
ADN	acide désoxyribonucléique
Adeno	<i>Adenovirus</i>
AIHV1	<i>Alcelaphine herpesvirus 1</i>
Arf6	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ARN	acide ribonucléique
ARN-T	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
BECs	cellules endothéliales matures du sang
BHK-21	<i>baby hamster kidney 21</i>
BL	lymphome de Burkitt
BoHV-1	<i>bovine herpesvirus-1</i>
BoHV-4	<i>bovine herpesvirus-4</i>
Cbl	<i>Casitas B-lineage Lymphoma protein</i>
CBP	<i>chemokine binding protein</i>
CCPs	<i>clathrin-coated pits</i>
CCSC	<i>C Capsid Specific Component</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIEBV	<i>Chromosome Integration of Epstein Barr Virus genome</i>
CME	<i>clathrin-mediated endocytosis</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CPNE	<i>copine</i>
CryoEM	<i>Cryo-électrotomography</i>
Cryo-ET	<i>Cryo-Electron-Tomography</i>
DHC	<i>dynein heavy chain</i>
DIC	<i>dynein internediate chain</i>
DLBCL	lymphome diffus à larges cellules B
DLC	<i>dynein light chain</i>
DMEM	<i>dubelcco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EBNA	<i>Epstein Barr nuclear antigen</i>
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>
Ecs	cellules endothéliales
EE	<i>early endosomes</i>
EHV-2	<i>Equid Herpesvirus-2</i>
EphA2	Ephrine A2
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FG	Phénylalanine-Gly
GA	appareil de Golgi
GAGs	glycosaminoglycans
GAM	<i>goat anti-mouse</i>
GEEC	<i>GPI-anchored anriched endocytic compartments</i>
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i>

HHV-1	<i>Human herpesvirus-1</i>
HHV-4	<i>Human herpesvirus-4</i>
HHV-5	<i>Human herpesvirus-5</i>
HHV-6	<i>Human herpesvirus 6</i>
HHV-7	<i>Human herpesvirus 7</i>
HHV-7	<i>Human herpesvirus 7</i>
HHV-8	<i>Human herpesvirus-8</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HL	lymphome de Hodgkin
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HPF	<i>homologous protein family</i>
HPV-16	<i>Human papillomavirus 16</i>
HS	héparans sulfates
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IBD	<i>Importin Binding Domain</i>
Ics	cytokines inflammatoires
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IE gene	<i>immediate-early gene</i>
IFN	interferon
IL	interleukine
ILV	<i>intraluminal vesicles</i>
Imp α	Importine α
Imp β	Importine β
INM	<i>Inner nuclear membrane</i>
IRAK-1	<i>Interleukin-1 receptor activated kinase-1</i>
IRL	<i>Internal repeat long</i>
KHC	<i>Kinesin heavy chain</i>
KLC	<i>Kinesin light chain</i>
KS	Kaposi sarcoma
KSHV	<i>Kaposi sarcoma associated virus</i>
L gene	<i>late gene</i>
LAMP	<i>lysosomal-associated membrane protein</i>
LANA	<i>latency associated nuclear antigen</i>
LCMV	<i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LE	<i>late endosomes</i>
LECs	<i>cellules endothéliales lymphatiques</i>
LMP	<i>Latent membrane protein</i>
LUR	longue région unique linéaire
Ly	lysosome
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MCD	maladie multicentrique de Castleman
MCF	<i>malignant catarrhal fever</i>
MCMV	<i>Murine cytomegalovirus</i>
MCP	<i>Major capsid protein</i>
ME	<i>maturing endosomes</i>
ME	microscopie électronique
MFSD	<i>major facilitator superfamily domain containing</i>
miRNAs	<i>micros RNAs</i>
MOCT	<i>Microtubule Organizing Center</i>
mPy	<i>Mouse polyomavirus</i>
MuHV-1	<i>Murid herpesvirus-1</i>
MuHV-4	<i>Murid Herpesvirus-4</i>
NAT8	<i>N-acetyltransferase 8</i>
NEC	<i>Nuclear Egress Complex</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLSs	signaux de localisation nucléaire
NPCs	carcinomes nasopharyngés
NTRs	<i>Nuclear Transport Receptors</i>
Nups	nucléoporines
OBP	<i>Origin-binding protein</i>
ONM	<i>Outer nuclear membrane</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
Ori	<i>Origin gene</i>
p.f.u	<i>plate forming unit</i>
p.i	post -infection
PAC	<i>Packaging sequence</i>
PAMP's	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBCH	hyperplasie à cellules B polymorphiques
PBL	lymphome plasmoblastique
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEL	lymphome primaire à effusion
PH	hyperplasie plasmocytaire
PIDD	<i>induced protein with a death domain</i>
PKD	protéine kinase D
PN	pores nucléaires
Poms	pores membranaires
prDNA	<i>poly-repetitive DNA</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
PRV	<i>pseudorabiesvirus</i>
RAIDD	<i>RIP-associated Ich-1/Ced-3 homologous protein with a death domain</i>
RE	<i>recycling endosomes</i>
RE	réticulum endoplasmique
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RRV	<i>Rhesus monkey rhadinovirus</i>

RTA	<i>replication and transcription activator</i>
SaHV-2	<i>Samiriine herpesvirus-2</i>
SC	<i>spindle cells</i>
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAF	<i>TBP-associated factors</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TF	<i>transcription factor</i>
TFIID	<i>transcription factor II D</i>
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TR	<i>terminal repeats</i>
TRI-1	triplex monomer protein
TRI-2	triplex dimer protein
TRIM	<i>tripartite motif</i>
TRL	long inverted repeat
UL	<i>Long unique region</i>
vCCLs	chémokines virales
v-FLIP	<i>viral FLICE inhibitory protein</i>
vGPCR	récepteur viral couplé à la protéine G
VIH	Virus de l'immunodéficience acquise
VP	<i>Viral protein</i>
VSV	<i>Vesicular stomatis virus</i>
VZV	<i>Varicella zona virus</i>

Je ne sais pas par où commencer.... Il s'est passé tant de choses. Il y a presque 6 ans, je contactais le Prof. Vanderplasschen qui souhaitait agrandir ses équipes et très vite, j'ai pu intégrer celle du Prof. Gillet. Je vais donc d'abord te remercier Laurent : pour ton humanité, ta gentillesse, ta présence, ton soutien dans les moments difficiles, professionnels ou privés. Ensuite, qui d'autre que toi m'aurait aussi bien guidée dans ce travail, orientée, suivie... .

Ensuite, je souhaite remercier mes collègues, scientifiques, secrétaires ou techniciens. Les semaines entières partagées sous la hotte avec François, plus de 90.000 puits à infecter, à marquer, à fixer... . Les campagnols à dompter avec Sylvie, les lapins de Béné tous les vendredis pendant des semaines, les nuits à réveiller Maygane qui dormait dans le couloir pendant que je revenais récolter mes puits et qu'elle manipulait toutes les deux heures... . Mais au-delà de ça, ce sont des liens affectifs qui se créent, et que la vie dénoue tant les chemins pris s'éloignent forcément. Sylvie, je n'oublierai jamais nos heures passées à LAX, aéroport international de Los Angeles où nous avons séjourné une semaine, coincée à cause du volcan Eyjafjöll en 2010. Les Etats-Unis, la Malaisie puis le Canada : mes plus grands voyages, je les ai faits avec toi ! Merci d'avoir partagé avec moi mon premier congrès international! Bénédicte et Céline, les inséparables : vous avez toujours eu un mot réconfortant en cas de coup dur ; toujours présentes pour un coup de main ou en cas de coup de mou... . Cher Bilal, grâce à toi, les amours pakistanaïses n'ont plus de secret pour moi ! Je sais tout ;-) Merci pour ta bonne humeur et dépêche-toi de trouver une femme... parce que tu le vauX bien. Bérengère, on en a partagé des larmes et des joies. Tu t'es éloignée de la Belgique mais j'espère vraiment qu'on fera notre possible pour perdurer cette amitié. Chère Maygane, toutes nos peines de cœur ont été passées à la moulinette, les hommes ont eu souvent les oreilles qui sifflaient avec nous, car on ne les a pas épargnés ! Merci pour tous ces moments d'amitié et de partage (y compris à suer au fitness !!!). Françoise, ton *capital sympathie* :-D a grandi chaque jour un peu plus dans mon cœur, tu es une fille géniale. Océane, j'espère que tu vas trouver un petit coin de labo au soleil pour accueillir tes deux hommes et toi, merci pour tous tes tuyaux sur le clonage ! Will, mon cher Will. Nous deux, on est devenu amis après le labo : nos rendez-vous hebdomadaires à s'enfiler les escaliers de Bueren en courant, les rendez-vous presque quotidiens sur Whatsapp/par mail/ou sms pour s'encourager dans nos moments difficiles, ... tu sais que je ne peux plus me passer de toi ;-). Après ça, il y a tous les anciens, et les nouveaux (que je ne

connais même pas). Je vais en oublier alors je ne me risque pas à tous les citer mais je garde à coup sûr, dans mon cœur, des moments privilégiés passés avec chacun, des échanges sincères, tendres et drôles. Je garderai précieusement ces moments intenses, humains et vrais en souvenir.

Mes amis. D'abord Pascal. Mon meilleur ami. Deux jours sans te parler ! C'est une éternité ! Parfois même, tu le sais, on s'appelle 5 fois par jour, et il n'y a pas toujours assez de place sur notre boîte vocale. Tu m'as toujours encouragée à terminer cette thèse, c'est aussi en partie grâce à toi que je n'ai pas abandonné. Marc, Annick, Caroline, Danièle, Vincent, Quentin, Kristel, Cécile, l'autre Cécile, Manu, Valérie, Philippe, Géraldine, Andy, Julien, Catherine, Barbara, Chantal, Nico ... il en manque certainement. Mais chacun d'entre vous contribue à ce que je suis aujourd'hui. Et si je ne compte pas mourir avec ma thèse dans les bras, j'espère vivre encore des moments complices et heureux avec vous tous! Merci pour votre soutien, et surtout, pour votre amour. Grâce à vous, je sais qu'on peut aimer très fort en amitié. Ma « nouvelle » filleule Kathleen : à 14 ans, tu m'as choisie comme marraine, merci de ton amour, de ta confiance et aussi, de ton soutien et de tes encouragements.

Et puis tous les copains du sport : Flo, Benoit, Christelle, et les 100 autres!!! Tous les lundis, les mardis et les vendredis, je me *shoote* à votre enthousiasme, au son de vos cris et à votre sourire lors de mes cours. Merci de m'avoir donné la pêche à chaque fois que j'en manquais.

Et *last but not least*, LA FAMILIA !!! Maman, chère maman, ça y est: ta fille sort enfin des études! La plus belle phrase que tu m'offres, c'est quand tu me dis : « Quoique tu décides, je te soutiens, tu feras les bons choix ». Plus on vieillit toutes les deux, plus on se comprend et plus on s'aime. Parrain, marraine et Marie-France : sans vous, je n'aurais certainement pas le parcours que j'ai aujourd'hui : merci pour votre soutien dans toutes les épreuves, et la thèse en faisait partie. Mes cousins : Renaud, super designer, merci pour avoir fait la couverture de ma thèse !! Et Maud, Thomas et Corentin qui ont partagé tant de moments avec moi. Et puis mon Estelle, ma petite fille, à qui j'ai si souvent dit que je ne pouvais pas jouer parce que je devais travailler. Estelle, si douce, patiente et aimante envers

moi. Tu es une petite fille exceptionnelle et je t'aime archi-fort-plus-que-la-galaxie, merci pour ton aide dans la patience que tu as montrée vis-à-vis de moi quand je devais travailler.



Table des matières

- Abréviations p1
- Remerciements p5
- Table des matières p8
- 1. Introduction** p10
- 1. Les *Herpesviridae*** p10
 - 1.1 Classification et critères d'inclusion
 - 1.2 Infection lytique, latence, réactivation
 - 1.2.1 L'infection lytique
 - 1.2.2 L'infection latente et la réactivation
 - 1.3 Génome des *Herpesviridae*
- 2. Les *Gammaherpesvirinae*** p14
 - 2.1 Génome des *Gammaherpesvirinae*
 - 2.2. Le virus d'Epstein Barr et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi
 - 2.2.1 Le virus d'Epstein Barr
 - 2.2.2 L'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi
 - 2.2.3 Clinique associée à l'EBV et au KSHV
 - 2.2.4 Modèles animaux
 - 2.3. L'herpèsvirus murin 4
 - 2.3.1 Spectre d'hôte
 - 2.3.2 Le génome viral
 - 2.3.3 Pathogénie
- 3. Cycle biologique des *Herpesviridae*** p29
 - 3.1 Phase I : ENTREE
 - 3.1.1 L'attachement
 - 3.1.2 L'endocytose
 - 3.1.3 La fusion
 - 3.1.4 Transport intracytoplasmique des capsides virales
 - 3.1.5 Transfert de l'ADN viral au sein du noyau
 - 3.1.6 Circularisation de l'épisome viral
 - 3.1.7 Maintien du génome viral à l'état latent
 - 3.2 Phase II : SORTIE
 - 3.2.1 Réplication de l'ADN viral et expression des protéines virales
 - 3.2.2 Formation de la nucléocapside
 - 3.2.3 Modèles de sorties des nucléocapsides hors du noyau
 - 3.2.4 Le complexe d'évasion nucléaire (*Nuclear Egress Complex*)
 - 3.2.5 Tégumentation primaire, enveloppement primaire et dé-enveloppement
 - 3.2.6 Tégumentation secondaire
 - 3.2.7 Enveloppement secondaire
 - 3.2.8 Transport des particules virales enveloppées vers la surface cellulaire
 - 3.2.9 Glycoprotéines présentes dans l'enveloppe virale
 - 3.2.10 Acquisition de protéines cellulaires

2. Objectifs p85

3. Section expérimentale p86

1. Préambule étude 1 p86

2. Etude 1 : Screening par ARNs interférents pour l'identification des facteurs cellulaires affectant l'herpèsvirus murin 4 p87

3. Préambule étude 2 p126

4. Etude 2 : Caractérisation protéomique des virions extracellulaires de l'herpèsvirus murin 4 p127

4. Discussion-perspectives p163

Bibliographie p188

Introduction

1. Les *Herpesviridae*

1.1. Classification et critères d'inclusion

L'ordre des *Herpesvirales* contient 3 familles : les *Alloherpesviridae*, les *Malacoherpesviridae* et les *Herpesviridae*. La famille des *Herpesviridae* consiste en 3 sous-familles : les *Alphaherpesvirinae* (contenant le genre *Simplexvirus* et le genre *Varicellovirus* notamment), les *Betaherpesvirinae* (auxquels appartiennent le genre *Cytomegalovirus* et le *Roseolovirus*) et les *Gammapherpesvirinae* (genres *Lymphocryptovirus*, *Rhadinovirus*, *Macavirus* et *Percavirus*) [1, 2] (Tableau 1).

Ordre	Famille	Sous-famille	Genre	Espèce	
<i>Herpesvirales</i>	<i>Malacoherpesviridae</i>				
	<i>Alloherpesviridae</i>				
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>		
			<i>Betaherpesvirinae</i>		
		<i>Gammapherpesvirinae</i>		<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Callitrichine herpesvirus 3</i> <i>Cercopithecine herpesvirus 14</i> <i>Gorilline herpesvirus 1</i> <i>Human herpesvirus 4</i> <i>Macacine herpesvirus 4</i> <i>Panine herpesvirus 1</i> <i>Papiine herpesvirus 1</i> <i>Pongine herpesvirus 2</i>
				<i>Macavirus</i>	<i>Alcelaphine herpesvirus 1</i> <i>Alcelaphine herpesvirus 2</i> <i>Bovine herpesvirus 6</i> <i>Caprine herpesvirus 2</i> <i>Hippotragine herpesvirus 1</i> <i>Ovine herpesvirus 2</i> <i>Suid herpesvirus 3</i> <i>Suid herpesvirus 4</i> <i>Suid herpesvirus 5</i>
				<i>Percavirus</i>	<i>Equid herpesvirus 2</i> <i>Equid herpesvirus 5</i> <i>Mustelid herpesvirus</i>
				<i>Rhadinovirus</i>	<i>Ateline herpesvirus 2</i> <i>Ateline herpesvirus 3</i> <i>Bovine herpesvirus 4</i> <i>Human herpesvirus 8</i> <i>Macacine herpesvirus 5</i> <i>Murid herpesvirus 4</i> <i>Saimiriine herpesvirus 2</i>

Tableau 1. Nomenclature et classification des *Gammapherpesvirinae*. Les espèces-types au sein de chaque genre sont indiquées en gras. Adapté de Davison *et al.* [1].

Le **premier critère d'inclusion** retenu pour classer un virus au sein de l'ordre des *Herpesvirales* est la morphologie du virion. Le virion est sphérique et comprend 4 composants majeurs : le core, la capside, le tégument et l'enveloppe (Figure 1). Le diamètre du virion dépend de l'espèce virale mais il est approximativement de 200 nm. Le core consiste en une copie d'ADN double brin linéaire fermement compacté à l'intérieur de la capside. La capside est un icosaèdre d'un diamètre de 125 à 130 nm renfermant l'ADN génomique. Le tégument contient une trentaine de protéines différentes qui occupent environs deux tiers du volume du virion. Antérieurement, il était décrit comme ne possédant pas de structure particulière si ce n'est éventuellement quelques organisations filamenteuses du côté de l'enveloppe faisant penser à des filaments d'actine [3]. Aujourd'hui, les auteurs s'accordent pour suggérer qu'au contraire, le tégument présente une organisation spécifique associée ou non aux protéines de capside et aux glycoprotéines d'enveloppe [4, 5]. Il est généralement divisé en un tégument externe, côté enveloppe, et interne situé du côté de la capside [6, 7]. La composition des protéines de tégument et des protéines d'enveloppe est très variable au sein des différentes familles alors que les protéines de capside sont relativement conservées [8].

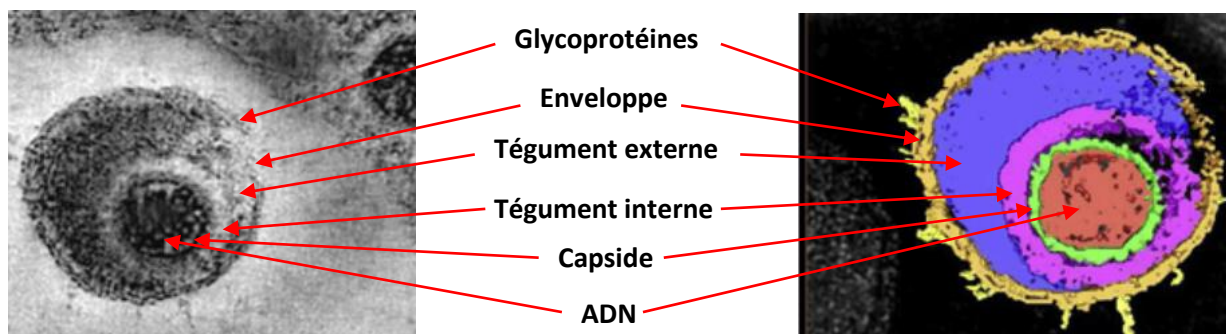


Figure 1. Structure des *Herpesviridae*. Image en *Cryo-Electron-Tomography* (Cryo-ET) du MuHV4 colorisée ou non. Code couleur : ADN viral, rouge; capside, vert; tégument interne, violet; tégument externe, bleu; enveloppe et glycoprotéines, jaune. D'après Peng *et al.* [9].

Le **second critère d'inclusion** est biologique. Dans les systèmes expérimentaux, les *Alphaherpesvirinae* peuvent infecter plusieurs espèces alors que le spectre des *Beta-* et des *Gammaherpesvirinae* reste la plupart du temps très restreint. Les *Herpesviridae* sont très bien adaptés à leurs hôtes et les symptômes sévères sont habituellement limités aux individus jeunes et immunodéprimés. Les voies naturelles de transmission sont diverses et vont de l'aérosol [10] aux contacts muqueux [11, 12], en passant par les transmissions lors

de transplantation d'organes [13]. La plupart des *Herpesviridae* établissent une infection systémique associée à une virémie bien que les infections du genre *Simplexvirus* sont limitées à l'épithélium au site d'inoculation et aux neurones sensoriels locaux [14]. La caractéristique biologique commune à tous les *Herpesviridae* est leur capacité à établir une infection dite latente. Le terme latence est utilisé pour décrire un état d'infection au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme hôte : l'hôte est considéré comme infecté latent quand l'infection aiguë primaire est résolue [15], tandis qu'au niveau cellulaire, la latence consiste en le maintien du génome viral au sein du noyau des cellules infectées en l'absence de tout cycle répliatif.

1.2. Infection lytique, latence, réactivation

1.2.1. L'infection lytique

Le cycle de multiplication des *Herpesviridae* est globalement identique au sein des différents membres et correspond à la phase lytique. Le cycle lytique débute lorsque la particule virale entre en contact avec une cellule non infectée. Le virus entre dans la cellule quand son enveloppe fusionne avec une membrane cellulaire (membrane plasmique ou de l'endosome). La capsid est partiellement dé-tégumentée et transportée vers le noyau via le réseau de microtubules. Le matériel génomique est alors injecté dans le noyau et répliaté. Les unités génomiques seront alors empaquetées au fur et à mesure dans les virions en maturation [16] et ces virions seront relâchés en vue d'infecter de nouvelles cellules. L'ensemble de ces étapes sera décrit en détails dans les chapitres qui suivent.

1.2.2. L'infection latente et la réactivation

La capacité à établir la latence est une caractéristique commune et fondamentale de tous les *Herpesviridae* [17]. Cet état est décrit comme la maintenance du virus au sein de l'hôte en l'absence de cycle productif. Durant la latence, le génome viral est maintenu sous forme d'épisome au sein du noyau de la cellule. Plusieurs copies du génome peuvent être présentes dans les cellules mais aucune particule virale n'est relarguée [18]. Contrairement à d'autres virus, les *Herpesviridae* ne doivent pas intégrer le génome de l'hôte pour compléter le cycle viral. Ce phénomène d'intégration est rare et ne concerne que certains *Herpesviridae* [19].

Pour les *Gammaherpesvirinae*, l'épisode viral est associé au génome cellulaire [20]. Pour les *Rhadinovirus*, le mécanisme implique la protéine LANA ou des orthologues [21]. Cette protéine est hautement préservée et bifonctionnelle : l'extrémité N-terminale se lie à la chromatine cellulaire alors que l'extrémité C-terminale interagit avec différentes séquences présentes dans les séquences polyrépétitives d'ADN localisées à la fin du génome viral [22, 23]. Cette interaction permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral par des enzymes cellulaires et l'attachement de l'épisode viral aux chromosomes cellulaires [24]. Quand la cellule se divise, cet ancrage permet une distribution des épisodes au sein des cellules filles, mais évite également leur perte dans le cytoplasme.

Le mécanisme moléculaire gouvernant la latence n'est pas bien connu. Cependant, l'établissement de la latence induit toujours une limitation drastique de la transcription des gènes viraux associée ou non à la production de protéines virales. Le maintien du virus à long terme requiert l'existence de mécanismes spécifiques d'immunoévasion permettant au virus d'échapper aux systèmes de surveillance immunitaire. Outre l'importance d'un nombre réduit de protéines associées à la latence, certaines études ont montré l'existence des microARNs viraux, produits à partir de transcrits associés à la latence, et qui semblent moduler notamment l'immunité cellulaire et les voies cellulaires apoptotiques. Ces microARNs pourraient aussi avoir un rôle dans le cycle viral lytique [25-27].

A la suite d'un stimulus exogène, l'état de latence peut être interrompu. En effet, des changements physiologiques dans la cellule la rendent à nouveau permissive pour une nouvelle infection productive. Le génome viral est alors transcrit avec plus d'efficacité et il est répliqué pour mener à la production de nouveaux virions. A ce jour, peu de choses sont connues à propos des mécanismes et des stimuli responsables de la réactivation des *Gammaherpesvirinae*. Cependant, certaines études suggèrent un rôle des *Toll-Like Receptor* (TLR) [28]. Ces récepteurs ont un rôle crucial dans l'immunité innée et sont capables de reconnaître des patterns spécifiques nommés PAMP's (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) et ainsi de provoquer une réponse immunitaire rapide envers les pathogènes qui ont induit leur synthèse. Des études récentes renforcent le rôle de TLRs dans la réactivation des *Herpesviridae* [28, 29].

1.3. Génome des *Herpesviridae*

Le génome des *Herpesviridae* consiste en un ADN linéaire double brin d'une taille de 125 à 240 kpb dont la composition en dinucléotides G+C varie de 32 à 75% en fonction de l'espèce virale. Les génomes des *Herpesviridae* ont été classifiés selon leur structure (Figure 2) [17].

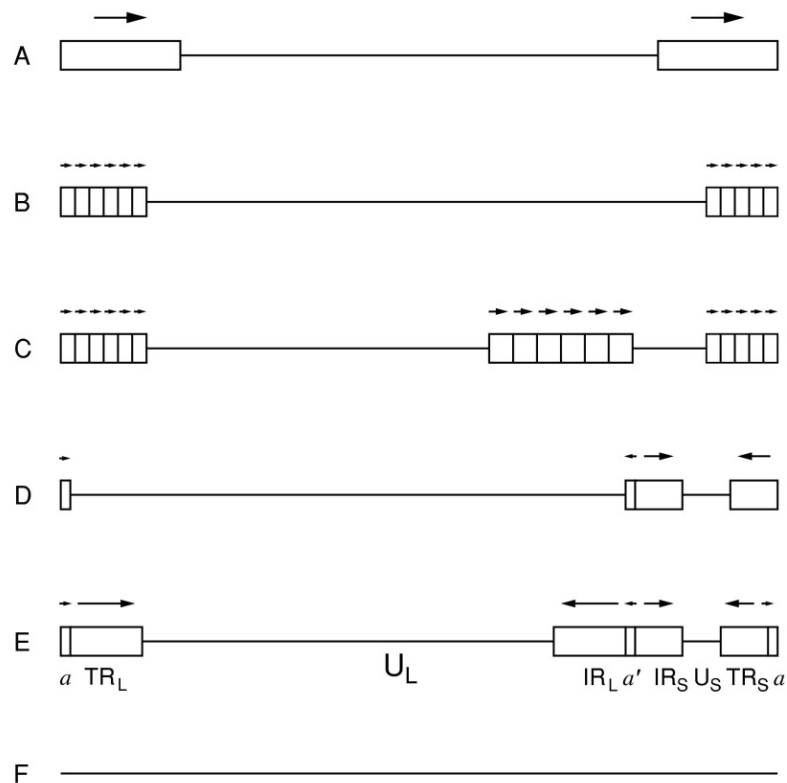


Figure 2. Classes de structures des différents génomes d'*Herpesviridae* selon Knipe et al. Les génomes de classe A consistent en une région unique flanquée par une région répétée. Ce type de génome est caractéristique des *Betaherpesvirinae* et d'un membre des *Gammaherpesvirinae* (*Equid Herpesvirus-2*, EHV-2). Les génomes de classe B ont aussi des séquences répétées terminales (prDNA pour poly-repetitive DNA) mais celles-ci sont représentées par un nombre variable de copies répétées en tandem contenant des séquences de 0,8 à 2,3 kpb. Ce type de génome est caractéristique de la plupart des *Gammaherpesvirinae* du genre *Rhadinovirus*, en particulier de l'*Herpesvirus Saimiri* (*Samiriine herpesvirus-2*, SaHV-2), du KSHV et du *Murid herpesvirus-4* (MuHV-4). La classe C est un dérivé de la classe B dans laquelle on trouve un set interne de répétitions indépendantes des répétitions des sets terminaux. L'EBV présente ce type d'arrangement. La classe D contient deux régions uniques (UL et US) chacune flanquée par des régions inversées (TRL/IRL et TRS/IRS). Cette structure est la caractéristique des *Alphaherpesvirinae*, tels que le *varicella zoster virus* (VZV). La classe E est la structure génomique la plus complexe et a été d'abord décrite pour l'*Herpes Simplex-1* (HSV-1 ou *Human herpesvirus-1*, HHV-1). Il s'agit d'une structure semblable à la classe D si ce n'est que les TRL/IRL peuvent s'inverser et l'ADN viral consister en quatre isomères équimolaires. Cette structure est retrouvée chez les *Alphaherpesvirinae* au sein du

genre *Simplexvirus*, et chez le *Human cytomegalovirus* (HCMV ou *Human herpesvirus-5*, HHV-5), membre des *Betaherpesvirinae*. Les génomes du groupe F ne contiennent aucune répétition ; on retrouve ce type de génome chez le *Mouse Cytomegalovirus* (MCMV ou *Murid herpesvirus-1*, MuHV-1). Les régions uniques et répétées sont montrées comme des lignes horizontales et des rectangles respectivement. L'orientation des répétitions est montrée par des flèches. La nomenclature des régions uniques et répétées, incluant la redondance terminale (a) et sa copie interne inversée (a') est indiquée pour les génomes de classe E. D'après Knipe et al. [17].

