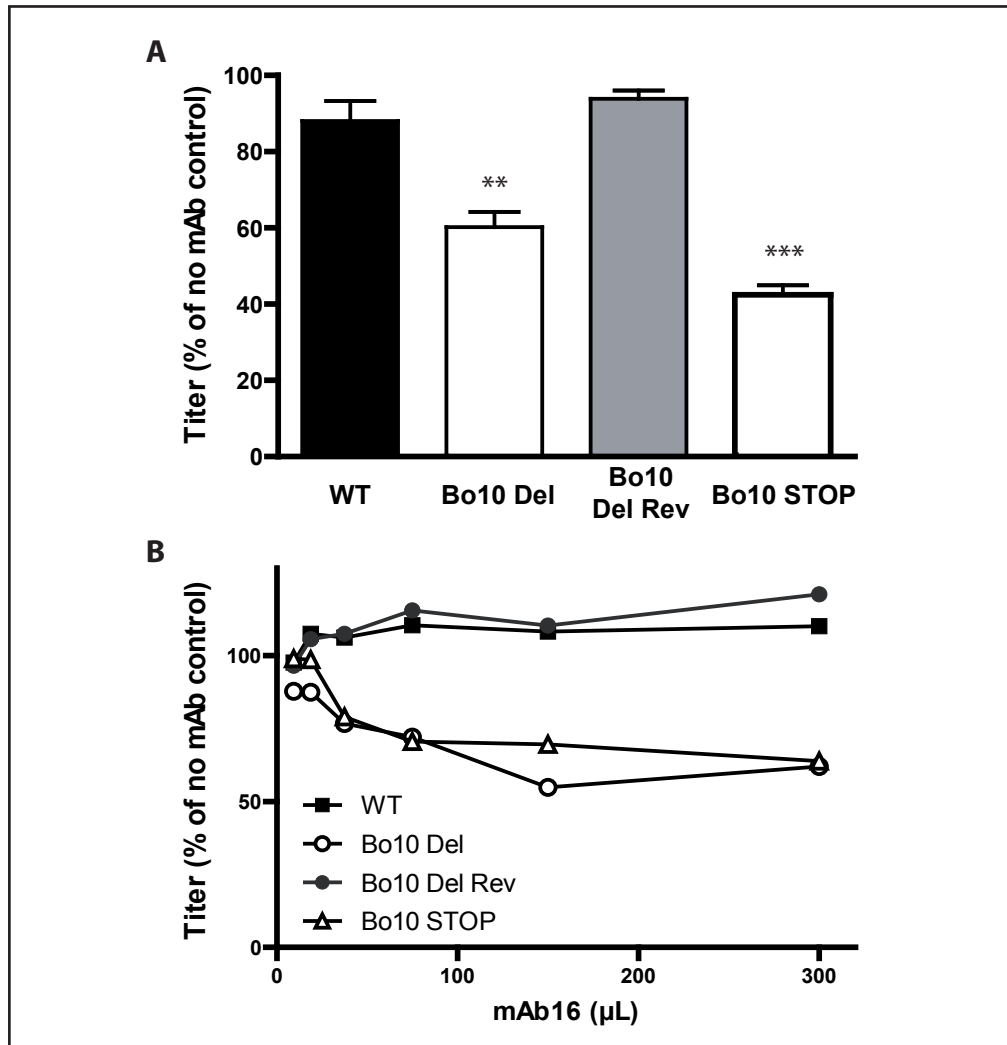




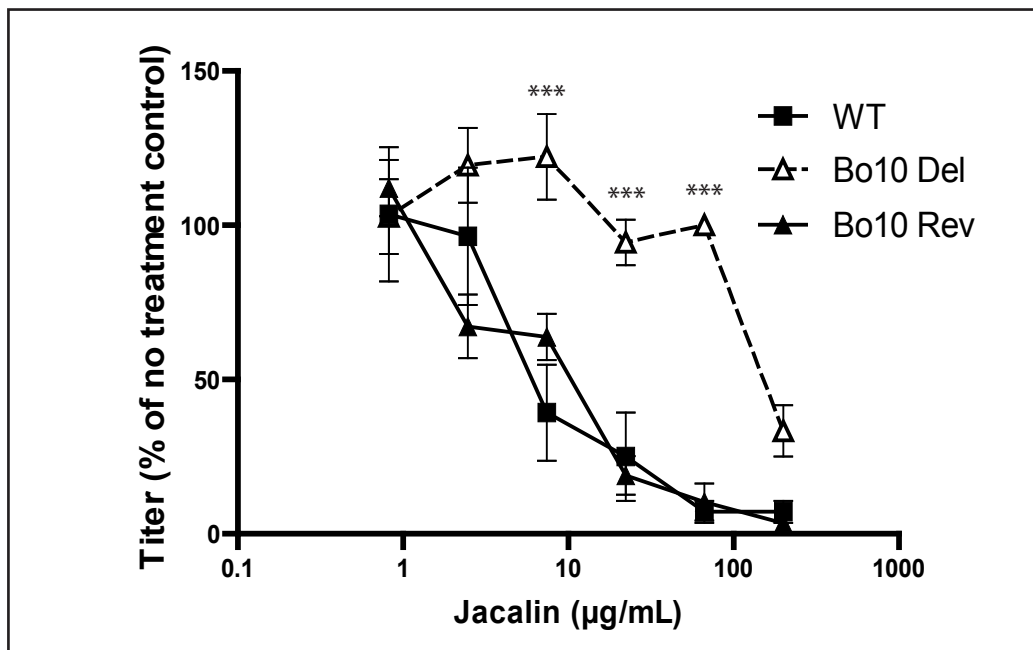
**Figure 5. Glycosylation of BoHV-4 gp180 and importance of BoHV-4 glycans in neutralization evasion.** **A.** Purified BoHV-4 WT V.test strain virions were deglycosylated after denaturation. /, no enzyme; N-, protein N-glycanase; O-, sialidase A +  $\beta$ 1-4 Galactosidase + O-glycanase; N O-, protein N-glycanase + sialidase A +  $\beta$ 1-4 Galactosidase + O-glycanase. Each was then immunoblotted for gp180 (encoded by Bo10) with anti-Bo10-c15 serum as described in the Methods. The position of a MM standard (in kDa) is shown on the left. **B.** Intact MDBK cell-derived BoHV-4 V.test strain virions were deglycosylated without denaturation. /, no enzyme, N-, protein N-glycanase, O-, sialidase A + O-glycanase, N-O- protein N-glycanase + sialidase A + O-glycanase. Each was then tested for neutralization by rabbit anti BoHV-4 V.test strain. After incubation (2h, 37°C) the viruses were plaque assayed for infectivity on MDBK cells. BoHV-4 titers are expressed relative to virus without antibody. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for 4 measurements and were analyzed by 2way ANOVA and Bonferroni posttests, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Statistical significance was only shown for O- treatment. Equivalent data were obtained in two further experiments.



**Figure 6. Antigenicity of the fusion complex of Bo10- mutants.** **A.** MDBK cells were infected (2 PFU/cell, 36 h) with wild-type (solid black lines), Bo10 Del (red lines), Bo10 Rev (dotted black lines) or Bo10 STOP (green lines) of BoHV-4 V.test, and then analyzed by flow cytometry. The filled histogram shows uninfected cells. MAb 29 and 35 recognize gB, mAb 16 recognizes gL, and mAb 33 recognizes gH/L. Fixed (PFA 4%, 4°C for 30 min) and permeabilized (saponin 0.1%) cells were used as control of protein expression. **B.** and **C.** Immunoelectron microscopy. Purified BoHV-4 WT V.test or Bo10 Del virions were processed for immunoelectron microscopy as described in Methods. These samples were stained for gB with mAb 35 followed by secondary goat anti-mouse IgG-10 nm gold labeled. Pictures of individual virions were then taken and gold particles were counted on each virion. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for 20 different virions and were analyzed by Student's t-test, \*\*\*  $p < 0.001$  (**B**). Pictures of representative virions are showed (**C**). **D.** Purified BoHV-4 WT V.test and Bo10 Del virus stocks were compared for gB content per PFU by immunoblotting for gB (with mAb 35) as described in the Methods. The position of a MM standard (in kDa) is shown on the left. **E.** MDBK cells were exposed to BoHV-4 WT V.test and Bo10 STOP virions (20 PFU/cell, 2 h, 4°C), then directly fixed with 2% paraformaldehyde. The cells were then stained for gB with mAb 29 and 35, for gL with mAb 16 and for gH/gL with mAb 33. For each image, a detailed cadran is shown at higher magnification. Pseudo-color glow scale (White, highest to black, lowest intensity).



**Figure 7. Sensitivity of Bo10- mutants to anti gL directed neutralization.** **A.** BoHV-4 WT V.test, Bo10 del, Bo10 Rev and Bo10 STOP virions were incubated with the gL-specific neutralizing mAb 16. After incubation (2h, 37°C) the viruses were plaque assayed for infectivity on MDBK cells. BoHV-4 titers are expressed relative to virus without antibody. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for triplicate measurements and were analyzed by 1way ANOVA and Bonferroni posttests, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **B.** BoHV-4 WT V.test, Bo10 del, Bo10 Rev and Bo10 STOP virions were incubated with increasing amounts of the gL-specific neutralizing mAb 16, and then assayed for infectivity on MDBK cells. BoHV-4 titers are expressed relative to virus without antibody. Equivalent data were obtained in two further experiments.



**Figure 8. Glycans on BoHV-4 gp180 allow virus neutralization.** Sensitivity of WT, Bo10 Del and Bo10 Rev strains to Jacalin mediated neutralization. BoHV-4 WT V.test, Bo10 Del and Bo10 Rev virions were incubated with increasing amounts of O-glycan specific lectin jacalin (1h, 37°C) and then assayed for infectivity on MDBK cells. BoHV-4 titers are expressed relative to virus without lectin. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for 3 measurements and were analyzed by 2way ANOVA and Bonferroni posttests, \*\*\*  $p < 0.001$ .

## *Préambule*

Les résultats obtenus au cours des premières études illustrent la complexité des interactions entre les gammaherpèsvirus et le système immunitaire. En particulier, l'analyse des fonctions du gène Bo10 a mis en évidence la subtilité des méthodes d'évasion du BoHV-4 vis à vis de la neutralisation par les Ac spécifiques. Parmi l'ensemble des stratégies utilisées par les gammaherpèsvirus, l'exploitation du processus de glycosylation semble représenter un mécanisme important pour se dérober à la réponse immune humorale. Chez ces virus, dont la dérive antigénique est faible, camoufler les épitopes essentiels à l'entrée est crucial pour assurer la transmission du virus depuis un individu immun. Cependant, alors que la glycosylation des protéines virales constitue un avantage évolutif majeur pour la dissémination des gammaherpèsvirus au sein de l'espèce hôte, qu'en est-il lors de la transmission entre espèces différentes ? Ces glycanes, dont le caractère peu immunogène profite au virus, sont-ils tout aussi « inertes » vis-à-vis du système immunitaire d'un hôte étranger ? Qu'elles sont leurs implications quand il s'agit de franchir la barrière d'espèces et plus précisément quand il s'agit d'infecter l'homme ?

Afin d'investiguer ces questions, nous avons envisagé la possibilité d'une infection humaine par le BoHV-4. Cette troisième partie expérimentale est donc consacrée à l'étude de la neutralisation de ce virus par le sérum humain. En préambule, certaines particularités de la réponse immune de l'homme sont brièvement abordées.

### **1. Le concept d'anticorps naturels**

La réponse immune comporte différents mécanismes de défense pour répondre aux agressions extérieures. Outre les barrières muqueuses, c'est l'immunité innée qui la première fait obstacle à l'invasion des pathogènes. Par le biais du système du complément, des médiateurs de l'inflammation et des différentes cellules effectrices, l'immunité innée contrôle bon nombre d'infections et établit un relais crucial avec l'immunité adaptative. Un composant intéressant de la barrière immunitaire chez l'homme est représenté par les Ac naturels. Ces derniers sont définis comme des Ac préexistant la rencontre d'un antigène et sont donc présents chez un individu naïf.

Les Ac naturels représentent une large fraction des Ac circulants retrouvés dans le sérum d'individus humains sains (Dighiero *et al.*, 1986). D'affinité faible pour leur cible, ces Ac sont issus de gènes n'ayant subi aucune mutation somatique et ne semblent pas être le résultat d'une réponse immunitaire adaptative spécifique antérieure (Avrameas, 1991). Représentés majoritairement par les



isotypes G et M mais aussi quelquefois par l'isotype A (Galili, 1993), ils constituent une défense charnière entre l'immunité innée et adaptative. Les Ac naturels reconnaissent, pour la plupart, des épitopes partagés par différentes molécules (Thompson *et al.*, 1992). Ils reconnaissent un spectre d'Ag étendu, comme des motifs de la membrane cellulaire, des molécules intra- et extra-cellulaires du soi ainsi que de nombreux agents pathogènes, par des réactions croisées. La question de l'origine des Ac naturels reste controversée. Différentes théories s'opposent encore aujourd'hui. Alors qu'une origine strictement génétique a été évoquée (Ternynck *et al.*, 1994), la production en réponse à la flore normale des surfaces épithéliales du corps ou en réaction au soi, semble être la théorie la plus probable (Galili *et al.*, 1988a).

Même si les fonctions biologiques des Ac naturels ne sont pas totalement éclaircies, ils semblent jouer un rôle bénéfique de défense en opsonisant les pathogènes et en contribuant à leur destruction par le complément (Hayashi *et al.*, 2004; Jayasekera *et al.*, 2007; Takeuchi *et al.*, 1997). De plus, ils pourraient également jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire (Ternynck *et al.*, 1994). Plus récemment, de nombreuses études ont démontré l'implication des Ac naturels dans la détection et l'élimination précoce des lésions cancéreuses (Brandlein *et al.*, 2004; Brandlein *et al.*, 2003; Vollmers & Brandlein, 2005; 2006).

## 2. Les anticorps anti-gal

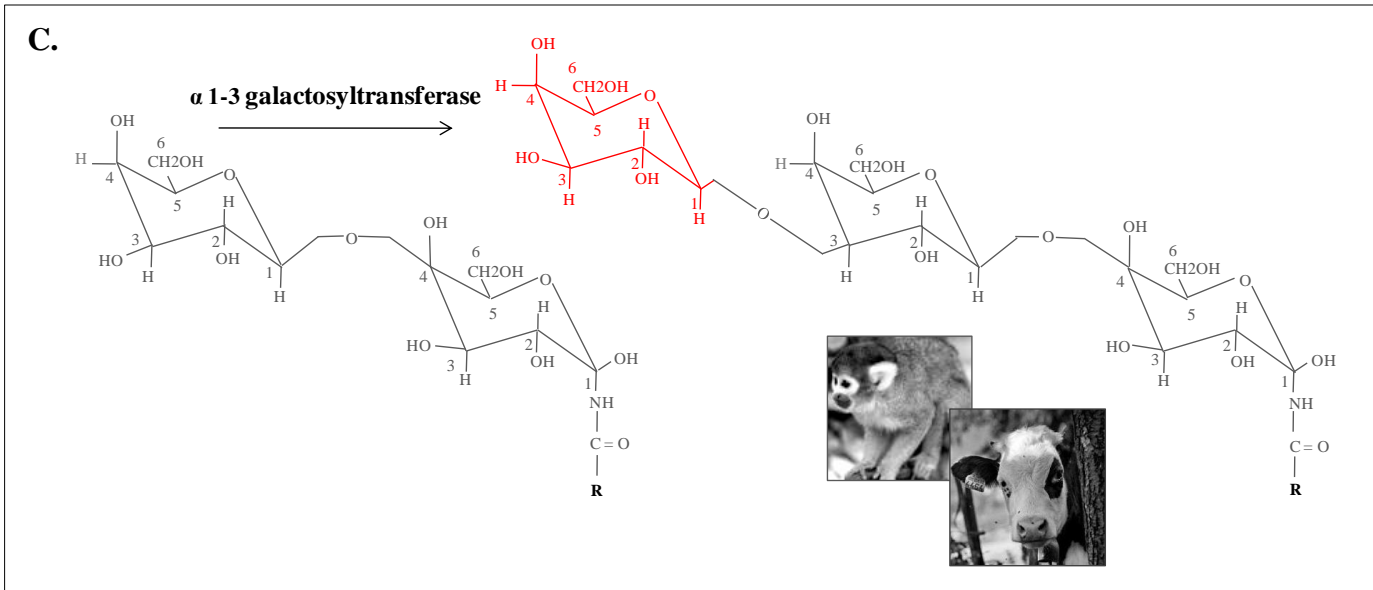
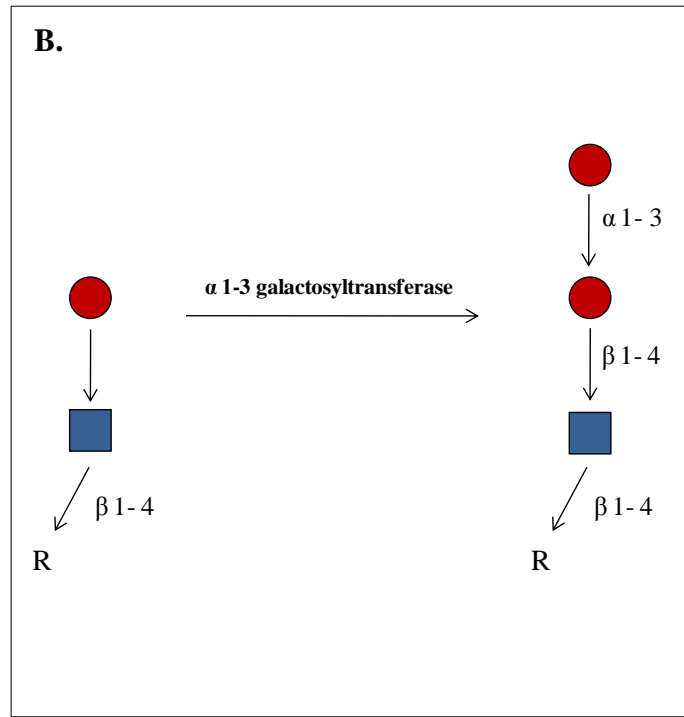
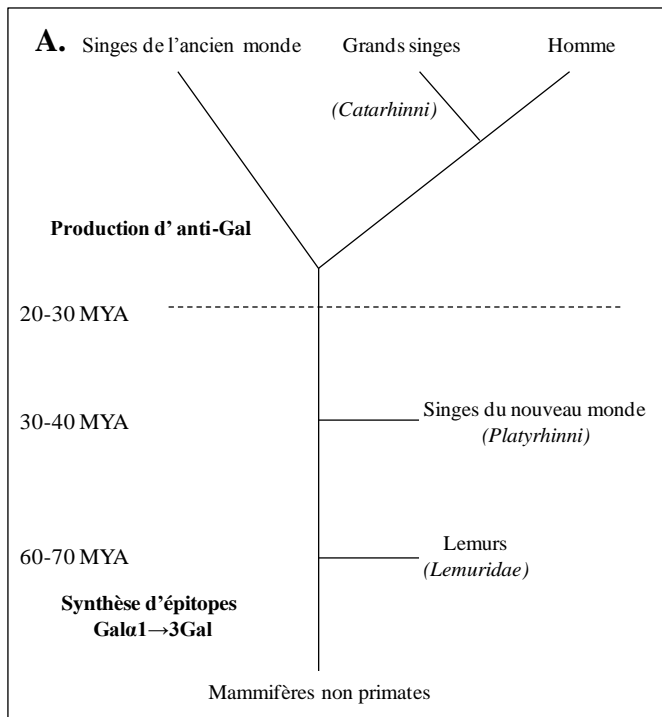
Les Ac naturels les plus abondants dans le plasma sont de deux types : ceux fixant les antigènes des groupes sanguins du système ABO, décrits par Landsteiner dès 1909 et ceux orientés vers les motifs alpha galactose. Les épitopes cibles sont, pour chacun d'eux, des résidus carbohydrates synthétisés par une même famille de glycosyltransférases (Milland *et al.*, 2006). Les Ac anti-galactose sont principalement d'isotype IgG ou IgM et constituent plus d'1% du pool des Ac circulants. Désignés sous le terme d'Ac « anti-gal », ils lient spécifiquement le résidu galactose  $\alpha$ -1,3-galactose- $\beta$ 1,4- NAcétylglucosamine (épitope gal) exprimé par les cellules de mammifères, à l'exception des singes supérieurs, des singes de l'ancien monde et de l'homme (Galili *et al.*, 1988b). Ce résidu est synthétisé par une  $\alpha$ -1,3-galactosyltransférase (GT) (Figure 7). Des orthologues fonctionnels de cette enzyme ont été conservés chez l'ensemble des espèces, au cours du processus de spéciation, jusqu'il y a approximativement 20 à 30 millions d'années. A cette époque, une mutation délétère est apparue sur le gène de l'enzyme GT, au niveau de la branche phylogénique qui allait conduire aux populations des hommes, des grands singes et des singes de l'ancien monde (Galili *et al.*, 1988b). Chez ces dernières espèces, la disparition du motif alpha galactose du répertoire antigénique du soi a permis l'apparition d'Ac naturels dirigés contre ce motif. Une hypothèse intéressante a été proposée pour expliquer la sélection de la mutation invalidant le gène de la GT, au cours de l'évolution. Selon cette hypothèse, les

singes de l'ancien monde auraient été soumis à une forte pression de sélection par un agent infectieux porteur de l'épitope gal (Galili *et al.*, 1988b). Les sujets mutants GT négatifs et donc pourvus d'Ac anti-gal, auraient dès lors survécu.

D'un point de vue moléculaire, les épitopes gal semblent se rajouter sur différents squelettes carbohydrates. Ainsi, plusieurs études ont voulu caractériser les substrats accepteurs de ces résidus terminaux et les auteurs ont proposé divers branchements particuliers aux N- comme aux O-glycans (Blanken & Van den Eijnden, 1985; Stults *et al.*, 1999; Thibaudeau *et al.*, 1996).

En partie responsables des réactions aiguës de rejet de xenogreffes (Abdel-Motal *et al.*, 2006; Galili *et al.*, 2007; Milland *et al.*, 2006), les Ac anti-gal sont de plus en plus étudiés et semblent interagir à de nombreux niveaux biologiques. Ainsi, plusieurs équipes scientifiques ont récemment suggéré une responsabilité des ces Ac dans l'émergence de maladies autoimmunes (Fullmer *et al.*, 2005). Dépassant le cadre strict de la xénotransplantation et des réactions de rejet, plusieurs études se sont penchées sur l'implication des Ac anti-gal dans la neutralisation de différents virus enveloppés (Hayashi *et al.*, 2004; McKane *et al.*, 2003; Welsh *et al.*, 1998). Ces recherches, ciblant notamment les rétrovirus et le virus de la maladie d'Aujeszký, ont démontré la responsabilité des Igs anti-gal dans l'initiation de la cascade du complément et dans l'inactivation subséquente de ces agents infectieux (Hayashi *et al.*, 2004).

Cette troisième étude a pour but d'investiguer la sensibilité du BoHV-4 à la neutralisation par le sérum humain naïf afin de déterminer si l'espèce humaine possède une immunité innée anti-virale contre cet agent. Dans le cadre de cette transmission inter-espèce potentielle, une attention particulière sera accordée à la protéine gp180 et aux glycans qu'elle expose afin de déterminer les implications éventuelles de ceux-ci vis-à-vis du franchissement de la barrière d'espèce.



**Figure 7.** A. Une mutation invalidant l'enzyme  $\alpha$  1-3 galactosyltransférase a été maintenue chez l'homme, les grands singes et les singes de l'Ancien Monde. Chez ces espèces, l'absence d'épitope gal a permis l'émergence d'Ac naturels anti-gal au niveau sérique (Adapté de Galili *et al.*, 1987). B. et C. Illustration de la catalyse de l'  $\alpha$ 1,3 galactosyltransférase ajoutant l'épitope gal à un squelette carbohydrate (R) selon les conventions internationales de représentation des glycanes (B) et selon la formule chimique classique (C)

**Le sérum humain neutralise l'herpèsvirus bovin 4 par un mécanisme inné  
dépendant des anticorps naturels**

*« Natural antibody-complement dependent neutralization of Bovine  
herpesvirus 4 by human serum »*

---

*Microbes and Infection*, (2007), 9, 1530-1537

Machiels B., Gillet L., Do Nascimento Brito S., Drion P., Delforge C., Nizet Y., Gianello P., Bona C., Costes B.,  
Markine-Goriaynoff N., Vanderplasschen A.

Original article

# Natural antibody–complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum

Bénédicte Machiels<sup>a</sup>, Laurent Gillet<sup>a</sup>, Sieberth Do Nascimento Brito<sup>a</sup>, Pierre Drion<sup>b</sup>,  
Cédric Delforge<sup>a</sup>, Yannick Nizet<sup>c</sup>, Pierre Gianello<sup>c</sup>, Christophe Bona<sup>a</sup>, Bérénice Costes<sup>a</sup>,  
Nicolas Markine-Goriaynoff<sup>a</sup>, Alain Vanderplasschen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Immunology–Vaccinology (B43b), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Bvd de Colonster 20, B-4000 Liège, Belgium

<sup>b</sup> Animal facility (B23), University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>c</sup> Experimental Immunology Unit, Université de Louvain, Faculté de Médecine, Department of Pathology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium

Received 17 May 2007; accepted 23 August 2007  
Available online 31 August 2007

## Abstract

In contrast to most gammaherpesviruses, *Bovine herpesvirus 4* (BoHV-4) has a broad range of host species both *in vitro* and *in vivo*. Several *in vitro* studies demonstrated that some human cell lines are sensitive or even permissive to BoHV-4. These observations led to the hypothesis that cross-species transmission of BoHV-4 could lead to human infections. In the present study, we investigate the sensitivity of BoHV-4 to neutralization by naïve human sera in order to determine if humans exhibit innate anti-viral activities against this virus. Our results demonstrate that human sera from naïve individuals, in contrast to the sera of naïve subjects from various animal species, neutralize BoHV-4 efficiently. A series of complementary experiments were performed to unravel the mechanism(s) of this neutralization. The data obtained in this study demonstrates that human serum neutralizes BoHV-4 in a complement dependent manner activated by natural antibodies raised against the Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R epitope expressed by bovine cells.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Bovine herpesvirus 4; Innate anti-viral immunity; Virus neutralization; Complement; Natural antibodies

## 1. Introduction

*Bovine herpesvirus 4* (BoHV-4) belongs to the *Herpesviridae* family, *gammaherpesvirinae* subfamily, *rhadinovirus* genus [1]. BoHV-4 has been isolated throughout the world from both healthy cattle as well as from those exhibiting

a variety of diseases. In contrast to most gammaherpesviruses, BoHV-4 can replicate in a broad range of host species both *in vitro* and *in vivo*. Several *in vitro* studies demonstrated that some human cell lines are sensitive or even permissive to BoHV-4 [2–4]. The sensitivity of human cells to BoHV-4 infection has been investigated to address two main questions.

The observation that human cells can support BoHV-4 infection led to the hypothesis that field strains of BoHV-4 could represent a danger for human health [2,4]. BoHV-4 could be potentially harmful to humans either by replicating in permissive cells and/or by protecting non-permissive persistently infected cells from apoptosis [4]. *In vivo*, the latter phenomenon could allow the infected cells to accumulate mutations leading eventually to transformation [4]. Importantly, this

**Abbreviations:** BoHV-4, *Bovine herpesvirus 4*; EGFP, enhanced green fluorescent protein; Gal $\alpha$ 1-3Gal, Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R; GT,  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase; MDBK, Madin Darby Bovine Kidney; MEM, minimal essential medium; MBL, mannan-binding lectin; Mab, mouse monoclonal antibody.

\* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 42 64; fax: +32 4 366 39 08.

E-mail address: a.vdplasschen@ulg.ac.be (A. Vanderplasschen).

property has been shown to play an important role in the oncogenesis induced by several gammaherpesviruses [5,6]. The risk of a viral cross-species transmission relies on several factors such as, the prevalence of the virus in the environment, the existence of events permitting the transmission of the virus, and finally, the capacity of the virus to infect and to persist in the non-natural host. In relation to these factors, several observations support the existence of a risk of BoHV-4 transmission to humans. Firstly, BoHV-4 is highly prevalent in the cattle population and no eradication scheme is directed against this virus. Secondly, there are many factors that increase the exposure of this virus from cattle to humans: (i) BoHV-4 is frequently isolated from bovine serum [7] which is abundantly used in food and pharmacological preparations [8], making human contamination by BoHV-4 possible by enteral or parenteral routes; (ii) BoHV-4 has been found in the milk of cows with mastitis as well as from apparently healthy cows, suggesting possible human contamination by oral route through milk ingestion [9,10]. The latter risk is drastically reduced by the sensitivity of BoHV-4 to milk pasteurization [11]; and (iii) infected animals excrete BoHV-4 in nasal and vaginal discharges both after primary infection and after reactivation [12] making human contamination possible resulting from direct contact with infected cattle. However, to date there are no reported cases of human infection with BoHV-4.

The ability of BoHV-4 to infect human cells has also been investigated to address the potential of BoHV-4 recombinant strains for viro-oncolytic treatment of human cancer. Recently, we reported the property of BoHV-4 to induce, *in vitro* and *in vivo*, apoptosis of some human carcinomas [13]. *In vivo* assays were performed in nude mice, and consequently, in absence of human innate immunity.

Human innate immunity against BoHV-4 could be crucial for both questions presented above resulting in beneficial or undesirable effects. Indeed, on the one hand, natural immunity could prevent human infection after contamination by BoHV-4 field strains. On the other hand, the potential of modified BoHV-4 strains as viro-oncolytic treatment of cancer could be drastically reduced by human innate anti-viral immunity.

Innate humoral immunity against viruses can be mediated by complement. Activation of complement on virions can occur independently of antibodies [14] or be the consequence of natural antibody binding on virions (Antibody–complement dependent viral neutralization) [15,16]. The serum of humans, apes and Old World monkeys contain high levels of natural antibodies specific for the carbohydrate moiety Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R (Gal $\alpha$ 1-3Gal) [16]. This moiety is a product of the  $\alpha$ -1-3-galactosyltransferase (GT) enzyme that adds a terminal galactose onto glycoproteins and glycolipids in a specific  $\alpha$ 1-3 linkage. Humans, apes and Old World monkeys do not express the Gal $\alpha$ 1-3Gal moiety as the consequence of an ancestral inactivation of their *GT* gene. The non-expression of this moiety resulted in loss of immune tolerance and production of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies as a presumed consequence of bacterial exposure [16]. In contrast, New World monkeys, prosimians and non-primate mammals express a functional *GT* enzyme which produces the Gal $\alpha$ 1-3Gal

epitope as a self antigen, preventing these species from producing anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies. Human serum contains high level of IgG and IgM against Gal $\alpha$ 1-3Gal [17]. Anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal constitutes approximately 1% of circulating IgG. It has been shown for few enveloped viruses that their passage through cells expressing Gal $\alpha$ 1-3Gal make them potential targets for natural human antibodies against Gal $\alpha$ 1-3Gal and eventually sensitive to antibody dependent complement neutralization [18–22].

In the present study, we investigate the sensitivity of BoHV-4 to neutralization by naïve human serum in order to determine if humans exhibit innate anti-viral activities against this virus. Our results demonstrate that human sera from naïve individuals, in contrast to the sera of naïve subjects from various animal species, neutralize BoHV-4 efficiently. A series of complementary experiments demonstrated that human serum neutralizes BoHV-4 through activation of complement by natural antibodies raised against bovine host cell derived epitopes. The Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope expressed by bovine cells was proved to play a key role in this neutralization. This study is the first to support the role of human natural anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies as an innate immune mechanism against a gammaherpesvirus. The present study also raises questions that must be considered when developing BoHV-4 recombinants as viro-oncolytic vectors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and virus

Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (ATCC CCL 22) and VERO (ATCC CCL 81) (African green monkey) cells were cultured following the recommendations of the ATCC (<http://www.atcc.org>). The BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I recombinant strain was used throughout this study. This strain carries an enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression cassette under control of the human cytomegalovirus *IE* gene promoter/enhancer in a region of the viral genome which does not contain any open reading frames. Comparison of the parental V. test strain and the derived V. test EGFP *Xho* I revealed no difference in viral replication both by single round and multiple step assays [4]. Virus grown on MDBK or VERO cells was semi-purified and stored as described previously [13].

### 2.2. Complement reagents

Serum was collected as a source of complement from human volunteers with different ABO blood groups and from several animal species (Table 1). The sera were treated as described previously to preserve complement activity, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  [23]. Complement activity of stored sera was controlled using the AH50 assay as described elsewhere [24]. This assay relies on the lysis of unsensitized rabbit erythrocytes by sample serum in a buffer containing the calcium chelator EGTA, thus preventing the activation of the calcium-dependent classical pathway. The results are expressed

Table 1  
Serum complement activity and anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody level<sup>a</sup>

Species (blood group)	Serum complement activity <sup>b</sup>		Anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody <sup>c</sup>	
	Serum dilution	R <sup>2</sup>	IgG ( $\mu$ g/ml)	IgM ( $\mu$ g/ml)
Hu (O+)	0.060	0.968	108.3	89.3
Hu (A+)	0.046	0.969	113.7	44.5
Hu (AB-)	0.041	0.910	75.6	68.5
Hu (B+)	0.043	0.885	69.4	25.6
Horse	0.088	0.942	<DL	<DL
Sheep	0.024	0.971	<DL	<DL
Bovine	0.042	0.985	<DL	<DL
Goat	0.028	0.970	<DL	<DL
Canine	0.043	0.974	<DL	<DL
Rat	0.415	0.887	<DL	<DL

<sup>a</sup> Data were obtained from a representative sample out of three serum samples of each species or blood group.

<sup>b</sup> Serum complement activity was determined by AH50 haemolysis assay. The results are expressed as the serum dilution leading to 50% of haemolysis of unsensibilised rabbit erythrocytes.

<sup>c</sup> <DL indicates that no antibody was detected.

as the dilution of the sample serum that induced the lysis of 50% of rabbit erythrocytes (Table 1).

The sera listed in Table 1 were analyzed for the presence of specific antibodies raised against BoHV-4 using two indirect immunofluorescent assays as described previously [25]. With exception of some of the bovine sera, none of the sera collected contained detectable antibodies against BoHV-4 (data not shown). The experiments presented in this manuscript were performed exclusively with BoHV-4 antibody negative bovine sera. Human C3 depleted serum and purified human C3 factor were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

### 2.3. Complement inhibitors

To identify the implication of specific complement activation pathways, samples were treated with EGTA (final concentration of 8 mM) and Mg<sup>2+</sup> (final concentration of 2 mM) to inactivate the classical and the mannan-binding lectin (MBL) pathways, or with D-mannose (final concentration of 100 mM) to interfere with activation of the MBL pathway. To inactivate all three complement activation pathways, EDTA (final concentration of 10 mM) was added to samples. To interfere with C3 activation, 40  $\mu$ M of circular compstatin was added to samples. Linear compstatin was used as an inactive control.