2. Les *Gammaherpesvirinae*

Les *Gammaherpesvirinae* sont une sous-famille d'*Herpesviridae* dont une des caractéristiques initialement définies est le tropisme de la plupart de ces virus pour les lymphocytes. La classification de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* a récemment été revue par l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV; <http://www.ictvonline.org>), et comprend maintenant 4 genres (Tableau 1): les *Lymphocryptovirus*, les *Rhadinovirus*, les *Macavirus* et les *Percavirus* [1]. Les *Gammaherpesvirinae* les plus étudiés sont l'*Epstein Barr Virus* (EBV ou *Human herpesvirus-4*) et le *Kaposi's Associated Herpesvirus* (KSHV ou *Human herpesvirus-8*). Les *Gammaherpesvirinae* infectent un large spectre de mammifères de la souris aux vaches, en passant par les chevaux et les primates. Une particularité des *Gammaherpesvirinae* est leur capacité à induire des cancers et des maladies lymphoprolifératives [30]. Les tumeurs associées à l'EBV et au KSHV surviennent en général chez des patients immunodéficients. Dans certains cas, ces tumeurs et maladies lymphoprolifératives apparaissent en cas de transmission inter-espèces (cross species) comme c'est le cas par exemple lors d'une infection de bovins par l'*Alcelaphine herpesvirus 1* (AIHV-1) [31].

2.1 Génome des *Gammaherpesvirinae*

Les *Herpesviridae* sont caractérisés par la présence d'homologues de gènes cellulaires au sein de leur génome. Ainsi, dans l'étude de Holzerlandt *et al.*, plusieurs homologues humains des gènes des *Herpesviridae* ont été identifiés par une base de données créée spécialement à cet effet (VIDA) [32]. Cette étude révèle que les gènes codant pour des protéines telles que l'ADN polymérase ou l'uracil-ADN glycosylase, ont été acquis chez un hôte très lointain. D'autres gènes ont par contre été acquis plus récemment et ne sont donc présents que dans certaines sous-familles ou certains genres. Le génome des *Gammaherpesvirinae* semble ainsi tout particulièrement riche en homologues de gènes cellulaires de mammifères. Ainsi parmi les 59 protéines homologues répertoriées dans cette étude, 16 ont été identifiées chez les *Alphaherpesvirinae*, 17 chez les *Betaherpesvirinae* et 32 chez les *Gammaherpesvirinae*. La figure 3 illustre l'analyse de certains de ces gènes dont les produits sont impliqués dans les interactions hôtes-virus [33]. L'examen de ces gènes révèle

que le KSHV encode au moins 12 ORFs (Open Reading Frames) qui ont des homologues cellulaires connus. La plupart de ces gènes interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'inhibition de l'apoptose, dans la signalisation par les cytokines et dans l'immunorégulation [34]. Le SaHV-2 code notamment pour des protéines régulatrices du complément, la cycline D, le récepteur à l'IL-8 et d'autres médiateurs de la réaction immunitaire [35].

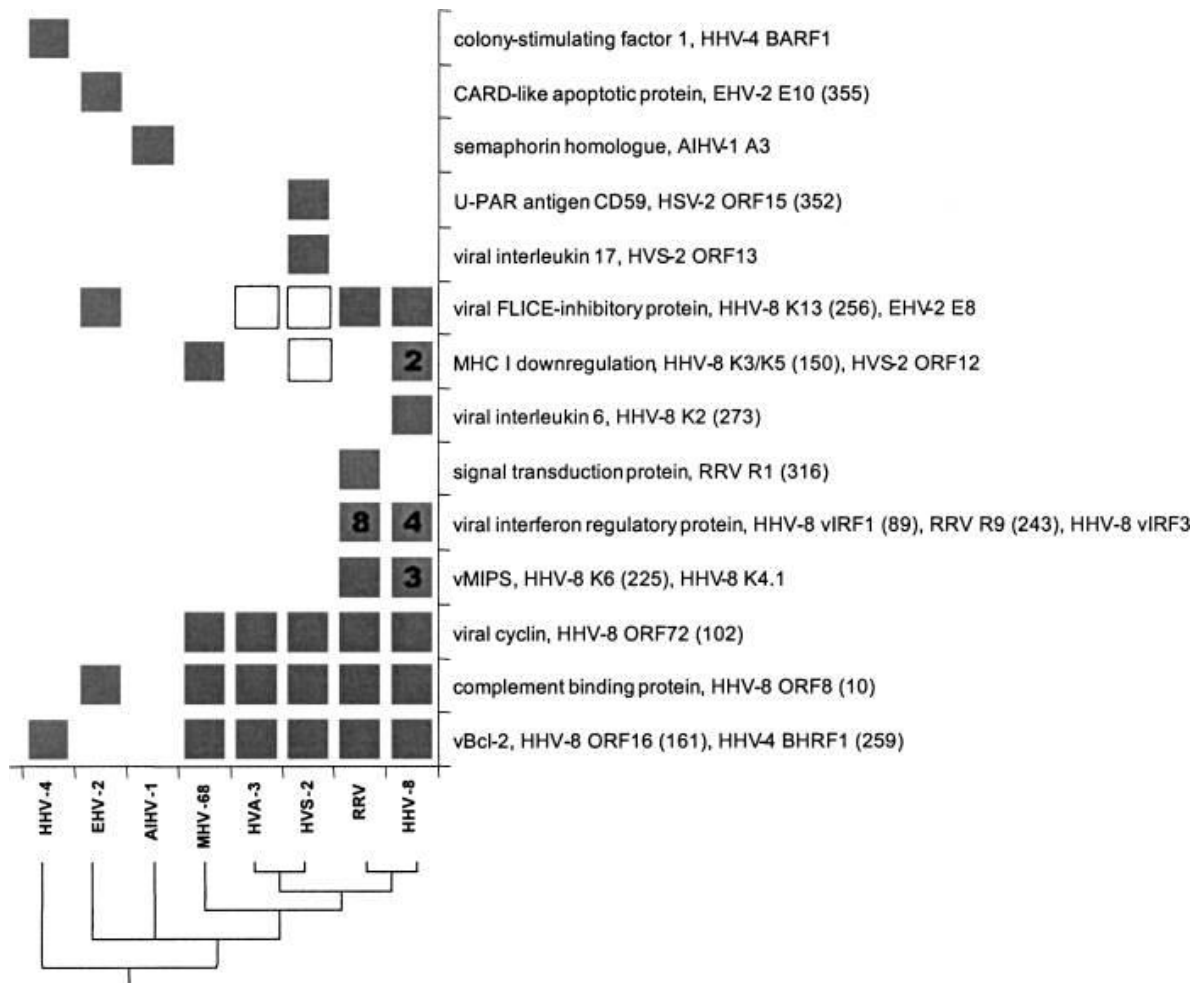


Figure 3. Protéines spécifiques des *Gammaherpesvirinae* impliquées dans les interactions hôtes-virus qui ont des homologues chez l'homme. Les carrés indiquent la présence d'un gène particulier dans le génome viral. Les nombres dans ces carrés représentent le nombre de copies au sein du génome. Sur le côté, sont notés: la fonction de la protéine virale, le nom de la famille de protéines homologues HPF (homologous protein family) et pour les HPF, le numéro correspondant selon la classification VIDA. Pour certains *Gammaherpesvirinae*, l'homologue cellulaire de la protéine virale particulière n'a pas été trouvé dans cette étude (case vide, non grisée) mais selon la fonction de la protéine ou les résidus conservés au sein de cette protéine, les protéines virales observées peuvent être groupées. Dans le bas de la figure, un arbre phylogénétique des *Gammaherpesvirinae* a été généré. D'après Holzerlandt et al. [33].

2.2. Le virus d'Epstein Barr et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi

2.2.1. Le virus d'Epstein Barr

L'EBV appartient au genre *Lymphocryptovirus* et a été identifié il y a environ 50 ans à partir de cellules isolées d'un lymphome de Burkitt [36]. D'un point de vue épidémiologique, on estime que 90% de la population adulte est infectée [37]. L'infection est contractée le plus souvent pendant l'enfance, et est habituellement asymptomatique. Le virus se transmet en général par la salive. Si l'infection primaire survient plus tard, la prolifération des lymphocytes B et la réponse immune résultante peuvent induire dans 30% des cas une mononucléose. Les signes cliniques sont de gravité variable et ils peuvent aller de la fatigue passagère à la fièvre intense accompagnée d'une pharyngite purulente avec altération conséquente de l'état général, le tout signé par des tests hépatiques altérés [38]. Le système immunitaire est capable de contrôler l'infection essentiellement via les cellules T CD4+ et CD8+ [39, 40] mais est incapable d'éliminer le virus qui se maintient à l'état latent. Ceci peut expliquer l'apparition de désordres lymphoprolifératifs chez les patients recevant des traitements immunosuppresseurs [41] ou chez les patients séropositifs pour le HIV et ayant développé le SIDA [42].

2.2.2. L'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi

Le KSHV a été identifié en 1994 au sein de lésions tumorales caractéristiques chez les patients porteurs du HIV, connues sous le nom de sarcome de Kaposi (KS) [43]. Les lésions cancéreuses associées au KSHV sont les tumeurs les plus fréquentes des patients infectés par le HIV [44]. Comme pour l'EBV, les symptômes liés à l'infection par le KSHV chez les personnes immunocompétentes sont quasi absents. Chez les enfants, l'infection primaire peut être associée à un rash maculo-papuleux parfois accompagné de fièvre [45]. Des adultes infectés sous traitement immunosuppresseur pour transplantation d'organe ont présenté une insuffisance médullaire associée à une splénomégalie et de la fièvre [45] et ces observations ont permis de mettre en évidence la preuve de la transmission du KSHV dans les organes transplantés [13, 46]. La forme classique du sarcome, originellement identifiée par Kaposi, et typique chez des patients âgés provenant du pourtour méditerranéen affectait la peau des membres inférieurs. La forme africaine endémique, préalable au pic épidémiologique de HIV, présente 4 formes différentes : une forme nodulaire bénigne

similaire à la forme classique, une forme agressive envahissant l'os, une forme muco-cutanée et viscérale et pour finir, une forme lymphadénopathique essentiellement pédiatrique. Dans les lésions du KS, le KSHV est détecté au sein des cellules vasculaires endothéliales et de cellules de morphologie caractéristique appelées *spindle cells* (SC). Ces cellules constituent la signature histopathologique du KS [47]. Il est intéressant de noter que la plupart des lésions de KS sont positives aussi pour l'EBV [30]. Par ailleurs, les lésions peuvent se résoudre lorsque l'immunité est améliorée [48].

Le KSHV infecte initialement les cellules endothéliales (ECs) : les ECs matures (BECs), les ECs lymphatiques (LECs) et les progéniteurs des ECs (probablement pour entraîner leur différenciation vers un phénotype LEC/BEC) [49, 50]. La pathogénie du sarcome de Kaposi est liée à des réactions angiogéniques et inflammatoires [51]. Les *spindle cells* (SCs), cellules tumorales dérivées des cellules endothéliales, sécrètent des cytokines inflammatoires (ICs) ainsi que des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques qui stimulent l'activation et la prolifération des ECs de façon paracrine et recrutent un grand nombre de cellules inflammatoires au site de l'infection. Ceci contribue à l'exacerbation de la réponse inflammatoire avec sécrétion d'ICs, de chémokines et de facteurs angiogéniques [52, 53]. En présence de co-facteurs additionnels tels qu'une immunosuppression ou des altérations génétiques par exemple, les réactions inflammatoires et angiogéniques initiales peuvent se muer en prolifération néoplasique. Dans les cas très précoces de sarcome, une prolifération polyclonale des ECs est détectée, alors que dans les stades tardifs, les lésions qui dominent sont caractérisées par une expansion mono- ou oligoclonale des cellules infectées. Dans les tumeurs très avancées, le virus est principalement retrouvé à un stade latent : seule une fraction (1-5%) des SCs est le siège d'une réplication lytique [54]. Dans les cellules infectées de manière latente, le génome viral est maintenu dans le noyau sous forme d'épisome et l'expression des gènes est limitée à la production de la protéine LANA (Latency Nuclear Associated Antigen), une protéine homologue de la cycline D2 cellulaire (v-cyclin), à la v-FLIP, aux kaposines A, B et C et d'au moins 17 miRNAs matures [55]. Les produits des gènes de latence sont impliqués dans le maintien de l'épisome, dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans l'inhibition de l'apoptose. Les gènes de latence stimulent donc la prolifération et la survie des cellules infectées et assurent leur croissance clonale au sein des lésions anciennes. Pendant la phase lytique, plus de 80 ORFs sont exprimés lors de cascades de

transcription étroitement régulées et résultent en la production de nouveaux virions, en l'inhibition de la réponse immunitaire hôte et en la synthèse de nouveaux facteurs pro-prolifératifs et anti-apoptotiques [56]. Les différentes protéines qui contribuent à l'environnement proinflammatoire et angiogénique sont, entre autres, le récepteur viral couplé à la protéine G (vGPCR), l'interleukine virale 6 (v-IL-6) et les chémokines virales (vCCLs) [51].

2.2.3. Clinique associée à l'EBV et au KSHV

A la fois l'EBV comme le KSHV infectent les lymphocytes B et peuvent largement coexister avec leur hôte sans causer de symptômes. Ces virus sont qualifiés d'oncogène c'est-à-dire qu'ils ont une propension à favoriser la transformation maligne de la lignée cellulaire infectée. L'expression des oncoprotéines virales peut interférer non seulement avec les mécanismes régulateurs de la prolifération cellulaires mais aussi avec les mécanismes de réparation de l'ADN ou encore via des modifications épigénétiques héritables (méthylation de l'ADN par exemple) [57]. D'autres facteurs viraux tels que les microARNs peuvent aussi participer à la transformation de la cellule infectée [58]. Chez un individu immuno-compétent, le système immunitaire est capable de contrôler l'infection virale sans pour autant éliminer le virus de l'hôte. En cas de perturbation des mécanismes immunitaires, la prolifération de lignées tumorales peut survenir secondairement à l'infection par l'un de ces deux virus. Ainsi, l'infection des cellules B par l'EBV et/ou le KSHV peut mener à une série de pathologies malignes décrites dans la figure 4.

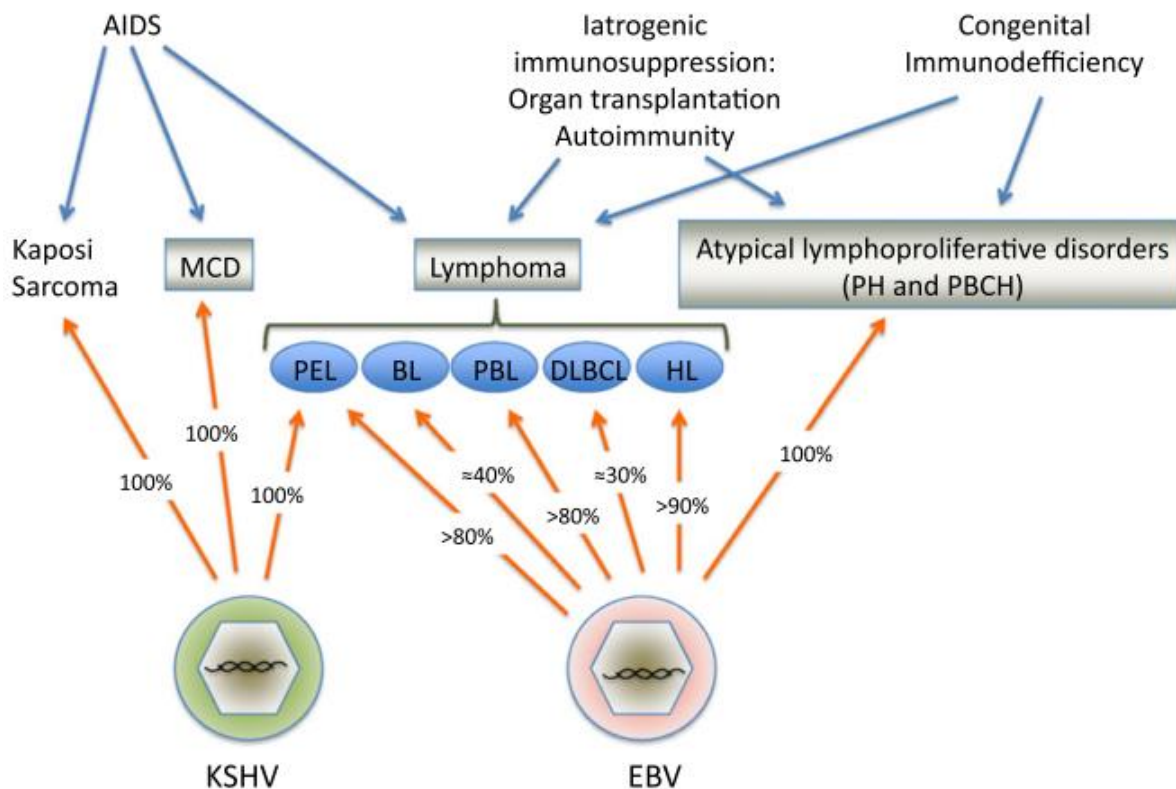


Figure 4. Maladies lymphoprolifératives causées par l'EBV et le KSHV. Les sous-types de maladies lymphoprolifératives sont indiqués dans les carrés où les flèches bleues indiquent la cause de l'immunodéficience et, les flèches oranges, les associations les plus fréquentes. Les pourcentages d'infection par l'EBV sont une approximation basée sur une compilation de la littérature réalisée par les auteurs. Ces nombres sont plus bas pour MCD, DLBCL et HL chez les individus sans immunosuppression. Abréviations : MCD : maladie multicentrique de Castleman ; PH : hyperplasie plasmocytaire ; PBCH : hyperplasie à cellules B polymorphiques ; PEL : lymphome primaire à effusion ; BL : lymphome de Burkitt ; PBL : lymphome plasmoblastique ; DLBCL : lymphome diffus à larges cellules B. D'après Cesarman *et al.* [30].

Parmi ces maladies prolifératives, la maladie de Castelman (MCD) est dite multicentrique car elle est capable d'envahir toute une série de ganglions lymphatiques [59]. Les symptômes et signes associent fièvre, malaise, fonte musculaire, hypoalbuminémie, hyponatrémie et cytopénie [60]. Bien que seule la moitié des cas de MCD soit associée au KSHV chez les personnes immunocompétentes, 100% des MCDs développées par les personnes séropositives pour le HIV sont liées au KSHV [30]. Le lymphome diffus à large cellules B (DLBCL) peut être divisé en centroblastique et immunoblastique. Parmi ces deux types, c'est le type immunoblastique qui est le plus souvent associé à l'EBV. Les patients présentant cette pathologie souffrent généralement d'un syndrome d'immunodéficience avancé (lié au HIV) et l'usage de la trithérapie en a diminué largement l'incidence [30, 61]. L'incidence des lymphomes de Hodgkin (HL) est en augmentation chez les personnes

séropositives pour le HIV. 30% des patients HL sont positifs pour l'EBV et cette incidence augmente dans les pays sous-développés et chez les personnes immunodéficientes [30, 62]. Le lymphome d'effusion primaire (PEL) est caractérisé par la présence de cellules tumorales infectées à la fois par le KSHV et l'EBV [63]. On parle d'effusion car il envahit le plus souvent un ou plusieurs espaces tels que la plèvre, le péritoine ou le péricarde. Le lymphome plasmoblastique (PBL) est particulièrement agressif et est décrit dans un premier temps dans la cavité orale des patients séropositifs pour le HIV, avec une infection concomitante par EBV dans 90% des cas. Cependant, le PBL peut aussi survenir dans d'autres sites où l'EBV est présent dans une moindre proportion de cas (75%). Les désordres prolifératifs post-transplantation surviennent suite à une transplantation d'organe solide ou de moelle osseuse. Son incidence varie de 0,3 à 12,5% selon le type d'organe transplanté et la quantité d'immunosuppresseurs utilisée. Les lésions sont généralement associées à l'EBV, particulièrement si la sérologie anti-EBV était négative avant la transplantation [64]. Le lymphome de Burkitt (BL) est une tumeur maligne de haut grade dérivée des cellules B, présente essentiellement chez les enfants. Une des caractéristiques de la maladie est sa présence dans les régions endémique pour la malaria. Il s'agit d'un lymphome non hodgkinien qui présente le temps de dédoublement le plus rapide parmi les tumeurs humaines. Dans les régions à fortes prévalence de paludisme, le taux de contamination par l'EBV est supérieur à 95%.

Au-delà des pathologies pour lesquelles l'EBV et le KSHV ont été isolées, il est reconnu que l'épisode viral peut être perdu lors de la division des cellules néoplasiques. Une des théories avancées pour expliquer cette disparition du matériel génétique viral est la théorie dite du *Hit and Run*. Selon cette théorie, l'acquisition, même transitoire, d'une portion de génome viral ou de la totalité de celui-ci est une condition suffisante pour induire une transformation maligne des cellules hôtes *in vivo*. Ainsi, le nombre de maladies néoplasiques induites par les *Herpesviridae* pourrait être largement sous-estimé [65].

2.2.4. Modèles animaux

L'EBV et le KSHV sont difficiles à cultiver *in vitro* [66, 67] et n'infectent pas les animaux de laboratoire. Il est donc nécessaire de se référer à d'autres *Gammaherpesvirinae* infectant les animaux pour améliorer la compréhension de l'EBV et du KSHV chez l'homme.

Parmi les *Gammaherpesvirinae*, le *Rhesus Monkey Rhadinovirus*, l'herpèsvirus bovin 4 et l'herpèsvirus murin 4 (MuHV-4) sont d'excellents modèles pour l'étude des *Gammaherpesvirinae* humains. Le MuHV-4 partage en effet 90% de ses gènes avec le KSHV et 80% avec l'EBV (gènes homologues). Le MuHV-4 et l'EBV partagent en outre un tropisme pour les cellules B et provoquent tous les deux un tableau clinique de type mononucléosique (symptômes liés à une atteinte pharyngée avec fatigue, modifications des enzymes hépatiques, atteinte splénique dans certains cas, ...) [68-73].

2.3. L'herpèsvirus murin-4

2.3.1. Spectre d'hôte

La souche MHV-68 du MuHV-4 a été isolée chez *Myodes glareolus* (campagnol roussâtre), capturés en Slovaquie en 1980 et ce, concomitamment aux souches 60 et 72 [74]. Lors de la même étude, les souches 76 et 78 ont été isolées chez *Apodemus flavicollis* (mulot à collier) [74]. A ce jour, aucun consensus n'existe en ce qui concerne l'hôte naturel du MuHV-4. Cependant, plusieurs études ont été conduites afin de déterminer quelles espèces pouvaient être naturellement infectées. En 2003, une étude conduite en Angleterre a montré que la séroprévalence était particulièrement élevée dans les populations de mulots sylvestres (*Apodemus sylvaticus*, *wood mouse*) dans cette région [75]. Ces résultats ont été confirmés en 2007 et ces études ont ainsi conclu que l'hôte naturel le plus probable était le mulot sylvestre sans exclure que d'autres espèces pouvaient aussi être naturellement infectées [76]. Cependant, en 2009, un autre virus a été isolé chez cet hôte et dénommé *Wood Mouse Herpesvirus* (WMHV) [77]. Ce dernier s'est révélé être particulièrement proche du MuHV-4. Ainsi, il est impossible d'exclure que les études révélant la présence de MuHV-4 dans les populations étudiées décrivaient en fait une infection par le WMHV. Il semble donc que la plupart de ces études ne soient pas convaincantes en termes de types de souches détectées tant les similitudes entre les différents virus sont grandes. De plus, compte tenu des travaux effectués en laboratoire sur le MuHV-4, il était important de comparer les infections expérimentales réalisées sur les souris de laboratoire et sur des hôtes supposés naturels. Ceci a été réalisé dans notre laboratoire et a permis de confirmer la légitimité du modèle murin pour l'étude du MuHV-4 (contribution personnelle à l'étude) [78].

2.3.2. Le génome viral

Le génome du MuHV-4 a été entièrement séquencé en 1997 par Virgin *et al.* [79] et présente une plus grande homologie avec celui du KSHV qu'avec celui de l'EBV [40, 69]. La longueur du génome du MuHV-4 est de 118.237pb, composé d'une longue région unique linéaire (LUR) flanquée de part et d'autre par un nombre important de répétitions comptant pour 1213 pb (« terminal repeats » ou TR) [80]. Il s'agit donc d'un génome de classe B (Figure 2) [80]. L'analyse de la séquence révèle plus de 80 ORFs dont 63 sont homologues à des gènes du SaHV-2, l'espèce type du genre *Rhadinovirus* [79]. Ces 63 ORFs sont aussi présents dans le génome du KSHV et la majorité également dans le génome de l'EBV. Ce génome est composé de larges blocs de gènes conservés au sein des *Gammaherpesvirinae*, entre lesquels des gènes spécifiques du MuHV-4 sont dispersés.

Ces gènes uniques sont au nombre de 14 et sont nommés M1 à M14. L'extrémité gauche du génome du MHV-68 contient les gènes M1 à M4, qui sont absents dans la souche MHV-76. L'infectivité de cette dernière souche est différente et l'absence de cette région génomique entraîne un contrôle plus rapide de l'infection (réponse inflammatoire plus aiguë) et une latence moins efficace. Par ailleurs, une souche MHV-76 complétée par l'extrémité gauche terminale du MHV-68 montre un degré d'infectivité proche de la souche MHV-68 [81].

Au sein du génome du MuHV-4, 41 ORFs semblent essentiels à la réplication du virus *in vitro*. Les études portant sur la mutagenèse systématique ont en effet mis en évidence les ORFs qui semblent indispensables à la réplication virale et qui sont schématisés à la figure 5 [82]. Comme les autres *Gammaherpesvirinae*, le MuHV-4 comprend des gènes qui sont homologues à des gènes cellulaires. Ces gènes codent notamment pour: la protéine régulatrice du complément (ORF4), intervenant dans l'inhibition de la lyse médiée par le C3 [83], la cycline D (ORF72) qui semble associée à la prolifération cellulaire chez le SaHV-2 et d'autres virus [84], le récepteur à l'IL-8 (ORF74) qui intervient dans l'angiogenèse et la prolifération tumorale chez le KSHV [85] et vbcl-2 (M11) qui inhibe l'apoptose chez le KSHV et l'EBV [86]. Ces vbcl-2 virales permettent, entre autres, aux *Gammaherpesvirinae* de prolonger la vie des cellules infectées afin de terminer un cycle de réplication virale et/ou de

promouvoir la survie de cellules impliquées dans la latence [69], elles interviennent également comme inhibitrices de l'autophagie [87]

Enfin, le génome du MuHV-4 contient également 8 séquences codant pour des ARNs de transfert (ARN-t) [88]. Le rôle de ces ARNs n'est pas clairement défini mais il est intéressant de noter qu'ils sont particulièrement abondants dans les centres germinatifs lorsque la latence virale est établie [88]. Au sein des séquences codants pour ces ARN-t, figurent des séquences promotrices pour l'expression de microARNs viraux, via l'ARN polymérase III [89]. Comme indiqué précédemment, l'expression de microARNs viraux été démontrée parmi les *Herpesviridae* [90, 91]. Ils semblent être impliqués à la fois dans l'infection lytique et dans l'infection latente, agissant probablement dans les interactions hôtes-virus [92].

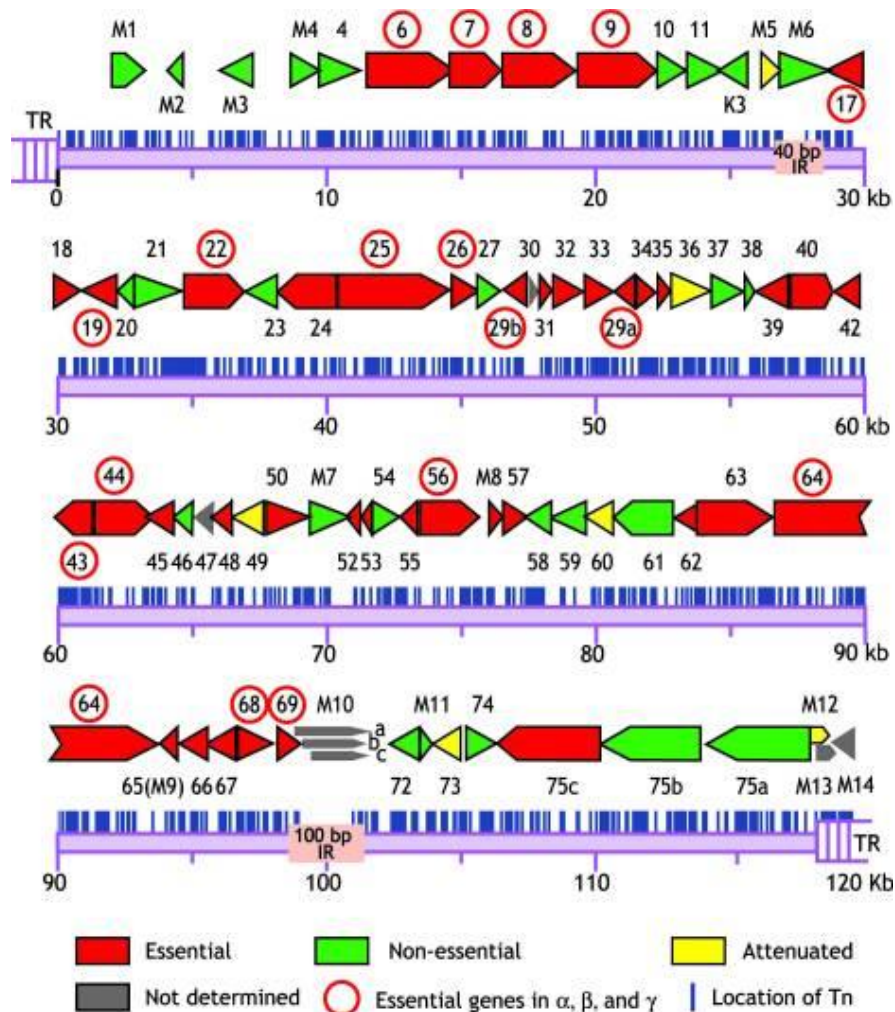


Figure 5. Carte génomique fonctionnelle de la souche MHV-68 en fonction des gènes essentiels à sa croissance *in vitro*. Les ORFs prédits par Virgin *et al.* sont colorés selon leur importance dans la croissance virale *in vitro* (dans des fibroblastes). Ces observations proviennent des différents mutants obtenus par mutagenèse systématique des ORFs, par insertion de transposons (en bleus). Les ORFs orientés vers la droite sont indiqués sur la ligne supérieure, alors que ceux orientés vers la gauche, sont notés en-dessous. Les cercles rouges indiquent que le gène est conservé chez les *Alpha-*, les *Beta-* et les *Gammaherpesvirinae*. Les lignes verticales représentent les sites d'insertion des transposons basés sur le séquençage des 988 mutants étudiés par Song *et al.* D'après Song *et al.* [82].

Les avancées technologiques récentes dans le domaine de l'analyse des transcrits à l'échelle du génome, rassemblées sous le terme de transcriptomique et utilisant des techniques tels que les *microarrays* ou les méthodes de séquençage de l'ARN, permettent maintenant une avancée rapide dans la compréhension du contenu génétique des *Gammaherpesvirinae* [93-97]. Ces larges analyses révèlent la complexité de l'organisation génomique de ces virus via l'utilisation de l'épissage alternatif, l'initiation et la terminaison de la traduction ainsi que via l'expression d'ARN régulateurs. La fonction de ces différents acteurs reste encore largement méconnue.

2.3.3. Pathogénie

Le MuHV-4 infecte et s'établit à l'état latent chez la souris de laboratoire. La voie naturelle d'infection n'est pas connue mais il est usuel de considérer qu'elle est située au niveau des voies respiratoires hautes. Plusieurs études ont comparé différentes voies non naturelles d'infection (intraveineuse, péritonéale, sous-cutanée, intracérébrale, orale, versus infection nasale), et ont montré que l'infection intranasale était la voie qui produisait les signes cliniques qui se rapprochaient le plus des signes observés lors de l'infection naturelle [98].

L'inoculation intranasale mène à une réplication virale au sein de l'épithélium olfactif chez des souris non anesthésiées [99] (Figure 6). Le virus infecte ensuite des cellules myéloïdes qui rejoignent les ganglions lymphatiques drainants où elles permettent l'infection des cellules B. Ces cellules B prolifèrent alors au sein des centres germinatifs. Certaines de ces cellules se différencient en plasmocytes au sein des cordons médullaires et réécrètent des virions infectieux dans les vaisseaux lymphatiques efférents. Via la circulation sanguine, ces virions gagnent la rate et infectent les macrophages de la zone marginale qui transmettent ensuite l'infection aux cellules B. Ces dernières migrent dans la

pulpe blanche, se différencient en plasmocytes et libèrent plus de virions. Ceux-ci infectent des cellules folliculaires dendritiques qui transfèrent l'infection aux cellules B des centres germinatifs. Celles-ci rejoignent le pool de lymphocytes B mémoires circulants. La différenciation en plasmocyte au sein des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses permet la réactivation virale et la libération de virions infectieux au niveau du tractus génital et probablement dans la salive.

Il faut souligner que les souris inoculées par voie intranasale sous anesthésie, présentent un premier site de réplication au niveau pulmonaire, causant une pneumonie interstitielle associée à une hyperleucocytose périvasculaire et des infiltrats péribronchiques. La primo-infection est largement contrôlée après 10 à 14 jours post-infection [98]. Aucune réplication pulmonaire n'est par contre observée chez les souris non anesthésiées [99]. Ainsi, la réplication pulmonaire n'est probablement pas le reflet de ce qui se passe naturellement. Simultanément à la réplication lytique, la latence est établie au sein des organes lymphoïdes, surtout dans la rate et les ganglions crâniens superficiels [99]. Une infection aiguë de ces organes est contrôlée en 14 à 16 jours et la latence est considérée comme établie 16 à 18 jours post-infection.

Quelle que soit la voie d'entrée, le MuHV-4 est capable de s'établir de manière systémique à l'état latent fournissant ainsi la preuve que le virus possède un large tropisme pour différentes lignées épithéliales et fibroblastiques. Les cellules infectées latentes circulantes peuvent théoriquement mener à l'infection de n'importe quel site anatomique expliquant la relative équivalence des voies d'inoculation.

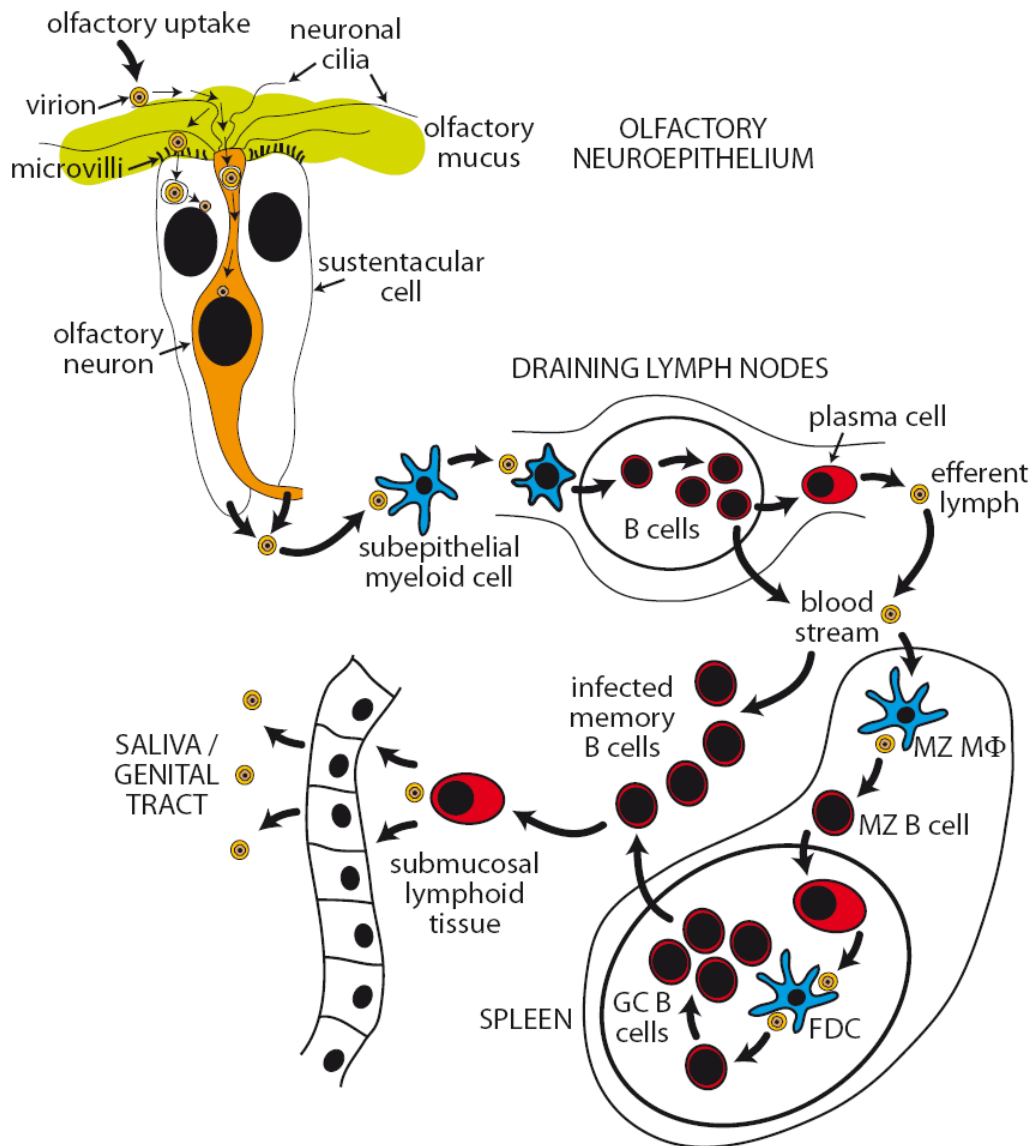


Figure 6. Représentation schématique du trajet du MuHV-4 au sein de son hôte après infection intranasale. Les virions s'attachent dans un premier temps aux cils neuronaux qui font protrusion hors du mucus olfactif. Ces cils permettent aux virions de traverser le mucus et d'atteindre les neurones olfactifs ou les cellules sous-tentaculaires. Celles-ci excrètent du virus à leur face basolatérale, où ceux-ci rencontrent des cellules myéloïdes sous-épithéliales. L'infection de ces cellules (CD11c+) permet au MuHV-4 d'atteindre les lymphocytes B au sein des ganglions lymphatiques. Ces cellules B prolifèrent au sein des centres germinatifs et certaines de ces cellules se différencient en plasmocytes au sein des cordons médullaires et réexcrètent des virions infectieux dans les vaisseaux lymphatiques efférents. Via la circulation sanguine, ces virions gagnent la rate et infectent les macrophages de la zone marginale qui transmettent ensuite l'infection aux cellules B qui migrent dans la pulpe blanche, se différencient en plasmocytes et libèrent plus de virions. Ceux-ci infectent des cellules folliculaires dendritiques qui transfèrent l'infection aux cellules B des centres germinatifs. Celles-ci rejoignent le pool de lymphocyte B mémoire circulants. La différenciation en plasmocyte au sein des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses permet la réactivation virale et la libération de virions infectieux au niveau du tractus génital et probablement dans la salive (Dr. P.G. Stevenson, figure non publiée).

3. Cycle biologique des *Herpesviridae*

Le cycle biologique des *Herpesviridae* peut être divisé en deux parties :

- La phase I reprenant l'attachement de la particule virale à la cellule cible, la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire, le transport de la capsid virale jusqu'au noyau, l'entrée du matériel génétique dans le noyau et la circularisation de l'épisome viral.
- La phase II comprenant la réplication du génome viral, l'expression des protéines virales, la formation de la capsid dans le noyau, la sortie de la capsid du noyau, la tégumentation, l'enveloppement de la particule virale et son relargage dans le milieu extérieur.

3.1 Phase I : ENTREE

3.1.1 L'attachement

Les *Herpesviridae* ont la particularité d'utiliser de nombreuses protéines d'enveloppe pour assurer leur entrée dans la cellule alors que la plupart des autres virus enveloppés n'en utilisent que peu [100-102]. Le mécanisme d'attachement des *Herpesviridae* se réalise en deux étapes : d'abord le virus se lie à la cellule hôte par certaines de ses glycoprotéines, ce qui permet un rapprochement de l'appareil de fusion viral à proximité de la membrane cellulaire. Il s'agit d'un mécanisme d'attachement de faible affinité. Certaines de ces glycoprotéines vont initier les étapes suivantes alors que d'autres ne jouent qu'un rôle dans l'attachement [100]. Ensuite, une seconde étape met en jeu d'autres protéines et met en contact les deux membranes l'une avec l'autre. Cette seconde étape est caractérisée par une liaison forte entre le virus et la cellule qui aboutit à la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane de la cellule cible (Figure 7).

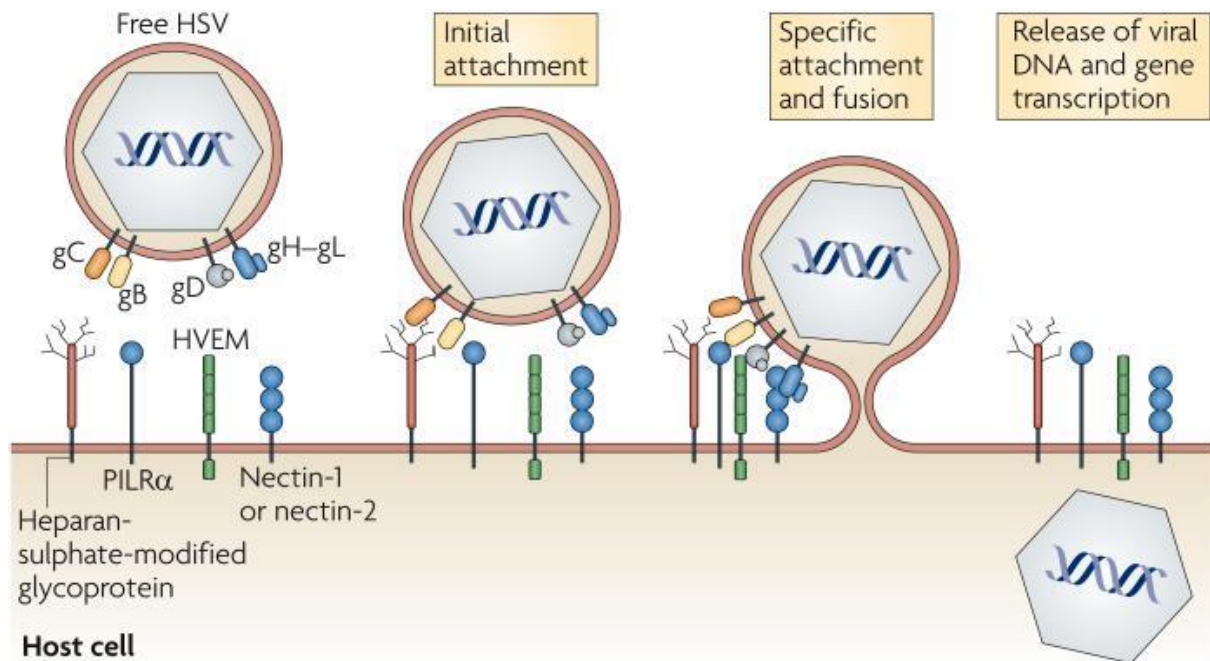


Figure 7. L'attachement chez les *Herpesviridae*. L'Herpès simplex virus (HSV-1) (pris comme modèle ici) contient à sa surface 5 glycoprotéines qui interviennent dans l'entrée : gB, gC, gD, gH et gL. gB et gC permettent l'attachement initial des particules virales aux résidus d'héparan sulfate sur les protéoglycans des cellules cibles. gB se lie au récepteur immunoglobulin-like type 2 receptor- α (PILR- α) et gD lie le *herpesvirus entry mediator* (HVEM), la protéine nectin-1, nectin-2 ou l'3-O-sulphotransferase-modified heparan sulfate, ce qui enclenche la fusion avec la membrane cellulaire et libère ainsi la capside dans le cytoplasme de l'hôte. D'après Sedy *et al.* [103].

Il est donc important de distinguer les facteurs liés à l'attachement strict des virions qui concentrent les virus à la surface de la cellule et ceux qui déclenchent des changements au sein du virus ou de la cellule comme par exemple, ceux qui vont induire l'endocytose (lorsque celle-ci est requise) et la fusion. En pratique, il est souvent difficile de faire la distinction entre les facteurs cellulaires intervenant dans l'attachement initial et ceux jouant le rôle de récepteurs proprement dits car tous contribuent à l'infectivité. Les facteurs cellulaires initiateurs de l'entrée les plus fréquemment rencontrés sont les chaînes de glycosaminoglycans (GAGs), en particulier les héparans sulfates (HS), situés sur les protéoglycans. La Figure 8 synthétise la majorité des interactions récepteurs cellulaires-glycoprotéines virales observées au sein des *Herpesviridae* infectant l'homme.

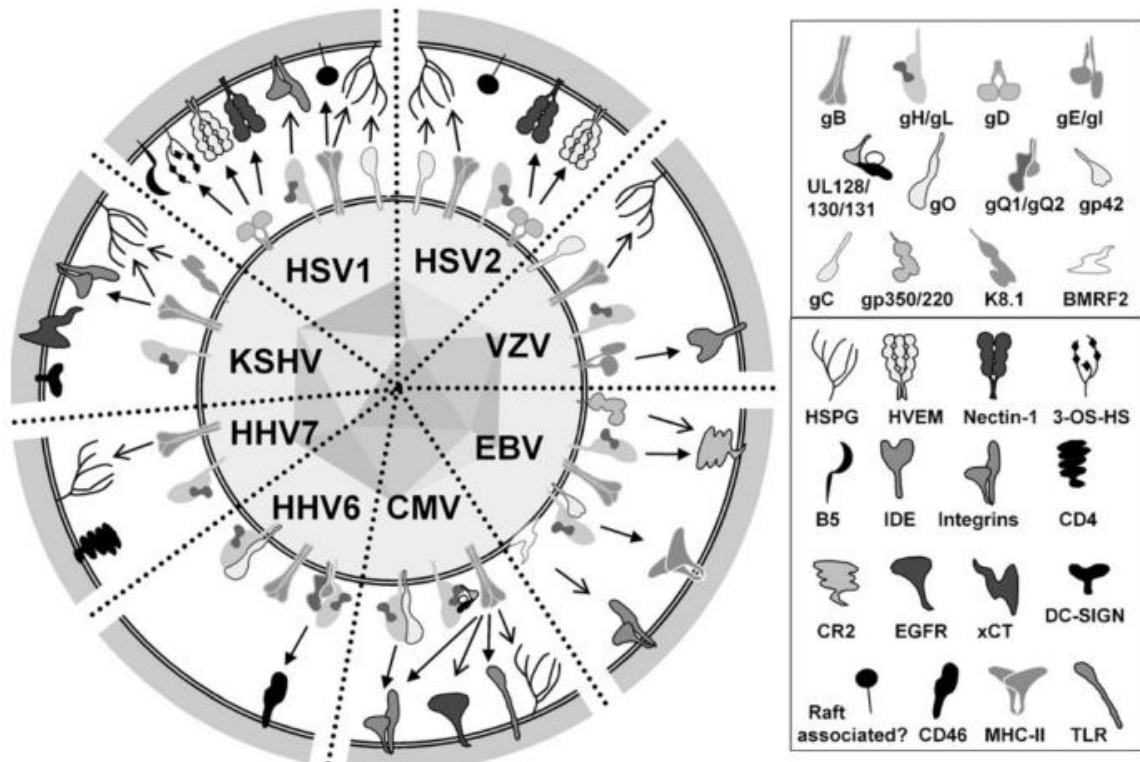


Figure 8. Interactions principales entre glycoprotéines virales et récepteurs cellulaires permettant l'entrée des herpesvirus humains. Les interactions résultant dans un attachement initial sont indiquées par des flèches ouvertes, et celles qui sont impliquées dans la fusion par des flèches fermées. Ces différentes interactions n'ont pas nécessairement lieu sur la même cellule au même moment. Les glycoprotéines virales sont représentées dans le cercle interne, les molécules de surface cellulaires dans le cercle externe. D'après Heldwein *et al.* [104].

Au sein des *Gammaherpesvirinae*, l'entrée de l'EBV dépend du type de cellules à infecter. A la surface des cellules B, l'attachement initial est médié par une des glycoprotéines les plus abondantes, gp350/220, liant le récepteur au complément de type 2 (CR2/CD21) [105, 106] (Figure 9). Gp42 interagit ensuite avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Ceci enclenche la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. En ce qui concerne les cellules épithéliales, la protéine virale BMRF2 lie les intégrines $\beta 1$ [107-109]. Ensuite, gH/gL interagit avec les intégrines $\alpha \beta 6/8$, ce qui provoque la fusion. Contrairement à l'entrée dans les cellules B, l'entrée dans les cellules épithéliales est donc indépendante de gp42 [107]. Gp42 agit comme un régulateur d'entrée et s'associe avec des molécules HLA de classe II pour promouvoir la fusion [110]. La séquence d'évènements survenant à la surface des cellules cibles du KSHV est moins bien décrite. Le KSHV a un tropisme pour les macrophages, les cellules B, les cellules

épithéliales et les fibroblastes entre autres. L'attachement initial est médié par gB qui s'attache aux intégrines et aux héparans sulfates [111, 112]. La glycoprotéine K8.1 est l'homologue de gp350/220 et se lie également aux héparans sulfates [113].

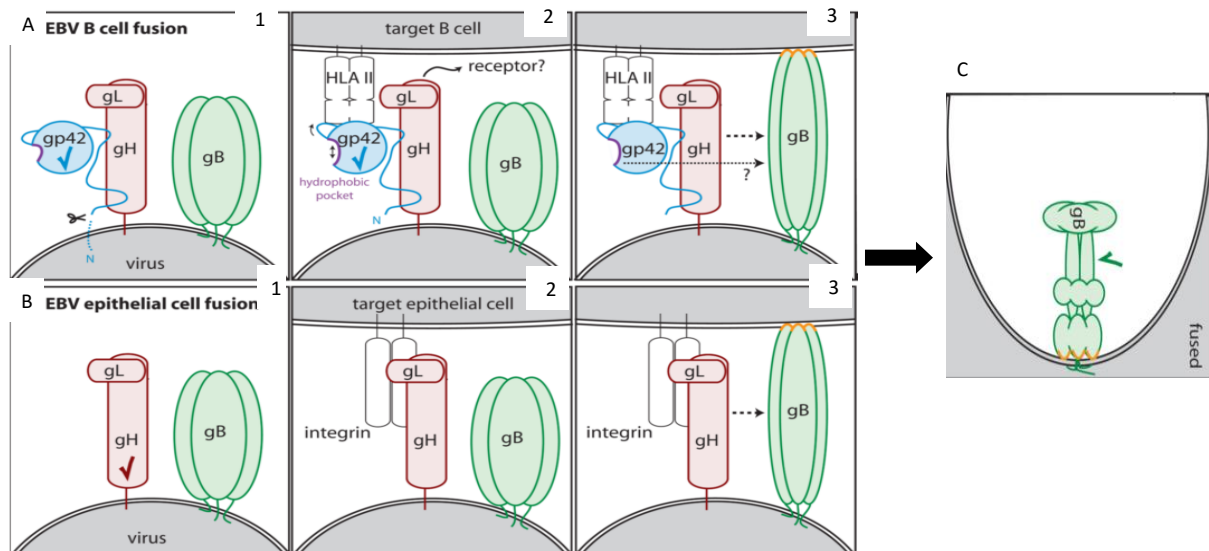


Figure 9. Modèles d'entrée de l'EBV au sein des cellules B et des cellules épithéliales. (A) Interaction de l'EBV avec la membrane plasmique ou d'un endosome d'une cellule B. (1) Gp42 subit un clivage de son extrémité transmembranaire N-terminale mais reste associée à la particule virale grâce à ses interactions avec gH et gL. (2) Quand une molécule du CMH de classe II lie gp42, une poche hydrophobe (mauve) s'ouvre sur gp42 et peut alors déclencher la fusion. (3) Les changements de conformation au sein de gp42 et/ou gH/gL conduisent à l'insertion des boucles de fusion de gB (en orange) au sein de la membrane cellulaire. (B) Interaction de l'EBV avec la membrane des cellules épithéliales. Gp42 permet à l'EBV de réguler son tropisme en inhibant l'infection des cellules épithéliales. (1) Le virus produit au sein des cellules B est déficient en gp42 et est donc capable d'infecter les cellules épithéliales. (2) gH/gL interagit avec une intégrine cellulaire. (3) Après la liaison à son récepteur, gH/gL interagit avec gB ce qui déclenche l'insertion des boucles de fusion de gB (en orange) au sein de la membrane cellulaire. (C) Dans les deux cas, gB se replie dans sa conformation post-fusion, permettant de ce fait la fusion des membranes cellulaire et virale. D'après Connolly *et al.* [100].

Le MuHV-4, quant à lui, est hautement dépendant des GAGs pour la liaison à la cellule [114, 115]. L'ORF4 code pour gp70 qui se lie fortement aux HS, et est l'homologue de l'ORF4 du KSHV [116]. Néanmoins, un virus délété pour gp70 ne montre qu'un faible déficit de liaison et cette glycoprotéine n'explique pas à elle seule la liaison aux cellules [115]. Deux autres protéines, communes au KSHV et à l'EBV, interviennent dans l'attachement: gL, liée à gH [117] qui se lie également aux GAGs [118] et gB dont la liaison est indépendante des GAGs [115]. Bloquer gH/gL ou gp70 individuellement via des anticorps n'a aucun effet sur la

liaison à la cellule. Par contre, les bloquer simultanément inhibe l'attachement. Enfin, l'homologue de gp350 EBV, gp150, se lie faiblement aux GAGs Elle participe à l'attachement mais n'est pas indispensable à la liaison. Par contre, elle intervient dans le relargage du virion et oriente son tropisme [114]. En résumé, la liaison aux GAGs via gH/gL et/ou gp70 est le point d'ancrage du virion, ce qui engage ensuite la liaison de gp150. Cette dernière change de conformation suite à sa liaison au GAGs et va promouvoir l'entrée. La figure 10 montre des images en microscopie électronique de l'attachement du MuHV-4.