### 2.4. Antibodies

Purified human IgG and IgM were used in this study (Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, USA). These antibodies were isolated from pooled serum of healthy individuals. Antibodies raised against BoHV-4 were not detected in these purified antibodies using two indirect immunofluorescent assays described elsewhere (data not shown) [25]. The mouse monoclonal antibody (Mab) M86 anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal was purchased from Alexis. Mab M86 is an IgM. Mab MADNP-5

(Experimental Immunology Unit, University of Louvain, Belgium) raised against dinitrophenyl hapten is also an IgM and was used as an isotypic control for Mab 86. Antibodies were used free of sodium azide [26].

### 2.5. Viral neutralization assay

The property of the sera listed in Table 1 to neutralize BoHV-4 was investigated by virus neutralization assay (in absence of detectable specific anti-BoHV-4 antibodies) as described previously with minor modifications [27]. Briefly, semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I was diluted in ice-cold minimal essential medium (MEM) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing active or heat-inactivated (56 °C, 30 min) serum (final concentration of 10%, vol/vol). After an incubation period of 60 min at 37 °C, samples were diluted 5 times with MEM and the amount of remaining infectious virus was determined by plaque assay on MDBK cells as described previously [28].

### 2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal IgG and IgM

The levels of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal IgG and IgM was determined by enzyme-linked immunosorbent assay as described in details elsewhere [17]. The results are expressed as the mean of triplicate measures.

### 2.7. Statistical analysis

Student's *t* test was used to test for the significance of viral neutralization data ( $P < 0.05$ ), while HA50 data were assessed by linear regression.

## 3. Results

### 3.1. Human serum exhibits an innate anti-viral activity against BoHV-4

The initial goal of the present study was to determine if human serum exhibits an innate anti-viral activity against BoHV-4. With that goal in mind, sera were collected from healthy human volunteers and from several animal species (Table 1). Sera collected were tested for the presence of specific antibodies raised against BoHV-4 using two indirect immunofluorescent assays. With exception of some of the bovine sera, none of the sera collected contained detectable anti-BoHV-4 antibodies (data not shown). Only seronegative bovine sera were further used in the present study.

In contrast to animal sera, human sera exhibited an innate anti-viral activity against BoHV-4 (Fig. 1). This neutralizing activity was observed only in sera in which the complement activity had been preserved and was independent of the donor ABO blood group.

To confirm that the absence of neutralization observed with animal sera was not the consequence of complement inactivation, the complement activity of all sera was compared using



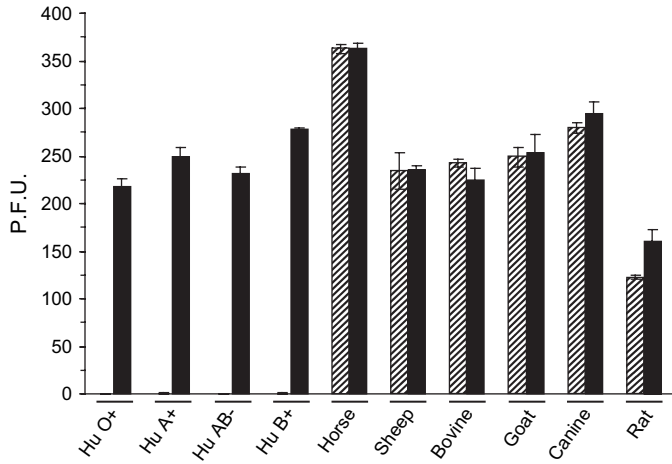


Fig. 1. Sensitivity of BoHV-4 to neutralization by serum. Semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I derived from MDBK cells was assayed for its sensitivity to neutralization by sera collected from human volunteers with different ABO blood groups and from several animal species. All sera tested in this study had no detectable anti-BoHV-4 antibodies (see Section 2 for details). Sera were tested at the final concentration of 10% (vol/vol). Hatched bars and solid bars represent the number of plaques obtained with active sera and heat-inactivated sera, respectively. Data represent the average  $\pm$  SD for triplicate measures. The results presented are representative of the data obtained for three serum samples tested individually for each species or blood group (human sera).

an AH50 assay (Table 1). This assay revealed that with exception of the rat serum, all other sera tested exhibited comparable complement activity; serum dilutions between 0.024 and 0.088 led to 50% of haemolysis (Table 1). The data present above suggest that human serum exhibits an innate anti-viral activity against BoHV-4 that is dependent on complement activation or on the activity of another thermo labile factor.

### 3.2. Anti-BoHV-4 innate anti-viral activity of human serum relies on complement activation

To investigate the role of complement activation in the ability of human serum to neutralize BoHV-4, we investigated the sensitivity of the virus to human serum depleted in C3 (Fig. 2A). Incubation of BoHV-4 with active human serum depleted in C3 induced a partial neutralization of the virus. The mean numbers of plaques observed with heat-inactivated and active serum were 295 and 95, respectively, implying a 68% reduction. Addition of purified C3 to human serum depleted in C3 gradually increased its neutralizing activity. Addition of 28.4  $\mu$ g/ml of C3 led to a complete inhibition of the virus. Knowing that the physiological concentration of C3 is around 1.25 mg/ml of serum, the former results suggest that efficient neutralization of BoHV-4 can occur with a low concentration of C3. Consequently, the partial neutralization observed with C3 depleted serum without addition of purified C3 could be the consequence of the remaining C3 left after the depletion process.

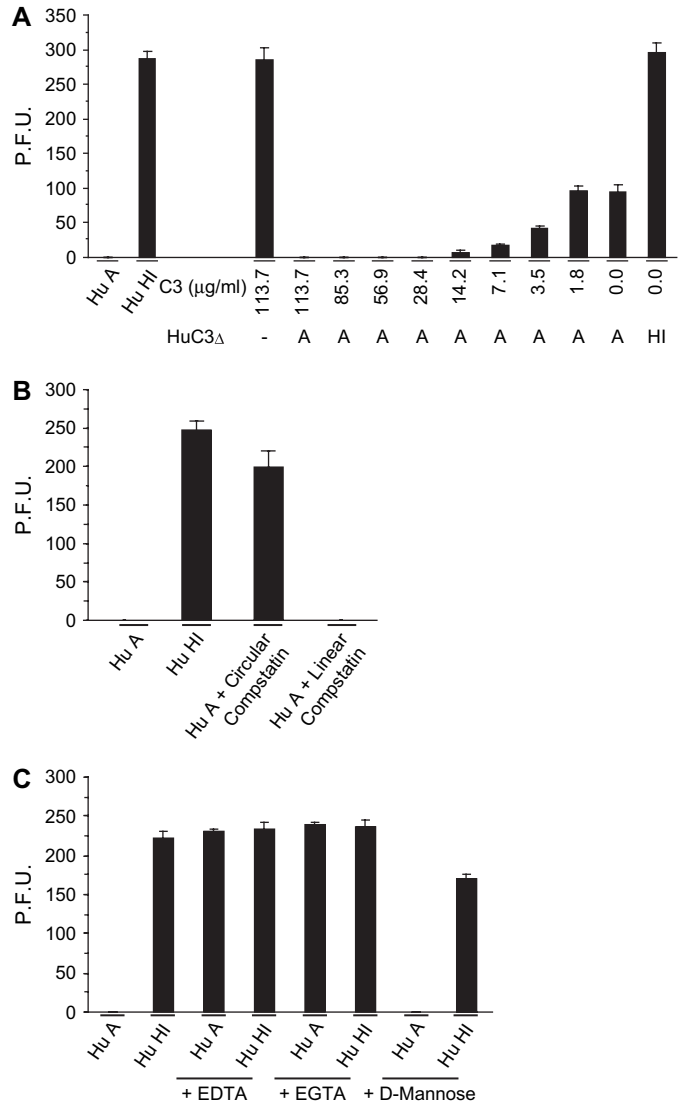


Fig. 2. BoHV-4 neutralization by human serum was dependent on complement activation. (A) Effect of C3 depletion on BoHV-4 neutralization by human serum. Semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I derived from MDBK cells was assayed for its sensitivity to neutralization by normal human serum (Hu) or human serum depleted in C3 (HuC3Δ). Active (A) or heat-inactivated (HI) sera were tested at the final concentration of 10% (vol/vol). HuC3Δ was tested in presence of increasing doses of purified C3. (B) Effect of compstatin on BoHV-4 neutralization by human serum. C3 activation was inhibited by circular compstatin (40  $\mu$ M). Inactive linear compstatin was used as an inactive control. (C) Identification of specific complement activation pathways implicated in BoHV-4 neutralization by human serum. Inhibitors of complement pathways were added to samples: EDTA to inhibit all three complement activation pathways; EGTA to inactivate the classical and the MBL pathways; and D-mannose to interfere with activation of the MBL pathway. Data represent the average of the number of plaques obtained  $\pm$ SD for triplicate measures. Data were obtained from a representative sample out of two serum samples of each ABO blood group (panels B and C). Experiments with human serum depleted in C3 were repeated with two different commercial badges.

To test the latter hypothesis and to further investigate the role of complement activation in the ability of human serum to neutralize BoHV-4, we used compstatin to prevent C3 activation (Fig. 2B). Circular compstatin drastically reduced the property of human serum to neutralize BoHV-4. The number



of plaques observed in presence of compstatin was reduced by only 20% compared to heat inactivated human serum. In contrast, linear compstatin used as an inactive control did not affect serum neutralization activity. Taken together, the results presented above suggest that the property of naïve human serum to neutralize BoHV-4 infectivity relies on complement activation.

### 3.3. Anti-BoHV-4 innate anti-viral activity of human serum relies on activation of the classical pathway of complement

In order to identify the specific complement pathway(s) activated in this study, we used chemical inhibitors (Fig. 2C) to distinguish the individual pathways. EDTA that inhibits all three activation pathways of complement abolished the property of active human serum to neutralize BoHV-4. Similarly, EGTA that inhibits the classical and the MBL pathways totally prevented BoHV-4 neutralization by active human serum suggesting the involvement of either one or both of the latter pathways. Finally, D-mannose that is used as an inhibitor of the MBL pathway, did not affect the ability of active human serum to neutralize BoHV-4. The results presented in Fig. 2C demonstrate that the ability of active human serum to neutralize BoHV-4 relies on activation of the classical pathway of complement.

### 3.4. Activation of the human classical pathway of complement on BoHV-4 virions relies on antibodies

Activation of human complement on BoHV-4 virions could occur independently of antibodies (through direct binding of C1q on virions) or be the consequence of natural antibody binding on virions. To investigate the existence of natural antibody able to bind to BoHV-4 virions in human serum, we tested whether the addition of purified human IgG and IgM to active horse serum could confer neutralizing activity to the latter (Fig. 3). IgG and IgM were added to active horse serum to a final concentration of 1.35 mg/ml and 0.3 mg/ml, respectively. It is important to note that these concentrations are lower than the physiological concentrations observed in human serum (13.5 mg/ml of IgG and 1.5 mg/ml of IgM). However, addition of human IgG and IgM to active horse serum induced neutralization of BoHV-4, thereby demonstrating the presence of human natural antibody able to bind on BoHV-4 virions.

### 3.5. Mab M86 raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal induces complement dependent neutralization of BoHV-4

Human natural antibodies raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal represent up to 1% of circulating antibodies [16]. Anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody analysis of the human sera used in this study revealed high levels of both IgG and IgM consistent with an earlier report (Table 1) [17]. As expected no anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibody was detected in the sera of non-primate mammals (Table 1). Previous studies reported the ability of the former antibodies

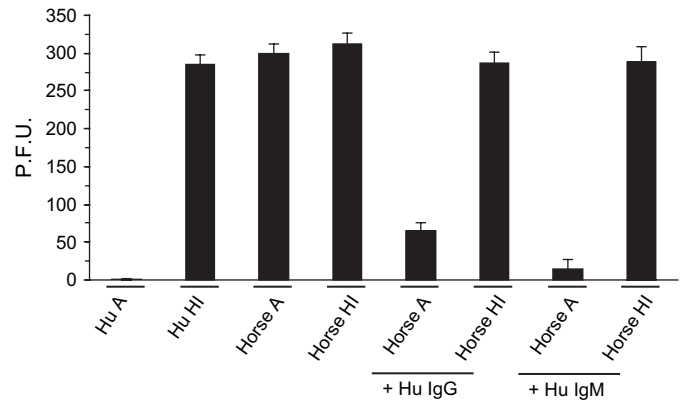


Fig. 3. Property of human IgG and IgM to induce complement dependent neutralization of BoHV-4. Semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I derived from MDBK cells was assayed for its sensitivity to neutralization by horse serum supplemented with purified human IgG (Hu IgG) (final concentration of 1.35 mg/ml) or human IgM (Hu IgM) (final concentration of 0.30 mg/ml). Human and horse sera were tested at the final concentration of 10% (vol/vol). A, active serum; HI, heat-inactivated serum. Data represent the average of the number of plaques obtained  $\pm$ SD for triplicate measures.

to induce complement neutralization of enveloped virus derived from cell expressing Gal $\alpha$ 1-3Gal [18–22]. Given that the MDBK cells used to grow BoHV-4 express Gal $\alpha$ 1-3Gal, we investigated whether Mab M86 raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal could induce complement dependent neutralization of the virus. While active horse serum did not affect the infectivity of BoHV-4, active horse serum supplemented with Mab M86 induced neutralization (the number of plaques was reduced by 92%) (Fig. 4). The infectivity of BoHV-4 was not affected by either active horse serum supplemented with an irrelevant isotypic control or by heat-inactivated horse serum containing Mab M86.

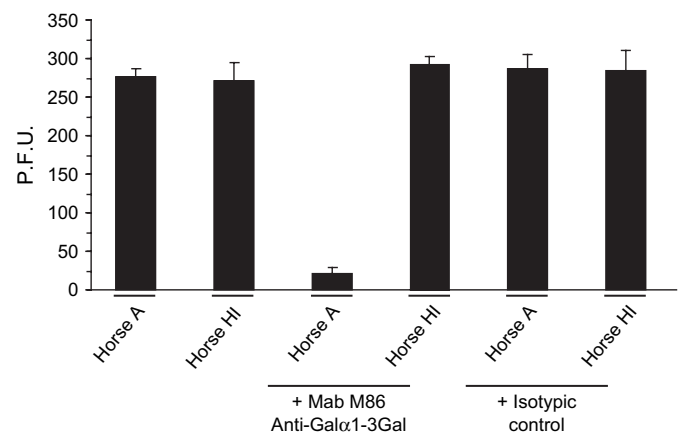


Fig. 4. Property of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies to induce complement dependent neutralization of BoHV-4. Semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I derived from MDBK cells was assayed for its sensitivity to neutralization by horse serum supplemented with Mab M86 (final concentration of 5  $\mu$ g/ml) raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal. Mab MADNP-5 was used as an isotypic irrelevant control (final concentration of 5  $\mu$ g/ml). Horse sera was tested at the final concentration of 10% (vol/vol). A, active serum; HI, heat-inactivated serum. Data represent the average of the number of plaques obtained  $\pm$ SD for triplicate measures.

### 3.6. BoHV-4 grown on MDBK and VERO cells exhibited different sensitivity to neutralization by human serum

The results presented above suggest that human serum neutralizes BoHV-4 through complement activation induced by natural antibodies raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal. If this conclusion is correct, BoHV-4 virions derived from cells expressing Gal $\alpha$ 1-3Gal should be sensitive to neutralization by human serum while virions derived from Gal $\alpha$ 1-3Gal negative cells should not. To test this hypothesis, BoHV-4 virions grown on MDBK (Gal $\alpha$ 1-3Gal positive) and on VERO (Gal $\alpha$ 1-3Gal negative) were compared for their sensitivity to human serum (Fig. 5A). As observed many times during this study, active human serum neutralized BoHV-4 grown on MDBK cells.

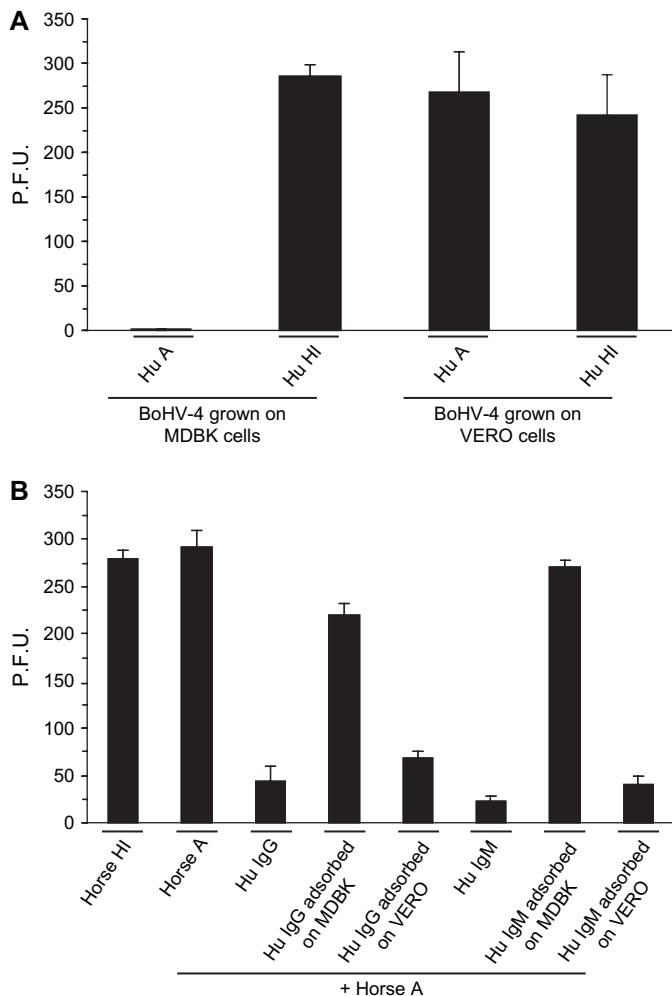


Fig. 5. (A) Effect of host cell species on the sensitivity of BoHV-4 to neutralization by human serum. Semi-purified BoHV-4 V. test EGFP *Xho* I derived from MDBK cells or VERO cells was assayed for its sensitivity to neutralization by human serum. Active, A, and heat-inactivated, HI, human sera were tested at the final concentration of 10% (vol/vol). Data represent the average of the number of plaques obtained  $\pm$ SD for triplicate measures. (B) Effect of pre adsorption on mock-infected cells on the ability of antibodies to induce complement dependent neutralization of BoHV-4. Purified human IgG and IgM were incubated on MDBK or VERO mock-infected cells for 2 h at 37 °C. Unbound antibodies were collected and assayed for their ability to induce complement dependent neutralization of BoHV-4 as described in Fig. 3 legend.

Interestingly, active human serum did not significantly affect the infectivity of BoHV-4 virions derived from VERO cells.

### 3.7. Preadsorption of human antibodies on mock-infected Gal $\alpha$ 1-3Gal positive cells reduced their ability to induce complement dependent neutralization of BoHV-4

To further support the role of human anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in the neutralization observed, a depletion experiment was performed (Fig. 5B). Human IgG and IgM were pre adsorbed on mock-infected cells positive (MDBK) or negative (VERO) for Gal $\alpha$ 1-3Gal expression. Recovered antibodies were then assayed for their ability to induce complement dependent neutralization of BoHV-4 grown on MDBK cells (Fig. 5B). Pre adsorption on MDBK cells but not on VERO cells drastically reduced the neutralizing property of the antibodies.

## 4. Discussion

The goal of this study was to investigate the existence of an innate anti-viral immunity raised against BoHV-4 in human serum. Our data demonstrate that human serum, in contrast to sera collected from several animal species, neutralized BoHV-4 efficiently. The mechanism of this neutralization was demonstrated to be complement dependent through activation of the classical pathway by natural antibodies. The latter antibodies were raised against the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope expressed in MDBK cells and possibly against other host cell derived epitopes expressed on the surface of BoHV-4 virions.

Innate anti-viral activity in serum has been described against many viruses for several host species. Interestingly, the anti-viral activity relies on several immune mechanisms that were found to vary in host species and according to the virus considered. The results of this study demonstrate that human serum neutralizes BoHV-4 through activation of complement by natural antibodies raised against host cell derived epitopes expressed on the virion surface. The latter conclusion relies on the observation that BoHV-4 virions grown in MDBK cells were neutralized by human serum while those derived from VERO cells were not (Fig. 5). Human antibodies raised against BoHV-4 virions could recognize either cellular molecules incorporated into the viral envelope and/or post-translational modifications induced by specific cellular enzymes. Further studies are required to determine the structure of all targeted epitopes and to identify on which molecules they are expressed. However, the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope present on BoHV-4 virions, as a consequence of host cell GT activity, was proved to be sufficient to induce complement dependent neutralization of BoHV-4 (Fig. 4). Human serum contains high level of IgG and IgM raised against the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope. Taken together, these results strongly suggest that the property of human serum to neutralize BoHV-4 relies on complement activation induced by natural antibodies raised against the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope on virion. This study is the first to

report this phenomenon for a member of the gammaherpesvirus subfamily.

BoHV-4 neutralization mediated by anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies and complement may play a role as a barrier to prevent cross-species infection from cattle to human. As described in Section 1, human contamination by BoHV-4 could occur by parenteral and mucosal routes. The results of this study suggest that IgG and IgM seric antibodies raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal may neutralize BoHV-4 immediately after parenteral transmission. Anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies could also play a role as a barrier to prevent human contamination through mucosal route. Indeed, it has been demonstrated that human secretions contains anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal IgA [29]. Further studies are required to determine the potential of these IgA to neutralize BoHV-4 at the mucosal surface. It is important to note that the latter property may be crucial to prevent human contamination as progeny virions released by human mucosal cells will be Gal $\alpha$ 1-3Gal negative, and consequently, insensitive to seric anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal immunoglobulins.

The protective effect of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies could be explained as suggested above by immediate viral neutralization after exposure or by promoting the adaptive immune response raised against the virus. The latter hypothesis is supported by a very recent study performed on the immunogenicity of *Human immunodeficiency virus* (HIV) gp120 engineered to express Gal $\alpha$ 1-3Gal [30]. These authors demonstrated that gp120 engineered to express Gal $\alpha$ 1-3Gal induced a better immune response compared to a Gal $\alpha$ 1-3Gal negative form. They hypothesized that *in vivo* anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies induce the formation of immune complexes leading to effective uptake of the antigen by antigen-presenting cells. It will be interesting in the future to determine if BoHV-4 produced in Gal $\alpha$ 1-3Gal expressing cells are more immunogenic than virions derived from Gal $\alpha$ 1-3Gal negative cells in GT deficient animals. The latter hypothesis could be tested in GT knockout mice, which produce anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal.

Finally, it has been proposed recently that BoHV-4 derived vectors could be developed for viro-oncolytic treatment of human carcinomas [13]. The results of this study suggest that virions will be more stable in humans if they are produced in Gal $\alpha$ 1-3Gal negative cells than in Gal $\alpha$ 1-3Gal positive cells.

In conclusion, this study demonstrates that human serum exhibits the innate property to neutralize BoHV-4 through activation of complement by natural antibodies raised against bovine host cell derived epitopes. The Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope expressed by bovine cells was demonstrated to play a key role in this neutralization. This study is the first to support the role of human natural antibodies raised against Gal $\alpha$ 1-3Gal as an innate immune mechanism to prevent cross-species transmission of a gammaherpesvirus to humans. The present study also raises questions that must be addressed when considering the development of BoHV-4 recombinants as viro-oncolytic vectors.

## Acknowledgements

B. Machiels and L. Gillet are Research Fellow and Postdoctoral Researcher of the “Fonds National belge de la Recherche

Scientifique” (FNRS), respectively. This work was supported by grants of the FNRS (grants «2.4583.03» and «2.4608.06»). The authors are grateful to Dr J.D. Lambris (University of Pennsylvania, USA) for providing compstatin.

## References

- [1] W. Zimmermann, H. Broll, B. Ehlers, H.J. Buhk, A. Rosenthal, M. Goltz, Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication, *J. Virol.* 75 (2001) 1186–1194.
- [2] L. Egyed, Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 2109–2111.
- [3] G. Donofrio, S. Cavirani, T. Simone, V.L. van Santen, Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector, *J. Virol. Methods.* 101 (2002) 49–61.
- [4] L. Gillet, F. Minner, B. Detry, F. Farnir, L. Willems, M. Lambot, E. Thiry, P.P. Pastoret, F. Schynts, A. Vanderplasschen, Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis, *J. Virol.* 78 (2004) 2336–2347.
- [5] R.D. Hunt, L.V. Melendez, F.G. Garcia, B.F. Trum, Pathologic features of Herpesvirus ateles lymphoma in cotton-topped marmosets (*Saguinus oedipus*), *J. Natl. Cancer. Inst.* 49 (1972) 1631–1639.
- [6] H. Fickenscher, B. Fleckenstein, Herpesvirus saimiri, *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 356 (2001) 545–567.
- [7] M. Bublot, J. Dubuisson, M.F. Van Bresse, S. Danyi, P.P. Pastoret, E. Thiry, Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4, *J. Gen. Virol.* 72 (1991) 715–719.
- [8] D.M. Asher, Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies, *Dev. Biol. Stand.* 99 (1999) 41–44.
- [9] G. Donofrio, C.F. Flammini, F. Scatozza, S. Cavirani, Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 4668–4671.
- [10] G.J. Wellenberg, E.R. Verstraten, S. Belak, S.B. Verschuren, F.A. Rijsewijk, R. Peshev, J.T. Van Oirschot, Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk, *J. Virol. Methods.* 97 (2001) 101–112.
- [11] C. Bona, B. Dewals, L. Wiggers, K. Coudijzer, A. Vanderplasschen, L. Gillet, Short communication: pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity, *J. Dairy. Sci.* 88 (2005) 3079–3083.
- [12] N. Markine-Goriaynoff, F. Minner, K. De Fays, L. Gillet, E. Thiry, P.P. Pastoret, A. Vanderplasschen, Bovine herpesvirus 4, *Ann. Med. Vet.* 147 (2003) 215–247.
- [13] L. Gillet, B. Dewals, F. Farnir, L. de Leval, A. Vanderplasschen, Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines in vitro and in vivo, *Cancer. Res.* 65 (2005) 9463–9472.
- [14] H.W. Favoreel, G.R. Van de Walle, H.J. Nauwincx, M.B. Pensaert, Virus complement evasion strategies, *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 1–15.
- [15] R.M. Welsh Jr., N.R. Cooper, F.C. Jensen, M.B. Oldstone, Human serum lyses RNA tumour viruses, *Nature* 257 (1975) 612–614.
- [16] U. Galili, M.R. Clark, S.B. Shohet, J. Buehler, B.A. Macher, Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 1369–1373.
- [17] K. Teranishi, R. Manez, M. Awwad, D.K. Cooper, Anti-Gal alpha 1-3Gal IgM and IgG antibody levels in sera of humans and old world non-human primates, *Xenotransplantation* 9 (2002) 148–154.
- [18] R.M. Welsh, C.L. O'Donnell, D.J. Reed, R.P. Rother, Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses, *J. Virol.* 72 (1998) 4650–4656.

- [19] S. Hayashi, Y. Takashima, H. Otsuka, Pseudorabies virus propagated in rabbit kidney-derived RK13 cells is neutralized by natural IgM antibodies in normal swine serum which specifically lyse host cells, *J. Vet. Med. Sci.* 67 (2005) 229–234.
- [20] J.P. Jayasekera, E.A. Moseman, M.C. Carroll, Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity, *J. Virol.* 81 (2007) 3487–3494.
- [21] G. Quinn, J.C. Wood, D.J. Ryan, K.M. Suling, K.M. Moran, D.L. Kolber-Simonds, J.L. Greenstein, H.J. Schuurman, R.J. Hawley, C. Patience, Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of galactose alpha-1-3 galactose-deficient pig cells, *J. Virol.* 78 (2004) 5805–5811.
- [22] Y. Takeuchi, S.H. Liang, P.D. Bieniasz, U. Jager, C.D. Porter, T. Friedman, M.O. McClure, R.A. Weiss, Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl (alpha1-3) galactosylation, *J. Virol.* 71 (1997) 6174–6178.
- [23] H. Schroeder, V. Daix, L. Gillet, J.C. Renauld, A. Vanderplasschen, The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species, *Microbes. Infect.* 9 (2007) 247–250.
- [24] V. Daix, H. Schroeder, N. Praet, J.P. Georgin, I. Chiappino, L. Gillet, K. de Fays, Y. Decrem, G. Leboulle, E. Godfroid, A. Bollen, P.P. Pastoret, L. Gern, P.M. Sharp, A. Vanderplasschen, *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins, *Insect. Mol. Biol.* (2007).
- [25] B. Dewals, L. Gillet, T. Gerdes, E.L. Taracha, E. Thiry, A. Vanderplasschen, Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa, *Vet. Microbiol.* 110 (2005) 209–220.
- [26] D.R. Shaw, M.W. Shaw, S.E. Hickman, E.W. Lamon, F.M. Griffin Jr., Sodium azide inhibition of complement-mediated functions, *Immunology* 39 (1980) 53–56.
- [27] A. Vanderplasschen, E. Mathew, M. Hollinshead, R.B. Sim, G.L. Smith, Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 7544–7549.
- [28] A. Vanderplasschen, M. Bublot, J. Dubuisson, P.P. Pastoret, E. Thiry, Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface, *Virology* 196 (1993) 232–240.
- [29] R.M. Hamadeh, U. Galili, P. Zhou, J.M. Griffiss, Anti-alpha-galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2 (1995) 125–131.
- [30] U. Abdel-Motal, S. Wang, S. Lu, K. Wigglesworth, U. Galili, Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R epitopes, *J. Virol.* 80 (2006) 6943–6951.

## *Annexe*

Les résultats obtenus au cours de cette dernière étude ont démontré la neutralisation du BoHV-4 par le sérum humain. Le mécanisme de cette neutralisation dépend du complément et repose sur l'activation de la voie classique, par le biais d'Ac naturels reconnaissant l'épitope gal. Cet épitope gal, exposé en surface du virion, est acquis aux dépens de la cellule hôte suite à l'activité de l'enzyme galactosyltransférase.

Alors que des articles ont décrit ce phénomène pour plusieurs virus tels que le virus de la maladie d'Aujeszky, le rétrovirus porcin endogène, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (Hayashi *et al.*, 2004; McKane *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 1997; Welsh *et al.*, 1998), cette étude est la première à rapporter ce processus pour un membre de la sous-famille des *gammaherpesvirinae*. Ainsi, la neutralisation du BoHV-4 et de plusieurs autres virus enveloppés, par les Ac anti-gal et par le complément, pourrait jouer un rôle de barrière naturelle et prévenir les infections croisées, de plusieurs espèces animales à l'homme.

Nous avons déterminé au cours de cette étude que le BoHV-4 présentait massivement l'épitope gal à sa surface. Ce résidu carbohydrate peut être porté par des O et N-glycans (Blanken & Van den Eijnden, 1985; Stults *et al.*, 1999; Thibaudeau *et al.*, 1996). Etant donné que gp180 représente potentiellement la protéine la plus glycosylée de l'enveloppe virale, nous avons posé l'hypothèse que cette protéine pouvait constituer le support majeur pour l'exposition des épitopes gal. Aussi, pour adresser cette question, nous avons reproduit les expériences de transcomplémentation de sérum de cheval par des Ac anti-gal, en comparant cette fois, la sensibilité des virions WT, Bo10 Del, Rev et Bo10 STOP, à la neutralisation. Lors de cette expérience, des quantités croissantes d'Ac monoclonaux anti-gal (M86) ont été ajoutées au sérum de cheval (10%, vol/vol) pour incuber les différentes souches virales dérivées de cellules MDBK. L'infektivité des virions, après neutralisation, a été évaluée par titrage sur cellules MDBK.

Les résultats de cette expérience ont démontré une plus grande résistance des virus délétés pour le gène Bo10 à la neutralisation. En effet, alors que les souches sauvage et révertante sont neutralisées par le sérum de cheval et les Ac anti-gal de manière dose-dépendante, les virus Bo10 Del et Bo10 STOP sont seulement légèrement affectés (Figure annexe). Cette différence de sensibilité à la neutralisation par les Ac anti-gal suggère que gp180 est un support majeur pour l'exposition des épitopes gal.

Outre l'intérêt fondamental de cette information, la mise en évidence que gp180 porte des épitopes gal ouvre de nouvelles perspectives pour des stratégies anti-virales originales. Ainsi, le bouclier de O-glycans présenté par les gammaherpèsvirus pourrait potentiellement être la cible de la neutralisation par des Ac spécifiques de résidus carbohydrates, tels que les épitopes gal. Le caractère

neutralisant de certains Ac dirigés contre des motifs sucrés a déjà été démontré pour d'autres modèles (Balzarini, 2007). Par exemple, chez l'homme, l'Ac monoclonal 2G12 neutralise le HIV (Doores *et al.*, ; Doores *et al.*, 2010b; Doores *et al.*, ; Scanlan *et al.*, 2002). Cet Ac reconnaît un épitope sur la glycoprotéine gp120 dont l'existence est directement dépendante de la présence des résidus mannoses qui l'encadrent (Scanlan *et al.*, 2002). Par ailleurs, une autre étude a analysé le profil des N-glycans de gp120 et a identifié un oligomannose terminal immunogène (Man6-9GlcNAc2) largement conservé au sein de différents isolats du HIV. Ce résidu a dès lors été proposé comme cible vaccinale potentielle contre ce virus (Doores *et al.*, 2010a).

En conclusion, alors que le bouclier de glycans représente un avantage sélectif pour différents virus chez l'hôte naturel, il peut aussi constituer le talon d'Achille de ces agents (Balzarini, 2007). En effet les glycans eux-mêmes pourraient devenir la cible de la neutralisation par les Ac, au cours d'infections accidentelles de l'homme ou encore, au cours de stratégies vaccinales spécifiques. Dans ce cadre, utiliser un vaccin combinant des carbohydrates spécifiques et des virus recombinants incapables de former le bouclier de glycans, pourrait être particulièrement intéressant pour stimuler une réponse immune performante à long terme. En effet, la production d'Ac à l'encontre du bouclier de glycans pourrait forcer le virus à modifier celui-ci. Cette sélection négative vis-à-vis des glycans protecteurs aurait alors comme conséquence, une exposition des épitopes vulnérables et donc un meilleur accès pour les Ac neutralisants. Le recours à des virus recombinants, présentant de manière dégagée ces mêmes épitopes vulnérables, stimulerait la mise en place d'une réponse humorale neutralisante à leur rencontre.

## *Préambule*

Le cycle biologique des herpèsvirus est excessivement complexe puisque ces virus se montrent capables d'établir une infection soit latente soit répliquative dans des cellules aussi différentes que les lymphocytes, les cellules épithéliales ou les fibroblastes. Ce tropisme élargi s'accompagne de mécanismes d'entrée particulièrement élaborés. Ainsi, à l'inverse de la plupart des autres virus enveloppés, les herpèsvirus utilisent plusieurs glycoprotéines lors des processus d'attachement à la cellule cible et de fusion avec une membrane de celle-ci. Chez les gammaherpèsvirus en particulier, des protéines additionnelles s'ajoutent au complexe conservé, constitué par les glycoprotéines gB, gH et gL. Ces glycoprotéines accessoires semblent jouer un rôle crucial dans l'orientation du tropisme des gammaherpèsvirus. Chez l'EBV par exemple, le virus exploite deux types de mécanisme pour orienter son tropisme : la présence ou l'absence d'un récepteur spécifique au niveau des cellules cibles ou bien la présence ou l'absence d'une glycoprotéine spécifique au niveau de l'enveloppe virale. Ainsi, la glycoprotéine gp350 est toujours incorporée dans l'enveloppe virale mais elle n'assure l'attachement de l'EBV qu'au niveau des lymphocytes B, présentant spécifiquement le récepteur CD21. De manière différente, la glycoprotéine gp42 s'attache aux cellules exposant le récepteur HLA de classe II mais elle n'est présente que de manière inconstante au niveau de l'enveloppe de l'EBV. Cette présence alternative de gp42 permet au virus de switcher d'un type cellulaire à l'autre. Alors que la fusion au niveau des lymphocytes B repose sur l'interaction entre gp42 et HLA, l'absence de gp42 favorise l'entrée au niveau des cellules épithéliales (Hutt-Fletcher, 2007). La régulation du tropisme des rhadinovirus est moins claire puisque, s'ils présentent tous un homologue de gp350 au niveau de leur enveloppe, ils ne possèdent pas d'homologue de gp42.

Au cours des études précédentes, nous avons étudié les fonctions de la protéine gp180 du BoHV-4, représentant l'homologue positionnel de gp350 de l'EBV. Cette protéine dérive d'un transcrit épissé du gène Bo10 et oriente le tropisme du virus par interaction avec les GAGs de la surface cellulaire. La caractérisation du profil de transcription du gène K8.1 du KSHV a mis en évidence l'existence d'un phénomène d'épissage alternatif. Chez ce virus, plusieurs sites donneurs d'épissage sont à l'origine de trois transcrits différents. Les rôles de ces transcrits au cours de l'infection sont potentiellement distincts et n'ont pas encore été identifiés avec précision. La présence d'un épissage alternatif potentiel chez plusieurs rhadinovirus suggère que ce mécanisme d'expression pourrait avoir une fonction conservée au sein de ce genre. Aussi, cette troisième étude a pour objectif de caractériser plus en détails, la transcription du gène Bo10 du BoHV-4.

---

## 3.4.

**L'épissage alternatif permet à un gammaherpèsvirus d'orienter son tropisme**

*« Alternative splicing switches tropism of a gammaherpesvirus »*

---

*In preparation*

Machiels B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A., Gillet L.



## *Abstract*

Herpesviruses have complex lifecycles that involve infection of various cell types. Interestingly, some of them are able to route infection by the use of different cellular receptors and different viral glycoprotein complexes. Thus, Epstein-Barr virus appears to use gp42 – Human leukocyte antigen class II interaction as a switch of cell tropism. Rhadinoviruses do not encode any gp42 homolog. In this study, we showed that Bovine Herpesvirus 4, a rhadinovirus closely related to Kaposi's Sarcoma associated herpesvirus (KSHV), could orientate tropism of progeny virions by using alternative splicing of its Bo10 gene. As a similar gene organization is observed in the KSHV K8.1 homologous gene, we hypothesized that this mechanism could be conserved in different rhadinoviruses.

## *Introduction*

Gammaherpesviruses are ubiquitous pathogens in human and animal populations all over the world. The best studied gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus (EBV) and the Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV), infect respectively some 90% [1] and 30% [2] of human populations. Primary infections by these viruses are most of the time subclinical; however, long-term carriage of these viruses can be associated with the development of various malignancies [3,4] such as Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, primary effusion lymphoma or Kaposi's Sarcoma. The variety of these pathologies reflects the different tropisms of these viruses. Understanding their entry mechanisms in different cell types is therefore essential.

Attachment to and penetration into the host cells are two distinct events in herpesviruses [5]. As enveloped viruses, gammaherpesviruses enter cells by fusion of their envelope with a cell membrane. While the precise mechanism of action is still unclear, the core fusion machinery is closely conserved and made of gB, gH and gL [6], although gL can be non essential [7]. On the opposite, the glycoproteins that mediate attachment and trigger fusion differ between viral species but also for a same virus between the target cells. Indeed, EBV infects predominantly epithelial cells or B lymphocytes [8]. Gp350/220 is the most abundant protein of EBV envelope and is responsible for the attachment of the virus with high affinity to B cells [9]. On the opposite, gp350 deleted viruses are more infectious for epithelial cells and gp350-specific antibodies enhance epithelial cells infection [10]. Besides gp350, gp42 can function as a switch of EBV tropism. Gp42 binds to human leukocyte antigen (HLA) class II [11]. EBV makes both three-part gH/gL/gp42 complexes and two-part gH/gL complexes [12]. While fusion with a B cell is triggered by interaction between gp42 and HLA class II, entry into epithelial cells requires complexes without gp42. Interestingly, HLA class II expression in the virus producing cells alters the ratio of three-part to two-part complexes. Therefore, virus produced in epithelial cells is more infectious for B cells whereas B-cell-derived virus better infects epithelial cells [13]. This switch in tropism presumably favors the movement between epithelial cells and B cells during the cycle of persistence [14].

The mechanisms that regulate cell tropism are less clear for KSHV and other rhadinoviruses such as Murid herpesvirus 4 (MuHV-4) or bovine herpesvirus 4 (BoHV-4). However, while these viruses do not have any gp42 homolog, they all encode a virion glycoprotein positionally homologous to gp350. These proteins are K8.1A encoded by K8.1 in KSHV [15], gp150 encoded by MuHV-4 M7 and gp180 encoded by BoHV-4 Bo10. Similarly to gp350, these proteins are involved in binding to some receptors on target cells [16,17,18]. Indeed, K8.1A, gp150 and gp180 interact with glycosaminoglycans (GAGs). Moreover, these proteins seem to block infection of cells that do not express this receptor [16,17]. It has therefore been proposed that these proteins could regulate viral tropism both positively and negatively in function of the presence or the absence of their receptor.

While this putative model explains GAG<sup>+</sup> cells infection, it does not encompass infection of GAG<sup>-</sup> cells such as B cells or monocytes. How do rhadinoviruses infect these cells remains therefore controversial.

In this study, we showed that BoHV-4 Bo10 gene encodes two different mRNA through alternative splicing. While mutant viruses expressing only the spliced message behave as WT virus, viruses unable to splice Bo10 mRNA infect GAG<sup>-</sup> cells similarly to Bo10 knockout mutants. We therefore propose that BoHV-4 could modify its tropism by regulating Bo10 mRNA splicing.

## *Material and Methods*

**Antibodies.** The rabbit monospecific polyserum raised against the C-term end of the Bo10 encoded transmembrane protein (anti-Bo10-c15) has been described previously [17].

**Cells.** Madin-Darby bovine kidney (MDBK) (ATCC CCL-22), CHO-K1 (ATCC CCL-61) and the GAG-deficient mutant CHO-K1-pgs-A745 (ATCC CRL-2242) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle Medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) and 1% non Essential amino acids (Invitrogen). Rabbit Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared as described elsewhere [19]. Briefly, PBMC were isolated from 5-ml of blood collected from the ear central artery. Mononuclear cell suspensions were prepared with Ficoll-Paque Premium density gradient media (GE Healthcare). Cell suspension in sterile PBS was overlaid onto 5-ml Ficoll-Paque density cushion and centrifuged ( $1825\times g$ ) during 20-min at room-temperature. Mononuclear cells at the interface were collected and washed twice in ice-cold PBS before further analysis. PBMC were cultured in RPMI Glutamax Medium containing 10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 1% Essential amino acids (Invitrogen), 1 mM Sodium pyruvate, 25 mM HEPES and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol.

**Viruses.** The BoHV-4 V. test strain has been initially isolated from a case of orchitis [20]. Bo10 Del, Bo10 Stop and the corresponding revertant strains have been described previously [17,21]. The other viruses were derived from a cloned BoHV-4 BAC [22]. We modified the BoHV-4 V. test Bo10 coding sequence (genomic coordinates 65844 to 66743) either by introducing a point mutation in the splicing donor site (Bo10 MuDir strain) or by replacing the entire Bo10 ORF by a sequence devoid of the intron (Bo10 Spliced strain). Mutagenesis of wild-type V. test BAC G plasmid [22] was performed by a two-step mutagenesis procedure in bacteria using the shuttle plasmid pST76KSR [22]. Plasmids used to induce homologous recombination were constructed as follows. For the Bo10 MuDir strain, we first PCR-amplified (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen) coordinates 65331–67427 of the BoHV-4 V. test genome, including SacI and XmaI restriction sites in the respective forward and reverse primers, and T/A cloned the PCR product into the pGEM-T Easy vector (Promega Corporation) resulting in pGEM-T Easy Bo10 zone Rec plasmid. Next, the Bo10 splicing donor site was mutated by site directed mutagenesis (Quick change site directed mutagenesis, Stratagene) resulting in pGEM-T Easy Bo10 zone Rec MuDir plasmid. For the Bo10 Spliced strain, cDNA was prepared from WT BoHV-4 infected MDBK cells and Bo10 specific sequences were amplified with Bo10 specific primers (Bo10 23-43 5'-TCATACATTCAAATTGCATGC-3' and Bo10 839-818 5'-CATTGAATGAGAACAAACACG-3'). The lower 740bp band was then BstBI/HpaI-restricted and cloned into the corresponding sites of the pGEM-T Easy Bo10 zone Rec plasmid resulting in pGEM-T Easy Bo10 zone Rec Spliced plasmid. Each construct was then subcloned as a

SacI/XmaI fragment into the same sites of the pST76K-SR shuttle vector, and recombined into the BoHV-4 BAC [22]. The correct construction of each mutant was confirmed by DNA sequencing. We also isolated by the same way revertants of the Bo10 MuDir and Bo10 Spliced BACs in which the Bo10 locus was restored to its wild-type form. Reconstitution of infectious virus from BAC plasmids was obtained by transfection in MDBK cells. To excise the BAC cassette, reconstituted viruses were propagated in EBL-NLS-Cre cells expressing Cre recombinase to generate the corresponding excised strain [22].

**RT-PCR.** Subconfluent monolayers of MDBK cells were infected with BoHV-4 strains at a m.o.i. of 1 PFU/cell. 24 hours after infection (p.i.), cytoplasmic RNA was isolated by using RNeasy mini kit (Qiagen). Contaminating DNA was removed by DNase treatment. cDNA was produced by using First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) with poly d(T) primer. The cDNA products were amplified by PCR with *Taq* polymerase (New England Biolabs), and specific primers pairs. Bo10 23-43 (5'-TCATACATTCAAATTGCATGC-3') and Bo10 839-818 (5'-CATTGAATGAGAACAACACG-3') were used to amplify both transcripts. Bo10 PBDF (5'-ATGAGGTTAAGAGTCAGATC-3') and Bo10 IntronRev (5'-ACCATTTAGTCAAATTCCACAC-3') or Bo10 SplicedOnlyRev (5'-GGATGTCTGTGTGCCTGAG-3') were used to amplify unspliced and spliced Bo10 mRNA respectively.

**Southern blot.** Southern blot analysis of viral DNA digested with *Bam*HI was performed with a probe corresponding to nucleotides 65900-66370 of the BoHV-4 V. test strain genome (coding for Bo10 Exon 1).

**Virus purification.** BoHV-4 strains grown on MDBK cells were purified as follows. Virions were harvested from infected MDBK cell supernatants by ultracentrifugation (100,000 x g, 2 h); infected-cell debris were then removed by low-speed centrifugation (1,000 x g, 10 min). Virions were then centrifuged through a 20 to 50 % (w/v) potassium tartrate gradient in PBS (100,000 x g, 2 h). Virions were recovered from the gradient and finally washed and concentrated in PBS (100,000 x g, 2 h).

**Western Blot.** Purified virions were lysed and denatured by heating (95°C, 5 min) in SDS-PAGE sample buffer (31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 12.5% (w/v) glycerol, 0.005% (w/v) Bromophenol Blue, 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol). Proteins were resolved by electrophoresis on Mini-PROTEAN TGX (Tris-Glycine eXtended) precast 7.5% resolving gels (Bio-Rad) in SDS-PAGE running buffer (25mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P transfer membrane, 0.45 µm pore size, Millipore). The membranes were blocked with 3% non-fat milk in PBS/0.1% Tween-20, and then incubated with anti-Bo10-c15 rabbit antibodies in the same buffer. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG pAb (Dako Corporation), followed by

washing in PBS/0.1% Tween-20, development with ECL substrate (GEHealthcare) and exposure to X-ray film.

**Growth curves.** The growth kinetics of mutant and revertant viruses were compared to those of WT. Cell cultures were infected at a multiplicity of 0.01 (multi-step assay). After 1 h of adsorption, the cells were washed then overlaid with MEM containing 5% FCS. Supernatants of infected cultures and infected cells were harvested at successive intervals and the amount of infectious virus was determined by plaque assay on MDBK cells [22].

**Indirect immunofluorescent staining of adherent cells.** Cells were fixed in PBS containing 4 % (w/v) paraformaldehyde (Merck) for 10 min on ice and then for 20 min at 20°C. After washing with PBS, samples were permeabilized in PBS containing 0.1 % (w/v) saponin (Sigma) at 37°C for 10 min. Immunofluorescent staining (incubation and washes) was performed in PBS containing 10 % FCS (v/v) and 0.1 % (w/v) saponin. Samples were incubated at 37°C for 45 min with mouse mAb 35 raised against BoHV-4 gB. After three washes, samples were incubated at 37°C for 30 min with Alexa Fluor 568 goat anti-mouse (GAM) IgG (2 µg/ml; Invitrogen). Fluorescence was then visualized with a TE 2000-S Nikon microscope and a Leica DC300F CCD camera system.

**Immunostainings of mononuclear cells.** Washes and incubation steps were performed in FACS buffer (PBS pH7.4, 0.1% BSA, 0.05%NaN<sub>3</sub>). Cells were incubated with Pacific Blue-conjugated anti-human CD14 (BD) on ice for 40-min. Cells were washed and incubated in 7-AAD before flow cytometry analysis to exclude dead cells

**Flow cytometry.** Cells exposed to eGFP<sup>+</sup> viruses were washed in PBS and analyzed directly for green channel fluorescence [7]. Cells were analyzed on a FACSAria (Becton Dickinson).

## Results

**Bo10 mRNA undergoes alternative splicing.** Initial DNA sequence analysis of BoHV-4 genome identified an ORF between ORF50 and ORF52 that was made of two exons [23]. With respect to its relative position in the genome, Bo10 is therefore similar to K8.1 of KSHV [15] and gp220/350 of EBV [24]. These genes encode transmembrane glycoproteins that have been shown to be translated from a spliced message. Recently, we demonstrated similarly that Bo10 mRNA splicing removes 77 nucleotides and generates a mRNA encoding a 273 aa protein with a signal sequence and membrane anchor [17]. However, sequence analysis revealed the presence of an in-frame Stop codon inside the Bo10 intron (Fig. 1A) that could generate a protein (Fig. 1B) similar to the potential expression product of the K8.1  $\gamma$  message [15]. To verify the transcription of this unspliced Bo10 message during BoHV-4 cycle we used RT-PCR with different pairs of primers (Fig. 1C) on cDNA from BoHV-4 infected MDBK cells. Primers spanning the putative intron revealed the existence of two different Bo10 messages. As previously described, the major 739 bp PCR product (Fig. 1C) corresponded to the expected size of the spliced mRNA. However, although weaker, an unspliced PCR product (817 bp) was also detectable (Fig. 1C). RT-PCR with primer pairs specific for either the spliced or the unspliced sequence confirmed the existence of both Bo10 messenger RNAs (Fig. 1C). None of the fragments could be amplified without prior reverse transcription (data not shown) and DNA sequencing confirmed the identity of the different PCR products (data not shown). Altogether, these results show that BoHV-4 Bo10 gene undergoes alternative splicing.

**Generation of the Bo10 MuDir and Spliced BoHV-4 mutant.** We previously described two BoHV-4 Bo10 knockout strains [17,25]. To unravel the function of both the spliced and the unspliced Bo10 expression products, we generated two additional Bo10 mutant viruses. In the Bo10 MuDir mutant we punctually mutated the Bo10 splicing donor site (T to G) to only express the unspliced form. On the opposite, the Bo10 Spliced strain only expresses the Bo10 spliced product of expression (Fig. 2A). Southern blots of viral DNA (Fig. 2B) confirmed the expected genomic structures of the two mutants, plus revertants of these both strains. The expected mutations were further confirmed by DNA sequencing (data not shown). As expected, RT-PCR analysis showed that the Bo10 MuDir and the Bo10 Spliced strains express either the unspliced or the spliced messenger RNA (Fig. 2C). Finally, immunoblotting with an anti-Bo10-c15 rabbit polyserum confirmed that only the Bo10 MuDir mutant virions lacked gp180 (Fig. 2D).

**Effect of Bo10 mRNA splicing on BoHV-4 replication *in vitro*.** We previously showed that the Bo10 knockout strains display a growth deficit associated with reduced binding to epithelial cells. We interpreted this phenotype as being a consequence of the absence of the gp180 glycoprotein that is

encoded by the Bo10 spliced message. However, as the Bo10 gene encodes two different transcripts, this growth deficit could also be associated with the absence of the unspliced Bo10 message. To address this question, multi-steps growth assays were performed on MDBK cells with the different Bo10 mutants. Interestingly, only the Bo10 MuDir virus grew to lower titers than the WT BAC parental strain (Fig. 3).

**Enhanced infection of GAG-deficient cells by the BoHV-4 Bo10 MuDir strain.** With the Bo10 knockout strains, we interpreted the growth deficit as a consequence of reduced binding to GAG. We therefore compared further the GAG dependence of the different Bo10 mutant strains by infecting CHO-K1 fibroblasts competent or not for GAG expression (Fig. 4). All strains infected GAG+ cells similarly. In contrast, the Bo10 MuDir strain entered CHO GAG- cells better than the other strains. Similar results were obtained either with PBS (Fig. 4A) or acid wash (Fig. 4B). Moreover, Bo10 MuDir virions remained sensitive to acid wash indicating that the better infection of CHO GAG- cells by Bo10 MuDir virions appeared to reflect better cell binding rather than better penetration.

*In vivo*, BoHV-4 infects monocytes, which are however relatively GAG deficient [26]. We therefore compared capacity of the different viruses to infect rabbit PBMC *ex vivo*. While all the other strains infected rabbit CD14+ cells very poorly, Bo10 MuDir viruses infected them much better (Fig. 5).



## *Discussion*

Herpesviruses display a complex lifecycles. Indeed, they can engender either a latent or a lytic infection at the level of a single cell. The precise mechanisms by which herpesviruses establish latent infection are still poorly understood. However, induction of one or the other infection program is often regulated by environmental factors among which the nature of the infected cell. Most of herpesviruses have a broad cell tropism as they infect a variety of host cells including lymphocytes, epithelial cells or fibroblasts. Interaction with cell surface receptors probably allows herpesviruses to manipulate the host cell's preexisting signaling pathway in order to create an environment that is conducive to either lytic or latent infection [27]. The use of different receptor binding proteins to mediate entry into different cell types and the use of different entry pathways are common features of herpesvirus entry [6]. They have even developed strategies that may route infection *in vivo*. Thus, EBV appears to use gp42 as a switch of cell tropism [13]. Epithelial cells produce virions high in gH/gL/gp42 complexes, which promote B-cell infection. On the opposite, B cells produce viruses low in gp42 which efficiently infect epithelial cells but not B cells. Interestingly, other herpesviruses, such as HCMV [28] and HHV-6 [29], also encode additional glycoproteins that redirect cell tropism by forming stable complexes with gH/gL [6]. No such mechanism is known for rhadinoviruses.

In this study, we showed that splicing of the BoHV-4 Bo10 gene, that encodes its gp350 homolog, orientates viral tropism. Thus, besides the Bo10 spliced message, that encodes the gp180 glycoprotein, an unspliced Bo10 mRNA is transcribed during BoHV-4 cycle. Viral strains expressing one or the other transcript showed different infectivity patterns in GAG<sup>+</sup> and GAG<sup>-</sup> cells. This was associated with gp180 expression as Bo10 MuDir virions that are unable to express this glycoprotein were both less infectious for MDBK GAG<sup>+</sup> cells than the wild-type and more infectious for GAG<sup>-</sup> cells. On the opposite, Bo10 Spliced virions that are unable to express the unspliced Bo10 message behaved similarly to wild-type. Interestingly, this mechanism could be conserved in other rhadinoviruses such as KSHV. In KSHV, the gp180 homolog is encoded by K8.1. As observed for BoHV-4 Bo10, K8.1 displays several alternative spliced forms [15]. Two proteins, K8.1A and B, are generated from spliced message and encode transmembrane glycoproteins that bind to cell surface heparan sulfate [18,30] and are thought to be involved in initial steps of virion attachment. K8.1 encodes also a third unspliced transcript, K8.1 $\gamma$  [15], which could code for a soluble form of K8.1 as the predicted protein would lack a transmembrane anchor. By regulating splicing of these genes, BoHV-4 and KSHV could therefore orientate their tropism. This regulation could be orchestrated by the viral ORF57 protein as it has recently been shown that this protein functions as a viral splicing factor [31] and is essential for K8.1A expression [32].

A central question about this mechanism is why BoHV-4 uses alternative splicing of Bo10 gene instead of expressing gp180 from an unspliced message that would be turned on or off. One of

the reasons could be that the unspliced Bo10 message has its own function. Indeed, the soluble protein potentially encoded by an unspliced Bo10 mRNA could have different roles. Firstly, as previously hypothesized, this study suggests that BoHV-4 gp180 binds to cell surface GAGs. During infection, the potential soluble form of gp180 could coat the infected cell surface and therefore promote release of progeny virions. Secondly, this form may serve as a decoy for adsorbing neutralizing antibodies as proposed for the secreted form of EBOLA virus glycoprotein [33]. Finally, we recently showed that Bo10 expression provides part of a glycan shield for otherwise vulnerable viral epitopes on other viral glycoproteins [25]. We linked this property to gp180 expression. However, this function could be shared by its putative soluble form. This would be particularly interesting for the virus as it would allow regulation of cell tropism without exposing virions to neutralization.

Altogether, our results show that splicing of the BoHV-4 Bo10 gene orientates viral tropism. In the future unraveling the function of the putative protein encoded by a Bo10 unspliced mRNA should help us to better understand rhadinoviruses lifecycle.

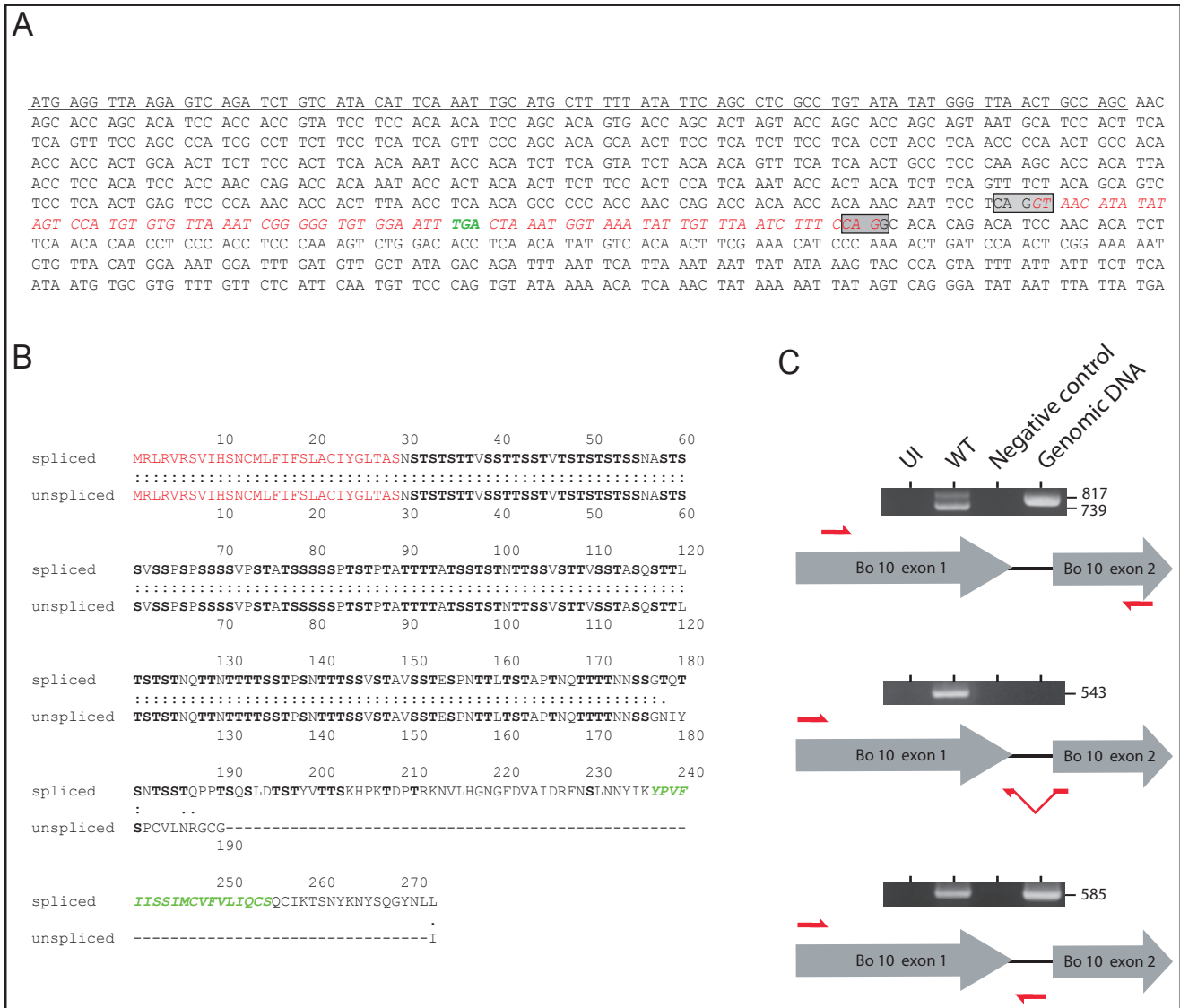
## *Acknowledgments*

B.M. and L.G. are Research Fellow and Research Associate of the “Fonds de la Recherche Scientifique - Fonds National Belge de la Recherche Scientifique” (F.R.S. - FNRS), respectively. P. G. S. is a Wellcome Trust Senior Clinical Fellow (GR076956MA). This work was supported by the following grants: starting grant (D-09/11) and GLYVIR ARC of the University of Liège and scientific impulse grant of the F.R.S. – FNRS n° F.4510.10.

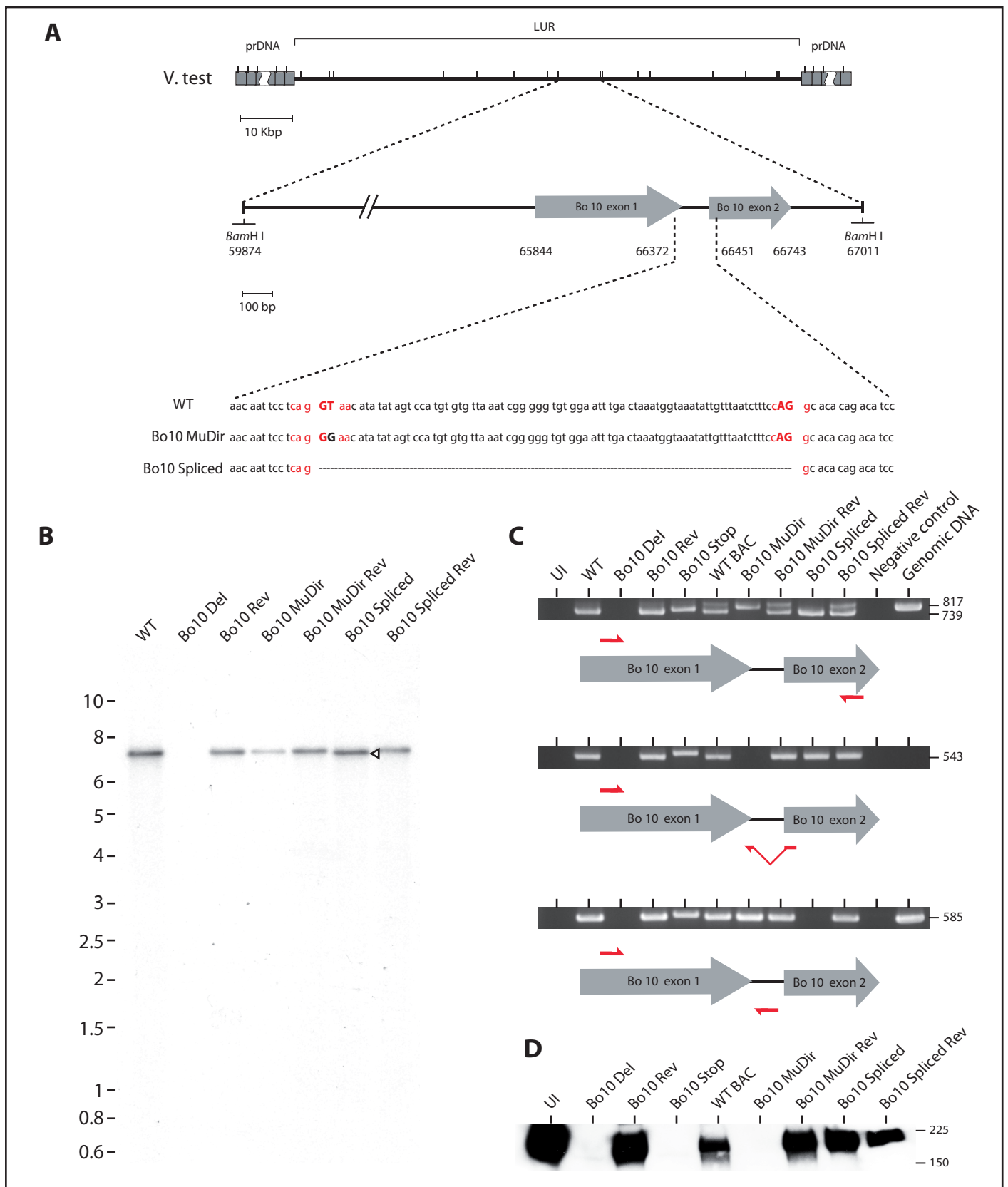
## References

1. Henle G, Henle W, Clifford P, Diehl V, Kafuko GW, et al. (1969) Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 43: 1147-1157.
2. Verma SC, Robertson ES (2003) Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett* 222: 155-163.
3. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-768.
4. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C (2010) Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* 10: 707-719.
5. Heldwein EE, Krummenacher C (2008) Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 1653-1668.
6. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* 9: 369-381.
7. Gillet L, May JS, Colaco S, Stevenson PG (2007) Glycoprotein L disruption reveals two functional forms of the murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein H. *J Virol* 81: 280-291.
8. Hutt-Fletcher LM (2007) Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 81: 7825-7832.
9. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50: 203-213.
10. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7065-7070.
11. Spriggs MK, Armitage RJ, Comeau MR, Strockbine L, Farrah T, et al. (1996) The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J Virol* 70: 5557-5563.
12. Wang X, Kenyon WJ, Li Q, Mullberg J, Hutt-Fletcher LM (1998) Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* 72: 5552-5558.
13. Borza CM, Hutt-Fletcher LM (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 8: 594-599.
14. Hutt-Fletcher LM, Chesnokova LS (2010) Integrins as triggers of Epstein-Barr virus fusion and epithelial cell infection. *Virulence* 1: 395-398.
15. Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, et al. (1998) The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol* 72: 6725-6731.
16. de Lima BD, May JS, Stevenson PG (2004) Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *J Virol* 78: 5103-5112.
17. Machiels B, Lete C, de Fays K, Mast J, Dewals B, et al. (2011) The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *J Virol* 85: 1011-1024.
18. Wang FZ, Akula SM, Pramod NP, Zeng L, Chandran B (2001) Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J Virol* 75: 7517-7527.
19. Gillet L, Schroeder H, Mast J, Thirion M, Renauld JC, et al. (2009) Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Vet Res* 40: 51.
20. Thiry E, Pastoret PP, Dessy-Doizé C, Hanzen C, Calberg-Bacq CM (1981) Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet rec* 108: 426.
21. Machiels B, Lete C, Guillaume A, Mast J, Dewals B, et al. (2011) Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield. *Plos pathogens* submitted for publication.
22. Gillet L, Daix V, Donofrio G, Wagner M, Koszinowski UH, et al. (2005) Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol* 86: 907-917.