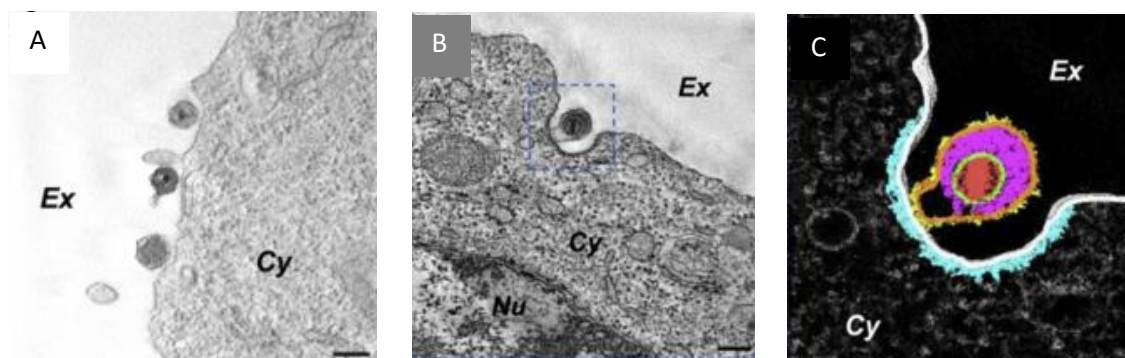


Figure 10. Attachement viral du MuHV-4. Image en microscopie électronique (ME). (A) Une cellule incubée à 4°C avec des particules virales attachées. (B) Attachement d'un virion de MuHV-4 à la membrane cellulaire. (C) Image agrandie et colorisée de B. Code couleurs : rouge : ADN viral ; vert : capsid ; magenta : tégument ; orange : enveloppe ; jaune : glycoprotéines membranaires ; gris clair : membrane plasmique ; cyan : vésicules de clathrine. Ex : extérieur de la cellule ; Cy : cytoplasme ; Nu : noyau. Temps post-infection: (A) : 2h ; (B) et (C) : 5h. Barres : 200nm. D'après Peng *et al.* [9].

Contrairement aux glycoprotéines d'enveloppe, les récepteurs cellulaires utilisés par ces virus sont moins bien connus. Concernant l'EBV, les récepteurs cellulaires sont partiellement identifiés [119]. Plus récemment, certains récepteurs ont pu être mis en évidence pour le KSHV. C'est le cas des protéines xCT (la chaîne légère à 12 domaines transmembranaires du système échangeur-transporteur cystine/glutamate x-c) et Ephrine A2 (EphA2) [120, 121]. L'entrée du KSHV est médiée en premier lieu par l'attachement de gB et de k8.1 aux héparans sulfates, suivie par l'attachement aux intégrines ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 5\beta 5$) et au récepteur xCT [113, 122]. Le KSHV utilise la voie des « lipid rafts » mais également l'endocytose médiée par les vésicules de clathrine [123] et la macropinocytose, promue par le récepteur EphA2 [124]. Ces voies seront détaillées plus loin.

La complexité des voies d'entrée des virus, le recours à des voies alternatives d'entrée, l'ubiquité des cibles cellulaires font que l'identification de ces protéines cellulaires est extrêmement complexe.

3.1.2 L'endocytose

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, qui résulte dans la délivrance de la capsid virale au sein du cytoplasme, peut se produire soit à la surface cellulaire, soit après une étape d'endocytose de la particule virale [100]. Certains virus, comme l'HSV-1, sont capables d'entrer dans la cellule directement ou par endocytose en fonction du type cellulaire.

Lors de l'endocytose, le virus fixé aux récepteurs est internalisé par invagination de la membrane cytoplasmique et se retrouve dans une vésicule à l'intérieur de la cellule. Cette voie d'entrée procure aux virus certains avantages [125-127]. Par exemple, elle permet aux virus de contourner des obstacles tels que l'encombrement cytoplasmique ou le maillage des microfilaments intracellulaires [128, 129]. D'autre part, la maturation de l'endosome entraîne des changements de conditions à l'intérieur de la vésicule, avec notamment une diminution du pH. Certains virus endocytés peuvent, grâce à ces changements, déclencher la fusion ou la décapsidation à un endroit précis dans la cellule [130]. Enfin, le fait d'être endocytés permet aux virus de se dissimuler à l'intérieur de la cellule et donc de s'exposer moins longtemps à la surface cellulaire, ce qui permet d'éviter leur détection par certains composants du système immunitaire [131].

Les virus endocytés ont un parcours intracellulaire identique à celui des ligands physiologiques tels que les nutriments et leurs molécules de transport, les hormones ou les facteurs de croissance. Les endosomes sont classés selon leur composition et leur localisation en endosomes précoces (EE pour *early endosomes*), endosomes de maturation (ME pour *maturing endosomes*), endosomes tardifs (LE pour *late endosomes*), endosomes de recyclage (RE pour *recycling endosomes*) et lysosomes [132-134]. Les EEs sont localisés à la périphérie du cytoplasme tandis que les MEs, LEs et lysosomes ont généralement une localisation périnucléaire.

Les principales voies d'endocytose utilisées par les virus sont l'endocytose médiée par les clathrines, l'endocytose médiée par les cavéoles ou les radeaux lipidiques (*lipid rafts*), la macropinocytose, la phagocytose ainsi que d'autres voies d'endocytose plus rares (Figure 11). Seules les voies décrites pour les *Herpesviridae* seront développées ci-dessous.

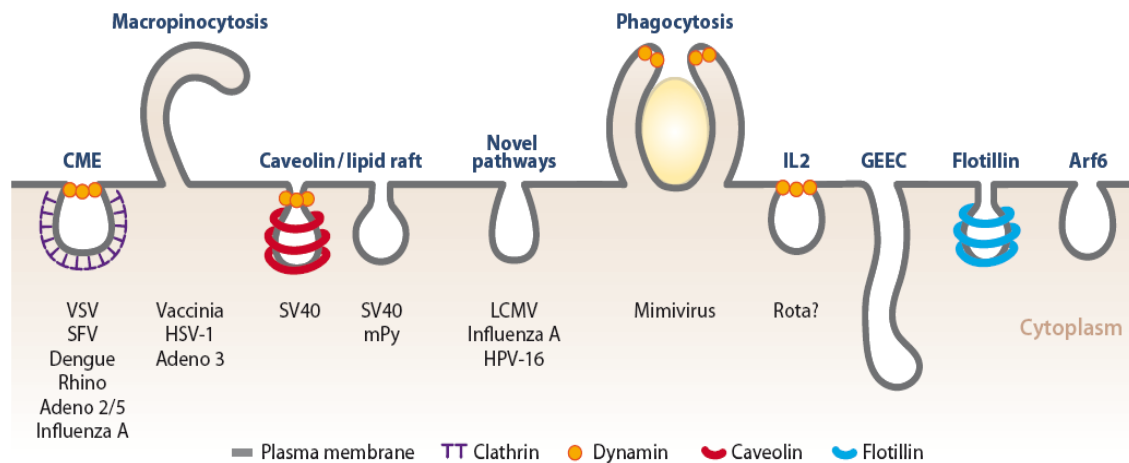


Figure 11. Représentation schématique des différentes voies d'endocytose. Plusieurs mécanismes d'endocytose ont été décrits pour l'entrée des virus. Il s'agit de l'endocytose par la voie des clathrines, la macropinocytose, l'endocytose par la voie des cavéoles et rafts lipidiques ainsi que plusieurs autres nouveaux mécanismes. De nouvelles voies d'endocytose ont également été décrites pour des protéines cellulaires (IL-2, GEEC, flotilline et ARf6) mais celles-ci ne sont pas pour l'instant décrites pour des virus. Abréviations: Adeno 2/5, Adenovirus 2/5; Adeno 3, Adenovirus 3; CME, *clathrin-mediated endocytosis*; HPV-16, *human papillomavirus 16*; HSV-1, *herpes simplex virus 1*; LCMV, *lymphocytic choriomeningitis virus*; mPy, *mouse polyomavirus*; SFV, *Semliki Forest virus*; SV40, *simian virus 40*; VSV, *vesicular stomatitis virus*; GEEC, *GPI-anchored enriched endocytic compartments*; ARf6, *ADP-ribosylation factor 6*. D'après Mercer et al. [135].

L'endocytose médiée par les clathrines (CME pour *clathrin-mediated endocytosis*) est la voie d'endocytose la plus étudiée. Les molécules de clathrines sont recrutées à la membrane plasmique suite à l'internalisation d'un signal pour former un « manteau » caractéristique (CCPs pour *clathrin-coated pits*) visible en microscopie électronique. On l'observe notamment lors de l'entrée du MuHV-4 [9].

L'endocytose médiée par les rafts et les cavéoles, utilisée notamment par l'herpèsvirus humain-6 (HHV-6), représente une voie d'endocytose dans laquelle la formation des vésicules d'endocytose primaire dépend des rafts (ou microdomaines lipidiques de cholestérol) et d'une voie de signalisation complexe impliquant des tyrosines kinases et phosphatases. Les cavéoles et la dynamin-2 peuvent être impliquées mais

l'endocytose peut également se produire sans celles-ci. Dans de précédentes études, un nouvel organite, le cavéosome, a été décrit [136]. Cependant, une récente étude indique qu'il s'agit plutôt d'un endo-lysosome modifié [135].

La macropinocytose et la phagocytose diffèrent des autres voies d'endocytose car elles nécessitent une importante réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces réarrangements provoquent la formation d'extensions de la membrane cytoplasmique vers l'extérieur de la cellule, à l'inverse des autres voies d'endocytose où la membrane plasmique s'invagine vers l'intérieur de la cellule. Les macropinosomes sont formés par le repliage des extensions membranaires suivi de la fusion avec la membrane plasmique [137]. Le KSHV entre dans certains types cellulaires par macropinocytose [138, 139].

Le trafic des vésicules et le mouvement des endosomes s'effectuent le long des microtubules de la cellule. La membrane des différents endosomes possède des domaines fonctionnels appartenant à la famille des « Rab GTPases » qui ont la faculté de recruter certaines protéines effectrices du transport vésiculaire. Ces « Rab GTPases » associées à leurs protéines effectrices permettent le transport sélectif des vésicules vers des cibles distinctes comme la membrane plasmique (Rab4), les EEs (Rab5), les LEs (Rab7), les REs (Rab22) ou le réseau trans-golgien (Rab9) [140-145]. Grâce à l'intervention des complexes d'adressage endosomal requis pour le transport (ESCRT pour *endosomal sorting complexes required for transport*), des vésicules bourgeonnent vers l'intérieur de l'endosome pour former des vésicules intraluminales (ILV pour *intraluminal vesicles*) [146]. Ce processus commence dans les EEs et mène à l'apparence multivésiculaire des LEs. La figure 12 résume les étapes du trafic des endosomes.

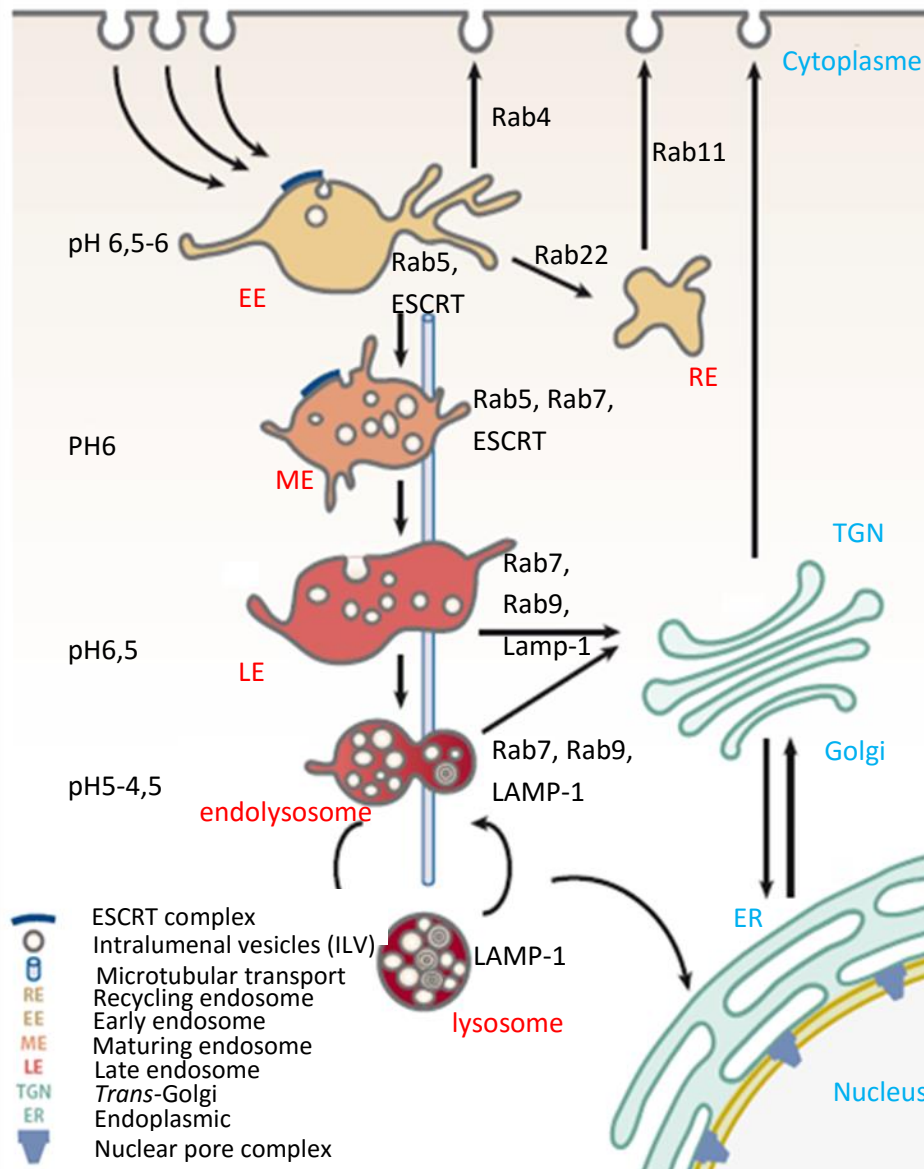


Figure 12. Représentation schématique du trafic des endosomes. Les principaux organites de la voie d'endocytose sont les endosomes précoces (EEs, early endosomes), les endosomes de maturation (MEs), les endosomes tardifs (LEs), les endomomes de recyclage (REs) et les lysosomes. Les EEs sont généralement localisés à la périphérie du cytoplasme. Ils possèdent une structure complexe avec des vacuoles et des domaines tubulaires. Ces structures tubulaires étroites donnent naissance aux vésicules de recyclage et aux vésicules de transport destinées aux REs et au réseau trans-golgien (TGN, *Trans-Golgi network*). Les domaines vacuolaires contiennent de grosses particules endocytées et se dirigent vers la région périnucléaire le long des microtubules. Les MEs possèdent des marqueurs des EEs et des LEs (Rab 5 et Rab 7). Ils subissent ensuite l'acidification et se convertissent en LEs. Ceux-ci fusionnent avec d'autres LEs ou avec des lysosomes pour former des endo-lysosomes dans lesquels a lieu une dégradation active. La majorité des molécules entrantes sont recyclées à la membrane plasmique. Cependant, les protéines membranaires destinées à la dégradation sont premièrement marquées avec des mono-ubiquitines, puis reconnues par des composants liant l'ubiquitine du complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) et finalement séquestrées à l'intérieur de vésicules intraluminales (ILVs, *intraluminal vesicles*). LAMP-1 (*lysosomal-associated membrane protein*). D'après Mercer *et al.*[135].

3.1.3 La fusion

La fusion fait intervenir, en plus des protéines impliquées dans l'attachement, une ou des protéines de fusion présente(s) à la surface de l'enveloppe virale. La fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire entraîne la libération de la nucléocapside à l'intérieur du cytoplasme.

Le processus de fusion membranaire est un processus défavorable d'un point de vue énergétique. Il nécessite le rapprochement des membranes virales et cellulaires, défavorable du fait des répulsions électrostatiques et de la présence de molécules d'eau qui interfèrent dans le rapprochement des deux membranes lipidiques. De même, la fusion membranaire est elle-même énergétiquement coûteuse puisqu'elle nécessite la déstabilisation de la structure ordonnée des deux bicouches lipidiques. L'énergie nécessaire à la fusion est fournie par les glycoprotéines d'enveloppe, qui passent lors du processus de fusion d'une conformation pré-fusionnelle métastable, à une conformation post-fusionnelle plus stable et donc moins énergétique [147]. La figure 9 illustre les changements de conformation qui s'opèrent au sein des protéines de fusion de l'EBV.

A ce jour, comme abordé ci-dessus, deux mécanismes de déclenchement de ce changement de conformation aboutissant à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire ont été décrits pour les *Herpesviridae* (Figure 13). Selon les virus, la fusion est **pH-indépendante** : le changement de conformation est induit par l'interaction entre un récepteur membranaire et une glycoprotéine d'enveloppe et la fusion a lieu directement au niveau de la membrane cytoplasmique ; ou **pH-dépendante** : suite à l'attachement du virus, une protéine de l'enveloppe interagit avec un récepteur cellulaire qui oriente le virus vers une voie d'endocytose. Au niveau de l'endosome, l'acidification du milieu entraîne la déstabilisation certaines glycoprotéines virales et déclenche les changements de conformation à l'origine du processus de fusion.

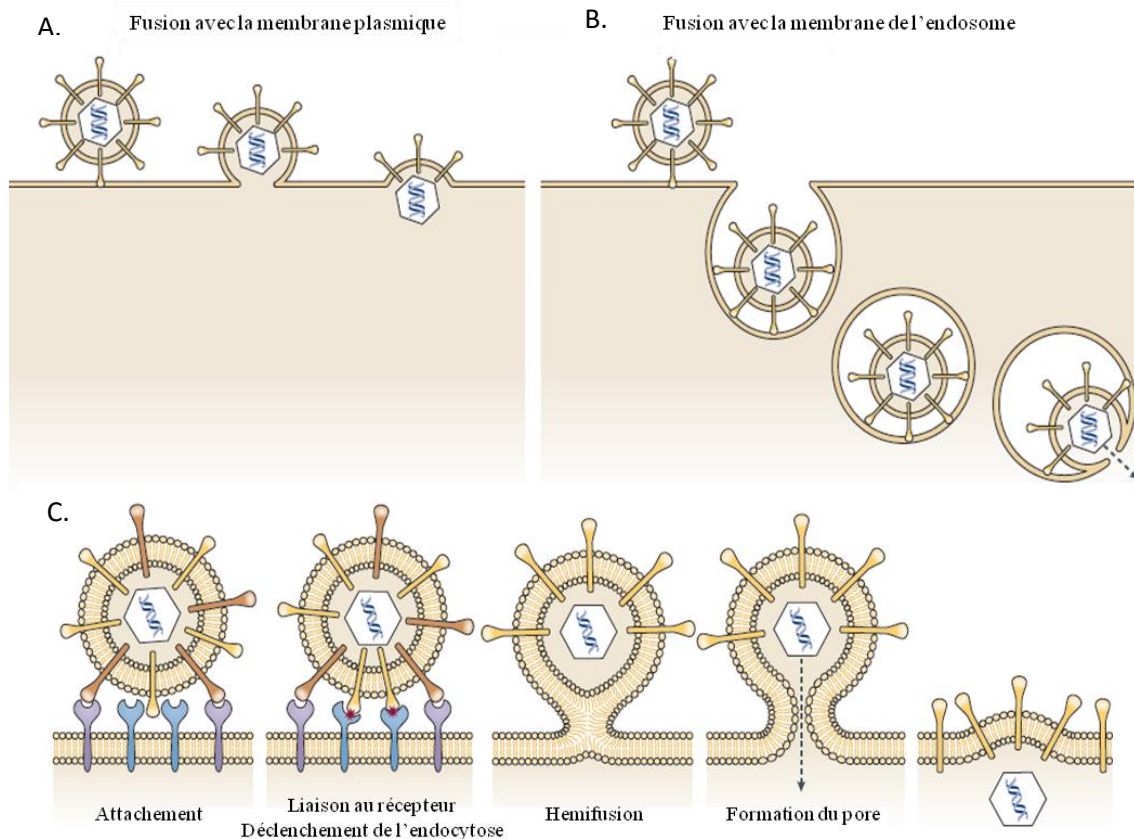


Figure 13. Voies d'entrée virale. Les *Herpesviridae* peuvent entrer dans la cellule, soit directement par fusion avec la membrane plasmique (A), soit par fusion avec la membrane de l'endosome après endocytose (B). Le virus se lie aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire de ses glycoprotéines (C). Les premières interactions virus-cellule sont destinées à l'attachement (glycoprotéines virales brunes et récepteurs cellulaires mauves) ensuite d'autres interactions déclenchent la fusion membranaire (glycoprotéines virales jaunes et récepteurs cellulaires bleus). La fusion des membranes conduit à la formation de pores membranaires et à la libération intracytoplasmique de la capside. D'après Connolly *et al.*, [100].

La transition structurale de la ou des protéines de fusion peut donc être déclenchée par l'interaction entre le virus et son récepteur et/ou par l'environnement acide de l'endosome car ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs l'un de l'autre. Cette transition structurale se traduit par l'exposition d'un peptide ou de boucles hydrophobes (dits peptides ou boucles de fusion) qui deviennent alors capables d'interagir avec les membranes afin de les déstabiliser [148]. Il convient de noter qu'il est possible de déclencher la transition structurale en l'absence de membrane cible (en incubant le virus en présence d'une forme soluble de son récepteur ou bien dans une solution acide). Dans ce cas, les propriétés de fusion de la glycoprotéine sont abolies. En conséquence, contrairement à ce qu'on peut lire

encore parfois, il n'existe pas de conformation fusogène de la protéine : c'est la transition structurale qui permet la fusion membranaire.

L'étude structurale de nombreuses glycoprotéines de fusion virales a conduit à l'élaboration de modèles détaillés des mécanismes de fusion membranaire. Trois grandes familles de protéines virales, les protéines de fusion de classe I, de classe II et de classe III, ont été définies sur base de leur structure moléculaire et de leurs mécanismes réactionnels [148, 149]. gB, qui intervient de façon prépondérante dans l'entrée du MuHV-4, est un prototype de protéine de fusion de classe III [150]. Avec gH/gL, elles forment le « core fusion machinery », impliqué dans la fusion chez tous les *Herpesviridae* dont le MuHV-4 [118]. La plupart des protéines gB des *Herpesviridae* contiennent un motif particulier (R-X-K/R-R) qui sert de signal de reconnaissance par les protéines de la classe des furines [151]. Ces sites de clivages interviennent dans l'infectivité des particules virales, comme cela a été démontré pour certains *Herpesviridae* [152] dont le MuHV-4 [153]. En effet, chez ce virus, l'empêchement du clivage de gB, via la mutation du site de reconnaissance par les furines, n'empêche ni l'expression de la protéine gB, ni sa capacité à permettre la fusion de ces particules virales avec la membrane de cellules épithéliales ou fibroblastiques. Par contre ces mutations réduisent de manière significative l'infectivité de ces particules virales pour les cellules myéloïdes. Ce déficit apparaît à une étape ultérieure à l'endocytose et est probablement lié à un défaut de fusion dans ce type cellulaire en particulier.

Les données expérimentales disponibles à ce jour indiquent que la façon dont se déforment les membranes et les structures intermédiaires que forment les lipides au cours du processus de fusion est très semblable pour tous les virus pour lesquels le processus a été caractérisé et cela quelle que soit la classe de leur glycoprotéine fusogène [154-156]. Ainsi, il a été proposé que le premier intermédiaire lipidique formé, baptisé « stalk », établit une connexion locale entre les feuillettes externes des deux membranes en train de fusionner. L'expansion radiale de ce stalk permet la formation d'un diaphragme d'hémifusion (c'est-à-dire d'une bicouche lipidique locale, constituée des deux feuillettes internes des membranes initiales). L'étape suivante du processus de fusion est la formation d'un pore dans ce diaphragme [157]. Le pore initial est de petite taille (quelques nanomètres de diamètre), c'est son élargissement qui va conduire à la fusion complète (Figure 14).

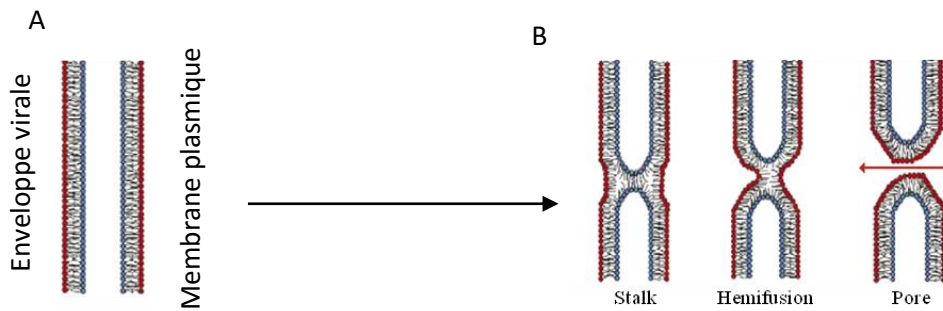


Figure 14. Etapes de la fusion membranaire. (A) rapprochement des deux membranes : enveloppe virale et membrane plasmique de la cellule ou de l'endosome. (B) Déformation des membranes au cours du processus de fusion selon le modèle « stalk-pore ». Le processus de fusion passe par un stade d'hémifusion avant de former un pore permettant la libération de la capsidie dans le cytoplasme. D'après Albertini *et al.* [158].

3.1.4 Transport intracytoplasmique des capsides virales

Les filaments d'actines et les microtubules jouent un rôle crucial dans le cycle viral. Durant l'attachement, l'internalisation, l'endocytose, le transport vers le noyau, la transcription, la réplication, le transport des particules nouvellement formées, l'assemblage, l'exocytose, le passage de cellule à cellule, les virus peuvent utiliser les différentes voies cellulaires pour utiliser le cytosquelette à leur avantage. Ils vont induire des réarrangements des filaments du cytosquelette pour, soit les utiliser pour leur transport, soit les éliminer lorsqu'ils représentent des barrières. Dans ce chapitre, ne seront décrites que les interactions des *Herpesviridae* avec le cytosquelette lors de l'entrée de la particule virale.

Les *Herpesviridae* utilisent les microtubules, l'actine et les moteurs associés pour assurer leur transport [129]. La présence des organelles mais également du cytosquelette lui-même fournit un environnement compact au travers des mailles duquel le virus va devoir se frayer un chemin. Les molécules d'un poids supérieurs à 500 kDa ne passent pas librement [159]. Ainsi, les *Herpesviridae* vont devoir user de mécanismes actifs pour permettre leur transport. Dans la périphérie cellulaire comme probablement dans le noyau, le transport est assuré par l'actine, à la fois par la synthèse de nouveaux filaments d'actine qui poussent les particules, ou par des molécules de myosine qui circulent le long des filaments d'actine [160]. Les protéines motrices cytoplasmiques, la dynéine et la kinésine, assurent quant à elles, le transport le long des microtubules de la périphérie cellulaire vers le noyau.