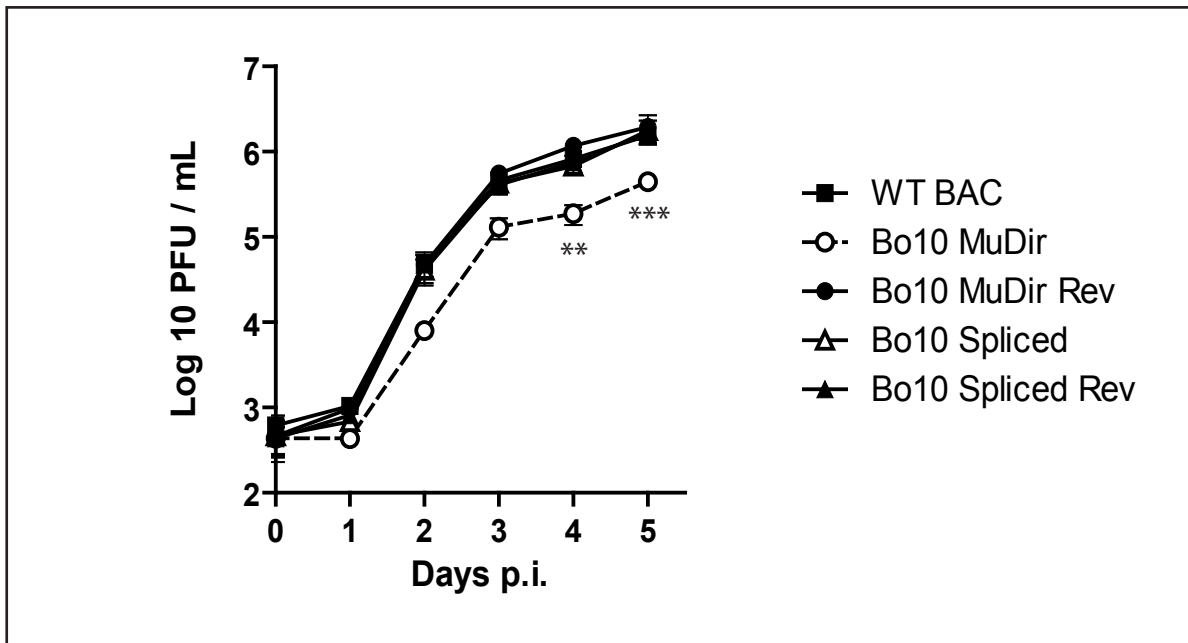
23. Zimmermann W, Broll H, Ehlers B, Buhk HJ, Rosenthal A, et al. (2001) Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol* 75: 1186-1194.
24. Thorley-Lawson DA, Poodry CA (1982) Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J Virol* 43: 730-736.
25. Machiels B, Lete C, Guillaume A, Mast J, Stevenson PG, et al. (Submitted for publication) The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects.
26. Kolset SO (1987) Proteoglycans in normal and neoplastic monocytes. *Exp Cell Res* 168: 318-324.
27. Chandran B (2010) Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *J Virol* 84: 2188-2199.
28. Scrivano L, Sinzger C, Nitschko H, Koszinowski UH, Adler B (2011) HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS Pathog* 7: e1001256.
29. Mori Y (2009) Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol* 11: 1001-1006.
30. Birkmann A, Mahr K, Ensser A, Yaguboglu S, Titgemeyer F, et al. (2001) Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol* 75: 11583-11593.
31. Majerciak V, Yamanegi K, Allemand E, Kruhlak M, Krainer AR, et al. (2008) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 functions as a viral splicing factor and promotes expression of intron-containing viral lytic genes in spliceosome-mediated RNA splicing. *J Virol* 82: 2792-2801.
32. Majerciak V, Pripuzova N, McCoy JP, Gao SJ, Zheng ZM (2007) Targeted disruption of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 in the viral genome is detrimental for the expression of ORF59, K8alpha, and K8.1 and the production of infectious virus. *J Virol* 81: 1062-1071.
33. Ito H, Watanabe S, Takada A, Kawaoka Y (2001) Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *J Virol* 75: 1576-1580.



**Figure 1. Bo10 mRNA undergoes alternative splicing.** A. Nucleotide sequence of the BoHV-4 Bo10 gene. The underlined nucleotides represent the signal peptide sequence. The boxes indicate the splicing donor and acceptor sites. The sequence in red italics indicates the removed nucleotides after splicing. Nucleotides in green indicate the STOP codon in the intron. B. Amino acids comparisons of the predicted spliced and unspliced Bo10 products. The red amino acids represent the signal peptide sequence. The green amino acids indicate the predicted transmembrane region of the Bo10 spliced expression product. Serines and threonines are highlighted in bold. C. RT-PCR analysis of BoHV-4 Bo10 reading frame. MDBK cells were mock infected or infected with BoHV-4 V. test strain. Twenty-four hours p.i., expression of Bo10 was studied using different pairs of primers specific for the spliced and/or unspliced Bo10 products. Locations of the different primers are indicated by red arrows. No PCR product was observed when the RT was omitted from the reactions. Amplification of viral genomic DNA is provided as control. UI and Neg. represent uninfected cells samples and PCR negative controls respectively. Sizes in bp are indicated on the right.

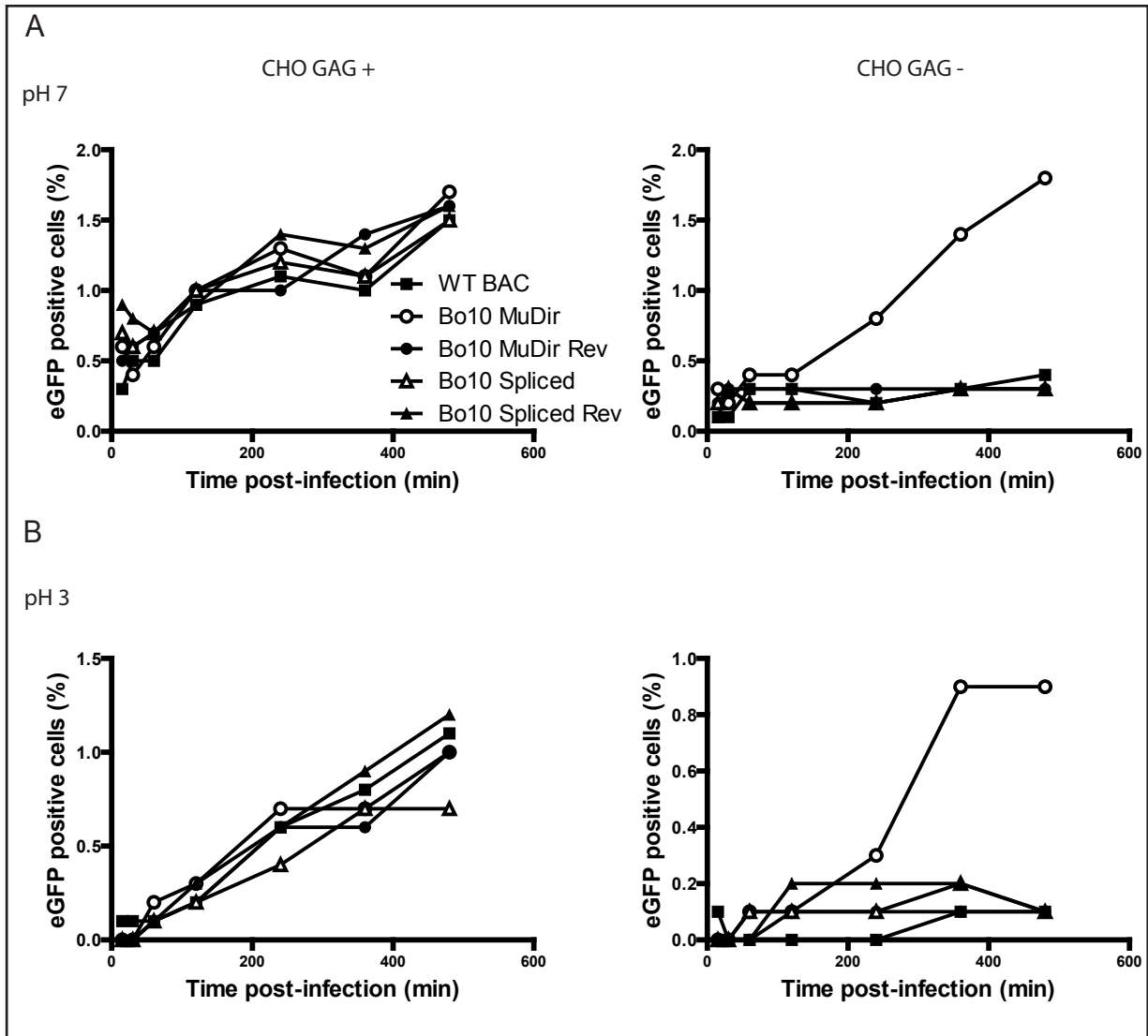


**Figure 2. Generation of the Bo10 MuDir and Spliced BoHV-4 mutants.** **A.** Schematic representation of the strategy followed to produce the recombinant BoHV-4 strains. The Bo10 MuDir and Spliced BoHV-4 mutants were derived from a cloned BoHV-4 BAC by shuttle mutagenesis method. We modified the BoHV-4 V. test Bo10 coding sequence (genomic coordinates 65844 to 66743) either by introducing a point mutation in the splicing donor site (Bo10 MuDir strain) or by replacing the entire Bo10 ORF by a sequence devoid of the intron (Bo10 Spliced strain). Splicing donor and acceptor sites are in red. **B.** Verification of the molecular structure. Viral DNA was digested with BamHI, resolved by agarose gel electrophoresis, and hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled probe, corresponding to nucleotides 65900-66370 of the BoHV-4 V. test strain genome (coding for Bo10 Exon 1). The 7,137-bp wild-type (WT) band becomes 7060-bp (open arrow) for the Bo10 spliced mutant. Marker sizes in Kbp are indicated on the left. **C.** RT-PCR analysis of BoHV-4 Bo10 expression by the different mutants. MDBK cells were mock infected or infected with the different BoHV-4 mutant strains. Twenty-four hours p.i., expression of Bo10 was studied using different pairs of primers specific for the spliced and/or unspliced Bo10 cDNA. No PCR product was observed when the RT was omitted from the reactions. Amplification of viral genomic DNA is provided as control. UI and Neg. represent uninfected cells samples and PCR negative controls respectively. Sizes in bp are indicated on the right. **D.** Detection of the Bo10 encoded gp180 protein by the anti-Bo10-c15 serum. Purified virions ( $5 \times 10^5$  virions per lane) were subjected to western blotting with anti-Bo10-c15 serum as described in the Methods. The position of a molecular mass (MM) standard (in kDa) is shown on the right.

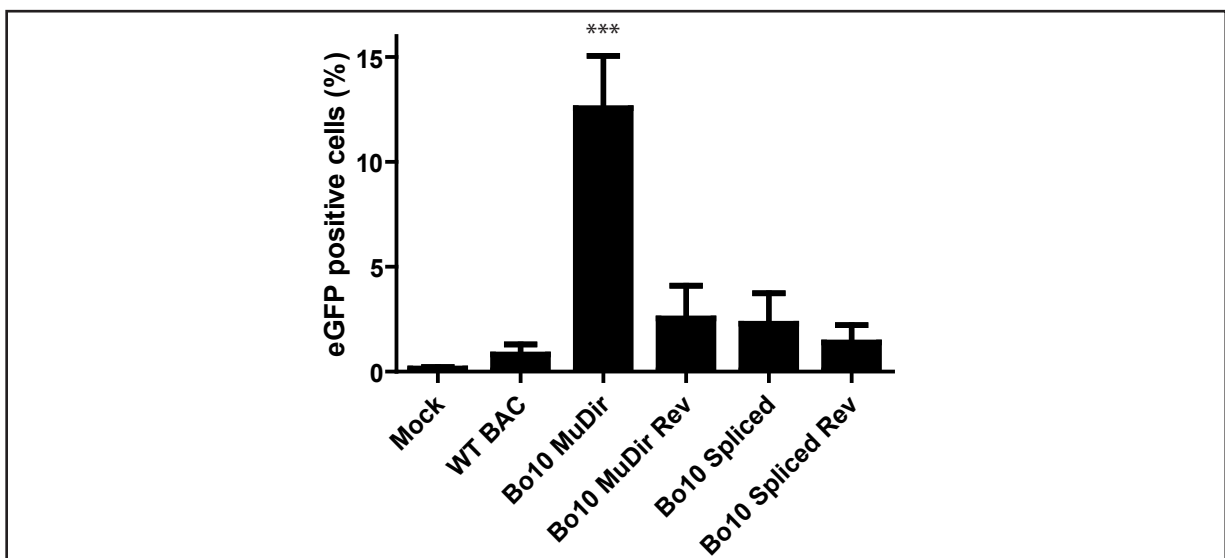


**Figure 3. Effect of Bo10 mRNA splicing on BoHV-4 replication in vitro.** MDBK cells grown in 6-well cluster dishes were infected at a m.o.i. of 0.01 for multi-steps assays as described in the Methods with BoHV-4 wild type V. test BAC (black squares), Bo10 MuDir (open circles), Bo10 MuDir Rev (black circles), Bo10 Spliced (Open triangles) and Bo10 Spliced Rev (black triangles). Supernatant of infected cultures and infected cells were harvested at different times post-infection, and the amount of infectious virus was determined by plaque assay on MDBK cells. Time 0 p.i. is re-titration of the inocula to ensure that similar amounts of virus were put on the cells. Plaques were visualized by immunofluorescent staining as described in the Methods. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for triplicate measurements. The data were analyzed by 2way ANOVA and Bonferroni posttests, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .





**Figure 4. Bo10 mRNA splicing determines BoHV-4 entry in CHO GAG- cells.** A and B. CHO-K1 cells (CHO GAG+) and the GAG-deficient derivative CHO-pgsA-745 (CHO GAG-) were infected at the m.o.i. of 0.1 with wild type V. test BAC (black squares), Bo10 MuDir (open circles), Bo10 MuDir Rev (black circles), Bo10 Spliced (Open triangles) or Bo10 Spliced Rev (black triangles) strains for the times indicated and then washed either with PBS (pH 7.4) (A) or with isotonic (pH 3) buffer (Acid wash) (B). Viral infection was assayed by measuring eGFP expression 18 h later by flow cytometry.



**Figure 5. Rabbit PBMC were isolated on Ficoll gradient and then left uninfected or infected with wild type V. test BAC, Bo10 MuDir, Bo10 MuDir Rev, Bo10 Spliced or Bo10 Spliced Rev strains (1 PFU / cell). 24h later, cells were analyzed by flow cytometry for CD14 and viral eGFP expression as described in the Methods. The data presented are the average  $\pm$  SEMs for six measurements and were analyzed by 1way ANOVA and Bonferroni posttests, \*\*\*  $p < 0.001$ .**

## **Discussion générale**

---

Les gammaherpèsvirus représentent l'archétype des virus persistants. Largement répandus au sein des populations humaines comme animales, ils ont évolué pour coexister avec leur l'hôte en dépit des Ac spécifiques circulants. Ainsi, ils se montrent capables d'établir une réactivation chez des individus immuns et de produire une infection contagieuse (Roth & Compans, 1980; Rovnak *et al.*, 1998) sans que cela ne nécessite une immunosuppression de l'hôte, une tolérance à des produits d'expression viraux ou encore une variation antigénique significative (Xu *et al.*, 1996). Si les mécanismes d'évasion de la réponse « cellules T-dépendante » des gammaherpèsvirus sont bien décrits (Stevenson *et al.*, 2009; Tortorella *et al.*, 2000; Yewdell & Hill, 2002), peu de données sont disponibles sur la façon dont ils échappent aux Ac neutralisants. Les Ac jouent pourtant un rôle déterminant dans l'immunité anti-virale et plus particulièrement dans l'efficacité de la vaccination anti-virale (Hangartner *et al.*, 2006b). Par leur potentiel neutralisant et leur stimulation de la cytotoxicité, ils combattent efficacement de nombreux agents mais semblent impuissants pour empêcher la transmission de virus persistants. La dérive antigénique négligeable des herpèsvirus dénote d'ailleurs la faiblesse de la pression sélective imposée par ces Ac (Xu *et al.*, 1996). Le développement de vaccins à l'encontre de virus persistants s'est donc révélé être un challenge majeur.

L'EBV et le KSHV sont deux gammaherpèsvirus qui infectent respectivement 90% (Henle *et al.*, 1969) et 30% (Verma & Robertson, 2003a) de la population humaine et qui sont impliqués dans plusieurs pathologies importantes dont différents cancers. Cependant, l'étude de la neutralisation de ces virus est rendue difficile, voire impossible, par leur croissance *in vitro* limitée et par la difficulté de réaliser des expériences *in vivo*. Dans ce contexte, le BoHV-4 est un modèle accessible pour l'étude de la biologie de l'infection des gammaherpèsvirus.

Tous les gammaherpèsvirus encodent une glycoprotéine majeure, homologue de la glycoprotéine gp350 de l'EBV. Chez le BoHV-4, l'homologue positionnel est le produit du gène Bo10. Ces glycoprotéines sont souvent impliquées dans l'attachement viral et pourraient constituer des cibles pour la neutralisation. Cependant, ces virus se transmettent en présence d'Ac dirigés contre ces protéines. Il reste donc beaucoup à apprendre au sujet des relations entre gp350 ou ses homologues, les Ac spécifiques et le mécanisme d'entrée du virus.

Pour adresser cette question, l'objectif de cette thèse fut l'étude du rôle du gène Bo10 au cours de l'infection du BoHV-4. Par la caractérisation de ce gène et par de l'analyse de son profil de transcription, nous avons mis en évidence l'existence de deux transcrits différents suite à un phénomène d'épissage alternatif. Le premier, épissé, code pour un produit présentant une ancre transmembranaire et correspondant aux homologues de gp350 de l'EBV. Le deuxième, non épissé, encode potentiellement une protéine plus courte, dépourvue d'ancre transmembranaire. Cette deuxième forme protéique n'a encore jamais été caractérisée et représente donc un intérêt majeur.

La présentation de cette thèse est articulée autour de plusieurs études : deux d'entre elles se sont intéressées aux rôles de la forme transmembranaire, dérivée du transcrit épissé. Une troisième a mis en évidence la présentation d'épitopes gal par cette protéine, à l'origine de la neutralisation du BoHV-4 par le sérum humain. Un dernier chapitre a introduit la caractérisation du transcrit non épissé, encodant potentiellement une protéine tronquée.

## 1) La protéine transmembranaire

Le transcrit épissé du gène Bo10 appartient au groupe des « transcrits tardifs » et il encode une protéine virale d'enveloppe de 180 kDa (gp180), transmembranaire de type I. Alors que gp180 est non essentielle à la réplication du BoHV-4 *in vitro* comme *in vivo*, son absence est associée à un déficit de croissance expliqué par un défaut d'attachement aux cellules épithéliales (Etude I : figures 4-6). Ce phénomène semble refléter une interaction entre gp180 et les GAGs, puisque le virus Bo10 Del est à la fois moins infectieux que le virus WT envers les cellules GAGs + et plus infectieux pour les cellules GAG- (Etude I : figure 8). Ce mécanisme d'attachement complexe pourrait présenter un intérêt pour le virus. En effet, gp180 semble cacher, au moins partiellement, plusieurs épitopes différents présents sur gB, gH et gL dont certains sont des épitopes sensibles à la neutralisation (Etude II : figures 6-7). L'interaction de gp180 avec les HS pourrait déplacer cette dernière et assurer l'exposition secondaire des structures virales impliquées dans l'entrée (Figure 8). La couverture de certains épitopes de gB, gH, gL semble être constituée par un bouclier de O-glycans porté par gp180. Ce bouclier assure une protection des épitopes vulnérables par rapport à la neutralisation par les Ac. L'étroite conservation des sites de O-glycosylation chez tous les homologues de gp180 (Etude I : table 1) suggère que ce mécanisme d'immunoévasion est largement exploité au sein des gammaherpèsvirus. Ainsi, malgré des divergences importantes dans leur séquence peptidique, gp180 et ses homologues pourraient partager la même fonction. Cependant, si la glycosylation des protéines virales représente une stratégie d'immunoévasion clé pour les gammaherpèsvirus, le caractère conservé de certains résidus sucrés portés par gp180, tels que les épitopes gal, pourrait à l'inverse, constituer un point faible pour le virus et une cible de contre-attaque. En effet, le recours à des Ac monoclonaux ou à des lectines spécifiques de ces motifs conservés permet d'assurer la neutralisation du virus.

Les résultats obtenus au cours de cette partie du travail ont initié plusieurs réflexions et ont introduit différentes perspectives dont les concepts principaux sont présentés ci-dessous.

### 1.1. La conservation de la fonction des homologues de gp180.

La connaissance précise de l'organisation des glycoprotéines d'entrée des gammaherpèsvirus et de leur façon de se dissimuler du système immunitaire est un prérequis nécessaire au contrôle de leur infection. Les résultats générés au cours de cette thèse ont démontré le rôle de gp180 dans la

protection de l'accès aux Ac, de gB, gH et gL. Cette fonction pourrait être partagée par les homologues de gp180 chez les autres gammaherpèsvirus. En particulier, cette question pourrait être adressée chez le MuHV-4 en raison de la simplicité d'utilisation de ce deuxième modèle. L'homologue de gp180, la glycoprotéine gp150, est potentiellement associée en complexe avec gB, gH et gL (Gillet *et al.*, 2007c). Aussi, le recours à des monoclonaux dirigés contre ces glycoprotéines pourrait être intéressant afin d'évaluer l'antigénicité du virion MuHV-4 WT ou du virion délété pour la glycoprotéine gp150 et d'identifier les épitopes du MuHV-4 potentiellement protégés par gp150. De plus, la sensibilité à la neutralisation par du sérum immun, du virus MuHV-4 sauvage et celle du délété pour gp150, pourrait être comparée. Des études préliminaires ont abordé cette question et ont suggéré une meilleure neutralisation du virus par le sérum en l'absence de gp150. D'après les résultats obtenus, une des cibles des Ac dissimulée par gp150 pourrait être l'extrémité N-terminale de gB (Gillet *et al.*, 2006). Sur base des connaissances acquises sur la gp180 du BoHV-4, les hypothèses formulées au cours de ces études préliminaires pourraient être analysées et confirmées. Par ailleurs, des recherches en cours, menées au sein du laboratoire, utilisent l'imagerie *in vivo* pour étudier l'infection du MuHV-4 dans le modèle murin. Grâce à cette technologie, ces recherches ont mis en évidence la présence du virus en phase répliquative au niveau du tractus génital des souris femelles, suite à une inoculation intranasale (S. François, communication personnelle). Cette première observation d'une réexcrétion génitale du MuHV-4 chez des femelles infectées latentes ouvre des perspectives pour comparer l'infectivité de différents virus recombinants *in vivo*. Dans ce contexte, l'infectivité de virus ré-excrétés MuHV-4 sauvage et du mutant gp150- pourrait être comparée. Par analogie avec les données acquises via le modèle gp180 du BoHV-4, l'infection de souris par un virus MuHV-4 déficient en gp150 pourrait stimuler une réponse humorale performante, avec des anticorps dirigés contre les glycoprotéines essentielles pour l'entrée virale. Lors de la réactivation-réexcrétion, les virions délétés par gp150 pourraient donc être neutralisés plus efficacement que dans un modèle d'infection par le virus sauvage.

### 1.2. Rôles et structure des O-glycans portés par gp180 et ses homologues

Comprendre comment le virus utilise le processus de glycosylation pour décorer ses propres protéines et évader la neutralisation par les Ac, est important pour améliorer le contrôle de l'infection virale. Aussi, une investigation possible, introduite par ce travail, est la précision des rôles des O-glycans portés par gp180 et ses homologues, dans l'évasion de la neutralisation. De manière surprenante, en comparaison avec les autres glycoprotéines conservées, la séquence des différents homologues de gp180 montre d'importantes divergences au sein des gammaherpèsvirus. Pourtant, ces produits constituent tous des glycoprotéines transmembranaires de type I, massivement O-glycosylées (Etude 1, table 1). Dès lors, l'hypothèse proposée est que ces protéines partagent une fonction commune, déterminée par leurs structures O-glycosylées.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont souligné l'importance de la O-glycosylation dans la protection du BoHV-4 contre la neutralisation. Si le concept de « glycan shield » a déjà été évoqué pour plusieurs virus, la plupart des sucres, décrits jusqu'alors pour protéger de la neutralisation, sont des N-glycans (Helle *et al.*, ; Wei *et al.*, 2003). Les N-glycans cependant, sont des structures ramifiées souvent volumineuses, pouvant affecter les interactions protéiques. Etant donné que gp180 semble être impliquée dans un complexe multi-protéique, les N-glycans pourraient ne pas être adéquats pour assurer une protection des épitopes vulnérables sans perturber l'organisation et les interactions entre protéines. Par ailleurs, la O-glycosylation semble être une stratégie utilisée largement au sein des herpèsvirus. En effet, outre les homologues de gp350 qui semblent tous être massivement O-glycosylés, l'extrémité N-terminale de gB du MuHV-4 ainsi que celle de gC de l'HSV sont elles aussi couvertes de O-glycans. La raison pour laquelle les herpèsvirus exploitent la N- mais aussi la O-glycosylation pourrait être la nécessité de faire varier les antigènes présentés par les glycans eux-mêmes. En effet, les glycans sont quelquefois ciblés par la réponse immunitaire. C'est le cas par exemple de certains antigènes présentés par l'arborescence de N-glycans que porte la protéine gp120 de l'HIV (Doores *et al.*, 2010b). Une dérive antigénique est alors nécessaire pour évader la réponse humorale. Etant donné que les N-glycans sont impliqués dans le folding des protéines, une mutation au niveau d'un site induit fréquemment l'apparition d'un changement compensatoire au niveau d'autres sites de N-glycosylation, comme observé pour l'HIV (Poon *et al.*, 2007). Un tel mécanisme n'est possible que pour les espèces virales qui présentent un taux de mutations élevé. La relative stabilité des herpèsvirus ne leur permet sans doute pas d'exploiter une même stratégie (Burton *et al.*, 2005). Aussi, les O-glycans, qui présentent une plus grande diversité (Mardberg *et al.*, 2004) et qui influencent moins la structure protéique, pourraient être plus adaptés.

Afin de modifier les sites de glycosylation pour varier leur profil antigénique, les gammaherpèsvirus pourraient réguler l'expression d'enzymes cellulaires de glycosylation (Lundstrom *et al.*, 1987) ou encore assurer la production de leur propre enzyme virale. Seuls deux virus de vertébrés sont connus pour encoder des glycosyltransférases (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004b). L'un d'eux est le BoHV-4 dont le gène Bo17 encode une enzyme C2GnT-M (Vanderplasschen *et al.*, 2000) dont la séquence est étroitement apparentée à celle de son homologue cellulaire. Par l'ajout des structures core 2, cette enzyme réalise une étape clé dans le processus de O-glycosylation à l'origine des sucres complexes. En effet, les O-glycans peuvent être soit linéaires, soit branchés. La voie de biosynthèse principale pour la constitution de ces sucres ramifiés se réalise via les branchements core 2. Ces structures complexes pourraient être massivement présentes au niveau de gp180 et de ses homologues. La présence de ces structures core 2 expliquerait pourquoi les O-glycans, habituellement décrits pour protéger *en cis* de petites structures linéaires (Gillet & Stevenson, 2007a), montrent dans notre modèle, un effet protecteur plus étendu. De manière intéressante, la construction d'un mutant BoHV-4 délété pour le gène Bo17, a permis d'identifier gp180, comme un substrat de l'enzyme

encodée par Bo17 (C. lété, données non publiées). Ce résultat préliminaire suggère que le BoHV-4 exploite l'activité de Bo17 afin de former par le biais de gp180, un bouclier protecteur tout en étant lui-même protégé par les structures core 2. Différentes expériences pourraient tester cette hypothèse. Les méthodes d'analyse des glycanes ont beaucoup évolué ces dernières années. Aussi, des techniques de glycomique après immunoprécipitation pourraient investiguer les conséquences de l'expression de pBo17, sur la structure de glycanes de gp180. Ensuite, le phénotype de virions délétés pour le gène Bo10 et pour le gène Bo17 pourrait être comparé. Concrètement, l'accessibilité des épitopes révélés par la délétion de Bo10 ainsi que la sensibilité à la neutralisation par des anticorps monoclonaux, pourraient être évaluées sur des virions WT et délété pour le gène Bo17. Ces expériences devraient potentiellement éclaircir le rôle de Bo17 et clarifier l'impact des O-glycanes portés par gp180 et ses homologues, sur la neutralisation virale.

Au sein des gammaherpèsvirus, seul le BoHV-4 encode une enzyme douée d'une activité de glycosyltransférase. Aussi, dans l'hypothèse d'une stratégie commune d'évasion de la neutralisation centrée sur les structures core 2 des homologues de gp180, l'absence de Bo17 pourrait être compensée par la modulation de l'activité de l'enzyme C2GnT-M cellulaire. Dès lors, il serait intéressant d'adresser cette question dans le modèle MuHV-4. Des souris knockout (KO), core 2 déficientes ont été décrites récemment (Lee *et al.*, 2010). Aussi, une perspective intéressante pourrait être l'étude de virions MuHV-4 cultivés sur des fibroblastes sauvages ou core 2 déficients, afin d'investiguer l'impact de l'activité core 2 cellulaire sur la glycosylation de gp150. Le recours aux techniques de glycomique permettrait, là encore, de comparer la taille et d'analyser la structure des glycanes de gp150, en présence ou non de l'activité core 2 cellulaire. En cas de différence, la sensibilité à la neutralisation des deux types de virions pourrait être évaluée afin de déterminer comment les glycanes portés par gp150 affectent la neutralisation par les anticorps. Enfin, grâce aux techniques d'imagerie *in vivo* disponibles au laboratoire, l'infection de souris KO devrait permettre l'évaluation des conséquences de l'absence de l'activité core 2 cellulaire sur la neutralisation de virus et donc sur l'efficacité de sa transmission.

### 1.3. Le déplacement de gp180 et de ses homologues

Au cours de ce travail, nous avons démontré que la gp180 du BoHV-4 réduisait l'accessibilité des épitopes exposés par gB, gH, gL. Ce phénomène se déroule vraisemblablement par encombrement stérique. Si cet encombrement protège les épitopes impliqués dans l'entrée de la neutralisation par les Ac, il entrave probablement aussi les interactions essentielles entre ces mêmes épitopes et leurs récepteurs cellulaires potentiels. Suite à la sensibilité du BoHV-4 sauvage (à la différence du virus gp180-) à l'inhibition par l'héparine soluble pour l'infection des cellules épithéliales, nous avons suggéré une liaison de gp180 aux héparanes sulfates de la surface cellulaire. Cette interaction seule pourrait être responsable du déplacement de gp180 de son site inhibiteur permettant alors à la fusion

de s'enclencher (Figure 8). Cependant, d'autres mécanismes pourraient également lever l'inhibition de la fusion maintenue par gp180 et ses homologues. Le MuHV-4 (Gill *et al.*, 2006) et le BoHV-4 (C. Lété, données non publiées) infectent les cellules par endocytose. Dans l'endosome, la protéolyse de glycoprotéines d'enveloppe est nécessaire pour l'infection de plusieurs virus. Par exemple, la glycoprotéine EBOV GP du virus EBOLA possède un important domaine mucinique et présente plusieurs similitudes avec gp180 et ses homologues. Chez le virus EBOLA, des études ont démontré que la protéolyse de EBOV GP dans l'endosome, par les cathepsines L et/ou B, enlevait le domaine mucinique pour générer un intermédiaire stable permettant l'infection virale. Ce mécanisme permettrait aux épitopes vulnérables de n'être seulement révélés qu'au sein des endosomes, c'est à dire, à l'abri des Ac (Shedlock *et al.*, 2010). Sur base de cet exemple, il serait intéressant d'investiguer davantage comment et où sont révélées les protéines cachées par la gp180 du BoHV-4 et éventuellement, par la gp150 du MuHV-4. Dans cet objectif, des inhibiteurs des différentes voies d'endocytose pourraient être testés ainsi que des inhibiteurs de protéases afin de caractériser l'infection virale en l'absence de protéolyse potentielle de gp180/gp150 dans l'endosome. Ces investigations pourraient avoir des retombées importantes. En effet, l'identification éventuelle de site(s) de clivage par certaines cathepsines sur gp180 pourrait désigner de nouvelles cibles pour la neutralisation par des Ac monoclonaux. L'existence de tels Ac neutralisants a été démontrée dernièrement pour le virus EBOLA (Shedlock *et al.*, 2010).

#### 1.4. La protection potentielle des épitopes cellulaires de surface

Plusieurs analogies structurelles et fonctionnelles semblent exister entre la glycoprotéine EBOV GP du virus EBOLA et la gp180 du BoHV-4 (Ito *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Manicassamy *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 1997). Des études récentes ont mis en évidence que la glycoprotéine EBOV GP formait par ses domaines massivement glycosylés, un encombrant bouclier en surface des cellules infectées (Francica *et al.*, 2010; Reynard *et al.*, 2009). Pour échapper à la détection par le système immunitaire, de nombreux virus altèrent l'expression de protéines cellulaires en surface des cellules infectées. Parmi les protéines downrégulées, on peut citer les molécules importantes pour la reconnaissance immune telles que les molécules du CMH (Hewitt, 2003) ou des récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les intégrines (Simmons *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2000). Le virus EBOLA montre un exemple de stratégie différente puisqu'en plus d'affecter le niveau d'expression des protéines cellulaires, il utilise les glycans décorant ses propres protéines pour couvrir les composants cellulaires impliqués dans la défense immunitaire (Francica *et al.*, 2010). Ainsi, l'encombrement stérique généré par EBOV GP bloque d'une part, la liaison des Ac aux protéines de surface et d'autre part, les interactions avec les cellules CD8+. Un rôle similaire de dissimulation des épitopes en surface des cellules infectées pourrait être joué par gp180 puisque cette protéine modifie l'accessibilité des protéines virales en surface cellulaire (Etude II, figure 6). Aussi, une perspective intéressante serait d'investiguer l'accessibilité aux Ac, de différentes protéines de la surface cellulaire, suite à l'infection



par les virus WT ou Bo10 Del ou encore suite à l'expression de gp180 en gène isolé. De la même façon, l'investigation des conséquences de l'expression de Bo17 à ce niveau pourrait identifier une implication éventuelle des O-glycans portés par les protéines des gammaherpèsvirus, pour masquer les épitopes cellulaires de surface.

#### 1.5. *La glycoprotéine gp180 et ses homologues en tant que cibles vaccinales*

Au cours de ce travail, nous avons analysé les interactions entre la glycoprotéine gp180 du BoHV-4 et les Ac. Dans l'hypothèse de l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales, les résultats obtenus ne présentent pas gp180 en tant que cible idéale pour générer une réponse immune humorale neutralisante. En effet, alors que le virus sauvage, présentant la forme gp180 à sa surface, n'est neutralisé que partiellement par de hautes concentrations de sérum immun, le virus dépourvu de gp180 est bien plus sensible à la neutralisation par ce même sérum. Loin d'assurer la neutralisation, gp180 agit donc au contraire pour protéger les épitopes sensibles. Chez le MuHV-4, la glycoprotéine gp150 est fortement immunogène puisqu'elle représente la cible majeure des Ac générés lors d'une infection par le virus sauvage (Gillet *et al.*, 2007c). Cependant, ni les Ac monoclonaux anti-gp150, ni les sera polyclonaux riches en Ac anti-gp150 ne parviennent à la neutralisation du virus. Au contraire, ces Ac ont pour effet d'augmenter l'efficacité de l'infection virale au niveau des cellules porteuses d'un récepteur Fc pour ces Ac (Gillet *et al.*, 2007c; Rosa *et al.*, 2007). La glycoprotéine gp150 agit donc comme un leurre immunologique détournant la réponse immune des épitopes essentiels pour l'infection virale. Cette fonction pourrait être partagée par gp180 et ses homologues au sein des gammaherpèsvirus.

L'analyse de ces données permet d'adresser un regard critique vis-à-vis des essais vaccinaux développés contre l'EBV et vis-à-vis du concept d'utilisation de gp350 en tant que cible vaccinale. La vaccination anti-EBV a été suggérée dès le début des années 80 (North *et al.*, 1982). Déjà à cette époque, une approche sous-unitaire basée sur une gp350 recombinante, était considérée comme le candidat de choix.