Les filaments d'actine d'une épaisseur de 7 à 9 nm sont polarisés et caractérisés par une extrémité *plus* à croissance rapide et une extrémité *moins* à croissance lente [161]. Bien que l'actine soit présente dans toute la cellule, c'est essentiellement sous la membrane plasmique que sa concentration est la plus importante, on parle de « cortex d'actine ». Les moteurs de myosine sont faits d'une ou deux chaînes lourdes, responsables de l'hydrolyse de l'ATP, et une ou plusieurs chaînes légères. Une vingtaine de types de myosine sont répertoriés. Les myosines se déplacent de façon unidirectionnelle le long de l'actine, soit vers l'extrémité *plus*, soit vers l'extrémité *moins*, selon le type de myosine [162]. Peu de molécules à ce jour sont connues parmi les *Herpesviridae* pour interagir avec la myosine. Une étude sur le KSHV a récemment montré le recrutement d'une protéine c-Cbl, de la famille des protéines adaptatrice Cbl (jouant un rôle dans la signalisation intra-cellulaire par ubiquitination), comme facteur adaptatif sur la myosine de type II, intervenant ainsi dans la macropinocytose induite par l'interaction virus-cellule [163]. L'HSV-1 recrute également les filaments d'actine lors de son entrée dans la cellule par un mécanisme proche de la phagocytose [164]. Les *Herpesviridae* contiennent au sein de leurs particules des molécules d'actine [3, 165, 166], il en sera question plus loin dans cette introduction. Pour finir, les *Herpesviridae* peuvent activer des voies de signalisation intracellulaire et ainsi, dans certains cas, modifier l'état de polymérisation de l'actine qui est un facteur déterminant de l'infection virale comme en témoignent les changements d'infectivité de l'EBV en cas d'altération de l'actine [167].

Pour les longues distances, ce sont les microtubules qui sont utilisés. Ils sont faits de longs cylindres de tubuline, protéine qui, comme l'actine, se retrouve régulièrement associée à des particules virales [166, 168, 169]. Les microtubules présentent également une polarité et les molécules associées se retrouvent préférentiellement à l'une des extrémités [170]. Les extrémités *plus* situées du côté de la membrane plasmique se stabilisent généralement en s'associant aux molécules d'actine alors que les extrémités *moins* sont stabilisées par liaison au MOCT (*Microtubule Organizing Center*) à proximité du noyau ou à d'autres protéines spécifiques de l'extrémité *moins*. Chaque protéine motrice de microtubules fonctionne de façon unidirectionnelle. Alors que la dynéine assure le transport vers l'extrémité *moins*, la kinésine voyage vers l'extrémité *plus*. Cependant, certaines kinésines, comme KIFC2, voyagent en sens contraire [171]. La dynéine contient deux chaînes

lourdes (DHC) qui se lient aux microtubules et hydrolysent l'ATP. Il existe, par ailleurs, plus de 6 types de chaînes légères (DLC) appartenant à 3 différentes familles, deux chaînes légères intermédiaires (DLIC) et deux chaînes intermédiaires (DIC) [172]. La dynéine s'associe à la dynactine, qui participe à la majorité sinon à tous les transports [173]. La kinésine de type I contient deux chaînes légères et deux sous-unités motrices. La kinésine de type II contient deux sous-unités qui ont toutes deux une activité motrice et une troisième sous-unité appelée « protéine associée à la kinésine ». Les kinésines de types III et IV sont constituées d'une et deux sous-unités motrices respectivement [174].

De nombreux virus requièrent les microtubules et en particulier la dynéine pour être transportés efficacement vers le noyau. C'est le cas notamment de l'HSV-1 [175] pour lequel le transport le long des microtubules est particulièrement important puisqu'il s'agit d'un virus neurotrophique dont le transport axonal requiert un réseau de microtubules intact. Au sein des *Gammaherpesvirinae*, gB du KSHV lie l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface de la cellule, ce qui active une voie de signalisation en cascade. Via l'adhésion locale de la kinase Src et de PIP3, cette cascade va stimuler la GTPase Rho qui stabilise les microtubules. Après internalisation, le virus exploite la dynéine et la dynactine pour voyager au sein des endosomes le long des microtubules stabilisés [176]. Les composants viraux lient directement la dynéine par liaison à la chaîne intermédiaire ou aux chaînes légères (familles tctex ou LC8) [177]. Le récepteur EphA2 du KSHV intervient également dans la macropinocytose en s'associant avec la c-Cbl-myosin IIA [178]. Les *Herpesviridae* neurotropes peuvent réguler la direction de leur transport axonal en modulant la quantité de transport vers l'extrémité *plus* axonale et donc faciliter le transport vers le noyau ou au contraire vers la membrane plasmique [179]. C'est le cas notamment de l'HSV-1 [180]. Des virus mutés pour certaines protéines du tégument ne permettent plus le recrutement de la dynéine et de la dynactine et rendent les virions immobiles [181]. Ceci met en évidence l'importance du tégument dans le transport des *Herpesviridae*. La figure 15 résume les interactions *Herpesviridae*-cytosquelette lors de l'entrée.

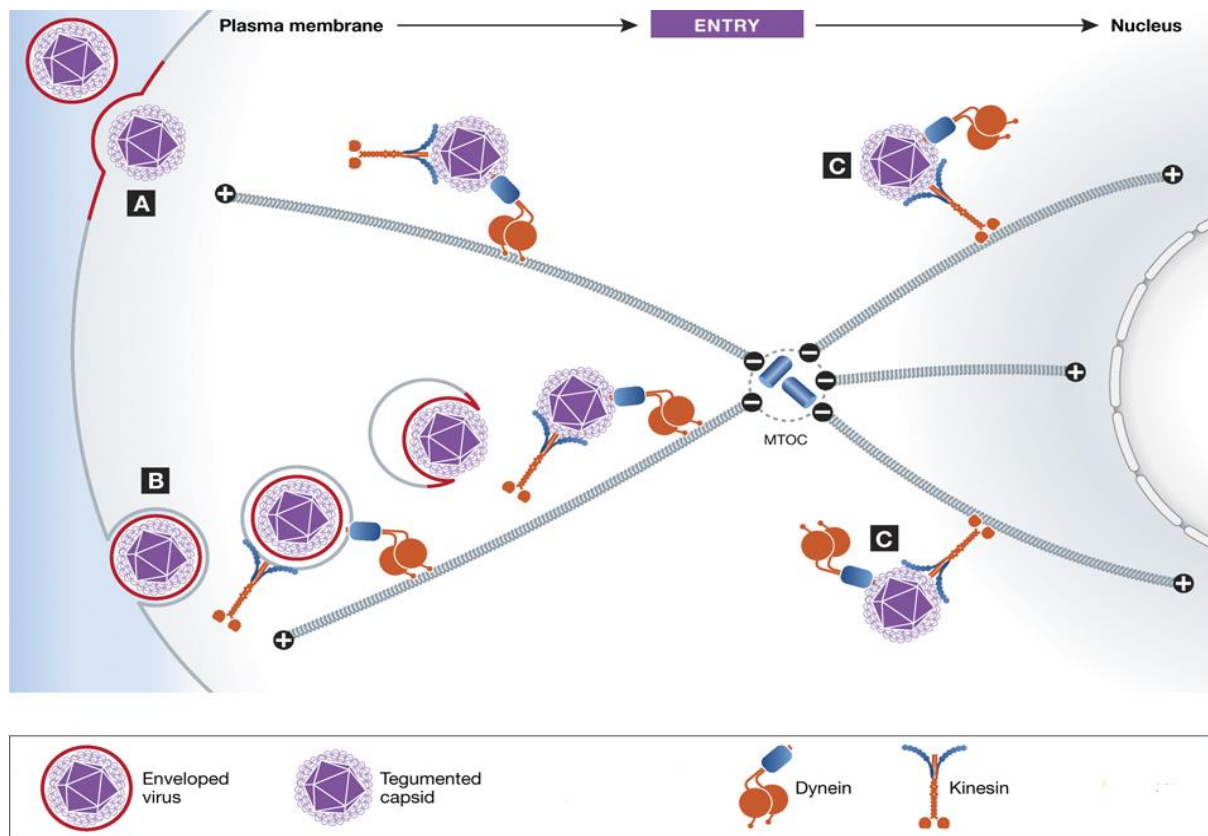


Figure 15. Transport des *Herpesviridae* lors de la phase d'entrée. En fonction du type cellulaire, ces virus entrent en (A) fusionnant directement avec la membrane plasmique ou (B) via un mécanisme basé sur l'endocytose. Indépendamment du mode d'entrée, les virions, au sein des endosomes ou plus habituellement en tant que capsides non enveloppées recrutent probablement à la fois des kinésines et des dynéines même si ils se déplacent de manière rétrograde (vers l'extrémité *moins*) en direction du noyau. En fonction de la position du MTOC et de l'organisation du cytosquelette de microtubules par rapport au noyau, il est possible que des mouvements vers une extrémité *plus*, dépendant de la kinesine-1, soient requis pour que le virus atteigne la membrane nucléaire. D'après Dodding *et al.*, [182].

3.1.5 Transfert de l'ADN viral au sein du noyau

Les échanges entre le cytoplasme et le noyau se font via les pores nucléaires (PN) agencés dans la double membrane nucléaire. La perméabilité sélective de la barrière nucléaire ne permet pas le passage de molécules d'un diamètre supérieur à 5 nm et d'une masse n'excédant pas 20 à 40 kDa selon les cas [183], mais permet par contre le passage sélectif de molécule cargo jusqu'à des tailles supérieures à 39 nm. Ces passages ne peuvent se faire que grâce à des récepteurs spécifiques de transport nucléaire (NTRs, pour Nuclear

Transport Receptors, appelés aussi Karyopherines) [184]. Le flux au travers d'un PN est d'environ 100 MDa/s, ce qui correspond à environ 10^3 évènements facilités/s [185]. La majorité des transports facilités sont effectués grâce aux NTRs de la superfamille des Importines β . Ces navettes, situées entre le noyau et le cytoplasme, assurent la livraison des molécules depuis le cytoplasme jusqu'au noyau. Selon la direction du transport, les molécules sont appelées Importines ou Exportines. Les Importines sont capables de reconnaître des signaux de localisation nucléaire (NLSs) sur les molécules cargo et de faciliter leur transport du cytoplasme vers le noyau. Les NLSs classiques reconnus par les Importines sont généralement des acides aminés basiques de type lysine [186]. Les Importines β lient une large gamme de molécules cargo contenant des NLSs dits « classiques » grâce à leur adaptateur, nommé Importine α (Imp α) [187, 188]. Les Imp α contiennent les domaines de liaison des Imp β (IBB, Importin Binding Domain) qui médient la formation d'un complexe entre Imp α et Imp β [189]. Les Imp β peuvent également reconnaître des NLSs non classiques et lier directement des molécules cargo. Les Exportines lient la molécule signal d'export sur la molécule cargo (NES, Nuclear Export Signal) qui contient 4 à 5 résidus hydrophobiques caractéristiquement espacés par des petits acides aminés polarisés chargés [190, 191]. Le transport depuis le cytoplasme s'effectue en plusieurs étapes : (1) liaison d'une molécule cargo à son NTR ; (2) arrimage des complexe cargo-NTR au PN ; (3) translocation à travers le pore nucléaire ; (4) relargage du cargo au côté opposé de l'enveloppe nucléaire. Ces échanges sont permis grâce à l'hydrolyse de GTP par une molécule située du côté du cytoplasme (RanGTPase activating protein) [192].

Les PNs sont composés de plus de 500 polypeptides représentant des copies multiples d'une trentaine de protéines de pores nucléaires différentes, les nucléoporines (Nups) [193]. Selon leur localisation et leur fonction, elles sont classées en 3 catégories. Le premier groupe inclut des nucléoporines contenant un domaine transmembranaire enchâssant le PN dans la membrane nucléaire. Le second groupe contient environ 19 nucléoporines qui forment l'échafaudage rigide du PN. La troisième catégorie contient des nucléoporines possédant un domaine globulaire d'ancrage au PN et un domaine non globulaire riche en Phénylalanine-Gly (FG) à leur extrémité N- ou C-terminale. Ces régions FG sont en regard du tunnel central du PN et interviennent dans la perméabilité sélective du pore [194, 195]. La figure 16 schématise un PN.

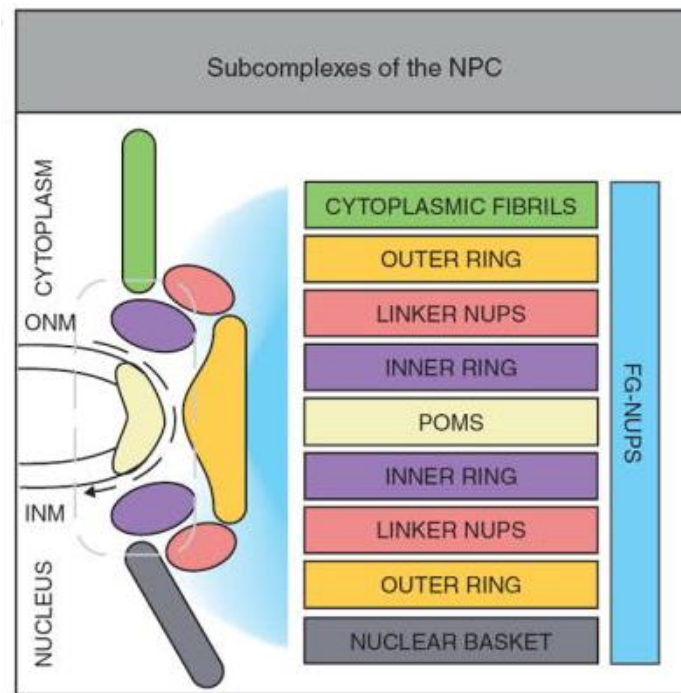


Figure 16. Constitution des pores nucléaires. Environ 30 Nups du PN s'assemblent en sous-complexes qui servent de blocs de construction à la base du PN. La symétrie de ces sous-complexes inclut une formation circulaire interne (violet), une formation circulaire externe (jaune), les protéines de pores membranaires (les Poms, en beige), les Nups attachées (rose) et un set central de Nups riches en domaines FG (bleu). Il existe des complexes asymétriques contenant des fibrilles cytoplasmiques (vert) et des paniers nucléaires (gris foncé) qui s'étendent dans le cytoplasme et le noyau et qui abritent également des Nups FG. L'espace situé entre l'anneau interne du sous-complexe et les Poms, représente un canal périphérique potentiel (ligne pointillée grise) pour le transit des protéines intégrales de la membrane nucléaire interne (line pointillée noire). D'après Burns *et al.* [196].

Les virus qui doivent atteindre le noyau pour se répliquer ont développé de remarquables aptitudes pour traverser les PN. Selon la taille du virus et donc de leur matériel génomique, ils ont chacun développé des mécanismes différents afin de pénétrer dans le noyau. Les *Herpesviridae* ayant un génome particulièrement volumineux, libérer le génome directement dans le cytoplasme mettrait en péril son transport intact vers le noyau et faciliterait sa dispersion. Il s'agit d'un transport par vésicules survenant à proximité du PN mais sans translocation à travers le canal central. Les stratégies virales pour pénétrer le noyau sont schématisées à la figure 17.

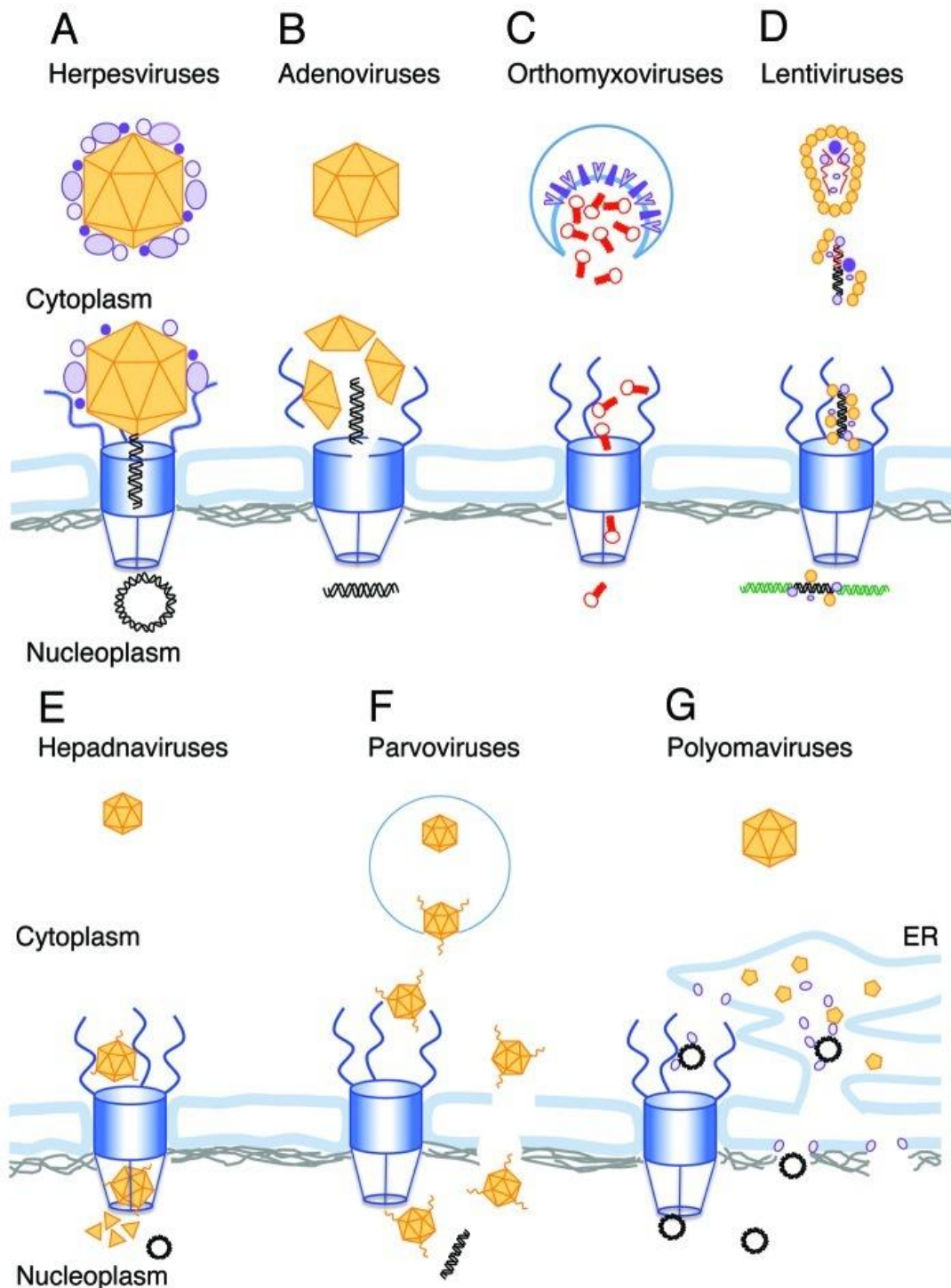


Figure 17. Illustration schématique des différentes stratégies utilisées par les génomes viraux pour entrer dans le noyau. (A) Les capsides virales des *Herpesviridae* parviennent au PN grâce à l'attachement via des protéines internes de tégument. Suivant un changement de conformation et l'ouverture d'un anneau portal au vertex de la capside, l'ADN est injecté dans le noyau. (B) Après relargage depuis l'endosome, la capside des *Adenoviridae* s'arrime au PN, où un complexe de protéines motrices détruit la capside et une partie de la structure du PN pour permettre l'entrée du génome. (C) Les ribonucléoprotéines des *Orthomyxoviridae* sont larguées dans le cytoplasme après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome (ligne bleue) avant d'être acheminées

librement jusque dans le noyau par les karyopherines cargo. (D) Après désagrégement dans le cytoplasme, les ARNs des lentivirus sont reverse-transcrités en ADN double brin. Le PIC (Complexe de Pré-Intégration), contenant l'ADN viral et plusieurs protéines, active l'entrée dans le noyau par interactions avec les protéines du PN. Après passage à travers le PN, l'ADN s'intègre aux chromosomes hôtes. (E) La capsidite des *Hepadnaviridae* entre par le pore nucléaire mais est trop volumineuse pour passer intacte. Ainsi, les capsidites contenant l'ADN viral se désassemblent dans le panier du pore nucléaire, relargant l'ADN viral et les débris de capsidites dans le nucléoplasme. (F) Les Parvoviridae entrent intacts dans le noyau. Le domaine N-terminal de la petite capsidite des Parvoviridae s'insinue à l'intérieur de l'endosome et expose ensuite un domaine contenant une activité phospholipase A qui facilite son relargage dans le cytoplasme. L'exposition de ce domaine N-terminal induit également l'extrusion de 4 domaines NLSs qui interviennent dans l'entrée via le PN. Un modèle alternatif propose une entrée directe dans le noyau via des trous dans la membrane nucléaire. (G) Les polyomaviridae se désassemblent dans le réticulum endoplasmique. Le génome ainsi exposé sort du réticulum endoplasmique via des viroporines créées à partir des protéines de capsidites selon deux mécanismes différents. Selon le premier mécanisme, le génome accède directement au noyau via le réticulum endoplasmique, selon le second, il passe d'abord par les PN. Codes couleurs : ADN viral : noir ; ADN hôte : vert ; ARN viral : rouge ; PN : bleu ; laminine : grise ; capsidite virale et protéines de capsidite : orange ; autres protéines virales : violet. D'après Kobiler *et al.* [197]

Une fois que la capsidite des *Herpesviridae*, accompagnée d'une partie des protéines internes du tégument, parvient au noyau, elle se lie au PN [198]. A ce moment, la capsidite subit un changement de conformation créant une ouverture au niveau du vertex alors que le reste de la capsidite reste intacte [199]. L'ADN est alors libéré à travers cette ouverture et délivré dans le noyau via un processus qui n'est pas totalement compris. Plusieurs gènes viraux facilitent probablement ce processus. Les gènes impliqués ont surtout été décrits chez l'HSV-1 mais possèdent tous des homologues chez les autres *Herpesviridae*. L'interaction entre le PN et la capsidite requiert de l'énergie et dépend de la protéine majeure de tégument VP1/2 (encodée par UL36) et les protéines hôtes Imp β et Nup358 [198, 200]. On observe également une interaction directe entre la protéine de capsidite pUL25 et les nucléoporines Nup214 et hCG1 [201]. Nup358, Nup214 et hCG1 sont retrouvées dans le cytoplasme, juste près du noyau et sont donc accessibles pour les capsidites. Le mécanisme par lequel la capsidite change de conformation une fois liée au noyau n'est pas élucidé. Le rôle de plusieurs protéines a cependant été clarifié. Le rôle de la protéine de tégument VP1/2 est connu depuis longtemps car une mutation du gène codant pour cette protéine permet la liaison de la capsidite au PN mais empêche la libération du matériel génomique [202]. Par ailleurs, un clivage protéolytique de VP1/2 est nécessaire pour la libération de l'ADN dans le noyau. Ce clivage survient seulement après liaison de la capsidite au PN [203]. De même, une mutation

de la protéine pUL35 prévient le changement de conformation de la capside et empêche la libération du matériel génomique [204]. La pUL6 forme la voie d'entrée de l'ADN viral dans la capside lors de l'assemblage viral. De la même façon, elle semble être la voie de sortie de l'ADN lors de sa libération de la capside [205, 206]. La translocation du génome à travers le pore nucléaire est considérée comme un processus rapide. Il semble que l'ADN soit libéré de façon linéaire [206]. L'ADN est packagé de façon très compacte dans la capside et il semble qu'il passe également à travers le PN en restant empaqueté fermement [207]. Et c'est précisément cet empaquetage qui entrainerait une pression sur le vertex et permettrait à l'ADN de sortir de la capside sur laquelle il fait pression et de pénétrer dans le pore nucléaire [208].

Les observations faites sur le MuHV-4 indiquent que des capsides contenant de l'ADN et des capsides vides s'agglutinent autour du noyau. Typiquement en ME, on observe les capsides complètes plus éloignées des PN que les capsides vides dans lesquelles n'apparaissent plus les éléments d'ADN, vraisemblablement car elles viennent de larguer le génome dans le noyau. Ce mode d'injection est particulièrement visible sur la figure 18.

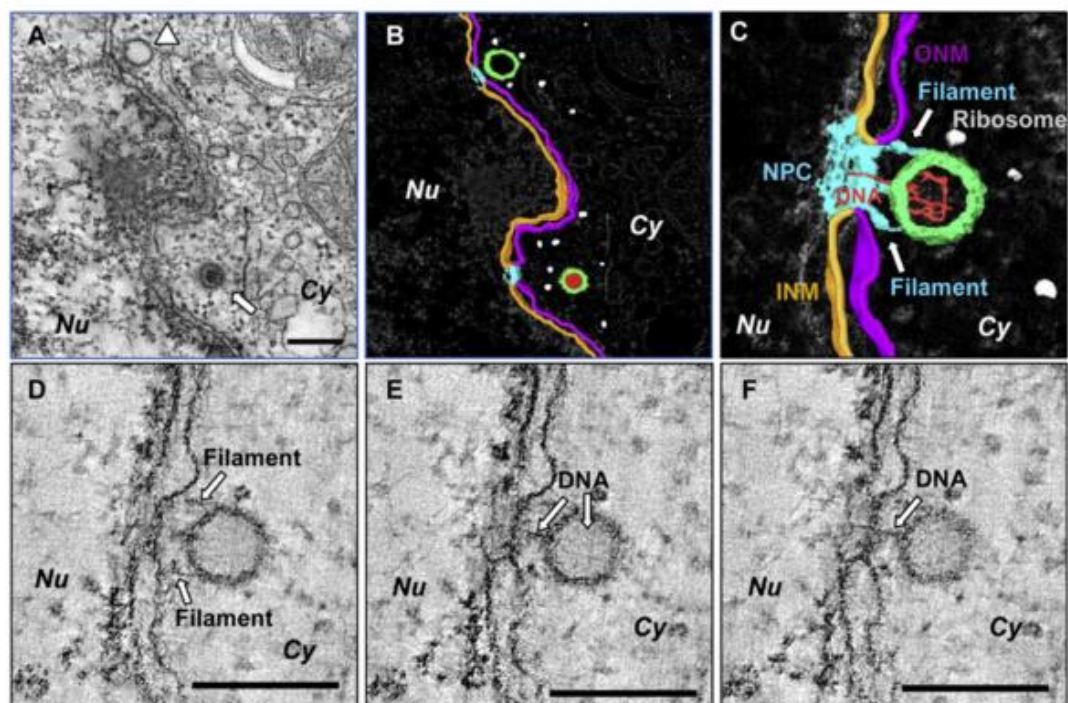


Figure 18. Amarrage des capsides du MuHV-4 aux PN et injection de l'ADN viral. (A) Les capsides arrivent tout près des pores nucléaires : on observe une capside vide juste devant un PN et une capside pleine à approximativement à 200nm d'un autre PN. La flèche indique la capside pleine et la

tête de flèche, la capsidie vide. (B) Même image colorisée que A. (C) Amarrage d'une capsidie au PN et injection d'ADN viral. (D-F) Différentes vue de l'image C, les filaments d'ADN sont indiqués par des flèches. Colorisation : rouge : ADN viral ; vert : capsidie ; gris clair : ribosomes ; orange : membrane nucléaire interne ; magenta : membrane nucléaire externe ; cyan : PN. Temps post-infection : A et B : 5h ; C à F : 24h. Barre : 200 nm. D'après Peng *et al.* [9].

3.1.6 Circularisation de l'épisome viral

Une fois libéré dans le noyau, le génome viral peut soit être maintenu à l'état latent, soit entrer en phase lytique. Dans les deux cas, le génome est rapidement circularisé en l'absence de synthèse de protéines virales, suggérant un mécanisme sous la dépendance de protéines cellulaires [209]. Pour l'HSV-1, l'ADN ligase IV est responsable de cette étape [210]. Les épisomes circulaires sont détectés en moyenne 16h après l'infection et leur formation nécessite que la cellule passe de G0 à G1 [211]. La synthèse de protéines *de novo* est probablement nécessaire pour la circularisation, et des complexes protéiques incluant la protéine Sp1 (un facteur de transcription largement exprimé) sont très probablement impliqués dans le processus [212].

3.1.7 Maintien du génome viral à l'état latent

Les *Herpesviridae* maintiennent leur génome sous forme circulaire extrachromosomique. L'épisome est ainsi la forme persistente extra-chromosomique de l'ADN viral maintenu à l'état latent dont la transcription des gènes est sévèrement réduite. Le génome viral latent est associé avec des histones et des régions hétéro- et euchromatique sont distinguables [213]. Les gènes viraux activement transcrits nécessaires pour la réplication latente sont localisés au sein de l'euchromatine, alors que ceux nécessaires à la réplication lytique sont situés dans l'hétérochromatine.

Dans les cas où la cellule infectée latente se réplique, ce qui est le cas pour les *Gammaherpesvirinae*, l'épisome viral est répliqué en même temps que l'ADN génomique. Les copies de cet épisome sont distribuées aléatoirement entre les cellules filles. Chez les *Rhadinovirus*, ce mécanisme implique la protéine LANA (*Latency Associated Nuclear Antigen*) ou ses orthologues (encodés par l'ORF63). 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 au sein des unités du prDNA (Figure 2) [22]. Cette interaction permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral par différents enzymes cellulaires ainsi que l'accrochage de l'épisome viral aux chromosomes cellulaires [214]. Ceci permet à l'épisome viral de rester au sein du noyau lors de la mitose cellulaire.

Sous l'effet d'un stimulus, dont la nature est encore mal connue mais liée vraisemblablement à la rupture d'un équilibre délicat entre le système immunitaire et le maintien du virus sous forme latente, il y a réactivation et entrée en phase lytique.

En dehors de ce phénomène le plus fréquent de formation de l'épisome, il est rapporté depuis de nombreuses années des cas d'intégration de l'ADN viral aux chromosomes hôtes sous l'effet de certains facteurs et dans certaines conditions. Ce phénomène concerne jusqu'à 1% des lignées germinales infectées par l'HHV-6 [19]. Dans de nombreux cas, seuls des fragments de génome viral sont intégrés au sein du génome de la cellule hôte, ce qui ne permet pas la formation subséquente de particules infectieuses. La plupart des cellules contenant ces fragments présentent néanmoins un phénotype transformé, renforçant le caractère oncogénique potentiel de ces virus [215-217]. Par contre, les *Herpesviridae* qui sont capables d'intégrer la totalité de leur matériel génomique au sein des chromosomes de l'hôte sont minoritaires. Il s'agit du virus de la maladie de Marek, de l'HHV-6 et de l'EBV. Dans le cas de l'infection par EBV, certaines cellules contiennent plusieurs copies de l'ADN viral mais aucune trace d'épisome, c'est le cas des cellules Namalwa et IB4 (des lignées lymphoblastoïdes) [218, 219]. Dans ces cas, même si certains gènes sont exprimés, la réplication ne peut avoir lieu. Hurley *et al.* ont également observé la persistance préférentielle de l'EBV au sein de cellules B activées en tant qu'unique copie intégrée au génome de l'hôte [220]. Par ailleurs, la co-existence d'un génome intégré et d'épisomes est possible comme l'ont montré des études portant sur l'infection des lignées dérivées de lymphomes de Burkitt [221, 222]. L'intégration de l'ADN de l'EBV (CIEBV, *Chromosome Integration of Epstein Barr Virus genome*) n'est pas restreinte aux LB, on en retrouve également au sein de cellules épithéliales dérivées des carcinomes nasopharyngés (NPCs) [223, 224]. EBNA1 est exprimé dans les NPCs contenant des CIEBVs, indiquant que, alors que la réplication virale nécessite un génome viral circularisé, la transcription de gènes viraux peut survenir en l'absence d'épisomes viraux. Enfin, utilisant des spécimens

biopsiques de NPCs, Kripalani-Joshi *et al.* ont rapporté la détection de génome intégré dans 4 pièces sur 17, ce qui permet de penser que le phénomène survient aussi *in vivo* [224].

3.2 Phase II : SORTIE

3.2.1. Réplication de l'ADN viral et expression des protéines virales

Une fois le matériel génétique du virus injecté dans le noyau, différentes interactions entre certaines protéines du tégument et des composants cellulaires vont enclencher la transcription des gènes viraux et la réplication de l'ADN génomique. On peut distinguer trois phases de transcription. La première phase de transcription est assurée par l'ARN polymérase II et entraîne la synthèse des gènes IE (*Immediate Early*, transcrits très précoces). La synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme et certaines des protéines sont alors importées dans le noyau pour stimuler la transcription des gènes E (*Early genes*, transcrits précoces) et L (*Late genes*, transcrits tardifs) mais aussi inhiber la synthèse des gènes IE. Les gènes IE sont essentiellement des facteurs de transcription, il s'agit du RTA (*Replication and Transcription Activator*) chez le MuHV-4, qui contrôle la transcription d'autres gènes viraux lytiques et joue un rôle clé dans l'initiation de la cascade lytique [225]. Parmi les autres gènes IE, on peut citer ORF38, ORF57 et ORF73 [226] ainsi que M4 qui influence positivement la production virale, notamment au niveau pulmonaire [227]. Les gènes précoces codent pour des protéines essentielles à la réplication de l'ADN, alors que des gènes tardifs codent pour les protéines structurales qui présentent un niveau d'expression nettement supérieur aux autres gènes [226]. La cascade lytique n'est pas encore parfaitement comprise mais on sait que des gènes cellulaires interviennent pour promouvoir l'activité des gènes viraux. C'est le cas notamment de la kinase MAP3K8/Tpl2 [228]. Par ailleurs, le niveau d'expression des gènes cellulaires est diminué de façon significative lors de l'infection lytique [226].

La synthèse du matériel génomique est placée sous le contrôle de l'ADN polymérase virale durant la phase précoce et démarre à une ou plusieurs origines de réplication. Cette synthèse se produit via un mécanisme en cercle roulant (Rolling Circle) [2, 229] résultant en des unités séparées par des séquences cibles pour des clivages enzymatiques (Figure 19). Ces unités seront empaquetées au fur et à mesure dans le virion en maturation [16]. La génération de concatémères d'ADN est indispensable pour l'empaquetage en capsides préformées [230]. La réplication de l'ADN commence par la reconnaissance des origines de réplication (Ori) par la protéine liant l'origine ou l'origin-binding protein (OBP), l'UL9 chez

l'HSV-1 (ORF73 chez le MuHV-4, LANA chez le KSHV et EBNA chez l'EBV). L'arrangement ainsi obtenu entre les protéines et l'ADN prend une forme de boucle en épingle à cheveux bien décrite chez l'HSV-1 [230], qui entraîne le recrutement de complexes d'enzymes de réplication (primases, hélicases et polymérases) et la synthèse de nouveaux brins d'ADN.

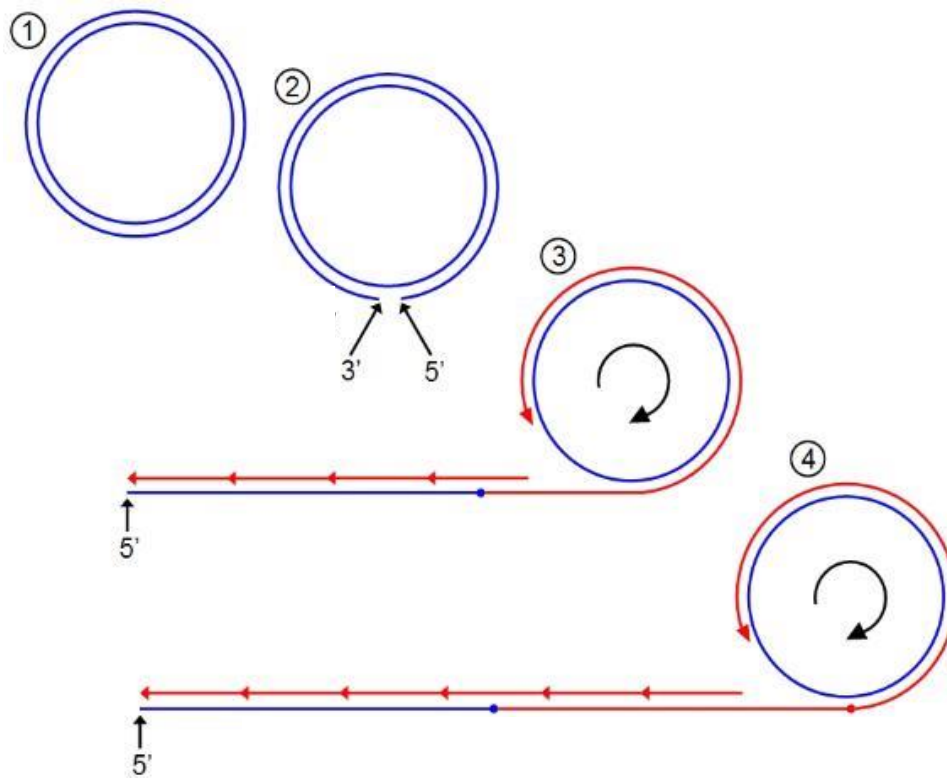


Figure 19. Mécanisme en cercle roulant (« rolling circle »). Un des deux brins d'ADN circulaire est coupé par une endonucléase (1-2). L'extrémité 3' de l'ADN est prise en charge par l'ADN polymérase et la synthèse d'ADN débute par de courts fragments (3). La réplication se poursuit jusqu'à ce qu'au moins une nouvelle copie complète soit obtenue (4). Figure issue et adaptée à partir de http://cronodon.com/BioTech/Virus_Tech.html.

3.2.2. Formation de la nucléocapside

L'assemblage de la capsid des *Herpesviridae* est un processus complexe débouchant sur la formation d'une structure contenant au minimum 11 protéines s'associant dans un ordre précis [231]. Bien que le nom des différentes protéines varie selon les virus, la structure de la capsid est remarquablement semblable chez tous les *Herpesviridae*.

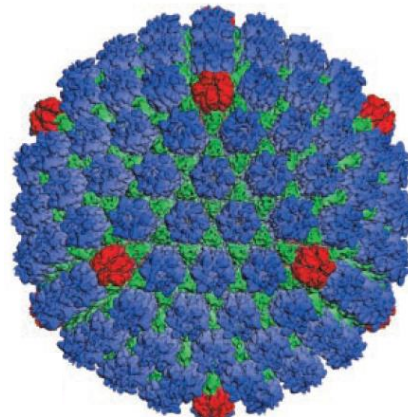


Figure 20. Reconstruction 3D après CryoElectroMicroscopie de capsid B d'HSV-1. Vue de la surface d'une capsid d'HSV-1 avec une symétrie T=16 contenant 11 pentons en rouge, 150 hexons en bleu et 320 triplexes en vert. D'après Zhou *et al.* [232].

Les nucléocapsides des *Herpesviridae* suivent une symétrie icosaédrale (T=16). Ces capsides contiennent 955 copies de la protéine majeure de capsid (MCP), encodée chez les *Rhadinovirus* par le gène ORF25. Ces copies de MCP sont organisées en 11 pentons contenant 5 copies de MCP et 150 hexons, comprenant chacun 6 copies de MCP. Chacune des 20 faces de l'icosahédre est formée par des hexons, tandis que chaque penton est situé à un des 12 sommets de l'icosahédre. Un des sommets est unique et est formé de 12 copies de la protéine porte, encodée par ORF43 chez les *Rhadinovirus*, et est dénommé "*portal vertex*" parce qu'il constitue le tunnel au travers duquel l'ADN viral est empaqueté ou expulsé [166, 233]. De récentes analyses par cryo-électrotomographie (CryoEM) ont permis de mettre en évidence cet unique vertex plongeant vers l'intérieur de la capsid, en comparaison avec les autres pentons faisant protrusion à l'extérieur de la capsid [234] (Figure 21). Les pentons et les hexons sont reliés entre eux par 320 complexes protéiques, appelés *triplex*, qui sont des structures relativement linéaires avec 3 projections. Chez les *Rhadinovirus*, les *triplex* sont formés par deux copies de pORF26 (TRI-2 ou triplex dimer protein) et une copie de pORF62 (TRI-1 ou triplex monomer protein). La protéine mineure de capsid (pORF65) est localisée à la surface extérieure de chaque hexon, mais elle est absente des pentons. Sa position à

l'extérieur de la capsid explique qu'elle peut potentiellement jouer un rôle dans les interactions avec les protéines de tégument mais également être impliquée dans la tégumentation et les interactions virus-hôte [235]. Des différences non pas dans l'organisation mais dans la taille de certains complexes ont été récemment observées au sein des *Gammaherpesvirinae*, dont la structure de la capsid était considérée comme très semblable [236].

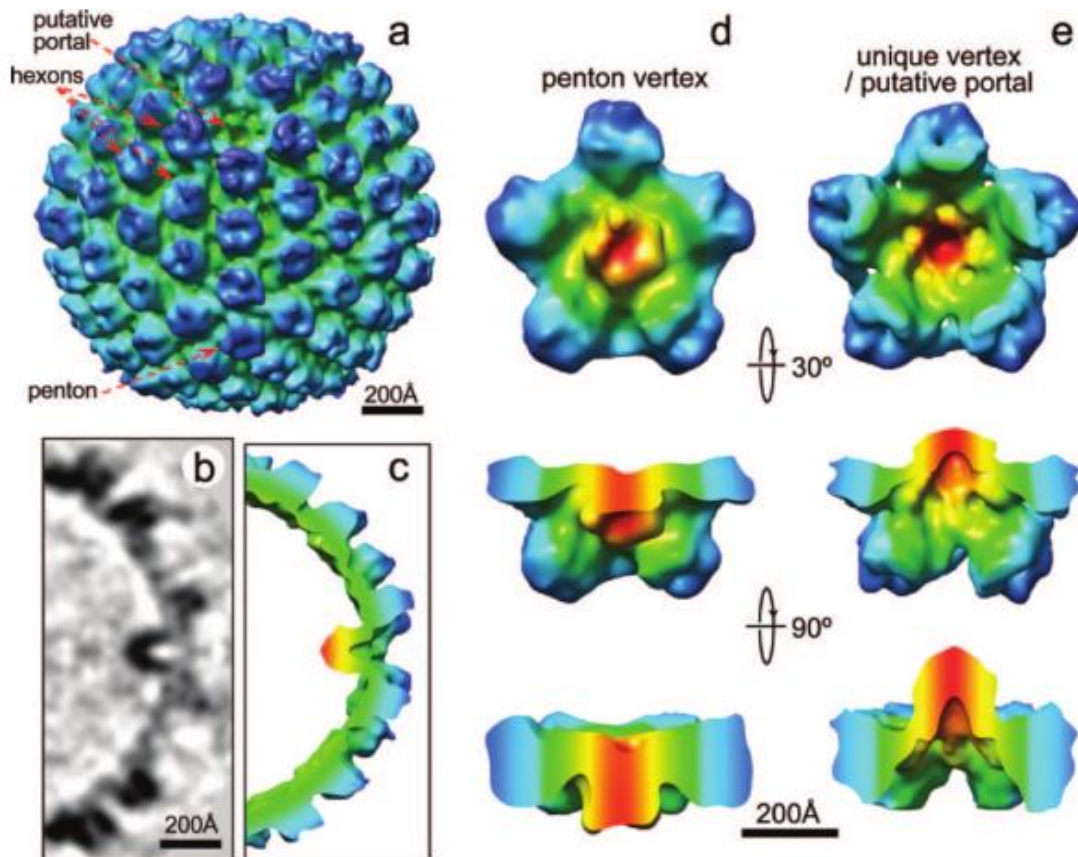


Figure 21. Structure du complexe portal du KSHV. (A) Reconstruction d'une capsid A par cryoEM reconstruction. Une cavité apparaît sur un des 12 vertex. (B et C) Coupe transversale de cette zone unique et reconstruction associée. (D et E) Le complexe portal et les 5 hexons voisins. Les couleurs sont basées sur la distance radiale depuis l'axe du vertex. Les densités les plus proches du vertex sont en rouge et changent vers le vert et le bleu au plus on s'éloigne de l'axe. Les deuxièmes et troisièmes lignes sont des vues en coupe obtenues après rotation des images de la première colonne. D'après Deng *et al.* [234].

L'assemblage de la capsid est un processus qui a lieu dans le noyau, ce qui implique que les protéines de capsides doivent atteindre ce compartiment. Cependant, beaucoup d'entre elles ne possèdent pas de signaux d'adressage nucléaire (*NLS, Nuclear Localization Signal*). Il a dès lors été démontré que plusieurs interactions protéines de capsid-protéines cytoplasmiques sont requises dans le but d'importer toutes les protéines de capsides dans le

noyau [237]. La formation de la nucléocapside implique chez les *Herpesviridae* la présence de protéines dites d'échafaudage (*scaffolding proteins*). Les protéines formant cet échafaudage sont codées par deux gènes qui se chevauchent, UL26 et UL26.5 chez HSV-1 et ORF17 et ORF17.5 chez les *Rhadinovirus*. Ces protéines partagent entre elles leur domaine C-terminal mais la plus longue des deux, pUL26 ou pORF17, possède en plus un domaine supplémentaire N-terminal contenant un motif protéase [238]. Ces protéines s'associent en dimères via un motif de dimérisation présent dans la partie commune, ce qui conduit donc à la formation d'homo- et d'hétéro-dimères. Au sein des cellules infectées par HSV-1, la quantité de pUL26 est 10 fois moindre que celle de pUL26.5 et la production de capside peut être grandement diminuée si l'expression de pUL26.5 est perturbée [239]. Outre leur rôle d'échafaudage pour la formation de la capside, ces protéines sont impliquées dans l'importation des protéines de capside au sein du noyau. Chez l'HSV-1, la protéine d'échafaudage codée par UL26.5 (ORF17.5b chez les *Rhadinovirus*) est connue pour assurer le transport de la protéine majeure de capside (VP5, pUL19 ou pORF25 chez les *Rhadinovirus*) alors que VP29 (pUL38, pORF62 chez les *Rhadinovirus*) est responsable de l'import de VP23 (pUL18, pORF 26 chez les *Rhadinovirus*) et de VP5 [240]. La protéine de capside VP26 (pUL35, pORF65 chez les *Rhadinovirus*) peut rejoindre le compartiment nucléaire grâce à son interaction avec VP5.

L'assemblage de la capside débute probablement toujours par la formation du "*portal vertex*" [241, 242]. Chez HSV-1, la protéine formant ce complexe, pUL6, interagit avec un petit domaine hydrophobe des protéines d'échafaudage. On considère que ce complexe est la structure initiale sur laquelle les pentons et les hexons vont venir s'ajouter. La conséquence importante de ce mécanisme est que chaque capside ne contient qu'un seul "*portal vertex*" [241]. Comme indiqué ci-dessus, la protéine majeure de capside s'assemble en capsomères [243]. L'association des capsomères avec les complexes protéiques appelés *triplex* et la coalescence des dimères de protéines d'échafaudage génèrent dans un premier temps des capsides partielles qui continueront à grandir et à se combiner pour former une procapside sphérique et fermée [242]. La **procapside** est désignée comme le stade très précoce de la capside. Contrairement à la capside, elle est moins bien organisée, de forme sphérique et contient essentiellement les protéines d'échafaudage et les protéases qui serviront à structurer la particule [244]. La figure 22 résume les stades d'évolution de la

capside. Cette figure est initialement réalisée sur base des protéines intervenant dans la constitution de la capsid de l'HSV-1, les noms des ORFs impliqués ont donc été adaptés aux *Gammaherpesvirinae*.

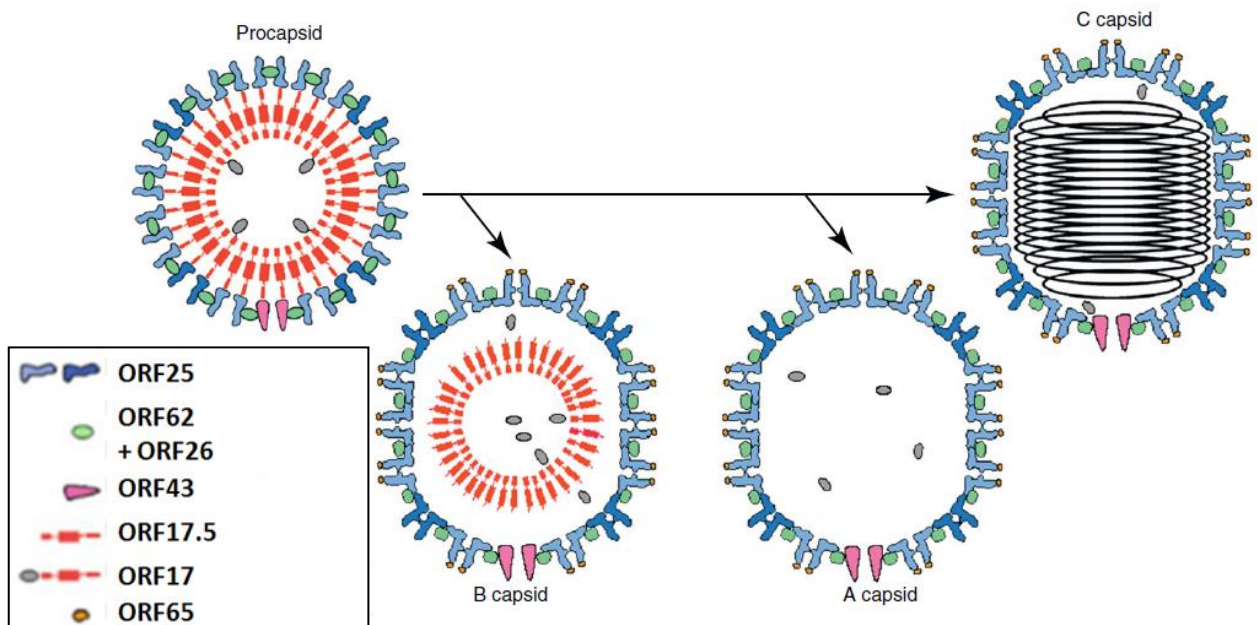


Figure 22. Maturation de la capsid des *Herpesviridae*. Les étapes successives sont montrées en coupe transversales. Voir la description détaillée dans le texte. D'après Baines [241].

Les capsides proprement dites sont classées en 3 types qu'on peut retrouver concomitamment dans un même échantillon de virus : les **capsides A** apparemment vides, se présentant comme une coque, les **capsides B** dont la coque contient une couche interne de protéines d'échafaudage, et les **capsides C** contenant l'ADN mais plus de protéines d'échafaudage [67]. La capsid A représente soit un stade précurseur avant le stade B et C ou bien, plus vraisemblablement une capsid C vide d'ADN [245, 246]. Cette deuxième hypothèse est renforcée par le fait que chez le RRV, les capsides A et C sont de composition identique mais différente des B [247]. Chez tous les *Herpesviridae*, la transition entre ces différentes formes se fait au moment de l'empaquetage de l'ADN viral. En effet, au moment de l'empaquetage, la protéase est activée et l'échafaudage est dégradé de telle façon que la procapsid subit un réarrangement substantiel, faisant que sa forme passe de relativement sphérique à icosaédrique (maturation de la capsid). La figure 23 montre une image de la densité relative liée au contenu en densité de chaque type de capsid.

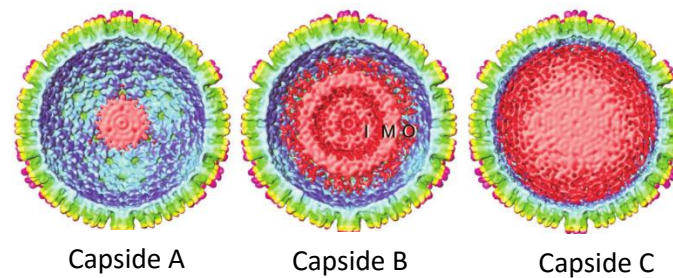


Figure 23. Comparaison des densités des capsides A, B et C, en coupe à une résolution de 27 Å. Alors que la surface des capsides est globalement identique, la densité du contenu est dépendante de la quantité d'ADN présent et varie considérablement. La capside A est quasi vide, la capside B contient un core de 600Å de diamètre arrangé en 3 régions radiales distinctes : interne (I), médiane (M) et externe (O). Les capsides C contiennent l'ADN hautement empaqueté. D'après Yu, [247].

Comme indiqué plus haut, lors de la réplication virale, les génomes nouvellement formés sont synthétisés sous la forme de longues structures appelées concatémères comprenant plusieurs unités génomiques. L'encapsidation et le clivage de l'ADN viral font intervenir plusieurs protéines. L'encapsidation inclut le retrait des protéines d'échafaudage clivées et l'empaquetage compact d'une unité complète d'ADN génomique, ce qui résulte en une capside C dense (Figures 22 et 23).

L'ADN concatémérique doit dans un premier temps être guidé au sein de la capside. En comparaison avec le processus d'encapsidation des bactériophages, qui est décrit plus en détails, l'encapsidation chez les *Herpesviridae* devrait impliquer plusieurs fonction analogues: (i) une structure d'entrée au sein de la capside, (ii) des protéines qui reconnaissent l'extrémité de l'ADN viral, (iii) une endonuléase ainsi qu'une translocase (complexe "terminase"). Sept gènes sont indispensables au processus d'encapsidation chez HSV-1: ULs 6, 15, 17, 25, 28, 32 et 33. Ces gènes sont conservés chez tous les *Herpesviridae* et correspondent respectivement aux gènes ORF43, 29, 32, 19, 7, 68, 67.5 chez les *Rhadinovirus*. Il a été démontré chez HSV-1 que lorsqu'un de ces gènes est délété du génome viral, des capsides vides et de l'ADN viral non-encapsidé s'accumulent au sein du noyau.

Le processus d'encapsidation démarre lorsque les protéines d'encapsidation s'associent à l'extrémité d'un concatémère et le connecte au *portal vertex* d'une procapside [248] (Figure 24). Le packaging du génome des *Herpesviridae* a été le mieux décrit pour HSV-1, c'est donc le processus pour ce virus qui sera décrit ci-dessous. Le processus est sans doute très similaire chez les *Gammaherpesvirinae*. Les protéines pUL32 et pUL17

(correspondant à pORF68 et pORF32) semblent être requises pour la translocation des protéines de capsides et des procapsides vers les sites de réplication au sein du noyau. Les protéines pUL15, pUL28 et pUL33 (correspondant aux protéines pORF29, pORF7, pORF67.5 chez les *Rhadinovirus*) constituent le complexe *terminase*. Ce complexe s'ancre au *portal vertex* et scanne l'ADN viral pour la présence de sites consensus de clivage (*pac* pour *packaging sequence*), présents à l'extrémité des génomes, en même temps qu'il le pompe à l'intérieur de la capsid grâce à l'hydrolyse d'ATP. Un clivage endonucléolytique est requis mais le mécanisme précis de celui-ci n'est toujours pas bien connu. Enfin, la protéine encodée par UL25 (ORF19 chez les *Rhadinovirus*) ne semble pas jouer de rôle dans le processus de clivage, mais semble être importante dans la stabilisation des capsides remplies d'ADN et pourrait jouer le rôle de « bouchon ».