Un vaccin contre l'EBV peut avoir différents objectifs : protéger les individus sains de l'infection, diminuer la charge virale et les symptômes liés à l'infection primaire, limiter ou abolir la réexcrétion virale et donc prévenir la transmission des individus porteurs vers les individus non-infectés ou encore limiter le développement et la progression de cancers chez les patients infectés latents. Un vaccin idéal devrait donc cumuler plusieurs qualités parmi lesquelles figurent la production d'Ac neutralisants protecteurs, la prévention de l'établissement de la latence et l'élimination du virus à long terme. La glycoprotéine gp350 a été présentée comme un candidat intéressant pour la mise au point d'un vaccin puisque le caractère immunogène de cette protéine majeure d'enveloppe induisait la production de hauts titres d'Ac tant dans le sérum que dans la salive (Hoffman *et al.*, 1980; Miller *et*

*al.*, 1982; Moutschen *et al.*, 2007; Sashihara *et al.*, 2009). Ces Ac anti gp350 assurent, de plus, la neutralisation de l'infection des lymphocytes B.

Plusieurs modèles animaux, dont certains primates, ont été proposés pour étudier l'infection de l'EBV. L'efficacité de différents vaccins centrés sur la glycoprotéine gp350 a été testée chez ces modèles, avec des taux de succès variables (Khanna *et al.*, 1999b). Le modèle animal principalement utilisé est le primate *cottonstop tamarin* (*Saguinus oedipus oedipus*), chez qui l'infection par l'EBV évolue en un lymphome associé aux lymphocytes B. Le singe *common marmoset* (*Callithrix jacchus*) développe quant à lui un profil clinique semblable à la mononucléose infectieuse chez l'homme, tandis que des virions EBV libres sont réexcrétés au niveau de la cavité orale (Cox *et al.*, 1996). Dès 1985, un premier vaccin, basé sur une gp350 purifiée, a démontré son efficacité chez le *cottonstop tamarin* pour protéger les animaux infectés de l'émergence de tumeurs associées à l'EBV (Epstein *et al.*, 1985). Plus tard, des virus recombinants (adénovirus, vaccinia) exprimant gp350 ont été inoculés à cette même espèce de singe et ont empêché également le développement de lymphomes (Ragot *et al.*, 1993). Enfin, un recombinant vaccinia exprimant gp350 a permis la réduction de la charge virale chez ces primates suite à une infection « challenge » par l'EBV (Mackett *et al.*, 1996). L'administration de vaccins gp350 semble induire une réponse humorale et cytotoxique spécifiques (Khanna *et al.*, 1999b; Wilson *et al.*, 1996). Les mécanismes de protection de la progression des tumeurs ne sont pas clairs. Etant donné que les cellules tumorales sont le siège d'une infection latente, l'absence probable d'expression de la glycoprotéine gp350 au sein de celles-ci suggère une neutralisation des virions libres plutôt qu'une réaction immunitaire à l'encontre des cellules tumorales infectées. La diminution de la charge virale pourrait secondairement limiter la progression cancéreuse puisque celle-ci semble proportionnelle à la quantité de virus (Morgan & Khanna, 2007). Les cellules épithéliales assurent l'amplification de l'EBV. Aussi, l'activation d'une réponse cytotoxique à l'encontre de ces dernières pourrait également réduire la charge virale et donc limiter le développement de cancers.

Par la suite, des études cliniques ont été menées chez l'homme. Le premier vaccin, consistant en un virus vaccinia exprimant gp350, fut testé en Chine en 1995 et démontra que les enfants inoculés avaient tous développé des Ac suite à la vaccination (Gu *et al.*, 1995). Cependant, aucune indication de protection de l'infection n'avait été mise en évidence avec cette expérience. En 2005, une étude clinique, réalisée en Belgique, a utilisé une gp350 purifiée pour vacciner une population de 98 jeunes adultes. Alors que cette vaccination s'est montrée efficace pour contenir les symptômes de la mononucléose infectieuse sur l'ensemble de la population vaccinée, certains individus ont quand même démontré une séroconversion à l'encontre de l'EBV (Sokal *et al.*, 2007). En 2007, une vaste étude clinique menée sur 148 volontaires a testé l'innocuité et l'immunogénicité d'un vaccin recombinant sous unitaire gp350. Cette expérience a révélé une bonne tolérance des individus au vaccin, ainsi que la présence de hauts taux d'Ac sériques neutralisants anti-gp350. Ces Ac ont permis de réduire les signes cliniques de la mononucléose infectieuse (Moutschen *et al.*, 2007). Enfin, des

essais vaccinaux ont également été réalisés pour prévenir les désordres lymphoprolifératifs chez des patients suivant une thérapie immunosuppressive lors de transplantation (Rees *et al.*, 2009). Le vaccin dans ce cadre a, lui aussi, induit l'apparition d'Ac neutralisants mais cette réponse immune fut de courte durée et vraisemblablement inefficace pour prévenir les événements prolifératifs EBV-dépendants faisant suite au traitement immunosuppresseur. Si toutes ces études cliniques présentent un intérêt considérable en permettant de contrôler l'évolution de l'infection et en limitant les signes cliniques, elles s'avèrent pourtant jusqu'à présent incapables d'assurer une protection vis-à-vis de l'infection ou encore d'éliminer le virus.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de protection de l'infection conférée par les « vaccins gp350 » malgré le caractère immunogène de ces derniers. Certains vaccins gp350 testés ont stimulé la production de hauts titres d'Ac spécifiques systémiques. Cependant, la glycoprotéine gp350 est exprimée au cours de l'infection répliquative et est absente au niveau des cellules supportant l'infection latente. Aussi, puisque 95% des lymphocytes B abritent le virus sous sa forme latente (Morgan & Khanna, 2007), une réponse anti-gp350 pourrait être inefficace pour éliminer les cellules infectées latentes. Ensuite, la définition du caractère neutralisant des Ac anti-gp350 est réalisée par différents tests *in vitro* tels que des tests d'inhibition de la transformation des cellules B (Moutschen *et al.*, 2007). Ces tests évaluent exclusivement la neutralisation de l'infection des cellules B. Or, bien que l'EBV infecte les lymphocytes B *in vitro* et qu'il persiste *in vivo* au niveau des cellules B mémoires dérivées des centres germinatifs, le virus est également capable de se répliquer au sein de cellules épithéliales comme l'épithélium des amygdales ou celui du nasopharynx (Hadinoto *et al.*, 2009) qui constituent la porte d'entrée la plus probable pour le virus. De plus, il a été démontré que les Ac anti-gp350, loin de neutraliser l'infection des cellules épithéliales, améliorent au contraire l'efficacité de l'infection de ces cellules (Turk *et al.*, 2006). Pour cette raison, l'administration oronasale d'un vaccin gp350 pour stimuler l'immunité muqueuse pourrait être remise en question puisqu'elle pourrait avoir pour effet de favoriser l'entrée du virus au niveau des cellules épithéliales. La fenêtre d'action potentielle des Ac anti-gp350 pourrait seulement concerner les virions libres, relargués à partir des cellules épithéliales. Cependant, l'infection des lymphocytes B se propage probablement de cellules en cellules. Dès lors, il est peu probable qu'un vaccin stimulant uniquement une réponse humorale dirigée contre gp350, puisse bloquer l'infection de l'EBV.

Si la glycoprotéine gp350 stimule la production d'Ac incapables à eux-seuls de neutraliser complètement l'infection, elle pourrait cependant être à l'origine d'une réponse à médiation cellulaire performante. Dans ce contexte, une stratégie intéressante est le design de vaccins basés sur des épitopes dont la séquence peut être présentée dans les molécules du CMH de classe I (Khanna *et al.*, 1999b; Morgan & Khanna, 2007). A ce titre, gp350 ainsi que d'autres antigènes lytiques tels que gp85, pourraient être analysés pour identifier au sein de leur séquence, des épitopes T capables d'activer une réponse cytotoxique spécifique. Des investigations *ex vivo* ont démontré une puissante activité

cytotoxique des lymphocytes T CD8+, issus de patients atteints de la mononucléose infectieuse, à l'encontre de tels peptides (Khanna *et al.*, 1999c). Cependant, une restriction importante à ce type d'approche est le polymorphisme des molécules de HLA. Cet obstacle pourrait être contourné par l'utilisation d'une collection de peptides différents ou encore par la construction d'un « polyépitope ». Cette dernière structure résulte d'une séquence unique, codant pour plusieurs « épitopes T », placée dans un vecteur d'expression (Thomson *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1995). Enfin, l'EBV étant majoritairement présent chez son hôte sous ses différentes formes latentes, plutôt que de cibler uniquement les « épitopes lytiques » tels que gp350, les approches vaccinales peuvent se baser sur différents « épitopes latents » tels que EBNA I, EBNA III ou encore LMP2 pour stimuler la réponse cellulaire cytotoxique (Fogg *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2002; Khanna *et al.*, 1999a; Taylor *et al.*, 2004).

## 2) La protéine potentiellement sécrétée

Comme chez son homologue K8.1 du KSHV, un phénomène d'épissage alternatif a lieu au cours de la transcription du gène Bo10. Chez le KSHV, ce processus est à l'origine de trois transcrits différents (Figure 9) dont le prédominant, dans les cellules BCLB-1, est celui codant pour l'homologue de gp180, K8.1.A (Raab *et al.*, 1998). Chez le BoHV-4, des sites uniques donneur et accepteur d'épissage encadrent l'intron du gène Bo10 et peuvent générer deux transcrits différents. Alors que le transcrit épissé conduit à la production de gp180, l'absence d'épissage permet la lecture d'un codon stop au niveau de l'intron. La traduction de ce transcrit non épissé conduirait à la formation d'une protéine plus courte que gp180 et ne disposant pas d'ancre transmembranaire. De manière intéressante, le transcrit non épissé du KSHV (K8.1 $\gamma$ ) présente la même caractéristique. Ainsi, comme pour le BoHV-4, la traduction potentielle de cet ARNm produirait une protéine tronquée. Etant donné que ce potentiel produit tronqué n'a jamais été étudié chez le KSHV, la caractérisation de son homologue chez le BoHV-4 présente un intérêt majeur.

Au cours de ce travail, plusieurs outils ont été construits. Ils devraient nous aider d'une part, à identifier et à caractériser la protéine tronquée potentielle et d'autre part, à comprendre le(s) rôle(s) qu'elle joue dans l'infection du BoHV-4. Certains résultats pourraient potentiellement être extrapolés chez d'autres gammaherpèsvirus. La construction puis la caractérisation *in vitro* des virus recombinants ne générant que l'un ou l'autre des transcrits (Mudir versus Spliced), ont révélé que seule la glycoprotéine gp180 était impliquée dans l'attachement du virus aux GAGs (Etude IV, figure 3). Ces expériences préliminaires n'ont pas mis en évidence de phénotype particulier associé à l'absence seule du transcrit non épissé. Cependant, des investigations supplémentaires *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour confirmer ces observations et pour discerner le rôle de chacune des formes.

Tout d'abord, une première étape consistera en l'étude du profil de transcription du gène Bo10 en fonction du moment du cycle viral, du type de cellules hôtes ou encore, de l'expression de certains gènes viraux. A ce titre, une étude récente, menée chez le KSHV, a mis en évidence le rôle de l'ORF57 dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes viraux au cours de l'infection lytique. Ainsi, cette ORF semble moduler le phénomène d'épissage de plusieurs gènes parmi lesquels figure K8.1 (Majerciak *et al.*, 2007). La caractérisation de la transcription de Bo10 pourrait mettre en évidence un déséquilibre dans la proportion des deux transcrits produits, sous l'influence de différents facteurs de l'environnement. Cette régulation fine serait une façon élégante pour le virus d'orienter son tropisme. De manière similaire à l'EBV qui utilise la glycoprotéine gp42, présente ou non à sa surface, pour "switcher" d'un type cellulaire à l'autre (Borza & Hutt-Fletcher, 2002; Kirschner *et al.*, 2006), le BoHV-4 pourrait diminuer la production du transcrit épissé pour moduler son tropisme cellulaire. Le phénomène d'épissage de Bo10 permettrait au virus présentant gp180 à sa surface d'infecter aisément les cellules GAG positives tandis que l'absence d'épissage orienterait l'infection du virus vers les cellules GAG-, telles que les monocytes. Pour tester cette hypothèse, une analyse quantitative, des cDNA obtenus à partir de différents types de cellules infectées, sera réalisée.

Outre un rôle indirect potentiel dans la régulation de la présence de gp180 dans l'enveloppe virale, le transcrit non épissé pourrait encoder une protéine avec une fonction propre. La séquence peptidique correspondant au transcrit non épissé ne présente pas de domaine hydrophobe prédit pour une ancre transmembranaire. Aussi, il serait intéressant de déterminer si la protéine est incorporée dans la particule virale ou si elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Pour adresser cette question, une première expérience consistera à détecter puis à caractériser la protéine potentielle que ce transcrit non épissé génère. A cette fin, des sera monospécifiques de chacune des formes ont été produits (données non présentées). Grâce à ces Ac, l'analyse par western blot du surnageant de cellules infectées pourrait permettre l'identification de la protéine potentiellement sécrétée. Cependant, ces Ac étant produits sur base d'un épitope séquentiel de chacune des formes, ils pourraient ne pas reconnaître les protéines sous leur conformation tridimensionnelle. Pour faire face à cette difficulté éventuelle, un virus recombinant, exprimant la protéine "tronquée", modifiée par un "tag" sera construit. L'analyse par western blot, de virions purifiés et de surnageant de cellules infectées par ce virus recombinant, au moyen d'Ac dirigés contre le "tag", devrait dès lors permettre de détecter la protéine et de révéler si elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire et/ou intégrée dans la particule virale.

Plusieurs rôles distincts peuvent être suggérés pour cette protéine tronquée. Par analogie avec les propriétés de gp180, cette forme plus courte pourrait également lier les GAGs et améliorer la sortie des néo-virions. En effet, le modèle proposé de fixation de gp180 aux GAGs de la surface cellulaire soulève quand même une interrogation: comment les virions néoformés, présentant la gp180 à leur surface, ne sont pas directement réattachés à la cellule qui les a produits? Une stratégie pour

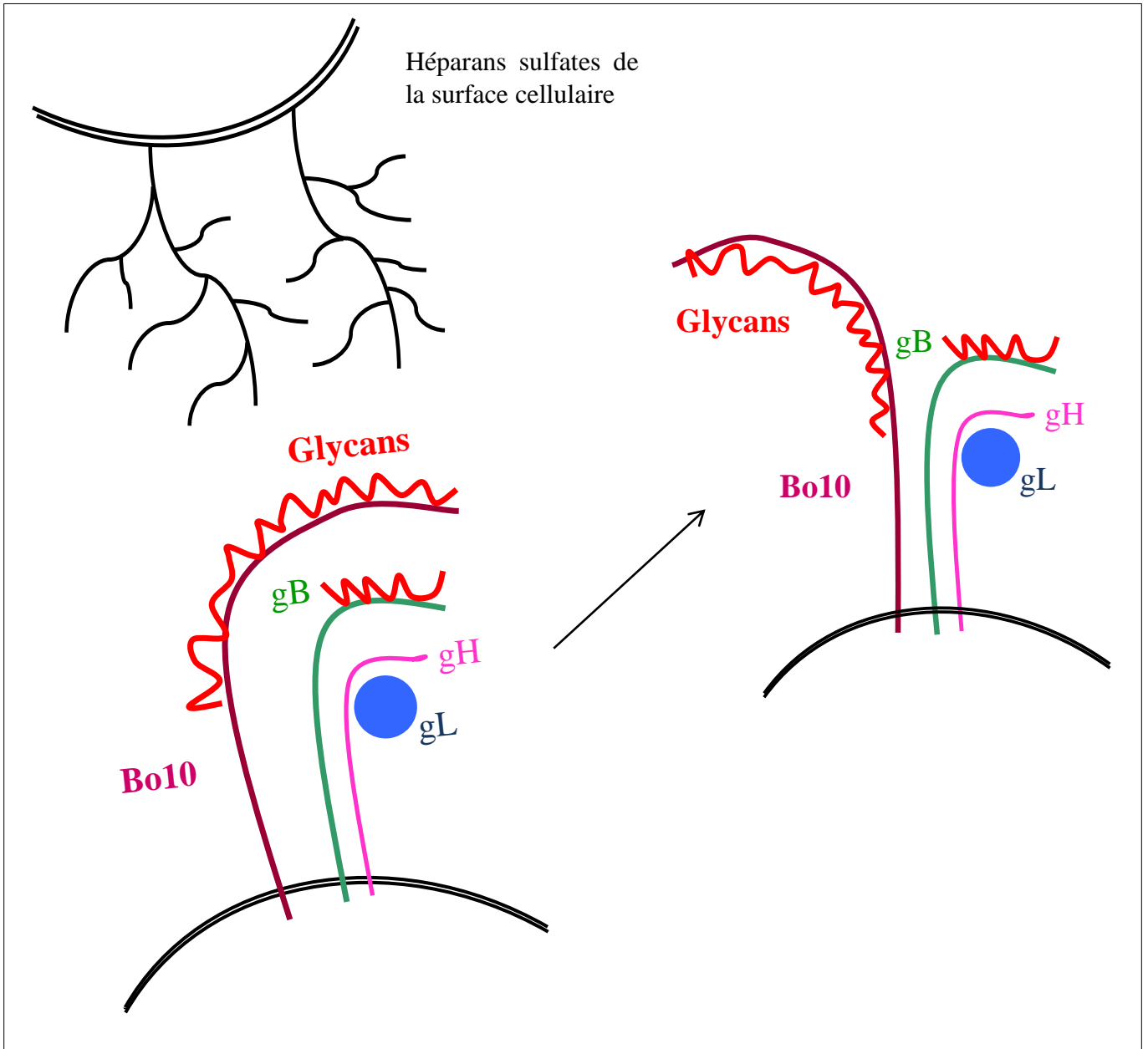
éviter cet effet, pourrait être de relarguer dans le milieu extracellulaire la forme sécrétée potentielle de Bo10. Celle-ci pourrait alors tapisser les GAGs de la surface cellulaire et prévenir un ré-attachement des virions. Cependant, une protéine différente de gp180 (Etude I, figure 7) désignée sous le nom de gp8, est elle-aussi, capable de lier les HS (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Présente sous une forme sécrétée, gp8 constitue un autre candidat potentiel pour améliorer la libération des néo-virions.

Selon nos hypothèses, le BoHV-4 pourrait être capable de générer deux types de virions différents: l'un exprimant gp180 à sa surface et l'autre exprimant la forme tronquée de Bo10. Pour échapper à la reconnaissance du système immunitaire, ces deux types de virus devraient avoir évolué pour se protéger des Ac neutralisants. Nous avons démontré un rôle du gène Bo10 dans la protection de la neutralisation par les Ac. Bien que nous avons associé ce phénotype à gp180, nos données n'excluent pas cependant, une implication de la forme tronquée dans cette même évation de la réponse humorale. Dans cette hypothèse, le virus pourrait, de manière particulièrement ingénieuse, orienter son tropisme tout en restant protégé de la neutralisation par les Ac.

D'autres fonctions peuvent encore être envisagées. Le virus EBOLA, par un phénomène "d'ARN editing", est capable de générer des forme transmembranaire (GP) ou sécrétées (SGP, ssGP) de la glycoprotéine EBOV GP (Mehedi *et al.*, 2011; Volchkov *et al.*, 1995). La fonction de ces formes sécrétées n'est pas bien définie à l'heure actuelle mais un rôle de leurre immunologique détournant la cible des Ac a été proposé (Dolnik *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2001). Une telle fonction pourrait également s'appliquer au produit tronqué du gène Bo10. Dans ce cadre, une première étape pourrait être de caractériser le profil de glycosylation de la forme sécrétée potentielle afin de mettre en évidence une possible différence avec la forme transmembranaire. Tel que mentionné précédemment, des résultats préliminaires ont suggéré une modification de la glycosylation de gp180 par pBo17. Cependant, l'activité enzymatique de pBo17 pourrait aussi être distincte, voire absente au niveau de la protéine tronquée encodée par Bo10. En effet, la transcription du gène Bo17 est également modulée par un phénomène d'épissage alternatif. Aussi, la régulation de l'épissage de Bo17 pourrait être corrélée avec celle de Bo10. Dans cette hypothèse, les deux formes protéiques, dérivées du même gène Bo10, pourraient afficher un profil de glycosylation tout à fait différent selon les circonstances. L'exposition différente des glycans au niveau de gp180 et de la protéine tronquée pourrait induire des variations au niveau de leur profil antigénique respectif et attribuer à ces deux formes, des rôles distincts.

En conclusion, cette étude s'est penchée sur les rôles du gène Bo10 au cours de l'infection du BoHV-4. La première caractérisation de la protéine d'enveloppe (gp180) encodée par ce gène a démontré son implication dans l'entrée et dans l'orientation du tropisme viral par une régulation positive et négative. Par l'exposition d'un bouclier de O-glycans, cette protéine assure la protection du virion vis-à-vis de la neutralisation par les Ac spécifiques de l'hôte. Cependant, l'exposition massive des épitopes gal sur les glycans de cette même protéine rend le BoHV-4 sensible à la neutralisation par

les Ac naturels du sérum humain et ouvre des perspectives pour des stratégies vaccinales originales. Une deuxième forme protéique dérive potentiellement du gène Bo10 par un phénomène d'épissage alternatif. Le rôle de cette dernière n'est pas encore défini mais la mise en place de plusieurs outils nous permettra à l'avenir d'investiguer cette question. Les résultats générés au cours de cette étude ainsi que les perspectives entrouvertes, pourraient avoir dans le futur, des implications tant fondamentales qu'appliquées.



**Figure 8.** La glycoprotéine gp180 forme un bouclier de glycans au devant de plusieurs épitopes de gB, gH et gL dont certains sont sensibles à la neutralisation. L'interaction de gp180 avec les glycosaminoglycans de la surface cellulaire permettrait le déplacement de celle-ci, révélant alors les épitopes nécessaires à la fusion du BoHV-4.



**Résumé-summary**

---

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) sont deux gammaherpèsvirus humains impliqués dans plusieurs cancers. Capables d'établir une réactivation et une réexcrétion chez un individu immun, ces virus persistants ont donc évolué pour coexister avec les anticorps (Ac) spécifiques de l'hôte. Définir précisément leur mécanisme d'entrée est nécessaire pour améliorer le contrôle de leur infection et pour mettre au point de nouvelles stratégies vaccinales. Cependant, l'entrée des gammaherpèsvirus est un processus complexe faisant intervenir différents récepteurs cellulaires et différentes glycoprotéines virales. Parmi celle-ci, la glycoprotéine gp350 de l'EBV est connue pour lier le récepteur CD21 des lymphocytes B et est décrite comme une cible de la neutralisation pour l'infection de ces cellules. L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) est un gammaherpèsvirus partageant des propriétés communes avec l'EBV et le KSHV. Ainsi, le gène Bo10 encode potentiellement une protéine homologue de la glycoprotéine gp350 de l'EBV. Afin de préciser les interactions entre gp350 ou ses homologues, les cellules hôtes et les Ac, ce travail s'est intéressé au rôle du gène Bo10 du BoHV-4. Les résultats générés au cours de cette thèse ont été rassemblés dans quatre études.

**1. Le gène Bo10 de l'herpèsvirus bovin 4 encode une protéine virale d'enveloppe non essentielle qui oriente le tropisme du virus par une régulation positive et négative.**

*Journal of Virology*, (2011), 85 (2), 1011-1024

Machiels B., Lete C., de Fays K., Mast J., Dewals B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. et Gillet L.

Cette étude a mis en évidence que le gène Bo10 encode une protéine virale de 180 kDa (gp180), incorporée dans l'enveloppe virale. Cette protéine n'est pas essentielle à la réplication mais est impliquée dans le processus d'entrée du virus. En effet, une souche virale recombinante, délétée pour le gène Bo10, montre un déficit de croissance associé à un défaut de d'attachement aux glycosaminoglycans (GAGs) de la surface cellulaire. A l'opposé, la délétion de Bo10 améliore l'efficacité de l'infection des cellules déficientes en GAGs. Ces résultats suggèrent que gp180 oriente le tropisme du BoHV-4 par une régulation positive et négative, selon la présence ou non du récepteur. Ce mécanisme pourrait être commun aux autres gammaherpèsvirus. Une hypothèse serait que les GAGs cellulaires déplacent gp180 pour assurer secondairement l'exposition d'épitopes viraux impliqués dans l'entrée. Un mécanisme aussi complexe pourrait être justifié par un rôle de protection de la neutralisation par les anticorps, joué par gp180 et ses homologues, envers des épitopes plus vulnérables. Cette hypothèse a été investiguée au cours d'une deuxième étude.

## 2. **Evasion de la réponse immune humorale à l'encontre d'un gammaherpèsvirus par la formation d'un bouclier de O-glycans.**

### *Soumis pour publication*

Machiels B., Lété C., Guillaume A., Mast J., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. et Gillet L.

La deuxième étude a mis en évidence que l'absence du gène Bo10 n'a pas d'impact significatif sur l'établissement et le maintien de la latence du BoHV-4. Cette délétion, par contre, sensibilise significativement les virions à la neutralisation par du sérum immun. Les résultats obtenus démontrent que gp180 cache plusieurs épitopes différents, présents sur gB, gH et gL, dont certains sont des épitopes sensibles à la neutralisation. Cette couverture, constituée notamment par un bouclier de O-glycans porté par gp180, assure donc une protection des épitopes vulnérables vis à vis de la neutralisation par les anticorps. Malgré des divergences importantes au niveau de la séquence peptidique, l'étroite conservation des sites de O-glycosylation chez tous les homologues de gp350 suggère que ce mécanisme d'immunoévasion est largement exploité au sein des gammaherpèsvirus.

## 3. **Le sérum humain neutralise l'herpèsvirus bovin 4 par un mécanisme inné dépendant des anticorps naturels.**

*Microbes and Infection*, (2007), 9, 1530-1537

Machiels B., Gillet L., Do Nascimento Brito S., Drion P., Delforge C., Nizet Y., Gianello P., Bona C., Costes B., Markine-Goriaynoff N. et Vanderplasschen A.

L'importance de l'exposition de l'homme au BoHV-4 et l'absence de prophylaxie à son encontre pourraient rendre possible une contamination humaine. Cependant, jusqu'à présent, aucun cas d'infection humaine par ce virus n'a été rapporté. Cette observation a suggéré l'existence d'une résistance naturelle de l'homme envers cette infection et a initié l'investigation d'une immunité innée envers le BoHV-4. Les résultats de cette étude ont mis en évidence une neutralisation efficace du BoHV-4 par le sérum humain, à l'inverse du sérum d'espèces animales variées. Le mécanisme de cette neutralisation dépend du complément et repose sur l'activation de la voie classique, par le biais d'Ac naturels dirigés contre l'épitope gal cellulaire. Une expérience complémentaire à cette étude a permis de révéler que la glycoprotéine virale, gp180, représentait le support majeur de ces épitopes gal au sein de la particule virale.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis d'une part, d'objectiver les contraintes qui s'opposent à une transmission du BoHV-4 à l'homme et d'autre part, de donner un exemple où la glycosylation des protéines virales ne constitue pas un avantage sélectif pour le virus mais est au contraire une cible pour les Ac neutralisants. Ainsi, les glycans qui constituent une base importante de l'évasion de la réponse humorale des gammaherpèsvirus, pourraient à l'inverse devenir la cible de stratégies vaccinales originales.

#### 4. L'épissage alternatif permet à un gammaherpèsvirus d'orienter son tropisme.

##### *En préparation*

Machiels B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. et Gillet L.

Les herpèsvirus ont un cycle biologique complexe qui peut avoir lieu au niveau de types cellulaires variés. Leur mécanisme d'entrée est élaboré et il implique différents récepteurs cellulaires ainsi que différentes glycoprotéines virales. Cette dernière étude a démontré que le BoHV-4 exploite l'épissage alternatif du gène Bo10 pour orienter le tropisme des virions néoformés. En effet, le transcrit épissé de Bo10 conduit à la formation de gp180 tandis que l'absence d'épissage induit la lecture d'un codon stop au niveau de l'intron. La traduction de ce transcrit non épissé pourrait générer une protéine tronquée ne disposant pas d'ancres transmembranaires. Des virions recombinants ne générant que l'un ou l'autre des transcrits ont démontré que seule gp180 est impliquée dans l'attachement aux GAGs cellulaires. Le gène homologue K8.1 du KSHV présente une organisation similaire suggérant que ce mécanisme d'expression pourrait être conservé au sein des rhadinovirus.

En conclusion, l'étude des produits d'expression du gène Bo10 du BoHV-4 a mis en évidence la complexité du mécanisme d'entrée des gammaherpèsvirus. Ce processus élaboré est probablement nécessaire pour protéger les épitopes vulnérables de la neutralisation par les Ac. Ce travail a aussi démontré l'importance de la O-glycosylation dans ce mécanisme et a suggéré une conservation de cette stratégie d'immunoévasion au sein de la sous famille des *gammaherpesvirinae*. Les résultats de cette thèse constituent les premières bases pour des perspectives tant fondamentales qu'appliquées.

The human gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV), are involved in several cancers. These viruses evolved to coexist with the host specific antibodies since they are able to induce reactivation and reexcretion in an immune carrier. Understanding precisely how they enter the target cells is crucial to improve their control and to design original vaccinal strategies. However, entry of gammaherpesviruses is a complex process that requires different cellular receptors and different viral glycoproteins. Among them, the EBV glycoprotein, gp350, binds to CD21 on B cells and is a target for antibodies that neutralize B cell infection. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) is a gammaherpesvirus that shares many common properties with EBV and KSHV. Thus, the Bo10 gene potentially encodes the EBV gp350 homologous protein. In order to further explore the relationship between gp350 or its homologs, host cells and antibodies, this work focused on the function of the BoHV-4 Bo10 gene in the biology of viral infection. The results obtained are presented in four studies.

**1. Bovine Herpesvirus-4 Bo10 gene encodes a non-essential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects**

*Journal of Virology*, (2011), 85 (2), 1011-1024

Machiels B., Lete C., de Fays K., Mast J., Dewals B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. and Gillet L.

This study demonstrated that the Bo10 gene encodes a 180 kDa product (gp180), which is incorporated in the virion envelope. This protein is not essential for viral replication but is involved in viral entry. Indeed, Bo10 deleted virus showed a growth deficit associated with a reduced binding to cellular glycosaminoglycans (GAGs). On the opposite, Bo10 deletion improves infection of GAG negative cells. These results suggest that gp180 regulates BoHV-4 tropism both positively and negatively depending upon the presence or absence of its receptor. This mechanism could be shared by the other gammaherpesviruses. We hypothesized that interaction with heparan sulfates of the cell surface displaces gp180 allowing the exposition of viral entry epitopes. A possible rationale for this arrangement would be for gp180 and its homologs to protect an otherwise vulnerable virion protein from antibody neutralization. This hypothesis has been investigated in a second study.

**2. Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield.**

Machiels B., Lété C., Guillaume A., Mast J., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. and Gillet L.

*Submitted for publication*

This study showed that a lack of gp180 has no impact on the establishment and maintenance of BoHV-4 latency, but markedly sensitizes virions to neutralization by immune sera. The results demonstrated that gp180 hides some different epitopes on gB, gH and gL, including epitopes targeted by neutralizing antibodies. It appeared that gp180 provides part of a

glycan shield for otherwise vulnerable viral epitopes and protects them from antibody neutralization. While these proteins are diverse in sequence, the conservation of O-glycosylation sites in all gp350 homologs suggests that this is a general evasion mechanism in the *gammaherpesvirinae* subfamily

### 3. « Natural antibody-complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum ».

*Microbes and Infection*, (2007), 9, 1530-1537

Machiels B., Gillet L., Do Nascimento Brito S., Drion P., Delforge C., Nizet Y., Gianello P., Bona C., Costes B., Markine-Goriaynoff N. and Vanderplasschen A.

The importance of human exposure to BoHV-4 and the lack of prophylactic scheme against this virus make human contamination possible. However, to date there is no reported case of human infection by BoHV-4. This observation raises the question of a natural human resistance against this virus. The results of this study highlighted an efficient neutralization of BoHV-4 by human serum, in contrast to sera of various animal species. The mechanism of this neutralization depends of the complement through activation of the classical pathway by natural antibodies raised against the cellular gal epitope. A supplemental experiment revealed that gp180 represents the main backbone for gal epitope exposition. The results of this study allowed us, on one hand, to objectivize the risk of BoHV-4 transmission to humans. On the other hand, this study illustrated a situation where glycosylation of viral proteins did not give a selective advantage to the virus but on the opposite, allowed neutralization. Therefore, glycans that represent a crucial strategy for evasion of antibody response by gammaherpesviruses, could also become the target of original vaccine approaches.

### 4. Alternative splicing switches tropism of a gammaherpesvirus.

*In preparation*

Machiels B., Stevenson P.G., Vanderplasschen A. and Gillet L.

Herpesviruses have complex lifecycles that involve infection of various cell types. Interestingly, some of them are able to route infection by the use of different cellular receptors and different viral glycoprotein complexes. In this study, we showed that BoHV-4 could use alternative splicing of the Bo10 gene to orientate tropism of progeny virions. Indeed, the spliced transcript of Bo10 produces gp180 while the absence of splicing leads to the reading of a stop codon in the intron. The traduction of this unspliced transcript could generate a truncated protein without transmembrane anchor. Although only gp180 is involved in attachment to cellular GAGs, the function of this truncated protein is not still defined. As a similar gene

organization is conserved in the KSHV K8.1 homologous gene, we hypothesized that a similar mechanism could be conserved in different rhadinoviruses.

In conclusion, the study of BoHV-4 Bo10 gene products highlighted the complexity of gammaherpesviruses entry mechanism. This elaborate process could be required to protect vulnerable epitopes from antibody neutralization. This work also demonstrated the importance of O-glycosylation in this mechanism and suggested that this immune evasion strategy is widespread within the *gammaherpesvirinae* subfamily. The results of this thesis give the first basis for fundamental and applied researches.

## Références bibliographiques

---



- Abdel-Motal, U., Wang, S., Lu, S., Wigglesworth, K. & Galili, U. (2006).** Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R epitopes. *Journal of virology* **80**, 6943-6951.
- Ackermann, M. (2004).** Herpesviruses: a brief overview. *Methods Mol Biol* **256**, 199-219.
- Ackermann, M. (2006).** Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* **113**, 211-222.
- Adler, H., Messerle, M. & Koszinowski, U. H. (2003).** Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol* **13**, 111-121.
- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M. & Koszinowski, U. H. (2000).** Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Journal of virology* **74**, 6964-6974.
- Aguilar, H. C., Matreyek, K. A., Filone, C. M., Hashimi, S. T., Levroney, E. L., Negrete, O. A., Bertolotti-Ciarlet, A., Choi, D. Y., McHardy, I., Fulcher, J. A., Su, S. V., Wolf, M. C., Kohatsu, L., Baum, L. G. & Lee, B. (2006).** N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *Journal of virology* **80**, 4878-4889.
- Akula, S. M., Pramod, N. P., Wang, F. Z. & Chandran, B. (2002).** Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell* **108**, 407-419.
- Ambroziak, J. A., Blackburn, D. J., Herndier, B. G., Glogau, R. G., Gullett, J. H., McDonald, A. R., Lennette, E. T. & Levy, J. A. (1995).** Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* **268**, 582-583.
- Andersson, J. (2000).** An Overview of Epstein-Barr Virus: from Discovery to Future Directions for Treatment and Prevention. *Herpes* **7**, 76-82.
- Anson, M. A., Benfield, D. A. & McAdaragh, J. P. (1982).** Bovine herpesvirus-5 (DN599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. *Can J Comp Med* **46**, 334-337.
- Asher, D. M. (1999).** Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand* **99**, 41-44.
- Astronomo, R. D. & Burton, D. R. (2010).** Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov* **9**, 308-324.
- Augsburger, H. R. & Metzler, A. E. (1989).** In vitro growth characteristics of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) as revealed by indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies and polyvalent antisera. *Arch Virol* **104**, 309-321.
- Avrameas, S. (1991).** Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* **12**, 154-159.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M. & Thorley-Lawson, D. A. (1998).** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**, 395-404.
- Backovic, M., DuBois, R. M., Cockburn, J. J., Sharff, A. J., Vaney, M. C., Granzow, H., Klupp, B. G., Bricogne, G., Mettenleiter, T. C. & Rey, F. A. (2010).** Structure of a core fragment of glycoprotein H from pseudorabies virus in complex with antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22635-22640.
- Backovic, M., Jardetzky, T. S. & Longnecker, R. (2007a).** Hydrophobic residues that form putative fusion loops of Epstein-Barr virus glycoprotein B are critical for fusion activity. *Journal of virology* **81**, 9596-9600.
- Backovic, M., Leser, G. P., Lamb, R. A., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2007b).** Characterization of EBV gB indicates properties of both class I and class II viral fusion proteins. *Virology* **368**, 102-113.
- Backovic, M., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2009).** Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2880-2885.
- Baeuerle, P. A. & Huttner, W. B. (1986).** Chlorate--a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* **141**, 870-877.
- Baghian, A., Luftig, M., Black, J. B., Meng, Y. X., Pau, C. P., Voss, T., Pellett, P. E. & Kousoulas, K. G. (2000).** Glycoprotein B of human herpesvirus 8 is a component of the

- virion in a cleaved form composed of amino- and carboxyl-terminal fragments. *Virology* **269**, 18-25.
- Ballestas, M. E., Chatis, P. A. & Kaye, K. M. (1999).** Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* **284**, 641-644.
- Ballestas, M. E. & Kaye, K. M. (2001).** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *Journal of virology* **75**, 3250-3258.
- Balzarini, J. (2005).** Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *Lancet Infect Dis* **5**, 726-731.
- Balzarini, J. (2007).** Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol* **5**, 583-597.
- Barahona, H. H., Meléndez, L. V., King, N. W., Daniel, M. D., Fraser, C. E. O. & Preville, A. C. (1973).** Herpesvirus aotus type 2: a new viral agent from owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Infect Dis* **127**, 171-178.
- Bartha, A., Fadol, A. M., Liebermann, H., Ludwig, H., Mohanty, S. B., Osorio, F. A., Reed, D. E., Storz, J., Straub, O. C., Van der Maaten, M. J. & et al. (1987).** Problems concerning the taxonomy of the 'Movar-type' bovine herpesviruses. *Intervirology* **28**, 1-7.
- Bartha, A., Juhász, M. & Liebermann, H. (1966).** Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet Acad Sci Hung* **16**, 357-358.
- Bartha, A., Juhász, M., Liebermann, H., Hantschel, H. & Schulze, P. (1967).** Isolation and properties of a bovine herpesvirus from a calf with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Arch Exp Veterinarmed* **21**, 615-623.
- Becker, Y. (2000).** Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes* **21**, 7-12.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.
- Bennett, N. J., May, J. S. & Stevenson, P. G. (2005).** Gamma-herpesvirus latency requires T cell evasion during episome maintenance. *PLoS Biol* **3**, e120.
- Bermudez-Cruz, R., Zhang, L. & van Santen, V. L. (1997).** Characterization of an abundant, unique 1.7-kilobase bovine herpesvirus 4 (BHV-4) late RNA and mapping of a BHV-4 IE2 transactivator-binding site in its promoter-regulatory region. *J Virol* **71**, 527-538.
- Bermudez-Cruz, R., Zhang, L. & van Santen, V. L. (1998).** Characterization of a bovine herpesvirus 4(BHV-4) 1.1-kb RNA and its transactivation by BHV-4 immediate-early 2 gene product. *Arch Virol* **143**, 2391-2412.
- Biller, M., Mardberg, K., Hassan, H., Clausen, H., Bolmstedt, A., Bergstrom, T. & Olofsson, S. (2000).** Early steps in O-linked glycosylation and clustered O-linked glycans of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C: effects on glycoprotein properties. *Glycobiology* **10**, 1259-1269.
- Birkmann, A., Mahr, K., Ensser, A., Yaguboglu, S., Titgemeyer, F., Fleckenstein, B. & Neipel, F. (2001).** Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *Journal of virology* **75**, 11583-11593.
- Blake, N. (2010).** Immune evasion by gammaherpesvirus genome maintenance proteins. *The Journal of general virology* **91**, 829-846.
- Blanken, W. M. & Van den Eijnden, D. H. (1985).** Biosynthesis of terminal Gal alpha 1----3Gal beta 1----4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1----3-galactosyltransferase from calf thymus. *J Biol Chem* **260**, 12927-12934.
- Blaskovic, D., Stancekova, M., Svobodova, J. & Mistrikova, J. (1980).** Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* **24**, 468.
- Boerner, B., Weigelt, W., Buhk, H. J., Castrucci, G. & Ludwig, H. (1999).** A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. *J Virol Methods* **83**, 169-180.

- Bona, C., Dewals, B., Wiggers, L., Coudijzer, K., Vanderplasschen, A. & Gillet, L. (2005).** Short communication: Pasteurization of milk abolishes bovine herpesvirus 4 infectivity. *J Dairy Sci* **88**, 3079-3083.
- Borchers, K., Brackmann, J. & Kershaw, O. (2002).** The mouse is not permissive for equine herpesvirus 2 (EHV-2), however viral DNA persisted in lung and spleen depending on the inoculation route. *Arch Virol* **147**, 1437-1444.
- Borchers, K., Frolich, K. & Ludwig, H. (1999).** Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch Virol* **144**, 771-780.
- Borza, C. M. & Hutt-Fletcher, L. M. (2002).** Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* **8**, 594-599.
- Boudry, C., Markine-Goriaynoff, N., Delforge, C., Springael, J. Y., de Leval, L., Drion, P., Russell, G., Haig, D. M., Vanderplasschen, A. F. & Dewals, B. (2007).** The A5 gene of alcelaphine herpesvirus 1 encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor that is non-essential for the induction of malignant catarrhal fever in rabbits. *The Journal of general virology* **88**, 3224-3233.
- Brandlein, S., Eck, M., Strobel, P., Wozniak, E., Muller-Hermelink, H. K., Hensel, F. & Vollmers, H. P. (2004).** PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum Antibodies* **13**, 97-104.
- Brandlein, S., Pohle, T., Ruoff, N., Wozniak, E., Muller-Hermelink, H. K. & Vollmers, H. P. (2003).** Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* **63**, 7995-8005.
- Bresnahan, W. A. & Shenk, T. (2000).** A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* **288**, 2373-2376.
- Britt, W. J. & Vugler, L. G. (1989).** Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **63**, 403-410.
- Broll, H., Buhk, H. J., Zimmermann, W. & Goltz, M. (1999a).** Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol* **80**, 979-986.
- Broll, H., Finsterbusch, T., Buhk, H. J. & Goltz, M. (1999b).** Genetic analysis of the bovine herpesvirus type 4 gene locus for the putative terminase. *Virus Genes* **19**, 243-250.
- Browne, H., Bell, S., Minson, T. & Wilson, D. W. (1996).** An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *Journal of virology* **70**, 4311-4316.
- Bublot, M., Dubuisson, J., Van Bresseem, M. F., Danyi, S., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1991a).** Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *The Journal of general virology* **72**, 715-719.
- Bublot, M., Lomonte, P., Lequarre, A. S., Albrecht, J. C., Nicholas, J., Fleckenstein, B., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1992).** Genetic relationships between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology* **190**, 654-665.
- Bublot, M., Van Bresseem, M. F., Thiry, E., Dubuisson, J. & Pastoret, P. P. (1990).** Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. *The Journal of general virology* **71** ( Pt 1), 133-142.
- Bublot, M., Wellemans, G., Van Bresseem, M. F., Dubuisson, J., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1991b).** Genomic diversity among bovine herpesvirus 4 field isolates. *Arch Virol* **116**, 1-18.
- Buisman, A. M., Abbink, F., Schepp, R. M., Sonsma, J. A., Herremans, T. & Kimman, T. G. (2008).** Preexisting poliovirus-specific IgA in the circulation correlates with protection against virus excretion in the elderly. *J Infect Dis* **197**, 698-706.
- Burnside, J., Bernberg, E., Anderson, A., Lu, C., Meyers, B. C., Green, P. J., Jain, N., Isaacs, G. & Morgan, R. W. (2006).** Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *Journal of virology* **80**, 8778-8786.
- Burton, D. R. (2002).** Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**, 706-713.
- Burton, D. R., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. (2005).** Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14943-14948.

- Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C. M., Damania, B. & Cullen, B. R. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5570-5575.
- Calderwood, M., White, R. E., Griffiths, R. A. & Whitehouse, A. (2005). Open reading frame 73 is required for herpesvirus saimiri A11-S4 episomal persistence. *The Journal of general virology* **86**, 2703-2708.
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., Bell, J. I., Rickinson, A. B. & McMichael, A. J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* **2**, 906-911.
- Cardin, R. D., Schaefer, G. C., Allen, J. R., Davis-Poynter, N. J. & Farrell, H. E. (2009). The M33 chemokine receptor homolog of murine cytomegalovirus exhibits a differential tissue-specific role during in vivo replication and latency. *Journal of virology* **83**, 7590-7601.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Cilli, V., Donelli, G., Ferrari, M., Chicchini, U. & Bordoni, E. (1986). A study of a herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **9**, 13-21.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Ferrari, M., Aldrovandi, V., Di Luca, D. & Gatti, R. (1988). Comparative study of two strains of Bovid herpesvirus-4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **11**, 143-151.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Ferrari, M., Cilli, V., Aldrovandi, V., Rampichini, L. & Gatti, R. (1987a). A study of the pathogenesis of bovid herpesvirus-4 in calves. *Zentralbl Veterinarmed [B]* **34**, 473-479.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Ferrari, M., Pedini, B., Aldrovandi, V., Cilli, V., Rampichini, L. & Gatti, R. (1987b). Reactivation in calves of latent infection by Bovid herpesvirus-4. *Microbiologica* **10**, 37-45.
- Cavirani, S., Allegri, G. & Flammini, C. F. (1990). Tipizzazione sierologica di stipiti di bovid herpesvirus-4 (BHV-4) isolati in corso di glossite ulcerativa cronica della bovina da latte e comportamento dell'infezione sperimentale. *Selezione Veterinaria* **31**, 1261-1269.
- Cavirani, S., Martelli, P., Cabassi, C. S., Lavazza, A., Allegri, G. & Flammini, C. F. (1996). Isolation of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) from dairy cows with digital dermatitis. *Proceedings of the XIX World buiatric Congress*, 121.
- Chandran, B. (2010). Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *Journal of virology* **84**, 2188-2199.
- Chandran, B., Bloomer, C., Chan, S. R., Zhu, L., Goldstein, E. & Horvat, R. (1998). Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology* **249**, 140-149.
- Chang, H., Wachtman, L. M., Pearson, C. B., Lee, J. S., Lee, H. R., Lee, S. H., Vieira, J., Mansfield, K. G. & Jung, J. U. (2009). Non-human primate model of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *PLoS pathogens* **5**, e1000606.
- Chang, L. Y. & Van Santen, V. L. (1992). Immediate-early, early, and late RNAs in bovine herpesvirus-4-infected cells. *Virology* **191**, 909-920.
- Chmielewicz, B., Goltz, M. & Ehlers, B. (2001). Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res* **75**, 87-94.
- Chmielewicz, B., Goltz, M., Franz, T., Bauer, C., Brema, S., Ellerbrok, H., Beckmann, S., Rziha, H. J., Lahrman, K. H., Romero, C. & Ehlers, B. (2003). A novel porcine gammaherpesvirus. *Virology* **308**, 317-329.
- Chowdary, T. K., Cairns, T. M., Atanasiu, D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. & Heldwein, E. E. (2010). Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 882-888.
- Cleary, M. L., Epstein, M. A., Finerty, S., Dorfman, R. F., Bornkamm, G. W., Kirkwood, J. K., Morgan, A. J. & Sklar, J. (1985). Individual tumors of multifocal EB virus-induced malignant lymphomas in tamarins arise from different B-cell clones. *Science* **228**, 722-724.
- Cole, N. L. & Grose, C. (2003). Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev Med Virol* **13**, 207-222.

- Collins, C. M., Medveczky, M. M., Lund, T. & Medveczky, P. G. (2002).** The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *The Journal of general virology* **83**, 2269-2278.
- Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S. & Longnecker, R. (2011).** Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* **9**, 369-381.
- Cox, C., Chang, S., Karran, L., Griffin, B. & Wedderburn, N. (1996).** Persistent Epstein-Barr virus infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *The Journal of general virology* **77** ( Pt 6), 1173-1180.
- Cox, C., Naylor, B. A., Mackett, M., Arrand, J. R., Griffin, B. E. & Wedderburn, N. (1998).** Immunization of common marmosets with Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340: effect on viral shedding following EBV challenge. *J Med Virol* **55**, 255-261.
- Czaplicki, G. & Thiry, E. (1998).** An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev Vet Med* **33**, 235-240.
- D'Addario, M., Libermann, T. A., Xu, J., Ahmad, A. & Menezes, J. (2001).** Epstein-Barr Virus and its glycoprotein-350 upregulate IL-6 in human B-lymphocytes via CD21, involving activation of NF-kappaB and different signaling pathways. *J Mol Biol* **308**, 501-514.
- Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J. P., Chiappino, I., Gillet, L., de Fays, K., Decrem, Y., Leboulle, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P. P., Gern, L., Sharp, P. M. & Vanderplasschen, A. (2007).** Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol*.
- Damania, B. & Desrosiers, R. C. (2001).** Simian homologues of human herpesvirus 8. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **356**, 535-543.
- Davis-Poynter, N., Bell, S., Minson, T. & Browne, H. (1994).** Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *Journal of virology* **68**, 7586-7590.
- Davison, A. J. (2002).** Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**, 69-88.
- Davison, A. J., Dargan, D. J. & Stow, N. D. (2002).** Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res* **56**, 1-11.
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J. & Thiry, E. (2009).** The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**, 171-177.
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R. M. & Renault, T. (2005).** A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *The Journal of general virology* **86**, 41-53.
- de-The, G., Dubouch, P., Fontaine, C., Wedderburn, N., Carter, R. L., Edwards, M. B. & Cohen, B. (1980).** Natural antibodies to EBV-VCA antigens in common marmosets (*Callithrix jacchus*) and response after EBV inoculation. *Intervirology* **14**, 284-291.
- de Lima, B. D., May, J. S., Marques, S., Simas, J. P. & Stevenson, P. G. (2005).** Murine gammaherpesvirus 68 bcl-2 homologue contributes to latency establishment in vivo. *The Journal of general virology* **86**, 31-40.
- de Lima, B. D., May, J. S. & Stevenson, P. G. (2004).** Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *Journal of virology* **78**, 5103-5112.
- de Sanjose, S., Mbisa, G., Perez-Alvarez, S., Benavente, Y., Sukvirach, S., Hieu, N. T., Shin, H. R., Anh, P. T., Thomas, J., Lazcano, E., Matos, E., Herrero, R., Munoz, N., Molano, M., Franceschi, S. & Whitby, D. (2009).** Geographic variation in the prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. *J Infect Dis* **199**, 1449-1456.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. & Hammerschmidt, W. (1998).** Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8245-8250.
- Delecluse, H. J., Kost, M., Feederle, R., Wilson, L. & Hammerschmidt, W. (2001).** Spontaneous activation of the lytic cycle in cells infected with a recombinant Kaposi's sarcoma-associated virus. *Journal of virology* **75**, 2921-2928.

- Dell, A. & Morris, H. R. (2001).** Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* **291**, 2351-2356.
- Desgranges, C. & de-The, G. (1978).** Presence of Epstein-Barr virus specific IgA in saliva of nasopharyngeal carcinoma patients: their activity, origin and possible clinical value. *IARC Sci Publ*, 459-469.
- Dewals, B., Boudry, C., Farnir, F., Drion, P. V. & Vanderplasschen, A. (2008).** Malignant catarrhal fever induced by alcelaphine herpesvirus 1 is associated with proliferation of CD8+ T cells supporting a latent infection. *PLoS ONE* **3**, e1627.
- Dewals, B., Boudry, C., Markine-Goriaynoff, N., Desmecht, D., Pastoret, P. P. & Vanderplasschen, A. (2003).** L'herpèsvirus alcélapin 1, l'agent responsable de la forme africaine du coryza gangreneux. *Ann Méd Vét* **147**, 373-386.
- Dewals, B., Gillet, L., Gerdes, T., Taracha, E. L., Thiry, E. & Vanderplasschen, A. (2005).** Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet Microbiol* **110**, 209-220.
- Dewals, B., Thirion, M., Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., de Fays, K., Minner, F., Daix, V., Sharp, P. M. & Vanderplasschen, A. (2006).** Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *The Journal of general virology* **87**, 1509-1519.
- Diehl, V., Henle, G., Henle, W. & Kohn, G. (1968).** Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *Journal of virology* **2**, 663-669.
- Dighiero, G., Lymberi, P., Guilbert, B., Ternynck, T. & Avrameas, S. (1986).** Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* **475**, 135-145.
- Dijkstra, J. M., Brack, A., Jons, A., Klupp, B. G. & Mettenleiter, T. C. (1998).** Different point mutations within the conserved N-glycosylation motif of pseudorabies virus glycoprotein M result in expression of a nonglycosylated form of the protein. *The Journal of general virology* **79** ( Pt 4), 851-854.
- Dijkstra, J. M., Visser, N., Mettenleiter, T. C. & Klupp, B. G. (1996).** Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *Journal of virology* **70**, 5684-5688.
- Dingwell, K. S., Brunetti, C. R., Hendricks, R. L., Tang, Q., Tang, M., Rainbow, A. J. & Johnson, D. C. (1994).** Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *Journal of virology* **68**, 834-845.
- 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.
- Dolnik, O., Volchkova, V., Garten, W., Carbonnelle, C., Becker, S., Kahnt, J., Stroher, U., Klenk, H. D. & Volchkov, V. (2004).** Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *Embo J* **23**, 2175-2184.
- Donofrio, G., Cavirani, S., Flammini, C. F. & Scatozza, F. (2000a).** Molecular typing of a BHV-4 (bovine herpesvirus 4) field isolate. *Vet Res Commun* **24**, 411-422.
- Donofrio, G., Cavirani, S., Simone, T. & van Santen, V. L. (2002).** Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector. *J Virol Methods* **101**, 49-61.
- Donofrio, G., Cavirani, S., van Santen, V. & Flammini, C. F. (2005).** Potential secondary pathogenic role for bovine herpesvirus 4. *J Clin Microbiol* **43**, 3421-3426.
- Donofrio, G., Cavirani, S. & van Santen, V. L. (2000b).** Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. *The Journal of general virology* **81**, 1807-1814.
- Donofrio, G., Flammini, C. F., Scatozza, F. & Cavirani, S. (2000c).** Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J Clin Microbiol* **38**, 4668-4671.
- Donofrio, G., Herath, S., Sartori, C., Cavirani, S., Flammini, C. F. & Sheldon, I. M. (2007).** Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* **134**, 183-197.

- Donofrio, G. & van Santen, V. L. (2001).** A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *The Journal of general virology* **82**, 1181-1185.
- Doores, K. J., Bonomelli, C., Harvey, D. J., Vasiljevic, S., Dwek, R. A., Burton, D. R., Crispin, M. & Scanlan, C. N. (2010a).** Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13800-13805.
- Doores, K. J., Fulton, Z., Hong, V., Patel, M. K., Scanlan, C. N., Wormald, M. R., Finn, M. G., Burton, D. R., Wilson, I. A. & Davis, B. G. (2010b).** A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17107-17112.
- Doores, K. J., Fulton, Z., Huber, M., Wilson, I. A. & Burton, D. R. (2010c).** Antibody 2G12 recognizes di-mannose equivalently in domain- and nondomain-exchanged forms but only binds the HIV-1 glycan shield if domain exchanged. *Journal of virology* **84**, 10690-10699.
- Dubin, G. & Jiang, H. (1995).** Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes. *Journal of virology* **69**, 4564-4568.
- Dubuisson, J., Boulanger, D., Bublot, M., Thiry, E. & Pastoret, P. P. (1989a).** Proteins specified by bovine herpesvirus type 4: structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* **70** ( Pt 7), 1743-1753.
- Dubuisson, J., Danyi, S., Bublot, M., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1991a).** Comparison of proteins of simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol* **72**, 1145-1150.
- Dubuisson, J., Guillaume, J., Boulanger, D., Thiry, E., Bublot, M. & Pastoret, P. P. (1990).** Neutralization of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J Gen Virol* **71**, 647-653.
- Dubuisson, J., Koromyslov, I., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1992a).** Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells: identification of a 135K glycoprotein involved in viral attachment. *The Journal of general virology* **73** ( Pt 1), 189-194.
- Dubuisson, J., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1991b).** Temporal control of bovine herpesvirus type 4 glycoprotein synthesis. *J Gen Virol* **72**, 1429-1434.
- Dubuisson, J., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1992b).** Identification and characterization of glycoprotein gp1 of bovine herpesvirus type 4. *The Journal of general virology* **73** ( Pt 5), 1293-1296.
- Dubuisson, J., Thiry, E., Bublot, M. & Pastoret, P.-P. (1987a).** Intervention du complément dans la neutralisation du Bovid herpesvirus 4. *Ann Med Vet* **131**, 69-73.
- Dubuisson, J., Thiry, E., Bublot, M., Sneyers, M., Boulanger, D., Guillaume, J. & Pastoret, P. P. (1989b).** Production and characterization of monoclonal antibodies to bovid herpesvirus-4. *Vet Microbiol* **19**, 305-315.
- Dubuisson, J., Thiry, E., Bublot, M., Thomas, I., van Bresse, M. F., Coignoul, F. & Pastoret, P. P. (1989c).** Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Vet Microbiol* **21**, 97-114.
- Dubuisson, J., Thiry, E., Thalasso, F., Bublot, M. & Pastoret, P. P. (1988).** Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains. *Vet Microbiol* **16**, 339-349.
- Dubuisson, J., Thiry, E., Thomas, I., Coignoul, F., Bublot, M., Van Heules, G., Dekegel, D. & Pastoret, P. P. (1987b).** Infection expérimentale de taureaux par injection intratesticulaire d'une souche de bovid herpesvirus 4 isolée d'un cas d'orchite. *Ann Méd Vét* **131**, 37-48.
- Dunowska, M., Letchworth, G. J., Collins, J. K. & DeMartini, J. C. (2001).** Ovine herpesvirus-2 glycoprotein B sequences from tissues of ruminant malignant catarrhal fever cases and healthy sheep are highly conserved. *The Journal of general virology* **82**, 2785-2790.
- Dunowska, M., Wilks, C. R., Studdert, M. J. & Meers, J. (2002).** Equine respiratory viruses in foals in New Zealand. *N Z Vet J* **50**, 140-147.
- Edwards, S. & Newman, R. H. (1985).** Detection of antibodies to bovid herpesvirus 4 by ELISA. *Vet Microbiol* **10**, 149-154.

- Egelhof, S., Bartha, A. & Magyar, G. (1991). The existence of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) in lions. In *Proceedings of the XVI International Herpesvirus Workshop*, p. 245. Pacific Groove, CA.
- Egyed, L. (1998). Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. *J Clin Microbiol* **36**, 2109-2111.
- Egyed, L. (2000). Bovine herpesvirus type 4: a special herpesvirus (review article). *Acta Vet Hung* **48**, 501-513.
- Egyed, L., Ballagi-Pordany, A., Bartha, A. & Belak, S. (1996). Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J Clin Microbiol* **34**, 1091-1095.
- Egyed, L. & Bartha, A. (1998). PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet Res Commun* **22**, 209-216.
- Egyed, L. & Baska, F. (2003). Histological lesions in vascular tissues of bovine herpes virus type 4-infected rabbits. *Vet Microbiol* **91**, 1-10.
- Egyed, L., Berencsi, G. & Bartha, A. (1999). Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **22**, 199-206.
- Egyed, L., Kluge, J. P. & Bartha, A. (1997). Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non-ruminant species. *Vet Microbiol* **57**, 283-289.
- Egyed, L., Sassi, G., Tibold, J., Madl, I. & Szenci, O. (2011). Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microb Pathog*.
- Ehlers, B., Buhk, H. J. & Ludwig, H. (1985). Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. *J Gen Virol* **66**, 55-68.
- Ensoli, B., Sgadari, C., Barillari, G., Sirianni, M. C., Sturzl, M. & Monini, P. (2001). Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* **37**, 1251-1269.
- Epstein, M. A., Morgan, A. J., Finerty, S., Randle, B. J. & Kirkwood, J. K. (1985). Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature* **318**, 287-289.
- Eugster, A. K. (1978/1979). Isolation of bovine herpesvirus III from diarrheic feces. *Vet Microbiol* **3**, 199-204.
- Evermann, J. F. & Henry, B. E. (1989). Herpetic infections of cattle: a comparison of bovine cytomegalovirus and bovine rhinotracheitis. *Comp, Food Animal* **11**, 205-215.
- Evermann, J. F., Mueller, G. M. & Dilbeck, P. M. (1985). Clinical and diagnostic implications of bovid herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus) infections. *Amer Assoc Vet Lab Diag Proc* **27**, 125-136.
- Fabian, K. & Egyed, L. (2004). Detection of bovine gammaherpesviruses by a nested duplex PCR. *J Virol Methods* **115**, 93-98.
- Fabian, K., Ivanics, R., Terenyi, M. & Egyed, L. (2005). Detection of bovine herpesvirus 4 in CD11b+ leukocytes of experimentally infected rabbits. *Acta Vet Hung* **53**, 265-273.
- Fabricant, C. G., Gillespie, J. H. & Krook, L. (1971a). Intracellular and extracellular mineral crystal formation induced by viral infection of cell cultures. *Infect Immun* **3**, 416-419.
- Fabricant, C. G., King, J. M., Gaskin, J. M. & Gillespie, J. H. (1971b). Isolation of a virus from a female cat with urolithiasis. *J Am Vet Med Assoc* **158**, 200-201.
- Falk, L., Deinhardt, F., Wolfe, L., Johnson, D., Hilgers, J. & de-The, G. (1976). Epstein-Barr virus: experimental infection of Callithrix jacchus marmosets. *Int J Cancer* **17**, 785-788.
- Favoreel, H. W., Van de Walle, G. R., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (2003). Virus complement evasion strategies. *The Journal of general virology* **84**, 1-15.
- Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Van de Walle, G. R., Ficinska, J. & Nauwynck, H. J. (2006). Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies. *Vet Microbiol* **113**, 257-263.
- Feederle, R., Linnstaedt, S. D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B. R. & Delecluse, H. J. (2011). A Viral microRNA Cluster Strongly Potentiates the Transforming Properties of a Human Herpesvirus. *PLoS pathogens* **7**, e1001294.
- Fejer, G., Medveczky, M. M., Horvath, E., Lane, B., Chang, Y. & Medveczky, P. G. (2003). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts



- preferentially with the terminal repeats of the genome in vivo and this complex is sufficient for episomal DNA replication. *The Journal of general virology* **84**, 1451-1462.
- Fickenscher, H. & Fleckenstein, B. (2001).** Herpesvirus saimiri. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **356**, 545-567.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. & Fearon, D. T. (1984).** Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4510-4514.
- Flano, E., Kim, I. J., Woodland, D. L. & Blackman, M. A. (2002).** Gamma-herpesvirus latency is preferentially maintained in splenic germinal center and memory B cells. *J Exp Med* **196**, 1363-1372.
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Enquist, L. W., Skalka, A. M. & Krug, R. M. (2000).** *Virology : molecular biology, pathogenesis, and control*. Washington, D. C.: ASM press.
- Fogg, M. H., Wirth, L. J., Posner, M. & Wang, F. (2009).** Decreased EBNA-1-specific CD8+ T cells in patients with Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3318-3323.
- Fowler, P., Marques, S., Simas, J. P. & Efstathiou, S. (2003).** ORF73 of murine herpesvirus-68 is critical for the establishment and maintenance of latency. *The Journal of general virology* **84**, 3405-3416.
- Francica, J. R., Varela-Rohena, A., Medvec, A., Plesa, G., Riley, J. L. & Bates, P. (2010).** Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS pathogens* **6**.
- Francois, S., Vidick, S., Sarlet, M., Michaux, J., Koteja, P., Desmecht, D., Stevenson, P. G., Vanderplasschen, A. & Gillet, L. (2010).** Comparative study of murid gammaherpesvirus 4 infection in mice and in a natural host, bank voles. *The Journal of general virology* **91**, 2553-2563.
- Frazier, K., Pence, M., Mauel, M. J., Liggett, A., Hines, M. E., 2nd, Sangster, L., Lehmkuhl, H. D., Miller, D., Styer, E., West, J. & Baldwin, C. A. (2001).** Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J Vet Diagn Invest* **13**, 502-508.
- Frazier, K. S., Baldwin, C. A., Pence, M., West, J., Bernard, J., Liggett, A., Miller, D. & Hines, M. E., 2nd (2002).** Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J Vet Diagn Invest* **14**, 457-462.
- Fuchs, P. G., Ruger, R., Pfister, H. & Fleckenstein, B. (1985).** Genome organization of herpesvirus aotus type 2. *J Virol* **53**, 13-18.
- Fukuda, M. (2002).** Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 394-405.
- Fullmer, J., Lindall, A., Bahn, R. & Mariash, C. N. (2005).** The possible contribution of anti-Gal to Graves' disease. *Thyroid* **15**, 1239-1243.
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Browne, H., Pedone, C. & Galdiero, M. (2005).** Fusogenic domains in herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Biol Chem* **280**, 28632-28643.
- Galdiero, S., Vitiello, M., D'Isanto, M., Falanga, A., Cantisani, M., Browne, H., Pedone, C. & Galdiero, M. (2008).** The identification and characterization of fusogenic domains in herpes virus glycoprotein B molecules. *Chembiochem* **9**, 758-767.
- Galili, U. (1993).** Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* **14**, 480-482.
- Galili, U., Clark, M. R., Shohet, S. B., Buehler, J. & Macher, B. A. (1987).** Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 1369-1373.
- Galili, U., Mandrell, R. E., Hamadeh, R. M., Shohet, S. B. & Griffiss, J. M. (1988a).** Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infection and immunity* **56**, 1730-1737.
- Galili, U., Shohet, S. B., Kobrin, E., Stults, C. L. & Macher, B. A. (1988b).** Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* **263**, 17755-17762.

- Galili, U., Wigglesworth, K. & Abdel-Motal, U. M. (2007).** Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces xenograft-like destruction and conversion of lesions into endogenous vaccines. *J Immunol* **178**, 4676-4687.
- Gao, J., Coulson, J. M., Whitehouse, A. & Blake, N. (2009).** Reduction in RNA levels rather than retardation of translation is responsible for the inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation by the glutamic acid-rich repeat of herpesvirus saimiri open reading frame 73. *Journal of virology* **83**, 273-282.
- Garber, D. A., Beverley, S. M. & Coen, D. M. (1993).** Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**, 459-462.
- Gianni, T., Martelli, P. L., Casadio, R. & Campadelli-Fiume, G. (2005).** The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane alpha-helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the herpesviridae family. *Journal of virology* **79**, 2931-2940.
- Gibbs, E. P. J. & Rweyemamu, M. M. (1977).** Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet Bull* **47**, 317-342.
- Gill, M. B., Edgar, R., May, J. S. & Stevenson, P. G. (2008).** A gamma-herpesvirus glycoprotein complex manipulates actin to promote viral spread. *PLoS One* **3**, e1808.
- Gill, M. B., Gillet, L., Colaco, S., May, J. S., de Lima, B. D. & Stevenson, P. G. (2006).** Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* **87**, 1465-1475.
- Gillet, L., Adler, H. & Stevenson, P. G. (2007a).** Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS ONE* **2**, e347.
- Gillet, L., Alenquer, M., Glauser, D. L., Colaco, S., May, J. S. & Stevenson, P. G. (2009a).** Glycoprotein L sets the neutralization profile of murine herpesvirus 4. *The Journal of general virology* **90**, 1202-1214.
- Gillet, L., Colaco, S. & Stevenson, P. G. (2008a).** The murine herpesvirus-4 gH/gL binds to glycosaminoglycans. *PLoS One* **3**, e1669.
- Gillet, L., Colaco, S. & Stevenson, P. G. (2008b).** The Murine Herpesvirus-4 gL regulates an entry-associated conformation change in gH. *PLoS One* **3**, e2811.
- Gillet, L., Daix, V., Donofrio, G., Wagner, M., Koszinowski, U. H., China, B., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N. & Vanderplasschen, A. (2005a).** Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *The Journal of general virology* **86**, 907-917.
- Gillet, L., Dewals, B., Farnir, F., de Leval, L. & Vanderplasschen, A. (2005b).** Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res* **65**, 9463-9472.
- Gillet, L., Gill, M. B., Colaco, S., Smith, C. M. & Stevenson, P. G. (2006).** Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein B presents a difficult neutralization target to monoclonal antibodies derived from infected mice. *The Journal of general virology* **87**, 3515-3527.
- Gillet, L., May, J. S., Colaco, S. & Stevenson, P. G. (2007b).** Glycoprotein L disruption reveals two functional forms of the murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein H. *Journal of virology* **81**, 280-291.
- Gillet, L., May, J. S., Colaco, S. & Stevenson, P. G. (2007c).** The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS ONE* **2**, e705.
- Gillet, L., May, J. S. & Stevenson, P. G. (2009b).** In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murine herpesvirus-4 infection. *The Journal of general virology* **90**, 602-613.
- Gillet, L., Minner, F., Detry, B., Farnir, F., Willems, L., Lambot, M., Thiry, E., Pastoret, P. P., Schynts, F. & Vanderplasschen, A. (2004).** Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Journal of virology* **78**, 2336-2347.
- Gillet, L., Schroeder, H., Mast, J., Thirion, M., Renaud, J. C., Dewals, B. & Vanderplasschen, A. (2009c).** Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Vet Res* **40**, 51.