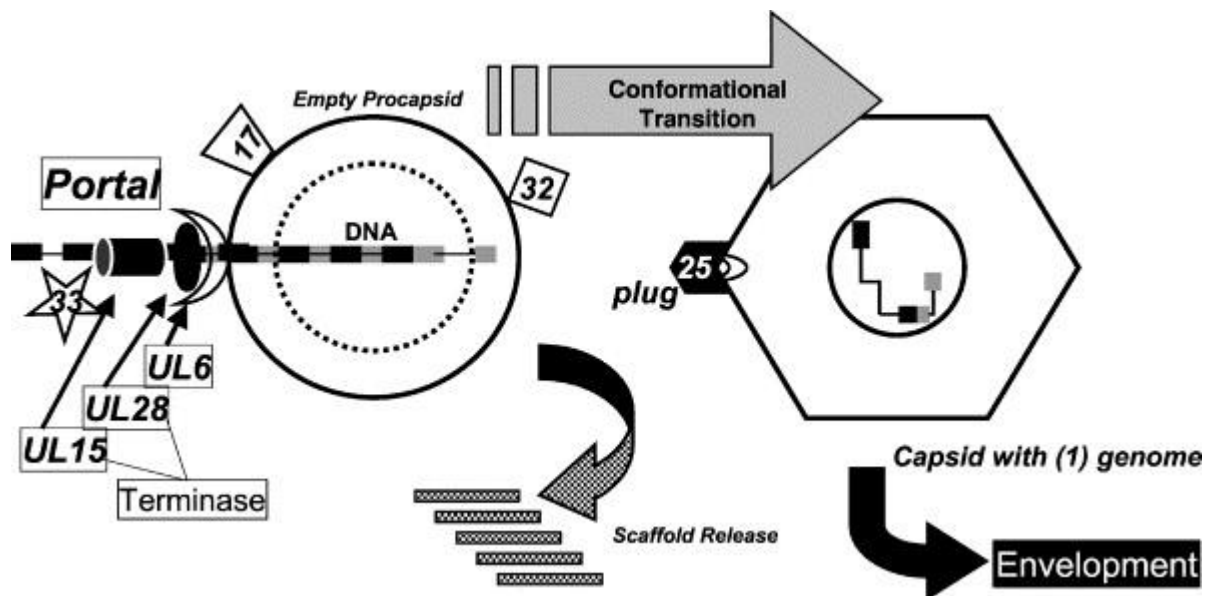


Figure 24. Représentation schématique de l'encapsidation de l'ADN viral d'HSV-1. Voir la description détaillée dans le texte. D'après Visalli *et al.*, [249].

3.2.3 Modèles de sorties des nucléocapsides hors du noyau

Plusieurs modèles ont été proposés, bien qu'actuellement les auteurs s'accordent pour un modèle de préférence (Figure 25). Le premier modèle est le processus d'enveloppement simple, qui propose le bourgeonnement de la nucléocapside à travers le noyau et l'acquisition d'une partie de la membrane nucléaire. Un second modèle propose que les nucléocapsides sortent du noyau via des pores nucléaires dilatés. Un troisième

modèle est celui de l'enveloppement – dé-enveloppement – ré-enveloppement, qui sera celui développé ci-dessous. Un quatrième modèle propose la rupture de la membrane nucléaire pour permettre le passage des virions [250].

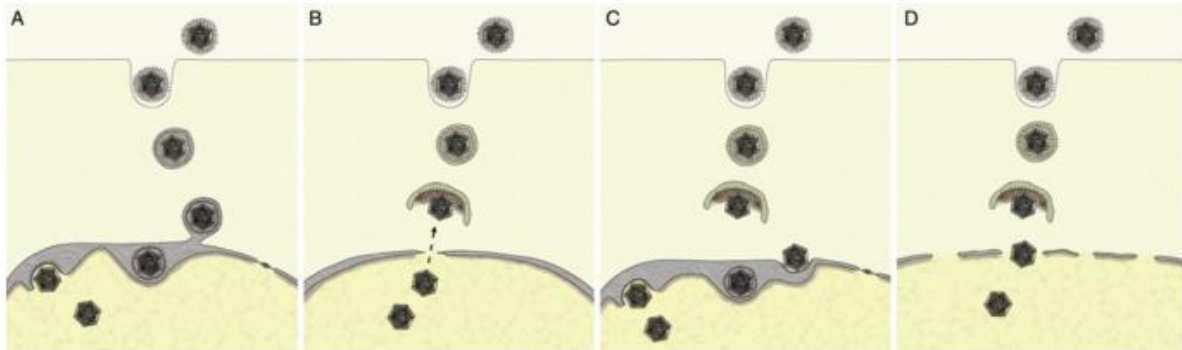


Figure 25. Schéma des 4 modèles de sorties des nucléocapsides des *Herpesviridae*. A. Modèle de l'enveloppement simple. B. Modèle des pores dilatés. C. Modèle de l'enveloppement - dé-enveloppement - ré-enveloppement. D. Modèle de la rupture de l'enveloppe nucléaire. D'après Mettenleiter *et al.*, [250].

Le modèle actuellement admis est celui de l'enveloppement - dé-enveloppement - ré-enveloppement. Il est illustré plus en détails à la figure 26 et des photographies en microscopie électronique de ces différentes phases sont présentées à la figure 27.

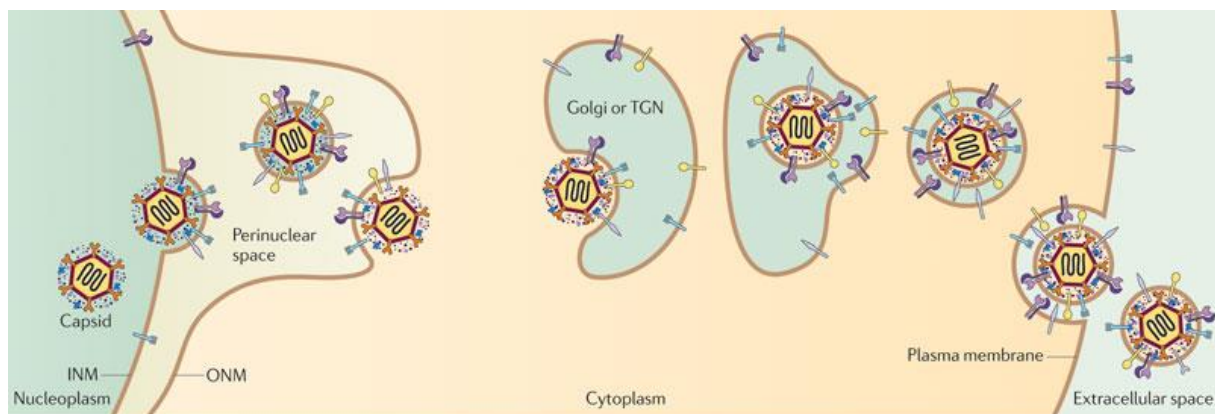


Figure 26. Modèle de l'enveloppement - dé-enveloppement – ré-enveloppement. Après la formation des capsides au sein du noyau, celles-ci bourgeonnent à la membrane nucléaire interne (INM, *inner nuclear membrane*). Ces particules fusionnent avec la membrane nucléaire externe (ONM, *outer nuclear membrane*) (dé-enveloppement) et sont relarguées dans le cytoplasme, laissant leur enveloppe au sein de l'ONM. Dans le cytosol, ces capsides s'attachent et bourgeonnent au sein de membranes cytoplasmiques (enveloppement secondaire), et les virions enveloppés sont sécrétés. TGN, trans-Golgi network. D'après Johnson et Baines, [251].

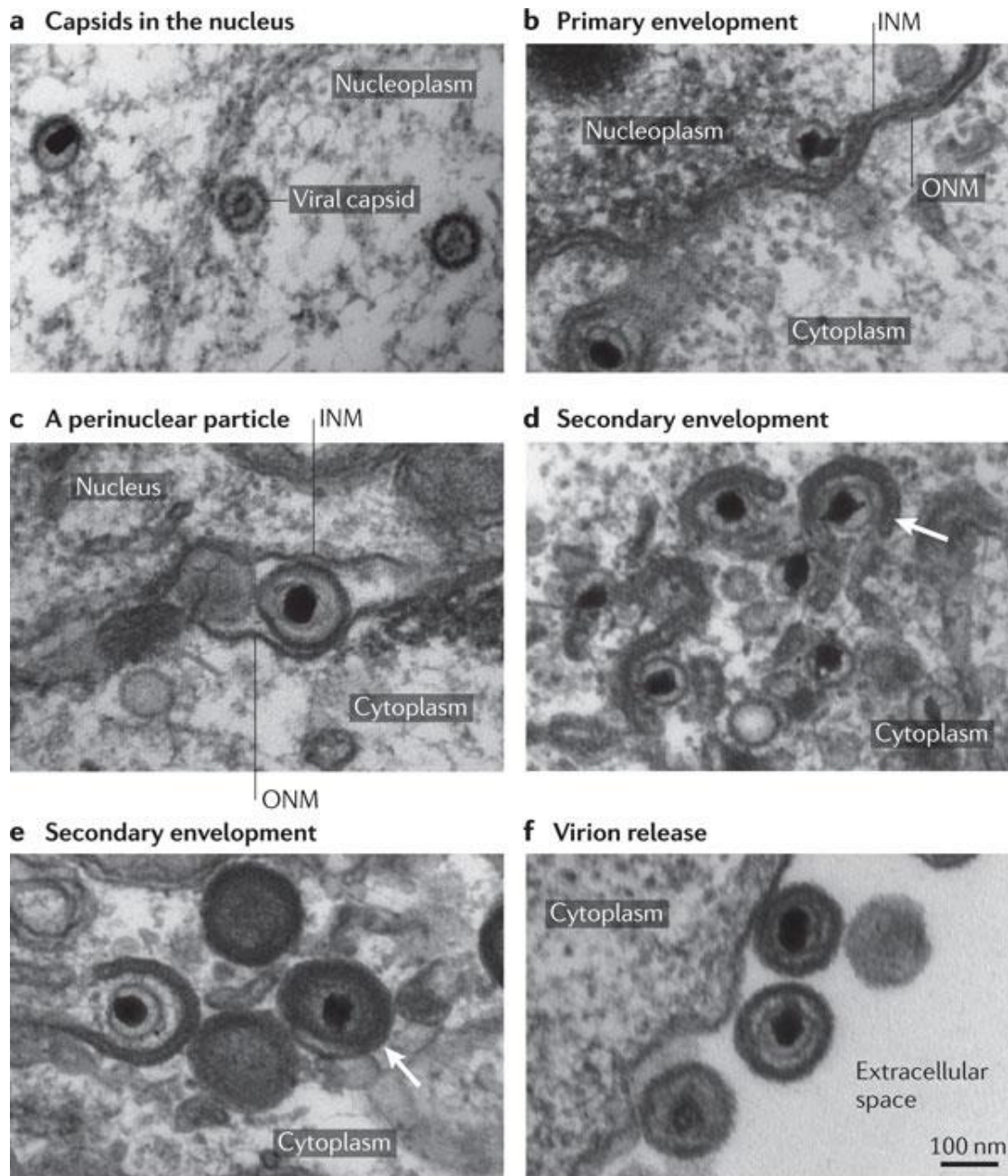


Figure 27. Microscopie électronique de la sortie des *Herpesviridae*. (A). Capsides virales au sein du noyau. (B). Enveloppement primaire, montrant l'apposition de la capsid à la membrane nucléaire interne (INM). (C). Capsides enveloppées présentes dans l'espace périnucléaire. La membrane entourant la capsid est donc dérivée de l'INM. (D). Etapes initiales de l'enveloppement secondaire. Les capsides désenveloppées libres dans le cytoplasme interagissent avec la membrane du TGN et acquièrent leur enveloppe (flèche blanche). (E). Etape finale de l'enveloppement secondaire. Les particules enveloppées (flèche blanche) sont présentes à l'intérieur de la lumière des membranes dérivées du TGN. (F). Relargage des virions. Les virions enveloppés sont transportés à la surface cellulaire et libérés. D'après Johnson et Baines, [251].

3.2.4 Le complexe d'évasion nucléaire (Nuclear Egress Complex)

Une fois formée, la nucléocapside va se rapprocher de la membrane interne du noyau grâce à des mouvements d'actine [252]. La membrane nucléaire est une barrière physique importante. Elle est, pour rappel, constituée d'une membrane interne (INM) et d'une membrane externe (ONM), séparées par la lumière périnucléaire. L'ONM est en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et l'espace périnucléaire en relation avec l'espace du RE. La membrane nucléaire est continue sauf aux endroits où on trouve les pores nucléaires. Théoriquement, ils peuvent être des portes de sorties pour les capsides mais celles-ci, d'un diamètre d'au moins 125 nm, ne peuvent franchir les pores d'un diamètre avoisinant les 40 nm (voire un peu plus selon les auteurs) [253, 254]. D'autre part, les protéines intégrées à la membrane nucléaire interagissent avec la laminine nucléaire et la chromatine pour former un réseau dense qui obstrue l'accès au cytoplasme. Ainsi, pour permettre le contact avec la membrane nucléaire, la lamina nucléaire (maillage fibrillaire dense bordant, côté nucléoplasme, l'enveloppe nucléaire d'une cellule) doit être assouplie et au moins partiellement poreuse. Ceci requiert les protéines virales pUL34 et pUL31 chez HSV-1 qui forment le **NEC (Nuclear Egress Complex)** (respectivement pORF67 et pORF69 chez les Rhadinovirus) [5, 6, 255, 256] (Figure 28). pUL34 est une protéine membranaire de type II présente au sein des deux membranes nucléaires [257]. pUL31 est une phosphoprotéine nucléaire [258], qui, en présence de pUL34, se relocalise à la membrane nucléaire [259, 260]. Toutes deux sont capables de lier la laminine A et C [260], et l'homologue de pUL34 chez le cytomégalovirus murin induit le recrutement de la protéine kinase cellulaire C (PKC), qui phosphoryle la laminine [261]. Le résultat local est la dissolution de la laminine, permettant ainsi l'accès à la membrane interne du noyau par la capside. Il est intéressant de noter que ces deux protéines sont présentes dans le virion primaire mais absentes dans le virion mature [262]. La pORF36 du KSHV est une phosphoprotéine kinase qui va également jouer un rôle dans la phosphorylation de la laminine et ainsi rendre la « barrière nucléaire » plus perméable [263].

Chez plusieurs *Herpesviridae*, les capsides C sont spécifiquement recrutées à l'INM. Pour expliquer ce phénomène, un complexe spécifique désigné CCSC pour C Capsid Specific Component et composé des protéines pUL25 et pUL17 (respectivement pORF19 et pORF32 chez les *Rhadinovirus*), a été proposé [264]. Selon ce modèle, le complexe pUL25/pUL17

interagit avec le complexe pUL31/pUL34 (respectivement pORF69 et pORF67 chez les *Rhadinovirus*) et explique le recrutement aux bords de la membrane nucléaire des seules capsides C qui contiennent presque 4 fois plus de pUL25 que les capsides B et qui, de ce fait, forment plus aisément des complexes au sein du noyau [265]. Il est intéressant de noter que l'enveloppement primaire de capsides vides d'ADN est rarement observé, on parle dans ce cas de L-particules [266]. Néanmoins, le complexe pUL25/pUL17 a également été mis en évidence dans des capsides immatures et renommé CVSC pour Capsid Vertex Specific Component dû à sa localisation au niveau du vertex [267]. La localisation précise du complexe pUL25/pUL17 a par ailleurs très récemment été décrite pour le KSHV [268]. D'autres interactions entre le NEC et la capside ont été mises en évidence notamment via pUL36 (pORF64) [269].

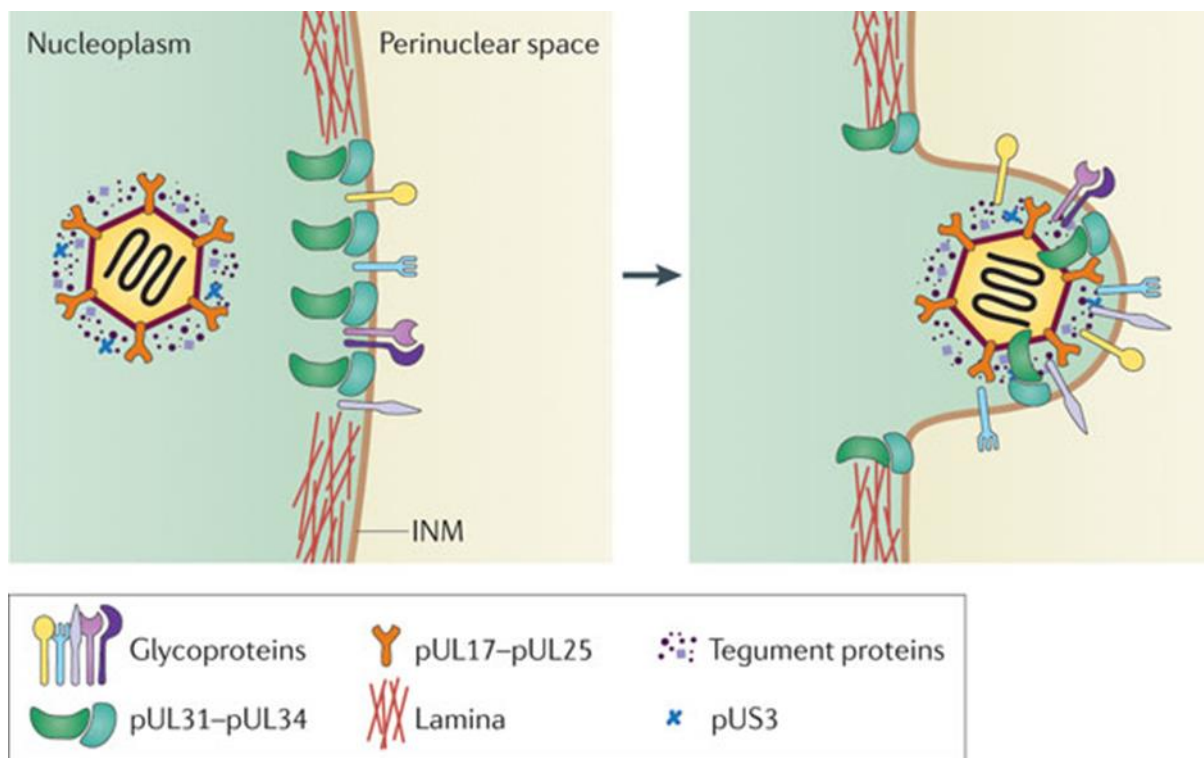


Figure 28. Enveloppement primaire (HSV-1 pris comme modèle). Le NEC, incluant pUL31 et pUL34, induit un amincissement de la lamina nucléaire. Par ailleurs, le NEC recrute d'autres protéines virales qui sont incorporées dans la particule lors de l'enveloppement primaire. Les protéines virales pUL17 et pUL25 forment un complexe à la surface de la capside qui est important pour la sélection de capsides matures contenant de l'ADN en vue de l'enveloppement primaire. Une partie du tégument est lié à la capside, dont pUS3, qui a un rôle important dans les étapes ultérieures de la sortie des *alpha*herpesvirinae. INM, *inner nuclear membrane*. D'après Johnson et Baines [251].

3.2.5 Tégumentation primaire, enveloppement primaire et dé-enveloppement

Les protéines du tégument sont cruciales, d'une part dans la formation de la particule virale, et d'autre part lors de l'entrée, dans les étapes post-fusion. Alors que longtemps, les protéines de tégument n'ont été considérées que comme des ancrages des protéines de capsides à l'enveloppe, n'ayant ainsi qu'un rôle passif dans le cycle viral [270, 271], il est admis à présent que les rôles du tégument sont nombreux et que celui-ci possède une architecture complexe [7]. Par ailleurs, le tégument subit des processus de réorganisation lors de l'entrée et ce, même avant la fusion [272]. Cette observation faite sur l'HSV-1, a mis en évidence que lors de l'attachement, la protéine pUL16 du tégument (commune à tous les *Herpesviridae* et correspondant à la protéine encodée par l'ORF33 chez les *Rhadinovirus*) subissait des changements de conformation avant la fusion. Chez les *Gammaherpesvirinae*, cette protéine est également essentielle lors de la formation de la particule virale [273].

La difficulté dans l'étude des protéines du tégument réside notamment dans l'identification des protéines faisant réellement partie du tégument et celles qui font partie de la capside, de l'enveloppe ou qui sont là par hasard. Ainsi, les critères généralement admis pour identifier une protéine comme faisant partie du tégument sont : 1) la résistance à la digestion par la trypsine en l'absence de détergent, et 2) la sensibilité à la digestion par la même enzyme après attaque de l'enveloppe par des détergents [274]. Ainsi, concernant le KSHV, les protéines du tégument identifiées selon ces critères sont encodées par les ORFs 6, 7, 11, 21, 33, 45, 52, 63, 64, 50 (RTA ou *replication and transcription activator*) et 75 [275, 276]. L'existence d'une organisation particulière du tégument a été exposée précédemment et il apparaît donc clair actuellement que le tégument revêt une architecture qui ne dépend pas du hasard [277].

La composition en protéines du tégument acquises dans le noyau semble varier d'un *Herpesviridae* à l'autre. Ainsi, les *Alphaherpesvirinae* contiennent au sein des virions immatures la protéine issue du gène US3, une kinase qui phosphoryle UL34 et modifie ainsi la morphogénèse du virus, mais qui n'est pas conservée chez les *Beta-* ni chez les *Gammaherpesvirinae*. Par ailleurs, la composition du tégument varie entre particules primaires et secondaires. Ainsi, une étude a récemment analysé la composition de virions de PRV par imagerie et a trouvé la présence d'une isoforme de pUL36 de façon éphémère dans

les particules immatures, alors que cette isoforme est remplacée durant la maturation cytoplasmique [278]. Un autre exemple de la disparité des protéines du tégument entre particules primaires et secondaires est l'absence, à la fois dans les virions primaires d'HSV-1 et de PRV, des protéines du tégument pUL47 et pUL49, alors que les particules matures en sont abondamment fournies [279, 280].

Les données connues à l'heure actuelle sur la composition du tégument des particules immatures sont largement incomplètes et concernent surtout les *Alphaherpesvirinae*. Néanmoins, aucune des protéines du tégument primaire ne semble requise pour le largage des virions dans le cytoplasme. Les glycoprotéines présentes sur les virions matures (« spikes »), ainsi que l'aspect morphologique du tégument, sont différents des virions immatures comme en témoignent les images en ME (concernant les *Alphaherpesvirinae*). En effet, le tégument des particules primaires est considérablement moins dense que celui des particules matures, suggérant que la majorité des protéines de tégument sont ajoutées au sein du cytoplasme [5, 250, 251]. Les images de la figure 29 illustrent bien ces différences.

La nature des virions primaires *versus* virions matures diffère donc grandement. L'analyse de leur différence est d'autant plus difficile qu'il est quasi impossible d'isoler des particules de l'espace périnucléaire et à la fois d'obtenir un échantillon pur et concentré. Bien que certains aient tenté l'expérience [281], cela s'est avéré peu robuste et difficilement reproductible.

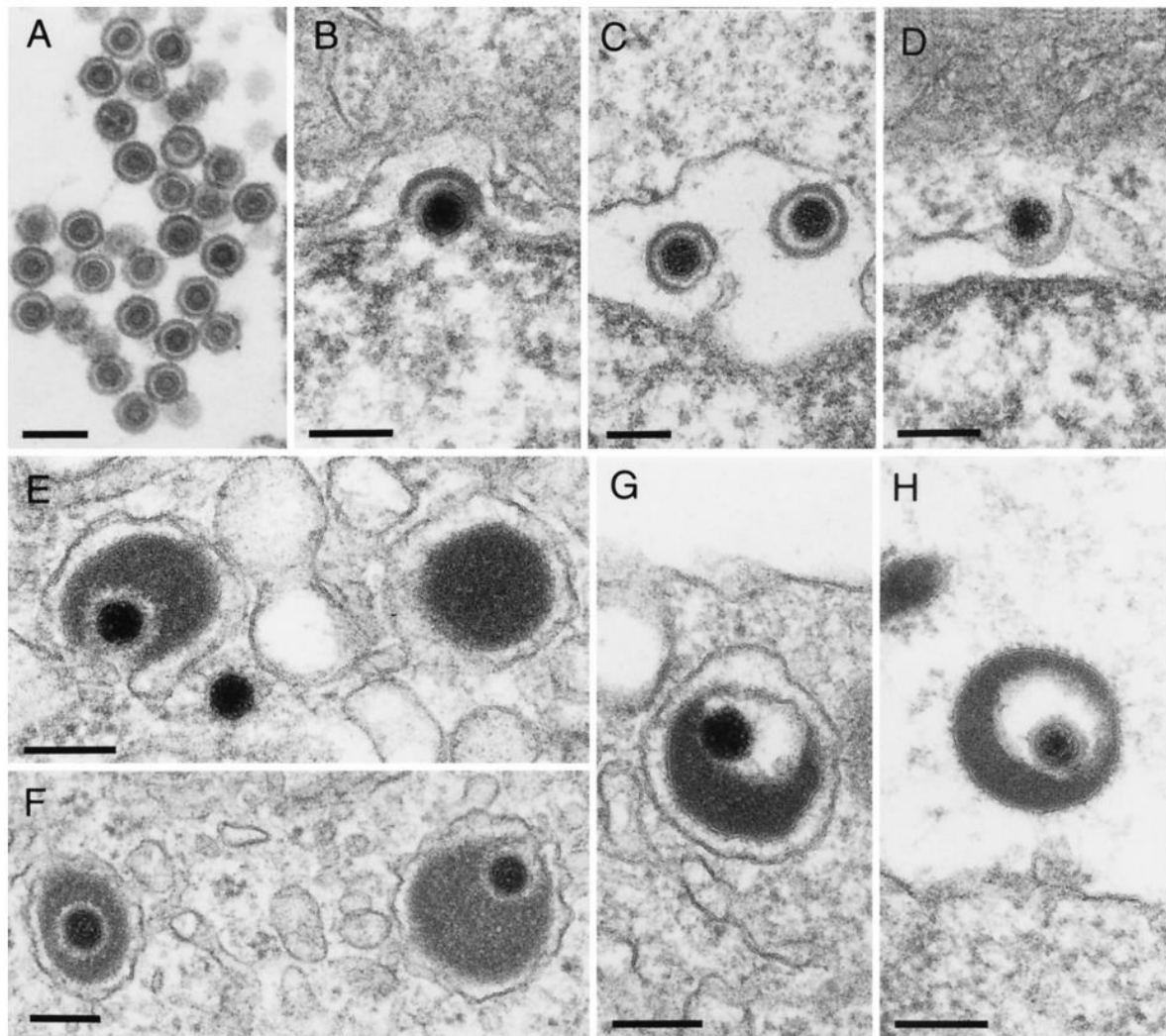


Figure 29. Assemblage et sortie du virus infectieux de la laryngotrachéite (ILTV) et du PRV. (A) Assemblage intranucléaire, (B et C) formation des virions périnucléaires, (D) fusion avec l'ONM. De larges quantités de protéines du tégument sont incorporées dans les virions (G et H) mais uniquement dans le cytoplasme (E et F). D'après Mettenleiter *et al.* [5].

Comme expliqué précédemment, des relations entre les protéines de capsides et les protéines du tégument interne ont été mises en évidence notamment par ME et reconstruction. Par contre, alors que des relations étroites interviennent chez les *Alpha-* et *Betaherpesvirinae* entre les protéines du tégument interne et les pentons et hexons de la capside [4, 282], ce type de relations semble différer dans le cas des *Gammaherpesvirinae* [283].

A ce stade, la particule virale se retrouve dans l'espace périnucléaire. Elle va devoir fusionner avec l'ONM pour rejoindre le cytoplasme. Les auteurs ne s'accordent pas sur la manière dont ce processus se produit. Selon Torrisi *et al.*, la fusion n'est possible qu'en présence de gB et gD (HSV-1) [284]. Ceci sera étayé en 2001 par Skepper *et al.* qui met en

évidence par marquage gD dans l'espace périnucléaire [285], par Farsworth en 2007 qui observe que des virions mutés pour gB et gH ne peuvent pas franchir l'ONM et entraînent la formation de hernies de la membrane nucléaire, les virions restant « coincés » (ce qui ne se produit pas si on ne mute que gB ou gH séparément) [286]. Wright *et al.* en 2009 tirent finalement les mêmes conclusions [287]. En revanche, Mettenleiter *et al.* en 2004 affirment que l'enveloppement et le déenveloppement contrairement à la fusion avec la membrane plasmique, ne requiert pas gH, gL ou gB, de même que Klupp en 2008, qui observe que les virions de PRV mutés pour gB et gH ne sont pas perturbés dans leur migration vers le cytoplasme [288]. En résumé, ces études sont d'accord pour dire que la fusion lors de l'entrée et la sortie du noyau sont deux phénomènes différents mais l'implication des glycoprotéines virales pour la fusion avec l'ONM est controversée. D'autre part, cela signifierait que les différents phénotypes observés pour gB et gH indiquent une fonction dans la fusion durant l'entrée et suggèrent ainsi que cette fonction est conservée au sein des *Herpesviridae*, alors que leur rôle dans la fusion avec l'ONM ne le serait pas. pUL34 (pORF66), une des protéines composant le NEC, transmembranaire et présente chez tous les *Herpesviridae*, pourrait jouer un rôle durant la fusion pendant la sortie du noyau [289, 290]. Des protéines de l'hôte, incluant les protéines ESCRT (pour *endosomal sorting complex required for transport*) mais également d'autres, pourraient être impliquées dans le déenveloppement [251].