- Gillet, L. & Stevenson, P. G. (2007a).** Antibody evasion by the N terminus of murid herpesvirus-4 glycoprotein B. *Embo J* **26**, 5131-5142.
- Gillet, L. & Stevenson, P. G. (2007b).** Evidence for a multiprotein gamma-2 herpesvirus entry complex. *Journal of virology* **81**, 13082-13091.
- Goltz, M., Broll, H., Mankertz, A., Weigelt, W., Ludwig, H., Buhk, H. J. & Borchers, K. (1994).** Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes* **9**, 53-59.
- Gorman, S., Harvey, N. L., Moro, D., Lloyd, M. L., Voigt, V., Smith, L. M., Lawson, M. A. & Shellam, G. R. (2006).** Mixed infection with multiple strains of murine cytomegalovirus occurs following simultaneous or sequential infection of immunocompetent mice. *The Journal of general virology* **87**, 1123-1132.
- Gottschalk, S., Heslop, H. E. & Roon, C. M. (2002).** Treatment of Epstein-Barr virus-associated malignancies with specific T cells. *Adv Cancer Res* **84**, 175-201.
- Goudsmit, J., Renwick, N., Dukers, N. H., Coutinho, R. A., Heisterkamp, S., Bakker, M., Schulz, T. F., Cornelissen, M. & Weverling, G. J. (2000).** Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam Cohort Studies (1984-1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4838-4843.
- Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. & Mettenleiter, T. C. (2001).** Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**, 3675-3684.
- Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B. G., Karger, A. & Mettenleiter, T. C. (1997).** Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* **71**, 2072-2082.
- Greco, A., Bausch, N., Coute, Y. & Diaz, J. J. (2000).** Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of host proteins whose synthesis is sustained or stimulated during the course of herpes simplex virus type 1 infection. *Electrophoresis* **21**, 2522-2530.
- Greensill, J., Sheldon, J. A., Murthy, K. K., Bessonette, J. S., Beer, B. E. & Schulz, T. F. (2000a).** A chimpanzee rhadinovirus sequence related to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8: increased detection after HIV-1 infection in the absence of disease. *Aids* **14**, F129-135.
- Greensill, J., Sheldon, J. A., Renwick, N. M., Beer, B. E., Norley, S., Goudsmit, J. & Schulz, T. F. (2000b).** Two distinct gamma-2 herpesviruses in African green monkeys: a second gamma-2 herpesvirus lineage among old world primates? *Journal of virology* **74**, 1572-1577.
- Griffin, B. E. & Karran, L. (1984).** Immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA. *Nature* **309**, 78-82.
- Griffiths, R., Harrison, S. M., Macnab, S. & Whitehouse, A. (2008).** Mapping the minimal regions within the ORF73 protein required for herpesvirus saimiri episomal persistence. *The Journal of general virology* **89**, 2843-2850.
- Grundhoff, A. & Ganem, D. (2003).** The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus permits replication of terminal repeat-containing plasmids. *Journal of virology* **77**, 2779-2783.
- Grundhoff, A. & Ganem, D. (2004).** Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* **113**, 124-136.
- Gu, S. Y., Huang, T. M., Ruan, L., Miao, Y. H., Lu, H., Chu, C. M., Motz, M. & Wolf, H. (1995).** First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand* **84**, 171-177.
- Gur, S. & Dogan, N. (2010).** The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim Sci J* **81**, 304-308.
- Habuchi, H., Habuchi, O. & Kimata, K. (2004).** Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj J* **21**, 47-52.
- Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C. C. & Thorley-Lawson, D. A. (2009).** The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS pathogens* **5**, e1000496.

- Hamadeh, R. M., Galili, U., Zhou, P. & Griffiss, J. M. (1995).** Anti-alpha-galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**, 125-131.
- Hammerschmidt, W. & Sugden, B. (1988).** Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**, 427-433.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996).** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
- Handley, J. A., Sargan, D. R., Herring, A. J. & Reid, H. W. (1995).** Identification of a region of the alcelaphine herpesvirus-1 genome associated with virulence for rabbits. *Vet Microbiol* **47**, 167-181.
- Hangartner, L., Zellweger, R. M., Giobbi, M., Weber, J., Eschli, B., McCoy, K. D., Harris, N., Recher, M., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (2006a).** Nonneutralizing antibodies binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread. *J Exp Med* **203**, 2033-2042.
- Hangartner, L., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (2006b).** Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* **6**, 231-243.
- Hayashi, S., Ogawa, S., Takashima, Y. & Otsuka, H. (2004).** The neutralization of pseudorabies virus by anti-alpha-galactosyl natural antibody in normal serum. *Virus Res* **99**, 1-7.
- Hayashi, S., Takashima, Y. & Otsuka, H. (2005).** Pseudorabies virus propagated in rabbit kidney-derived RK13 cells is neutralized by natural IgM antibodies in normal swine serum which specifically lyse host cells. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **67**, 229-234.
- Heldwein, E. E. & Krummenacher, C. (2008).** Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1653-1668.
- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. & Harrison, S. C. (2006).** Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* **313**, 217-220.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2001).** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C. I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G. & Dubuisson, J. (2010).** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *Journal of virology* **84**, 11905-11915.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G. W., Kirya, B. G., Klein, G., Morrow, R. H., Munube, G. M., Pike, P., Tukei, P. M. & Ziegler, J. L. (1969).** Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* **43**, 1147-1157.
- Herndier, B. & Ganem, D. (2001).** The biology of Kaposi's sarcoma. *Cancer Treat Res* **104**, 89-126.
- Herrold, R. E., Marchini, A., Fruehling, S. & Longnecker, R. (1996).** Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo. *Journal of virology* **70**, 2049-2054.
- Hewitt, E. W. (2003).** The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* **110**, 163-169.
- Hislop, A. D. & Sabbah, S. (2008).** CD8+ T cell immunity to Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Semin Cancer Biol* **18**, 416-422.
- Hoffman, G. J., Lazarowitz, S. G. & Hayward, S. D. (1980).** Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 2979-2983.
- Holloway, S. A., Studdert, M. J. & Drummer, H. E. (1998).** Characterization of glycoprotein B of the gammaherpesvirus equine herpesvirus-2. *The Journal of general virology* **79** ( Pt 7), 1619-1629.
- Holzerlandt, R., Orengo, C., Kellam, P. & Alba, M. M. (2002).** Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome. *Genome Res* **12**, 1739-1748.
- Honess, R. W. & Roizman, B. (1974).** Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of virology* **14**, 8-19.

- Honess, R. W. & Roizman, B. (1975).** Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 1276-1280.
- Hunt, R. D., Melendez, L. V., Garcia, F. G. & Trum, B. F. (1972).** Pathologic features of Herpesvirus ateles lymphoma in cotton-topped marmosets (*Saguinus oedipus*). *J Natl Cancer Inst* **49**, 1631-1639.
- Hutchinson, L., Browne, H., Wargent, V., Davis-Poynter, N., Primorac, S., Goldsmith, K., Minson, A. C. & Johnson, D. C. (1992).** A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *Journal of virology* **66**, 2240-2250.
- Hutt-Fletcher, L. M. (2007).** Epstein-Barr virus entry. *Journal of virology* **81**, 7825-7832.
- Hutt-Fletcher, L. M. & Chesnokova, L. S. (2010).** Integrins as triggers of Epstein-Barr virus fusion and epithelial cell infection. *Virulence* **1**, 395-398.
- Hyun, T. S., Subramanian, C., Cotter, M. A., 2nd, Thomas, R. A. & Robertson, E. S. (2001).** Latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with Tat and activates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 in human cells. *Journal of virology* **75**, 8761-8771.
- I.A.R.C. (1997).** Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. *International agency for research on cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon.
- Imai, S., Nishikawa, J. & Takada, K. (1998).** Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *Journal of virology* **72**, 4371-4378.
- Ito, H., Watanabe, S., Takada, A. & Kawaoka, Y. (2001).** Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of virology* **75**, 1576-1580.
- Jacob, R. J., Morse, L. S. & Roizman, B. (1979).** 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. *Journal of virology* **29**, 448-457.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. & Delecluse, H. J. (2000).** Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *Journal of virology* **74**, 10142-10152.
- Jayasekera, J. P., Moseman, E. A. & Carroll, M. C. (2007).** Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *Journal of virology* **81**, 3487-3494.
- Jenson, H. B., Ench, Y., Gao, S. J., Rice, K., Carey, D., Kennedy, R. C., Arrand, J. R. & Mackett, M. (2000).** Epidemiology of herpesvirus papio infection in a large captive baboon colony: similarities to Epstein-Barr virus infection in humans. *J Infect Dis* **181**, 1462-1466.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16286-16291.
- Johnson, W. E. & Desrosiers, R. C. (2002).** Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* **53**, 499-518.
- Jones, C. (2003).** Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* **16**, 79-95.
- Jones, P. C. & Roizman, B. (1979).** Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol* **31**, 299-314.
- Jons, A., Dijkstra, J. M. & Mettenleiter, T. C. (1998).** Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol* **72**, 550-557.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. (2005).** Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-164.

- Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N. G., Stuart, D. I. & Jones, I. M. (2008).** The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1024-1030.
- Kalman, D., Janosi, S. & Egyed, L. (2004).** Role of bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. *Microb Pathog* **37**, 125-129.
- Kaminjolo, J. S., Muger, G. M. & Rosted, A. F. (1972).** Isolation of a Herpes-type Virus from some Tumours of Bovine Origin. *Zentralbl Veterinarmed B* **19**, 626-632.
- Kapoor, P. & Frappier, L. (2005).** Methods for measuring the replication and segregation of Epstein-Barr virus-based plasmids. *Methods Mol Biol* **292**, 247-266.
- Karger, A., Schmidt, U. & Buchholz, U. J. (2001).** Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *The Journal of general virology* **82**, 631-640.
- Katano, H., Iwasaki, T., Baba, N., Terai, M., Mori, S., Iwamoto, A., Kurata, T. & Sata, T. (2000a).** Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *Journal of virology* **74**, 3478-3485.
- Katano, H., Sato, Y., Kurata, T., Mori, S. & Sata, T. (2000b).** Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* **269**, 335-344.
- Kendrick, J. W., Osburn, B. I. & Kronlund, N. (1976).** Pathogenicity studies of a bovine herpesvirus. *Theriogenology* **6**, 447-462.
- Khanna, R., Bell, S., Sherritt, M., Galbraith, A., Burrows, S. R., Rafter, L., Clarke, B., Slaughter, R., Falk, M. C., Douglass, J., Williams, T., Elliott, S. L. & Moss, D. J. (1999a).** Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10391-10396.
- Khanna, R., Moss, D. J. & Burrows, S. R. (1999b).** Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev* **170**, 49-64.
- Khanna, R., Sherritt, M. & Burrows, S. R. (1999c).** EBV structural antigens, gp350 and gp85, as targets for ex vivo virus-specific CTL during acute infectious mononucleosis: potential use of gp350/gp85 CTL epitopes for vaccine design. *J Immunol* **162**, 3063-3069.
- Kim, K. M. & Kopelman, R. I. (2005).** Medical mystery: abdominal pain--the answer. *N Engl J Med* **353**, 1421-1422; discussion 1421-1422.
- Kinzler, E. R. & Compton, T. (2005).** Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *Journal of virology* **79**, 7827-7837.
- Kirschner, A. N., Omerovic, J., Popov, B., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2006).** Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL, and gp42 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not in epithelial cell fusion. *Journal of virology* **80**, 9444-9454.
- Kirschner, A. N., Sorem, J., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2009).** Structure of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 suggests a mechanism for triggering receptor-activated virus entry. *Structure* **17**, 223-233.
- Kit, S., Kit, M., Ichimura, H., Crandell, R. & McConnell, S. (1986).** Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res* **4**, 197-212.
- Knossow, M. & Skehel, J. J. (2006).** Variation and infectivity neutralization in influenza. *Immunology* **119**, 1-7.
- Kokles, R. & Pellinghoff, B. (1987).** Zur charakterisierung von Bovinen Herpes-Orphan-Virusisolaten. *Monat Vet Med* **42**, 505-509.
- Kolset, S. O. (1987).** Proteoglycans in normal and neoplastic monocytes. *Exp Cell Res* **168**, 318-324.
- Komatsu, T., Barbera, A. J., Ballestas, M. E. & Kaye, K. M. (2001).** The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Viral Immunol* **14**, 311-317.

- Kopp, A., Blewett, E., Misra, V. & Mettenleiter, T. C. (1994).** Proteolytic cleavage of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or pseudorabies virus. *Journal of virology* **68**, 1667-1674.
- Koyano, S., Mar, E. C., Stamey, F. R. & Inoue, N. (2003).** Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *The Journal of general virology* **84**, 1485-1491.
- Krogman, L. A. & McAdaragh, J. P. (1982).** Recrudescence of bovine herpesvirus-5 in experimentally infected calves. *Am J Vet Res* **43**, 336-338.
- Kruger, J. M., Osborne, C. A., Goyal, S. M., Pomeroy, K. A. & O'Brien, T. D. (1990).** Clinicopathologic and pathologic findings of herpesvirus-induced urinary tract infection in conventionally reared cats. *Am J Vet Res* **51**, 1649-1655.
- Krzyzaniak, M., Mach, M. & Britt, W. J. (2007).** The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication. *Journal of virology* **81**, 10316-10328.
- Kwun, H. J., da Silva, S. R., Shah, I. M., Blake, N., Moore, P. S. & Chang, Y. (2007).** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mimics Epstein-Barr virus EBNA1 immune evasion through central repeat domain effects on protein processing. *Journal of virology* **81**, 8225-8235.
- Lacoste, V., Mauclore, P., Dubreuil, G., Lewis, J., Georges-Courbot, M. C. & Gessain, A. (2000a).** KSHV-like herpesviruses in chimps and gorillas. *Nature* **407**, 151-152.
- Lacoste, V., Mauclore, P., Dubreuil, G., Lewis, J., Georges-Courbot, M. C. & Gessain, A. (2001).** A novel gamma 2-herpesvirus of the Rhadinovirus 2 lineage in chimpanzees. *Genome Res* **11**, 1511-1519.
- Lacoste, V., Mauclore, P., Dubreuil, G., Lewis, J., Georges-Courbot, M. C., Rigoulet, J., Petit, T. & Gessain, A. (2000b).** Simian homologues of human gamma-2 and betaherpesviruses in mandrill and drill monkeys. *Journal of virology* **74**, 11993-11999.
- Lake, C. M., Molesworth, S. J. & Hutt-Fletcher, L. M. (1998).** The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J Virol* **72**, 5559-5564.
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D. B., Zucchini, S., Manservigi, R. & Glorioso, J. C. (1998).** 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. *Journal of virology* **72**, 6119-6130.
- Lavine, J. S., Poss, M. & Grenfell, B. T. (2008).** Directly transmitted viral diseases: modeling the dynamics of transmission. *Trends Microbiol* **16**, 165-172.
- Lee, J. E., Fusco, M. L., Hessel, A. J., Oswald, W. B., Burton, D. R. & Saphire, E. O. (2008).** Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* **454**, 177-182.
- Lee, J. E. & Saphire, E. O. (2009).** Neutralizing ebolavirus: structural insights into the envelope glycoprotein and antibodies targeted against it. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 408-417.
- Lee, M. A., Diamond, M. E. & Yates, J. L. (1999).** Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **73**, 2974-2982.
- Lee, S. H., Yu, S. Y., Nakayama, J., Khoo, K. H., Stone, E. L., Fukuda, M. N., Marth, J. D. & Fukuda, M. (2010).** Core2 O-glycan structure is essential for the cell surface expression of sucrase isomaltase and dipeptidyl peptidase-IV during intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* **285**, 37683-37692.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G. & Masucci, M. G. (1995).** Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & Masucci, M. G. (1997).** Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12616-12621.

- Li, M., MacKey, J., Czajak, S. C., Desrosiers, R. C., Lackner, A. A. & Jung, J. U. (1999).** Identification and characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 virion glycoprotein. *Journal of virology* **73**, 1341-1349.
- Liebermann, H., Schulze, P., Kokles, R. & Hantschel, H. (1967).** Isolation and identification of another new bovine herpesvirus. *Arch Exp Veterinarmed* **21**, 761-776.
- Lin, T. M., Jiang, M. J., Eng, H. L., Shi, G. Y., Lai, L. C., Huang, B. J., Huang, K. Y. & Wu, H. L. (2000).** Experimental infection with bovine herpesvirus-4 enhances atherosclerotic process in rabbits. *Lab Invest* **80**, 3-11.
- Lin, T. M., Shi, G. Y., Jiang, S. J., Tsai, C. F., Hwang, B. J., Hsieh, C. T. & Wu, H. L. (1999).** Persistent infection of bovine herpesvirus type 4 in bovine endothelial cell cultures. *Vet Microbiol* **70**, 41-53.
- Lin, T. M., Shi, G. Y., Tsai, C. F., Su, H. J., Guo, Y. L. & Wu, H. L. (1997).** Susceptibility of endothelial cells to bovine herpesvirus type 4 (BHV-4). *J Virol Methods* **63**, 219-225.
- Lomonte, P., Bublot, M., van Santen, V., Keil, G., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1996).** Bovine herpesvirus 4: genomic organization and relationship with two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Vet Microbiol* **53**, 79-89.
- Lomonte, P., Bublot, M., van Santen, V., Keil, G. M., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1995).** Analysis of bovine herpesvirus 4 genomic regions located outside the conserved gammaherpesvirus gene blocks. *J Gen Virol* **76**, 1835-1841.
- Lomonte, P., Filee, P., Lyaku, J. R., Bublot, M., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1997a).** Analysis of the biochemical properties of, and complex formation between, glycoproteins H and L of the gamma2 herpesvirus bovine herpesvirus-4. *The Journal of general virology* **78 ( Pt 8)**, 2015-2023.
- Lomonte, P., Filee, P., Lyaku, J. R., Bublot, M., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1997b).** Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. *Journal of virology* **71**, 3332-3335.
- Lopez, O. J., Galeota, J. A. & Osorio, F. A. (1996).** Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle. *Microb Pathog* **21**, 47-58.
- Lu, F., Weidmer, A., Liu, C. G., Volinia, S., Croce, C. M. & Lieberman, P. M. (2008).** Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *Journal of virology* **82**, 10436-10443.
- Luini, M., Fabbi, M. & Cervio, G. (1985).** Isolamento di un herpesvirus da lesioni erosive linguali del bovino. *Estratto sel Vet* **26**, 1131-1133.
- Luini, M. & Fioni, E. (1986a).** Frequency of bovid-herpesvirus-4 (BHV 4) infection in cattle in Lombardia and Emilia Romagna. *Abstract, Atti della Società Italiana di Buiatria, Vol XVIII*, 329-339.
- Luini, M. & Fioni, E. (1986b).** Frequency of bovid-herpesvirus-4 (BHV 4) infection in cattle in some regions of Northern Italy. *9th International Symposium of WAVMI*, 40.
- Luna, R. E., Zhou, F., Baghian, A., Chouljenko, V., Forghani, B., Gao, S. J. & Kousoulas, K. G. (2004).** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein K8.1 is dispensable for virus entry. *Journal of virology* **78**, 6389-6398.
- Lundstrom, M., Jeansson, S. & Olofsson, S. (1987).** Host cell-induced differences in the O-glycosylation of herpes simplex virus gC-1. II. Demonstration of cell-specific galactosyltransferase essential for formation of O-linked oligosaccharides. *Virology* **161**, 395-402.
- Luther, P. D., Bradley, P. G. & Haig, D. A. (1971).** The isolation and characterization of a herpesvirus from calf kidney cell cultures. *Res Vet Sci* **12**, 496-498.
- Mach, M., Kropff, B., Kryzaniak, M. & Britt, W. (2005).** Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *Journal of virology* **79**, 2160-2170.
- Machiels, B., Gillet, L., Nascimento Brito, S. D., Drion, P., Delforge, C., Nizet, Y., Gianello, P., Bona, C., Costes, B., Markine-Goriaynoff, N. & Vanderplasschen, A. (2007).** Natural antibody-complement dependent neutralization of bovine herpesvirus 4 by human serum. *Microbes Infect* **9**, 1530-1537.



- Machiels B, L. C., Guillaume A, Mast J, Dewals B, Vanderplasschen A, Gillet L (2011).** Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield. *Submitted for publication.*
- Machiels, B., Lete, C., de Fays, K., Mast, J., Dewals, B., Stevenson, P. G., Vanderplasschen, A. & Gillet, L. (2011).** The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *Journal of virology* **85**, 1011-1024.
- Mackett, M., Cox, C., Pepper, S. D., Lees, J. F., Naylor, B. A., Wedderburn, N. & Arrand, J. R. (1996).** Immunisation of common marmosets with vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus (EBV) gp340 and challenge with EBV. *J Med Virol* **50**, 263-271.
- MacLean, C. A., Robertson, L. M. & Jamieson, F. E. (1993).** Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *The Journal of general virology* **74 ( Pt 6)**, 975-983.
- Majerciak, V., Pripuzova, N., McCoy, J. P., Gao, S. J. & Zheng, Z. M. (2007).** Targeted disruption of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 in the viral genome is detrimental for the expression of ORF59, K8alpha, and K8.1 and the production of infectious virus. *Journal of virology* **81**, 1062-1071.
- Majerciak, V., Yamanegi, K., Allemand, E., Kruhlak, M., Krainer, A. R. & Zheng, Z. M. (2008).** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 functions as a viral splicing factor and promotes expression of intron-containing viral lytic genes in spliceosome-mediated RNA splicing. *Journal of virology* **82**, 2792-2801.
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. & Plummer, T. H., Jr. (1989).** Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* **180**, 195-204.
- Malope, B. I., MacPhail, P., Mbisa, G., MacPhail, C., Stein, L., Ratshikhopha, E. M., Ndhlovu, L., Sitas, F. & Whitby, D. (2008).** No evidence of sexual transmission of Kaposi's sarcoma herpes virus in a heterosexual South African population. *Aids* **22**, 519-526.
- Manicassamy, B., Wang, J., Jiang, H. & Rong, L. (2005).** Comprehensive analysis of ebola virus GPI in viral entry. *Journal of virology* **79**, 4793-4805.
- Mansfield, K. G., Westmoreland, S. V., DeBakker, C. D., Czajak, S., Lackner, A. A. & Desrosiers, R. C. (1999).** Experimental infection of rhesus and pig-tailed macaques with macaque rhadinoviruses. *Journal of virology* **73**, 10320-10328.
- Mardberg, K., Nystrom, K., Tarp, M. A., Trybala, E., Clausen, H., Bergstrom, T. & Olofsson, S. (2004).** Basic amino acids as modulators of an O-linked glycosylation signal of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC: functional roles in viral infectivity. *Glycobiology* **14**, 571-581.
- Mare, J. & Van Resenburg, S. J. (1961).** The isolation of viruses associated with infertility in cattle: a preliminary report. *J S Afr Vet Med Ass* **32**, 201-210.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. & Nicolas, J. C. (1999).** Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *Journal of virology* **73**, 4385-4392.
- Markine-Goriaynoff, N. (2001).** Etude du gène Bo17 de l'herpèsvirus bovin 4. In *Département des maladies infectieuses et parasitaires*, p. 80. Liège: Université de Liège.
- Markine-Goriaynoff, N., Georgin, J. P., Goltz, M., Zimmermann, W., Broll, H., Wamwayi, H. M., Pastoret, P. P., Sharp, P. M. & Vanderplasschen, A. (2003a).** The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J Virol* **77**, 1784-1792.
- Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Karlsen, O. A., Haarr, L., Minner, F., Pastoret, P. P., Fukuda, M. & Vanderplasschen, A. (2004a).** The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. *The Journal of general virology* **85**, 355-367.
- Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Van Etten, J. L., Korres, H., Verma, N. & Vanderplasschen, A. (2004b).** Glycosyltransferases encoded by viruses. *The Journal of general virology* **85**, 2741-2754.

- Markine-Goriaynoff, N., Minner, F., De Fays, K., Gillet, L., Thiry, E., Pastoret, P. P. & Vanderplasschen, A. (2003b). Bovine herpesvirus 4. *Annales De Medecine Veterinaire* **147**, 215-247.
- Marques, S., Efsthathiou, S., Smith, K. G., Haury, M. & Simas, J. P. (2003). Selective gene expression of latent murine gammaherpesvirus 68 in B lymphocytes. *Journal of virology* **77**, 7308-7318.
- Marsh, M. & Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-740.
- Marth, J. D. (1996). Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* **6**, 701-705.
- Martin, J. N., Ganem, D. E., Osmond, D. H., Page-Shafer, K. A., Macrae, D. & Kedes, D. H. (1998). Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* **338**, 948-954.
- Maruo, S., Yang, L. & Takada, K. (2001). Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *The Journal of general virology* **82**, 2373-2383.
- Masse, M. J., Jons, A., Dijkstra, J. M., Mettenleiter, T. C. & Flamand, A. (1999). Glycoproteins gM and gN of pseudorabies virus are dispensable for viral penetration and propagation in the nervous systems of adult mice. *J Virol* **73**, 10503-10507.
- Mast, J., Nanbru, C., van den Berg, T. & Meulemans, G. (2005). Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Vet Pathol* **42**, 559-565.
- Matsuura, H., Kirschner, A. N., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2010). Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22641-22646.
- May, J. S., Smith, C. M., Gill, M. B. & Stevenson, P. G. (2008). An essential role for the proximal but not the distal cytoplasmic tail of glycoprotein M in murid herpesvirus 4 infection. *PLoS One* **3**, e2131.
- May, J. S., Walker, J., Colaco, S. & Stevenson, P. G. (2005). The murine gammaherpesvirus 68 ORF27 gene product contributes to intercellular viral spread. *Journal of virology* **79**, 5059-5068.
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E. & Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**, 443-458.
- McGeoch, D. J., Dolan, A. & Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of virology* **74**, 10401-10406.
- McGeoch, D. J., Gatherer, D. & Dolan, A. (2005). On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae. *The Journal of general virology* **86**, 307-316.
- McKane, B. W., Ramachandran, S., Yang, J., Xu, X. C. & Mohanakumar, T. (2003). Xenoreactive anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal antibodies prevent porcine endogenous retrovirus infection of human in vivo. *Hum Immunol* **64**, 708-717.
- McShane, M. P. & Longnecker, R. (2004). Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17474-17479.
- Means, R. E. (2004). Characterization of the Herpesvirus saimiri Orf51 protein. *Virology* **326**, 67-78.
- Means, R. E., Sabine M. Lang, and Jae U. Jung (2007). *Human herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Meersschaert, C., Thiry, E. & Pastoret, P.-P. (1988). Epizootiologie des infections à herpèsvirus chez les ruminants sauvages. II. Les virus de la thélite herpétique bovine et du coryza gangréneux et les autres herpèsvirus isolés des ruminants. *Revue Elev Méd Vét Pays trop* **41**, 235-242.
- Mehedi, M., Falzarano, D., Seebach, J., Hu, X., Carpenter, M. S., Schnittler, H. J. & Feldmann, H. (2011). A New Ebola Virus Nonstructural Glycoprotein Expressed Through RNA Editing. *Journal of virology*.
- Mesri, E. A., Cesarman, E. & Boshoff, C. (2010). Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* **10**, 707-719.

- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14759-14763.
- Mettenleiter, T. C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**, 167-180.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. & Granzow, H. (2009). Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**, 222-234.
- Mettenleiter, T. C. & Minson, T. (2006). Egress of alphaherpesviruses. *Journal of virology* **80**, 1610-1611; author reply 1611-1612.
- Metzler, A. E. & Burri, H. R. (1990). [The etiology and epidemiology of malignant catarrh--a review]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **132**, 161-172.
- Metzler, A. E., Ossent, P., Guscetti, F., Rubel, A. & Lang, E. M. (1990). Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Wildl Dis* **26**, 41-49.
- Metzler, A. E. & Wyler, R. (1986). Prevalence of bovine herpesvirus 4 in the Swiss cattle population and possible serologic cross reaction with bovine herpesvirus 1 (IBR/IPV virus). *Schweiz Arch Tierheilkd* **128**, 459-467.
- Milland, J., Christiansen, D., Lazarus, B. D., Taylor, S. G., Xing, P. X. & Sandrin, M. S. (2006). The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol* **176**, 2448-2454.
- Miller, G., Heston, L. & Hoffman, G. (1982). Neutralization of lymphocyte immortalization by different strains of Epstein-Barr virus with a murine monoclonal antibody. *Infection and immunity* **37**, 1028-1031.
- Miller, G., Niederman, J. C. & Stitt, D. A. (1972). Infectious mononucleosis: appearance of neutralizing antibody to Epstein-Barr virus measured by inhibition of formation of lymphoblastoid cell lines. *J Infect Dis* **125**, 403-406.
- Miller, N. & Hutt-Fletcher, L. M. (1988). A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **62**, 2366-2372.
- Minson, A. C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., McGeoch, D. J., Pellet, P. E., Roizman, B. & Studdert, D. M. (2000). Family Herpesvirus in Virus taxonomy. , pp. 203-225. Edited by C. M. F. M. H. V. van Regenmortel, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. London: Academic Press.
- Miyano, H., Haritani, M., Sentsui, H., Tsuboi, T., Tanimura, N., Kimura, K. M., Kobayashi, M., Obara, N. & Akimoto, Y. (2004). Mammary lesions associated with bovine herpesvirus type 4 in a cow with clinical mastitis. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **66**, 457-460.
- Mohanty, S. B., Hammond, R. C. & Lillie, M. G. (1971). A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch Gesamt Virusforsch* **34**, 394-395.
- Mohanty, S. B., Lillie, M. G., Ingling, A. L. & Hammond, R. C. (1972). Effects of an experimentally induced herpesvirus infection in calves. *J Am Vet Med Assoc* **161**, 1008-1011.
- Molesworth, S. J., Lake, C. M., Borza, C. M., Turk, S. M. & Hutt-Fletcher, L. M. (2000). Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *Journal of virology* **74**, 6324-6332.
- Monge, A., Elvira, L., Gonzalez, J. V., Astiz, S. & Wellenberg, G. J. (2006). Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci* **80**, 120-125.
- Moreno-Lopez, J., Goltz, M., Reh binder, C., Valsala, K. V. & Ludwig, H. (1989). A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentralbl Veterinarmed [B]* **36**, 481-486.
- Morgan, A. J. & Khanna, R. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mori, Y. (2009). Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cellular microbiology* **11**, 1001-1006.
- Moutschen, M., Leonard, P., Sokal, E. M., Smets, F., Haumont, M., Mazzu, P., Bollen, A., Denamur, F., Peeters, P., Dubin, G. & Denis, M. (2007). Phase I/II studies to evaluate

- safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* **25**, 4697-4705.
- Mullen, M. M., Haan, K. M., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. (2002).** Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol Cell* **9**, 375-385.
- Mushi, E. Z. & Rurangirwa, F. R. (1981).** Epidemiology of bovine malignant catarrhal fevers, a review. *Vet Res Commun* **5**, 127-142.
- Muylkens, B., Farnir, F., Meurens, F., Schynts, F., Vanderplasschen, A., Georges, M. & Thiry, E. (2009).** Coinfection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference. *Journal of virology* **83**, 3127-3137.
- Naeem, K., Caywood, D. D., Goyal, S. M., Werdin, R. E. & Murtaugh, M. P. (1991a).** Variation in the pathogenic potential and molecular characteristics of bovid herpesvirus-4 isolates. *Vet Microbiol* **27**, 1-18.
- Naeem, K., Caywood, D. D., Goyal, S. M., Werdin, R. E. & Murtaugh, M. P. (1993).** Persistence of bovid herpesvirus-4 in experimentally inoculated pregnant rabbits. *New Microbiol* **16**, 87-93.
- Naeem, K., Caywood, D. D., Werdin, R. E. & Goyal, S. M. (1990).** Evaluation of pregnant rabbits as a laboratory model for bovid herpesvirus-4 infection. *Am J Vet Res* **51**, 640-644.
- Naeem, K., Murtaugh, M. P. & Goyal, S. M. (1991b).** Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Virol* **119**, 239-255.
- Nakane, T., Hara, T., Saika, K., Hirose, O. & Kazama, T. (2000).** Isolation of bovine herpesvirus type 4 from the spinal cord of a cow. *Abstract of the 129th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science*.
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K. & Takada, K. (2002).** Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *Embo J* **21**, 954-965.
- Nash, A. A., Dutia, B. M., Stewart, J. P. & Davison, A. J. (2001).** Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **356**, 569-579.
- Neipel, F., Albrecht, J. C. & Fleckenstein, B. (1998).** Human herpesvirus 8--the first human Rhadinovirus. *J Natl Cancer Inst Monogr* **23**, 73-77.
- Nemerow, G. R. & Cooper, N. R. (1984).** Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* **132**, 186-198.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V. & Cooper, N. R. (1987).** Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of virology* **61**, 1416-1420.
- Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E. & Cooper, N. R. (1985).** Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *Journal of virology* **55**, 347-351.
- Nicholas, J. (2000).** Evolutionary aspects of oncogenic herpesviruses. *Mol Pathol* **53**, 222-237.
- Niederman, J. C., Miller, G., Pearson, H. A., Pagano, J. S. & Dowaliby, J. M. (1976).** Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* **294**, 1355-1359.
- Nikolin, V. M., Donofrio, G., Milosevic, B., Taddei, S., Radosavljevic, V. & Milicevic, V. (2007).** First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. *New Microbiol* **30**, 53-57.
- Niller, H. H., Wolf, H. & Minarovits, J. (2010).** Viral hit and run-oncogenesis: Genetic and epigenetic scenarios. *Cancer Lett*.
- North, J. R., Morgan, A. J., Thompson, J. L. & Epstein, M. A. (1982).** Purified Epstein-Barr virus Mr 340,000 glycoprotein induces potent virus-neutralizing antibodies when incorporated in liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 7504-7508.
- Oda, T., Imai, S., Chiba, S. & Takada, K. (2000).** Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology* **276**, 52-58.

- Ogra, P. L., Karzon, D. T., Righthand, F. & MacGillivray, M. (1968). Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *N Engl J Med* **279**, 893-900.
- Ohlin, M., Sundqvist, V. A., Mach, M., Wahren, B. & Borrebaeck, C. A. (1993). Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies. *Journal of virology* **67**, 703-710.
- Okazaki, K. (2007). Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication, but required for syncytium formation of pseudorabies virus. *The Journal of general virology* **88**, 1859-1865.
- Osorio, F. A. & Reed, D. E. (1983). Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am J Vet Res* **44**, 975-980.
- Osorio, F. A., Reed, D. E. & Rock, D. L. (1982). Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet Microbiol* **7**, 503-513.
- Osorio, F. A., Rock, D. L. & Reed, D. E. (1985). Studies on the pathogenesis of a bovine cytomegalo-like virus in an experimental host. *J Gen Virol* **66**, 1941-1951.
- Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmuller, C., Braun, B., Kaaden, O. R. & Baines, J. D. (1996). The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of virology* **70**, 4110-4115.
- Pagano, J. S., Blaser, M., Buendia, M. A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N. & Roizman, B. (2004). Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* **14**, 453-471.
- Pagnini, U., Montagnaro, S., Pacelli, F., De Martino, L., Florio, S., Rocco, D., Iovane, G., Pacilio, M., Gabellini, C., Marsili, S. & Giordano, A. (2004). The involvement of oxidative stress in bovine herpesvirus type 4-mediated apoptosis. *Front Biosci* **9**, 2106-2114.
- Parks, J. B. & Kendrick, J. W. (1973). The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch* **41**, 211-215.
- Parsons, C. H., Adang, L. A., Overdevest, J., O'Connor, C. M., Taylor, J. R., Jr., Camerini, D. & Kedes, D. H. (2006). KSHV targets multiple leukocyte lineages during long-term productive infection in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* **116**, 1963-1973.
- Pearson, G., Dewey, F., Klein, G., Henle, G. & Henle, W. (1970). Relation between neutralization of Epstein-Barr virus and antibodies to cell-membrane antigens-induced by the virus. *J Natl Cancer Inst* **45**, 989-995.
- Pertel, P. E. (2002). Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *Journal of virology* **76**, 4390-4400.
- Pertel, P. E., Spear, P. G. & Longnecker, R. (1998). Human herpesvirus-8 glycoprotein B interacts with Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein 110 but fails to complement the infectivity of EBV mutants. *Virology* **251**, 402-413.
- Peterson, R. B. & Goyal, S. M. (1988). Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **11**, 93-98.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M. & Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* **2**, 269-276.
- Pirot, T., Tramier, M., Coppey, M., Nicolas, J. C. & Marechal, V. (2001). Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *Journal of virology* **75**, 3948-3959.
- Poffenberger, K. L. & Roizman, B. (1985). A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *Journal of virology* **53**, 587-595.
- Poon, A. F., Lewis, F. I., Pond, S. L. & Frost, S. D. (2007). Evolutionary interactions between N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope. *PLoS Comput Biol* **3**, e11.

- Pope, J. H., Horne, M. K. & Scott, W. (1968).** Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* **3**, 857-866.
- Potgieter, L. N. & Mare, C. J. (1974).** Assay and antigenic interrelationships of the recently isolated bovine herpesviruses, DN599, FTC, and V11. *Arch Gesamte Virusforsch* **46**, 238-247.
- Quinn, G., Wood, J. C., Ryan, D. J., Suling, K. M., Moran, K. M., Kolber-Simonds, D. L., Greenstein, J. L., Schuurman, H. J., Hawley, R. J. & Patience, C. (2004).** Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of galactose alpha1-3 galactose-deficient pig cells. *Journal of virology* **78**, 5805-5811.
- Raab, M. S., Albrecht, J. C., Birkmann, A., Yaguboglu, S., Lang, D., Fleckenstein, B. & Neipel, F. (1998).** The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *Journal of virology* **72**, 6725-6731.
- Raftery, M., Muller, A. & Schonrich, G. (2000).** Herpesvirus homologues of cellular genes. *Virus Genes* **21**, 65-75.
- Ragot, T., Finerty, S., Watkins, P. E., Perricaudet, M. & Morgan, A. J. (1993).** Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *The Journal of general virology* **74** ( Pt 3), 501-507.
- Reed, D. E., Langpap, T. J. & Anson, M. A. (1977).** Characterization of herpesviruses isolated from lactating dairy cows with mammary pustular dermatitis. *Am J Vet Res* **38**, 1631-1634.
- Reed, D. E., Langpap, T. J. & Bergeland, M. E. (1979).** Bovine abortion associated with mixed Movar 33/63 type herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus infection. *Cornell Vet* **69**, 54-66.
- Rees, L., Tizard, E. J., Morgan, A. J., Cubitt, W. D., Finerty, S., Oyewole-Eletu, T. A., Owen, K., Royed, C., Stevens, S. J., Shroff, R. C., Tanday, M. K., Wilson, A. D., Middeldorp, J. M., Amlot, P. L. & Steven, N. M. (2009).** A phase I trial of Epstein-Barr virus gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation. *Transplantation* **88**, 1025-1029.
- Regezi, J. A., MacPhail, L. A., Daniels, T. E., DeSouza, Y. G., Greenspan, J. S. & Greenspan, D. (1993).** Human immunodeficiency virus-associated oral Kaposi's sarcoma. A heterogeneous cell population dominated by spindle-shaped endothelial cells. *Am J Pathol* **143**, 240-249.
- Reynard, O., Borowiak, M., Volchkova, V. A., Delpeut, S., Mateo, M. & Volchkov, V. E. (2009).** Ebola virus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. *Journal of virology* **83**, 9596-9601.
- Rivailler, P., Carville, A., Kaur, A., Rao, P., Quink, C., Kutok, J. L., Westmoreland, S., Klumpp, S., Simon, M., Aster, J. C. & Wang, F. (2004).** Experimental rhesus lymphocryptovirus infection in immunosuppressed macaques: an animal model for Epstein-Barr virus pathogenesis in the immunosuppressed host. *Blood* **104**, 1482-1489.
- Rizvi, S. M., Slater, J. D., Slade, A. J. & Field, H. J. (1997).** Transmission of equine herpesvirus 2 to the mouse: characterization of a new laboratory infection model. *The Journal of general virology* **78** ( Pt 5), 1119-1124.
- Robert E. Means, S. M. L., 2 and Jae U. Jung (2007).** *Human herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y. & Bressanelli, S. (2007).** Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **315**, 843-848.
- Roizman, B. (1996).** *Herpesviridae*. In *Virology*, 3rd edn, pp. 2221-2230. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Roizman, B. & Sears, A. E. (1996).** Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology*, Third Edition edn, pp. 2231-2295. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley & e. al. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Roizman, B. & Whitley, R. J. (2001).** The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* **8**, 23-27.
- Rosa, G. T., Gillet, L., Smith, C. M., de Lima, B. D. & Stevenson, P. G. (2007).** IgG fc receptors provide an alternative infection route for murine gamma-herpesvirus-68. *PLoS One* **2**, e560.
- Rossiter, P. B., Gumm, I. D. & Mirangi, P. K. (1988).** Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (alcelaphine herpesvirus 1) and bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 3). *Vet Microbiol* **16**, 211-218.

- Rossiter, P. B., Gumm, I. D., Stagg, D. A., Conrad, P. A., Mukolwe, S., Davies, F. G. & White, H. (1989). Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res Vet Sci* **46**, 337-343.
- Roth, M. G. & Compans, R. W. (1980). Antibody-resistant spread of vesicular stomatitis virus infection in cell lines of epithelial origin. *Journal of virology* **35**, 547-550.
- Rovnak, J., Quackenbush, S. L., Reyes, R. A., Baines, J. D., Parrish, C. R. & Casey, J. W. (1998). Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *Journal of virology* **72**, 4237-4242.
- Rowe, M., Kelly, G. L., Bell, A. I. & Rickinson, A. B. (2009). Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol* **19**, 377-388.
- Rüger, R., Daniel, M. D. & Fleckenstein, B. (1980). Herpesvirus aotus type 2, a virus related to the oncogenic herpesviruses of new world primates. *Zentralbl Bakter Parasit Infektionskrankh Hyg, Abteilung I, Originale A* **246**, 241.
- Russell, G. C., Stewart, J. P. & Haig, D. M. (2009). Malignant catarrhal fever: a review. *Vet J* **179**, 324-335.
- Ruszczzyk, A., Cywinska, A. & Banbura, M. W. (2004). Equine herpes virus 2 infection in horse populations in Poland. *Acta Virol* **48**, 189-192.
- Rweyemamu, M. M. & Loretu, K. (1973). Isolation of "non-syncytia forming" herpes viruses from cattle in Tanzania. *J Comp Pathol* **83**, 377-386.
- Sadaoka, T., Yanagi, T., Yamanishi, K. & Mori, Y. (2010). Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M. *Journal of virology* **84**, 3488-3502.
- Safaiyan, F., Kolset, S. O., Prydz, K., Gottfridsson, E., Lindahl, U. & Salmivirta, M. (1999). Selective effects of sodium chlorate treatment on the sulfation of heparan sulfate. *J Biol Chem* **274**, 36267-36273.
- Sakamoto, K., Asanuma, H., Nakamura, T., Kanno, T., Sata, T. & Katano, H. (2010). Immune response to intranasal and intraperitoneal immunization with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in mice. *Vaccine* **28**, 3325-3332.
- Salveti, M., Giovannoni, G. & Aloisi, F. (2009). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* **22**, 201-206.
- Sarid, O., Anson, O., Yaari, A. & Margalith, M. (2001). Epstein-Barr virus specific salivary antibodies as related to stress caused by examinations. *J Med Virol* **64**, 149-156.
- Sashihara, J., Burbelo, P. D., Savoldo, B., Pierson, T. C. & Cohen, J. I. (2009). Human antibody titers to Epstein-Barr Virus (EBV) gp350 correlate with neutralization of infectivity better than antibody titers to EBV gp42 using a rapid flow cytometry-based EBV neutralization assay. *Virology* **391**, 249-256.
- Sass, B., Mohanty, S. B. & Hetrick, F. M. (1974). Fluorescent antibody study of a new bovine herpesvirus (strain DN-599). *Am J Vet Res* **35**, 1343-1346.
- Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M. & Burton, D. R. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *Journal of virology* **76**, 7306-7321.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renauld, J. C. & Vanderplasschen, A. (2007). The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by Ixodes ricinus ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes Infect* **9**, 247-250.
- Sciortino, M. T., Perri, D., Medici, M. A., Foti, M., Orlandella, B. M. & Mastino, A. (2000a). The gamma-2-herpesvirus bovine herpesvirus 4 causes apoptotic infection in permissive cell lines. *Virology* **277**, 27-39.
- Sciortino, M. T., Perri, D., Medici, M. A., Foti, M., Orlandella, B. M. & Mastino, A. (2000b). The gamma-2-herpesvirus bovine herpesvirus 4 causes apoptotic infection in permissive cell lines. *Virology* **277**, 27-39.
- Scrivano, L., Sinzger, C., Nitschko, H., Koszinowski, U. H. & Adler, B. (2011). HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS pathogens* **7**, e1001256.
- Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., Nanni, M., Dall'Olio, F., Campadelli-Fiume, G., Tanner, J. & Kieff, E. (1989). Characterization of N- and O-linked oligosaccharides of glycoprotein 350 from Epstein-Barr virus. *Virology* **170**, 1-10.

- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A. & Aloisi, F. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* **204**, 2899-2912.
- Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B. & Delecluse, H. J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7065-7070.
- Sharma-Walia, N., Krishnan, H. H., Naranatt, P. P., Zeng, L., Smith, M. S. & Chandran, B. (2005). ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. *Journal of virology* **79**, 10308-10329.
- Sharma-Walia, N., Naranatt, P. P., Krishnan, H. H., Zeng, L. & Chandran, B. (2004). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 envelope glycoprotein gB induces the integrin-dependent focal adhesion kinase-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-rho GTPase signal pathways and cytoskeletal rearrangements. *Journal of virology* **78**, 4207-4223.
- Shaw, D. R., Shaw, M. W., Hickman, S. E., Lamon, E. W. & Griffin, F. M., Jr. (1980). Sodium azide inhibition of complement-mediated functions. *Immunology* **39**, 53-56.
- Shedlock, D. J., Bailey, M. A., Popernack, P. M., Cunningham, J. M., Burton, D. R. & Sullivan, N. J. (2010). Antibody-mediated neutralization of Ebola virus can occur by two distinct mechanisms. *Virology* **401**, 228-235.
- Shen, Y., Zhu, H. & Shen, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3341-3345.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y. & Takada, K. (1994). Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *Journal of virology* **68**, 6069-6073.
- Shin, Y. C., Jones, L. R., Manrique, J., Lauer, W., Carville, A., Mansfield, K. G. & Desrosiers, R. C. (2010). Glycoprotein gene sequence variation in rhesus monkey rhadinovirus. *Virology* **400**, 175-186.
- Shope, T., Dechairo, D. & Miller, G. (1973). Malignant lymphoma in cottontop marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 2487-2491.
- Shope, T. C. & Miller, G. (1975). EB virus: malignant lymphoma in cottontop marmosets following inoculation and recovery of the virus from cells of an experimental tumor maintained in organ culture. *Bibl Haematol*, 375-383.
- Simas, J. P. & Efsthathiou, S. (1998). Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**, 276-282.
- Simmons, G., Wool-Lewis, R. J., Baribaud, F., Netter, R. C. & Bates, P. (2002). Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence. *Journal of virology* **76**, 2518-2528.
- Simpson, G. R., Schulz, T. F., Whitby, D., Cook, P. M., Boshoff, C., Rainbow, L., Howard, M. R., Gao, S. J., Bohenzky, R. A., Simmonds, P., Lee, C., de Ruiter, A., Hatzakis, A., Tedder, R. S., Weller, I. V., Weiss, R. A. & Moore, P. S. (1996). Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**, 1133-1138.
- Sinclair, A. J. & Farrell, P. J. (1995). Host cell requirements for efficient infection of quiescent primary B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **69**, 5461-5468.
- Singer, S. J. (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 247-296.
- Sixbey, J. W. & Yao, Q. Y. (1992). Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* **255**, 1578-1580.
- Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A. & Wiley, D. C. (1984). A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses



- inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 1779-1783.
- Smith, J. D. (1980).** An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus. *Intervirology* **13**, 312-316.
- Smith, P. C., Cutlip, R. C., Ritchie, A. E. & Young, J. K. (1972).** A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* **161**, 1134-1141.
- 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.
- Sokal, E. M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Leonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F. & Denis, M. (2007).** Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis* **196**, 1749-1753.
- Sorem, J. & Longnecker, R. (2009).** Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *The Journal of general virology* **90**, 591-595.
- Spear, P. G. & Longnecker, R. (2003).** Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology* **77**, 10179-10185.
- Spriggs, M. K., Armitage, R. J., Comeau, M. R., Strockbine, L., Farrah, T., Macduff, B., Ulrich, D., Alderson, M. R., Mullberg, J. & Cohen, J. I. (1996).** The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *Journal of virology* **70**, 5557-5563.
- Srinivas, S. K., Sample, J. T. & Sixbey, J. W. (1998).** Spontaneous loss of viral episomes accompanying Epstein-Barr virus reactivation in a Burkitt's lymphoma cell line. *J Infect Dis* **177**, 1705-1709.
- Stamminger, T., Honess, R. W., Young, D. F., Bodemer, W., Blair, E. D. & Fleckenstein, B. (1987).** Organization of terminal reiterations in the virion DNA of herpesvirus saimiri. *The Journal of general virology* **68 ( Pt 4)**, 1049-1066.
- Staskus, K. A., Zhong, W., Gebhard, K., Herndier, B., Wang, H., Renne, R., Beneke, J., Pudney, J., Anderson, D. J., Ganem, D. & Haase, A. T. (1997).** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *Journal of virology* **71**, 715-719.
- Stevenson, P. G. (2004).** Immune evasion by gamma-herpesviruses. *Current opinion in immunology* **16**, 456-462.
- Stevenson, P. G., Simas, J. P. & Efstathiou, S. (2009).** Immune control of mammalian gamma-herpesviruses: lessons from murid herpesvirus-4. *The Journal of general virology* **90**, 2317-2330.
- Stewart, J. P., Janjua, N. J., Pepper, S. D., Bennion, G., Mackett, M., Allen, T., Nash, A. A. & Arrand, J. R. (1996).** Identification and characterization of murine gammaherpesvirus 68 gp150: a virion membrane glycoprotein. *Journal of virology* **70**, 3528-3535.
- Stewart, J. P., Micali, N., Usherwood, E. J., Bonina, L. & Nash, A. A. (1999).** Murine gamma-herpesvirus 68 glycoprotein 150 protects against virus-induced mononucleosis: a model system for gamma-herpesvirus vaccination. *Vaccine* **17**, 152-157.
- Storz, J., Ehlers, B., Todd, W. J. & Ludwig, H. (1984).** Bovine cytomegaloviruses: identification and differential properties. *The Journal of general virology* **65 ( Pt 4)**, 697-706.
- Stults, C. L., Macher, B. A., Bhatti, R., Srivastava, O. P. & Hindsgaul, O. (1999).** Characterization of the substrate specificity of alpha1,3galactosyltransferase utilizing modified N-acetyllactosamine disaccharides. *Glycobiology* **9**, 661-668.
- Sugano, N., Chen, W., Roberts, M. L. & Cooper, N. R. (1997).** Epstein-Barr virus binding to CD21 activates the initial viral promoter via NF-kappaB induction. *J Exp Med* **186**, 731-737.
- Sullivan, D. C., Allen, G. P. & O'Callaghan, D. J. (1989).** Synthesis and processing of equine herpesvirus type 1 glycoprotein 14. *Virology* **173**, 638-646.

- Sun, R., Lin, S. F., Staskus, K., Gradoville, L., Grogan, E., Haase, A. & Miller, G. (1999). Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *Journal of virology* **73**, 2232-2242.
- Szakonyi, G., Klein, M. G., Hannan, J. P., Young, K. A., Ma, R. Z., Asokan, R., Holers, V. M. & Chen, X. S. (2006). Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 996-1001.
- Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K. G., Whitt, M. A. & Kawaoka, Y. (1997). A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14764-14769.
- Takada, A., Watanabe, S., Ito, H., Okazaki, K., Kida, H. & Kawaoka, Y. (2000). Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **278**, 20-26.
- Takeuchi, Y., Liang, S. H., Bieniasz, P. D., Jager, U., Porter, C. D., Friedman, T., McClure, M. O. & Weiss, R. A. (1997). Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl(alpha1-3)galactosylation. *Journal of virology* **71**, 6174-6178.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. & Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**, 203-213.
- Taylor, G. S., Haigh, T. A., Gudgeon, N. H., Phelps, R. J., Lee, S. P., Steven, N. M. & Rickinson, A. B. (2004). Dual stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-specific CD4+- and CD8+-T-cell responses by a chimeric antigen construct: potential therapeutic vaccine for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Journal of virology* **78**, 768-778.
- Teranishi, K., Manez, R., Awwad, M. & Cooper, D. K. (2002). Anti-Gal alpha 1-3Gal IgM and IgG antibody levels in sera of humans and old world non-human primates. *Xenotransplantation* **9**, 148-154.
- Ternynck, T., Druet, P. & Avrameas, S. (1994). [Physiological autoimmunity]. *Rev Prat* **44**, 36-38.
- Theodoridis, A. (1978). Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. *Onderstepoort J Vet Res* **45**, 187-195.
- Theodoridis, A. (1985). Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J Vet Res* **52**, 239-254.
- Thibaudeau, K., Borche, L., Soullillou, J. P. & Blanchard, D. (1996). Characterization of porcine platelet glycoproteins recognized by human natural "anti-gal" antibodies. *Blood* **87**, 4636-4642.
- Thiry, E., Bublot, M., Dubuisson, J., Lequarre, A. S., Lomonte, P., Van Bresseem, M. F., Vanderplasschen, A. & Pastoret, P. P. (1992a). La biologie du bovine herpesvirus 4. *Ann Méd Vét* **136**, 617-624.
- Thiry, E., Bublot, M., Dubuisson, J. & Pastoret, P. P. (1989). Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infections of cattle. In *Herpesvirus diseases of cattle, horse and pigs Developments in veterinary virology*, pp. 96-115. Edited by G. Wittmann. Boston: Kluwer academic Publishers.
- Thiry, E., Bublot, M., Dubuisson, J., Van Bresseem, M. F., Lequarre, A. S., Lomonte, P., Vanderplasschen, A. & Pastoret, P. P. (1992b). Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet Microbiol* **33**, 79-92.
- Thiry, E., Chappuis, G., Bublot, M., Van Bresseem, M. F., Dubuisson, J. & Pastoret, P. P. (1991). Failure to infect cats with bovine herpesvirus type-4 strain Movar 33/63. *Vet Rec* **128**, 614-615.
- Thiry, E., Dubuisson, J., Bublot, M., Van Bresseem, M. F. & Pastoret, P. P. (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **97**, 72-77.
- Thiry, E., M. Bublot, J. Dubuisson, and P. P. Pastoret. (1989). *Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infection in cattle*. Boston: Kluwer.
- Thiry, E., Markine-Goriaynoff, N., Minner, F., Pastoret, P. P. & Vanderplasschen, A. (2000). L'herpèsvirus bovin de type 4 : virus pathogène ou passager ? *Le point vét* **31**, 49-55.
- Thiry, E., Pastoret, P. P. & Calberg-Bacq, C. M. (1981a). Isolement d'un herpesvirus chez un taureau infertile. *Ann Méd Vét* **125**, 143.
- Thiry, E., Pastoret, P. P., Dessy-Doizé, C., Hanzen, C. & Calberg-Bacq, C. M. (1981b). Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet rec* **108**, 426.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thompson, K. M., Sutherland, J., Barden, G., Melamed, M. D., Wright, M. G., Bailey, S. & Thorpe, S. J. (1992).** Human monoclonal antibodies specific for blood group antigens demonstrate multispecific properties characteristic of natural autoantibodies. *Immunology* **76**, 146-157.
- Thomson, S. A., Burrows, S. R., Misko, I. S., Moss, D. J., Coupar, B. E. & Khanna, R. (1998).** Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design. *Journal of virology* **72**, 2246-2252.
- Thomson, S. A., Elliott, S. L., Sherritt, M. A., Sproat, K. W., Coupar, B. E., Scalzo, A. A., Forbes, C. A., Ladhams, A. M., Mo, X. Y., Tripp, R. A., Doherty, P. C., Moss, D. J. & Suhrbier, A. (1996).** Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* **157**, 822-826.
- Thomson, S. A., Khanna, R., Gardner, J., Burrows, S. R., Coupar, B., Moss, D. J. & Suhrbier, A. (1995).** Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5845-5849.
- Thorley-Lawson, D. A. & Edson, C. M. (1979).** Polypeptides of the Epstein-Barr virus membrane antigen complex. *Journal of virology* **32**, 458-467.
- Thorley-Lawson, D. A. & Geilinger, K. (1980).** Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 5307-5311.
- Thorley-Lawson, D. A. & Gross, A. (2004).** Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* **350**, 1328-1337.
- Thorley-Lawson, D. A. & Poodry, C. A. (1982).** Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *Journal of virology* **43**, 730-736.
- Tischer, B. K., Schumacher, D., Messerle, M., Wagner, M. & Osterrieder, N. (2002).** The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Gen Virol* **83**, 997-1003.
- Toho, T., Kanaya, K. & Oki, Y. (1985).** Experimental transmission to calf and goat of the virus associated with the cultured T-cell lymphoma cell line from the calf type of bovine leukosis. I. Detection of antibodies to BTLA by immunofluorescence assay. *Bull Nipp Vet Zootech Coll* **34**, 23-26.
- Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J. & Ploegh, H. L. (2000).** Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* **18**, 861-926.
- Truman, D. (1985).** Bovines herpesvirus typ 4 (BHV-4) eine studie zur Biologie und Verbreitung. Inaugural-Dissertation Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freie Universität Berlin.
- Truman, D., Ludwig, H. & Storz, J. (1986).** [Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4): studies on biology and transmission in cattle herds and insemination bulls]. *Zentralbl Veterinarmed B* **33**, 485-501.
- Tsuboi, S. & Fukuda, M. (2001).** Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays* **23**, 46-53.
- Tugizov, S. M., Berline, J. W. & Palefsky, J. M. (2003).** Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* **9**, 307-314.
- Turk, S. M., Jiang, R., Chesnokova, L. S. & Hutt-Fletcher, L. M. (2006).** Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *Journal of virology* **80**, 9628-9633.
- Turnbull, J., Powell, A. & Guimond, S. (2001).** Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* **11**, 75-82.

- Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M. & Cullen, B. R. (2008).** MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**, 780-783.
- Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A. & Opdenakker, G. (1998).** Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**, 151-208.
- Van Malderen, G., Van Opdenbosch, E. & Wellemans, G (1987).** Bovien herpes virus 1 en 4: een sero-epidemiologisch onderzoek van de Belgische Rundveestapel. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr*, 21-30.
- Van Opdenbosch, E., Wellemans, G., Antoine, H., Broers, A. & Charlier, G. (1984).** Chronic metritis, associated with various symptoms: an immunodepressive herpes virus (LVR 140) as etiological agent? *Vlaams Diergeneesk Tijdschr* **53**, 21-30.
- van Opdenbosch, E., Wellemans, G., Ooms, L. A. & Degryse, A. D. (1988).** BHV4 (bovine herpes virus 4) related disorders in Belgian cattle: a study of two problem herds. *Vet Res Commun* **12**, 347-353.
- van Santen, V. L. (1991).** Characterization of the bovine herpesvirus 4 major immediate-early transcript. *J Virol* **65**, 5211-5224.
- van Santen, V. L. (1993).** Characterization of a bovine herpesvirus 4 immediate-early RNA encoding a homolog of the Epstein-Barr virus R transactivator. *J Virol* **67**, 773-784.
- Vanderplasschen, A., Bublot, M., Dubuisson, J., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1993).** Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology* **196**, 232-240.
- Vanderplasschen, A., Goltz, M., Lyaku, J., Benarafa, C., Buhk, H. J., Thiry, E. & Pastoret, P. P. (1995).** The replication in vitro of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is restricted by its DNA synthesis dependence on the S phase of the cell cycle. *Virology* **213**, 328-340.
- Vanderplasschen, A., Markine-Goriaynoff, N., Lomonte, P., Suzuki, M., Hiraoka, N., Yeh, J. C., Bureau, F., Willems, L., Thiry, E., Fukuda, M. & Pastoret, P. P. (2000).** A multipotential beta -1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine herpesvirus type 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5756-5761.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B. & Smith, G. L. (1998).** Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7544-7549.
- Verma, S. C. & Robertson, E. S. (2003a).** Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett* **222**, 155-163.
- Verma, S. C. & Robertson, E. S. (2003b).** ORF73 of herpesvirus Saimiri strain C488 tethers the viral genome to metaphase chromosomes and binds to cis-acting DNA sequences in the terminal repeats. *Journal of virology* **77**, 12494-12506.
- Villarreal, L. P., Defilippis, V. R. & Gottlieb, K. A. (2000).** Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology* **272**, 1-6.
- Volchkov, V. E., Becker, S., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., Kotov, A. N., Netesov, S. V. & Klenk, H. D. (1995).** GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* **214**, 421-430.
- Vollmers, H. P. & Brandlein, S. (2005).** The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol* **20**, 927-937.
- Vollmers, H. P. & Brandlein, S. (2006).** Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 755-765.
- Wang, C. C., Chen, J. R., Tseng, Y. C., Hsu, C. H., Hung, Y. F., Chen, S. W., Chen, C. M., Khoo, K. H., Cheng, T. J., Cheng, Y. S., Jan, J. T., Wu, C. Y., Ma, C. & Wong, C. H. (2009).** Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 18137-18142.
- Wang, F., Rivaller, P., Rao, P. & Cho, Y. (2001a).** Simian homologues of Epstein-Barr virus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **356**, 489-497.

- Wang, F. Z., Akula, S. M., Pramod, N. P., Zeng, L. & Chandran, B. (2001b). Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *Journal of virology* **75**, 7517-7527.
- Wang, F. Z., Weber, F., Croce, C., Liu, C. G., Liao, X. & Pellett, P. E. (2008). Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication. *Journal of virology* **82**, 9065-9074.
- Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J. & Hutt-Fletcher, L. M. (1998). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *Journal of virology* **72**, 5552-5558.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* **33**, e36.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. & Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-312.
- Weisman, H. F., Bartow, T., Leppo, M. K., Marsh, H. C., Jr., Carson, G. R., Concino, M. F., Boyle, M. P., Roux, K. H., Weisfeldt, M. L. & Fearon, D. T. (1990). Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* **249**, 146-151.
- Weiss, R. A., Whitby, D., Talbot, S., Kellam, P. & Boshoff, C. (1998). Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 51-54.
- Wellemans, G. (1984). Symptomatologie variée apparaissant lors des métrites chroniques associées à un virus herpès chez les bovins. *Ann Med Vet* **128**, 614-615.
- Wellemans, G., Antoine, H., Broes, A., Charlier, G. & Van Opdenbosch, E. (1983). Isolement d'un virus Herpès chez des bovins atteints de métrite post-partum. *Ann Méd Vét* **127**, 481-482.
- Wellemans, G. & Van Opdenbosch, E. (1987). Transmission horizontale du virus BHV-4 à des génisses. *Ann Méd Vét* **121**, 487-491.
- Wellemans, G. & Van Opdenbosch, E. (1989). Association entre l'infection par le BHV-4 et l'avortement chez la vache. *Ann Med Vet* **133**, 347-350.
- Wellemans, G., Van Opdenbosch, E. & Mammerrickx, M. (1986). Experimental inoculation of bovine herpesvirus 4 (strain LVR 140) in pregnant and nonpregnant cows. *Ann Rech Vet* **17**, 89-94.
- Wellenberg, G. J. (2002). Bovine herpesvirus 4 infections and bovine mastitis. *Faculty of veterinary medicine Lelystad, University of Utrecht*: 187.
- Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. & Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol* **88**, 27-45.
- Wellenberg, G. J., Van Der Poel, W. H. M., Van Der Vorst, T. J. K., Van Valkengoed, P. H. R., Schukken, Y. H., Wagenaar, F. & Van Oirschot, J. T. (2000). Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. *Vet Rec* **147**, 222-225.
- Wellenberg, G. J., Verstraten, E. R., Belak, S., Verschuren, S. B., Rijsewijk, F. A., Peshev, R. & Van Oirschot, J. T. (2001). Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J Virol Methods* **97**, 101-112.
- Welsh, R. M., Jr., Cooper, N. R., Jensen, F. C. & Oldstone, M. B. (1975). Human serum lyses RNA tumour viruses. *Nature* **257**, 612-614.
- Welsh, R. M., O'Donnell, C. L., Reed, D. J. & Rother, R. P. (1998). Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *Journal of virology* **72**, 4650-4656.
- Whitby, D., Stossel, A., Gamache, C., Papin, J., Bosch, M., Smith, A., Kedes, D. H., White, G., Kennedy, R. & Dittmer, D. P. (2003). Novel Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Homolog in Baboons. *Journal of virology* **77**, 8159-8165.
- WHO (1997). Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **70**, 1-492.

- Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E. M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M. & Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *Journal of virology* **79**, 1071-1083.
- Willer, D. O. & Speck, S. H. (2003). Long-term latent murine Gammaherpesvirus 68 infection is preferentially found within the surface immunoglobulin D-negative subset of splenic B cells in vivo. *Journal of virology* **77**, 8310-8321.
- Wilson, A. D., Shooshstari, M., Finerty, S., Watkins, P. & Morgan, A. J. (1996). Virus-specific cytotoxic T cell responses are associated with immunity of the cottontop tamarin to Epstein-Barr virus (EBV). *Clin Exp Immunol* **103**, 199-205.
- Wong, S. W., Bergquam, E. P., Swanson, R. M., Lee, F. W., Shiigi, S. M., Avery, N. A., Fanton, J. W. & Axthelm, M. K. (1999). Induction of B cell hyperplasia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques with the simian homologue of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Exp Med* **190**, 827-840.
- Wu, L. & Hutt-Fletcher, L. M. (2007). Point mutations in EBV gH that abrogate or differentially affect B cell and epithelial cell fusion. *Virology* **363**, 148-155.
- Wu, L., Renne, R., Ganem, D. & Forghani, B. (2000). Human herpesvirus 8 glycoprotein K8.1: expression, post-translational modification and localization analyzed by monoclonal antibody. *J Clin Virol* **17**, 127-136.
- Wu, S. X., Zhu, X. P. & Letchworth, G. J. (1998). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *Journal of virology* **72**, 3029-3036.
- Wu, X., Yang, Z. Y., Li, Y., HogerCorp, C. M., Schief, W. R., Seaman, M. S., Zhou, T., Schmidt, S. D., Wu, L., Xu, L., Longo, N. S., McKee, K., O'Dell, S., Louder, M. K., Wycuff, D. L., Feng, Y., Nason, M., Doria-Rose, N., Connors, M., Kwong, P. D., Roederer, M., Wyatt, R. T., Nabel, G. J. & Mascola, J. R. (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856-861.
- Xu, J., Lyons, P. A., Carter, M. D., Booth, T. W., Davis-Poynter, N. J., Shellam, G. R. & Scalzo, A. A. (1996). Assessment of antigenicity and genetic variation of glycoprotein B of murine cytomegalovirus. *The Journal of general virology* **77** ( Pt 1), 49-59.
- Yamagishi, Y., Sadaoka, T., Yoshii, H., Somboonthum, P., Imazawa, T., Nagaike, K., Ozono, K., Yamanishi, K. & Mori, Y. (2008). Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread. *Journal of virology* **82**, 795-804.
- Yao, Q. Y., Rickinson, A. B. & Epstein, M. A. (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* **35**, 35-42.
- Yates, J. L., Warren, N. & Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815.
- Yewdell, J. W. & Hill, A. B. (2002). Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol* **3**, 1019-1025.
- Young, L. S., Finerty, S., Brooks, L., Scullion, F., Rickinson, A. B. & Morgan, A. J. (1989). Epstein-Barr virus gene expression in malignant lymphomas induced by experimental virus infection of cottontop tamarins. *Journal of virology* **63**, 1967-1974.
- Young, L. S. & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**, 757-768.
- Zaldumbide, A., Ossevoort, M., Wiertz, E. J. & Hoeben, R. C. (2007). In cis inhibition of antigen processing by the latency-associated nuclear antigen I of Kaposi sarcoma herpes virus. *Mol Immunol* **44**, 1352-1360.
- Zhang, L. & van Santen, V. L. (1995). Interaction of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) immediate early 2 gene product with BHV-4 thymidine kinase promoter-regulatory region. *J Gen Virol* **76**, 2433-2445.
- Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z. Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y. D., Scheid, J. F., Shi, W., Xu, L., Yang, Y., Zhu, J., Nussenzweig, M. C., Sodroski, J., Shapiro, L., Nabel, G. J., Mascola, J. R. & Kwong, P. D. (2010). Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811-817.
- Zhu, L., Puri, V. & Chandran, B. (1999). Characterization of human herpesvirus-8 K8.1A/B glycoproteins by monoclonal antibodies. *Virology* **262**, 237-249.

- Zimmermann, W., Broll, H., Ehlers, B., Buhk, H. J., Rosenthal, A. & Goltz, M. (2001).** Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol* **75**, 1186-1194.
- zur Hausen, H. (1999).** Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* **35**, 1878-1885.