3.2.6 Tégumentation secondaire

Le tégument des herpèsvirus présente une architecture complexe et la nature des protéines de tégument varie significativement plus entre les différentes sous-familles d'herpèsvirus que pour les protéines de capsides ou les glycoprotéines d'enveloppe participant à la fusion (Tableau 2). Ainsi, les virions d'HSV-1 contiennent au minimum 23 protéines différentes dont l'abondance varie de 200 à 2000 copies par virion [291]. L'analyse par microscopie électronique et la reconstruction en trois dimensions de particules virales a démontré que ces protéines de tégument s'organisent en tégument interne et tégument externe. La couche interne du tégument est en contact étroit et interagit avec la capside, tandis que la couche externe du tégument occupe l'espace entre la couche interne et l'enveloppe et est donc organisée de façon plus lâche puisqu'elle doit épouser la forme irrégulière de l'enveloppe virale [274] (Figure 30).

Conservation of HSV-1 tegument genes.

HSV-1 tegument gene	Gene conserved in <i>Herpesvirinae</i> subfamily			Gene nomenclature of HSV-1 tegument homologues		
	Alpha	Beta	Gamma	HCMV (Beta)	EBV (Gamma)	KSHV (Gamma)
UL7	Yes	Yes	Yes	UL103	BBRF2	ORF42
UL11	Yes	Yes	Yes	UL99	BBLF1	ORF38
UL13	Yes	Yes	Yes	UL97	BGLF4	ORF36
UL14	Yes	Yes	Yes	UL95	BGLF3	ORF34
UL16	Yes	Yes	Yes	UL94	BGLF2	ORF33
UL21	Yes	Yes	Yes	UL87	BcRF1	ORF24
UL23	Yes	No	Yes	NA	BXLF2	ORF21
UL36	Yes	Yes	Yes	UL48	BPLF1	ORF64
UL37	Yes	Yes	Yes	UL47	BOLF1	ORF63
UL41	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL46	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL47	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL48	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL49	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL50	Yes	No	No	NA	NA	NA
UL51	Yes	Yes	Yes	UL71	BSRF1	ORF55
UL55	Yes	No	No	NA	NA	NA
US2	No	No	No	NA	NA	NA
US3	Yes	No	No	NA	NA	NA
US10	No	No	No	NA	NA	NA
US11	No	No	No	NA	NA	NA
RL1 (ICP34.5)	No	No	No	NA	NA	NA
RL2 (ICP0)	Yes	No	No	NA	NA	NA
RS1 (ICP4)	Yes	No	No	NA	NA	NA

Italics indicate protein identified in virions by mass spectroscopy. NA: not applicable.

Tableau 2. Conservation des gènes du tégment chez les *Herpesviridae* en comparaison avec les gènes de l'HSV-1. D'après Kelly *et al.*, [270].

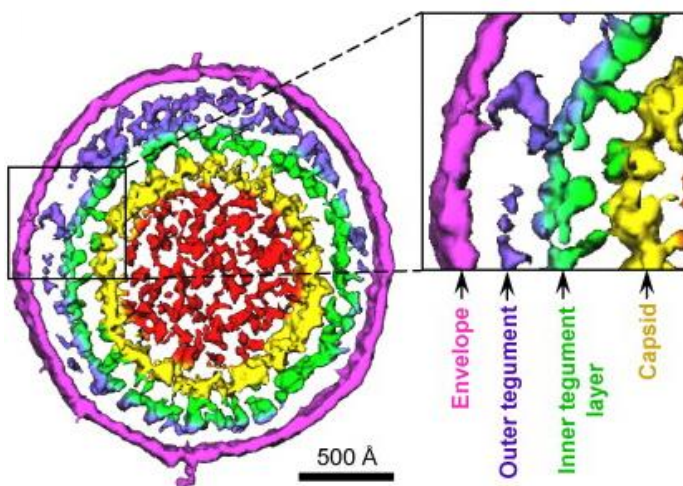


Figure 30. Structure tridimensionnelle d'un virion MuHV-4 reconstruit par *cryo-electron tomography*. D'après Dai *et al.*, [283].

De plus amples détails ont été obtenus au sujet de l'organisation du tégment par l'investigation systématique des interactions entre protéines. Chez le KSHV, un total de 37 interactions binaires a été détecté (à la fois entre protéines de tégment, mais aussi entre protéines de tégment et protéines de capsid ou d'enveloppe) [292] (Figure 31).

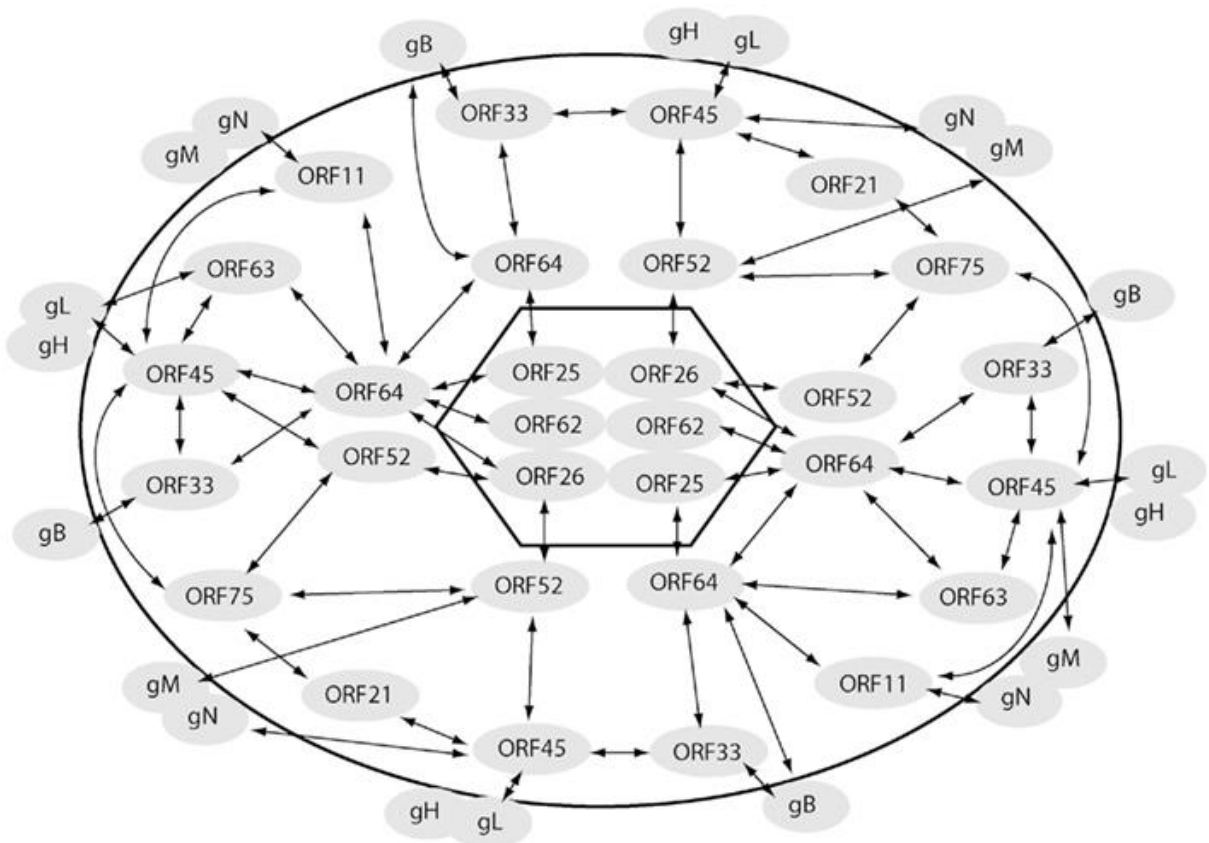


Figure 31. Interactome des protéines structurales du KSHV. Les interactions entre protéines structurales, de capsid (au sein de l'hexagone), de tegument (en dehors de l'hexagone, mais au sein de l'ovale) ou d'enveloppe (en dehors de l'ovale) sont indiquées par des flèches. Le pattern d'interactions du réseau ORF64-ORF52-ORF33-ORF45 avec de nombreuses protéines virales est particulièrement évident. D'après Sathish *et al.*, [274].

C'est l'existence de ces interactions entre protéines qui explique vraisemblablement la tégumentation des virions dans le sens où la présence d'une protéine détermine la présence ou l'absence d'une autre et inversement. En dehors des interactions physiques existantes entre les différentes protéines de capsid, tegument et/ou enveloppe [292-294], des déficits d'incorporation de certaines protéines ont été en effet montrés en l'absence d'autres protéines [295-297]. Ceci est observé chez les *Gammaherpesvirinae* dans le cas des mutants délétés pour les gènes ORF33 [273] ou ORF52 [298].

La tégumentation interne débute probablement par l'ajout d'une protéine conservée chez les *Herpesviridae*, l'UL36 (ORF64) [299]. Cette protéine lie la capsid et interagit avec UL37 (ORF63) [4, 300] qui peut de ce fait représenter une seconde ligne de tégument. Ce qui pousse la capsid à aller vers le TGN, lieu de l'enveloppement secondaire. Et même si ce

n'est pas encore clair, elle va y acquérir d'autres protéines de tégument telles qu'UL11 (ORF38) et d'autres.

L'importance des protéines de tégument chez les *Herpesviridae* dans la phase lytique de l'infection est confirmée par différentes études. Ces protéines jouent un rôle à la fois dans le processus de sortie de la particule virale, mais aussi lors de l'entrée comme indiqué précédemment. Ainsi, pORF33 a récemment été décrit comme une protéine de tégument indispensable à la maturation du MuHV-4 [273]. Le mutant délété pour ORF33 est déficient en terme de nombre de particules infectieuses relarguées, les capsides partiellement tégumentées ont tendance à s'accumuler dans le cytoplasme et contiennent pORF52 mais apparemment pas pORF45 [273]. Un mutant délété pour ORF52 présente également un déficit du nombre de particules infectieuses et des manquements d'autres protéines de tégument comme pORF45, mais contient pORF64 et pORF67, et représente ainsi une protéine essentielle pour la morphogénèse et le relargage du virion [298, 301]. A l'inverse, d'autres protéines de tégument sont utiles lors de l'entrée et/ou précocement lors de la réplication du virus. C'est le cas par exemple de pORF45 qui semble essentielle pour l'expression des gènes dès l'entrée du virus dans le noyau [302]. pORF45 joue également un rôle important chez le KSHV dans le transport des capsides tégumentées vers le cytoplasme et le TGN [274]. L'ORF63 inhibe l'activation de la caspase-1 et inhibe l'induction de la synthèse d'interleukine IL1 β à travers l'inhibition de la formation de l'inflammasome [303]. L'ORF64 agit comme protéine d'échafaudage mais également semble avoir un rôle dans les processus de transport du virion le long des microtubules, dans le relargage de l'acide nucléique dans le noyau et dans la sortie du virion [304]. L'UL11 (ORF38), l'UL16 (ORF33) et l'UL21 (ORF24) peuvent former un complexe trimérique dont le rôle n'est actuellement pas clair [305].

Lors de la sortie, après l'étape de dé-enveloppement, le mouvement des nucléocapsides au sein du cytoplasme va se faire grâce à la kinésine qui assure le transport le long des microtubules à la fois des capsides nucléaires vers le réseau trans-golgien et des virions enveloppés jusqu'à la membrane cytoplasmique [306], comme l'illustre la figure 32. Chez le KSHV, comme indiqué ci-dessus, il a été montré que c'est la protéine encodée par l'ORF45 qui permet l'interaction des nucléocapsides avec la protéine Kinesin-2 [307] (Figure 33). Comme indiqué précédemment, il n'est pas impossible qu'un mouvement vers

l'extrémité négative des microtubules (MTOC) soit nécessaire et implique d'autres protéines cellulaires.

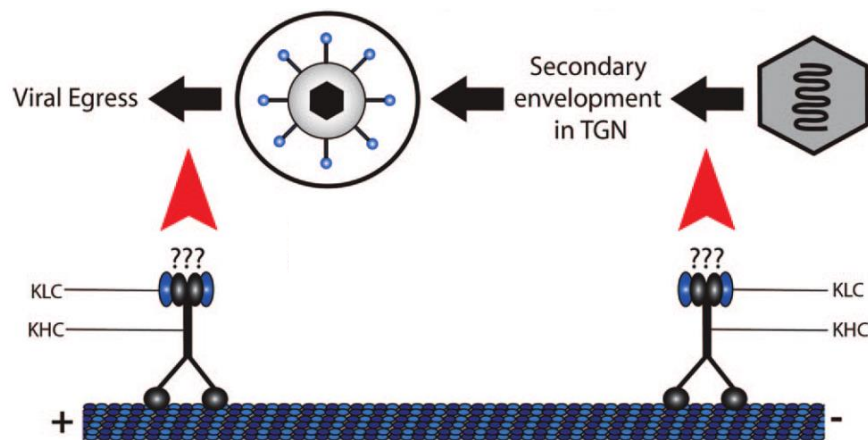


Figure 32. Transport des capsides du noyau vers le cytoplasme médié par la kinésine. Le transport médié par kinésine assure le transport des capsides vers le réseau transgolgien pour assurer l'enveloppement secondaire et celui des virus enveloppés pour assurer leur acheminement vers la surface cellulaire. La kinésine est représentée dans le schéma par 2 chaînes lourdes (KHC) en noir et deux chaînes légères (KLC) en bleu. D'après Lyman *et al.*, [306].

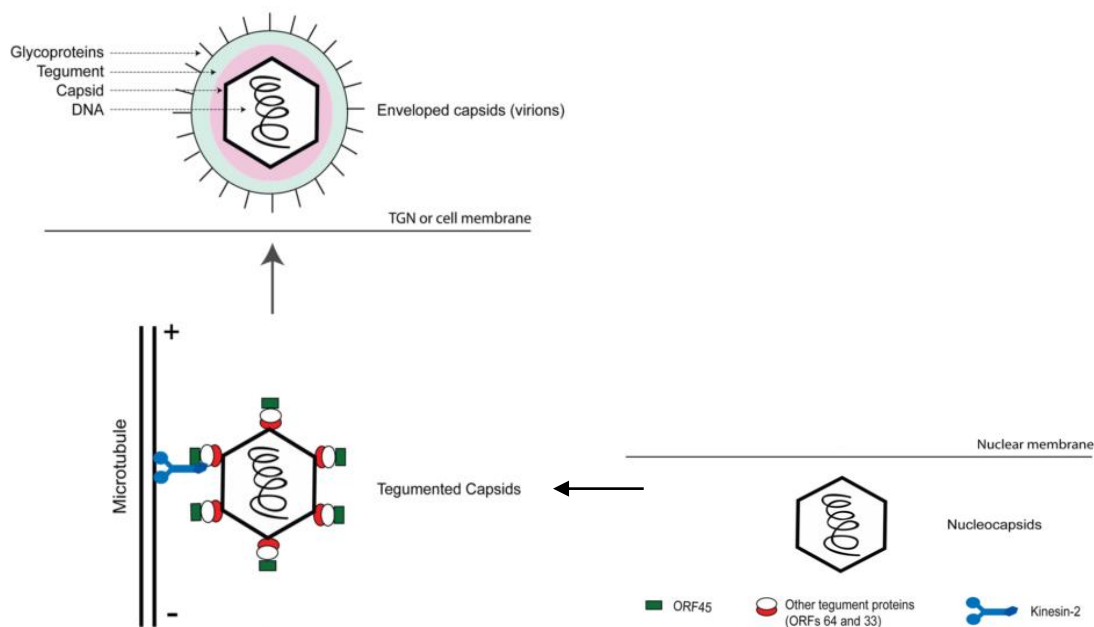


Figure 33. Rôle de l'ORF45 du KSHV dans le transport des capsides tégmentées du noyau vers le cytoplasme. Les capsides nouvellement synthétisées sortent du noyau et acquièrent notamment les protéines de tégment encodées par les ORF33, ORF45 et ORF64. L'ORF45 lie la kinésine-2 et le complexe est déplacé le long des microtubules à travers le TGN pour assurer l'enveloppement secondaire. D'après Sathish *et al.*, [274].

3.2.7 Enveloppement secondaire

Les capsides entourées de certaines protéines de tégument dans le cytoplasme, acquièrent l'enveloppe virale en bourgeonnant au sein de membranes cytoplasmiques. Les membranes cytoplasmiques utilisées par différents herpèsvirus pour l'enveloppement secondaire ont été définies comme étant le cis-Golgi, le Golgi-médian, le TGN et les endosomes [251, 308-310]. Cependant, le réarrangement important de ces organelles lors des événements tardifs de la réplication virale fait que les limites de ces structures deviennent floues. Ces réarrangements membranaires pourraient favoriser l'assemblage viral en rapprochant diverses protéines structurales virales ou en ordonnant les interactions entre divers composants à la façon d'une chaîne de montage [251].

Alors que le TGN était jusqu'il y a peu considéré comme le site de l'enveloppement secondaire des *Herpesviridae*, une étude récente a montré que l'HSV-1 utilisait des membranes dérivées d'endosomes pour son enveloppement secondaire [311] (Figure 34). Pour l'instant, aucune donnée ne montre que c'est également le cas pour les *Gammaherpesvirinae*.

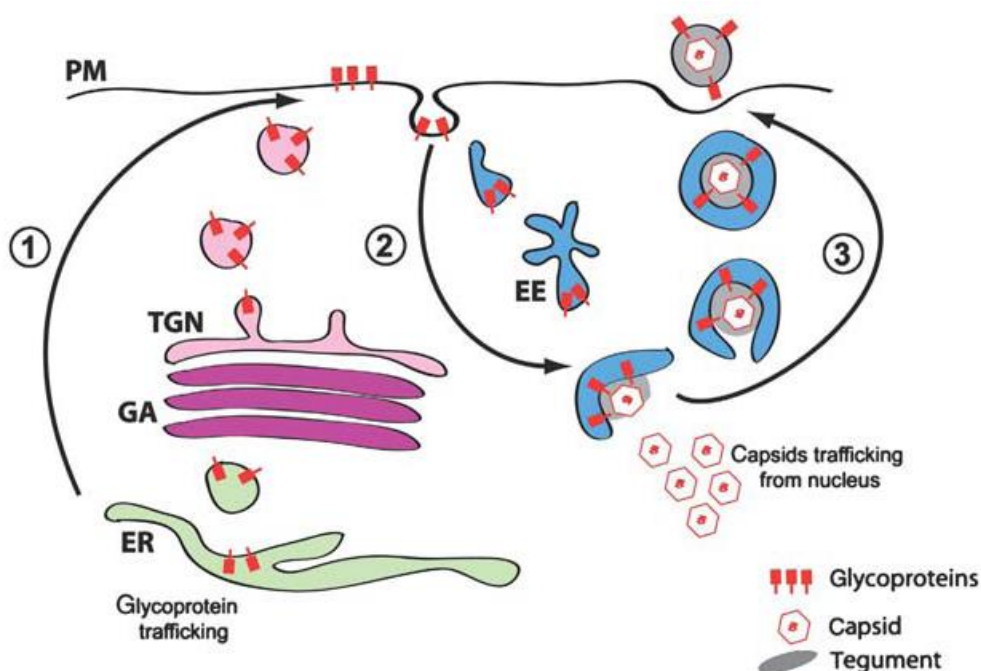


Figure 34. Modèle pour l'enveloppement viral via les endosomes. (1) Les glycoprotéines virales sont exprimées au sein du Golgi/TGN et exportées en surface cellulaire. (2) Des fragments de membrane plasmique contenant ces glycoprotéines sont endocytés et transportés via les endosomes précoces afin de générer des tubules d'enveloppement. (3) Ces tubules "s'enroulent" autour de ces capsides

cytoplasmiques, formant des virions entourés d'une double membrane. La fusion de la membrane externe à la surface cellulaire aboutit au relargage de virions entourés d'une seule membrane en surface cellulaire. EE, endosomes précoces positifs pour EEA-1; ER, réticulum endoplasmique; GA, appareil de Golgi; PM, membrane plasmique; TGN, réseau trans-golgien. D'après Hollinshead *et al.* [311].

Certaines glycoprotéines membranaires des herpèsvirus peuvent contenir des motifs qui les concentrent au niveau du TGN. Ce phénomène favorise l'assemblage et la sortie des particules virales. Un second groupe de glycoprotéines, dépourvues de ces motifs, peut également être recruté au sein du TGN suite à des interactions avec les protéines qui contiennent ces motifs. Enfin, certaines glycoprotéines pourraient ne pas être recrutées au sein de ces sites d'enveloppement secondaire, ce qui expliquerait leur absence au sein de la particule virale mature [291].

Lors de l'enveloppement secondaire, le domaine cytoplasmique des glycoprotéines membranaires virales interagit avec les protéines de capsid ou les protéines de tégument, ceci permet de rapprocher les membranes autour des capsides afin de permettre l'enveloppement ou le bourgeonnement (Figure 35). Ces interactions entre glycoprotéines membranaires et protéines de capsid ou de tégument conduisent à la formation de vésicules polarisées dont une face (concave) est enrichie en glycoprotéines virales et en protéines de tégument tandis que l'autre (convexe) contient principalement des protéines cellulaires. Après l'enveloppement, la face concave devient l'enveloppe virale tandis que le côté convexe constitue la vésicule de transport.

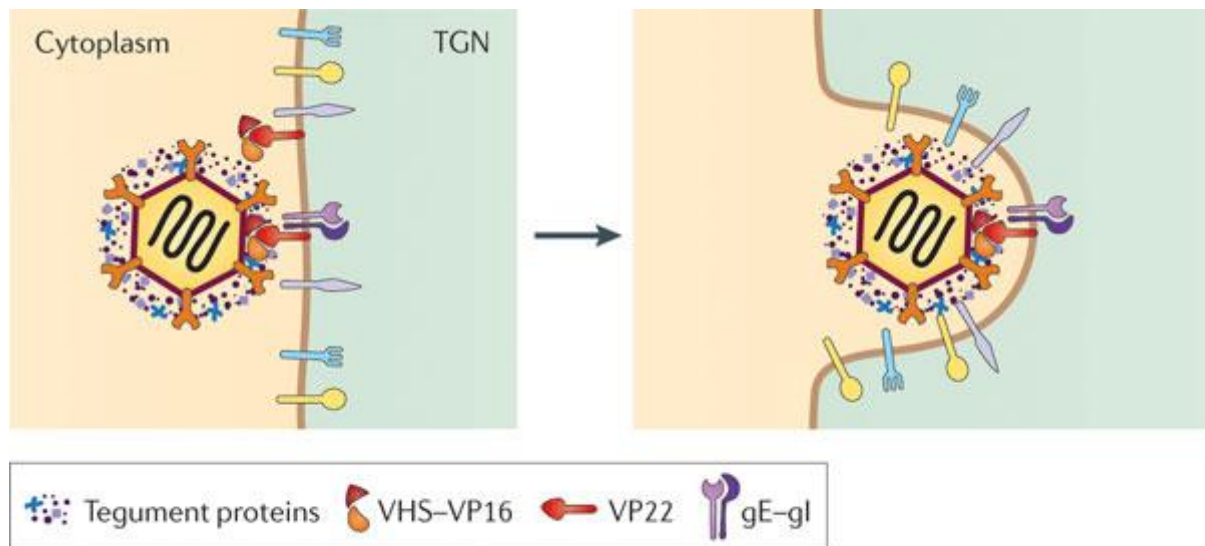


Figure 35. Enveloppement secondaire (modèle de l'HSV-1). Dans le cytosol, les capsides coatées avec plusieurs protéines de tégument, incluant le complexe pVP16, la *virion host shut-off protein* (*vhs*) et pVP22, lient la surface cellulaire de la membrane du TGN qui contient les glycoprotéines de l'HSV-1, incluant gE-gI, gD, gB, gH-gL et d'autres. Les interactions entre pVP16-vhs-pVP22, gE-gI et gD entraînent l'enveloppement qui correspond donc au recouvrement de la capside par de la membrane. D'après Johnson et Baines, [251].

La constitution de l'enveloppe dépend du réseau d'interactions entre protéines [299]. Ces interactions peuvent varier entre les différents herpèsvirus. Ainsi, pUL49 du PRV interagit avec l'extrémité carboxyterminale de gE et gM et cette interaction est requise pour l'inclusion d'UL49 dans la particule mature [259], ce qui n'est pas le cas pour l'HSV-1 et indique donc que des différences existent même entre les sous-familles d'*Herpesviridae* (Figure 36). De façon plus intéressante, car ces protéines sont conservées chez les *Gammaherpesvirinae*, l'absence de UL11 (ORF38) et de gM simultanément empêche l'enveloppement secondaire [312].

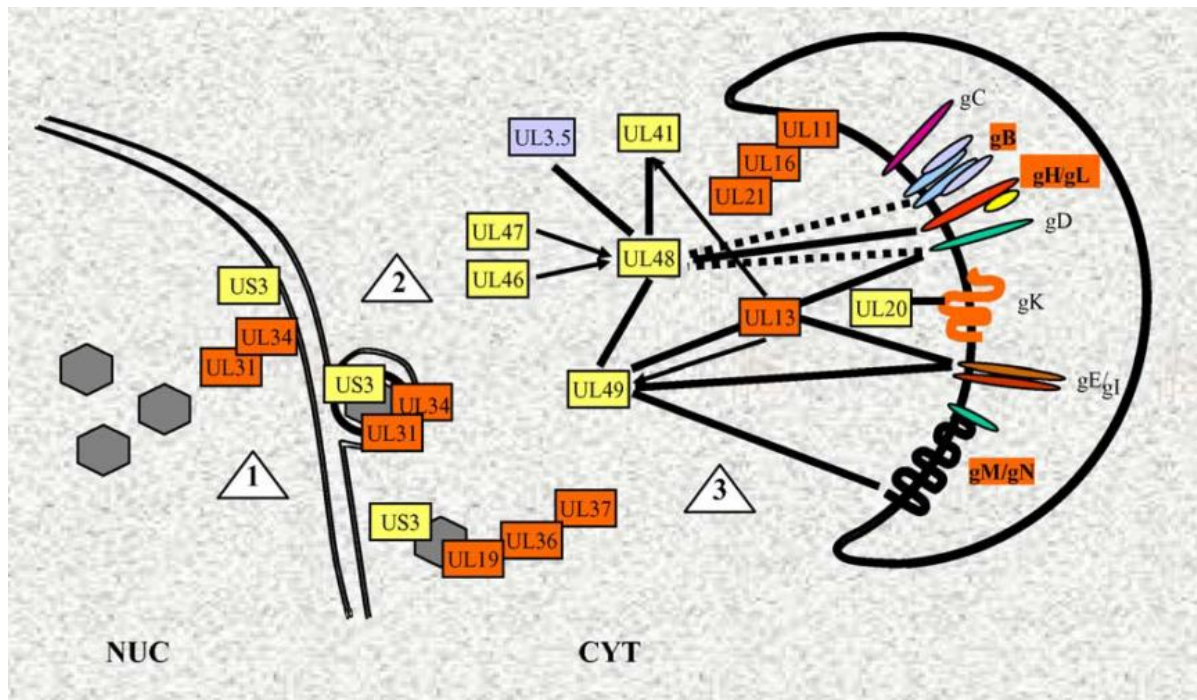


Figure 36. Diagramme des interactions moléculaires durant la formation des virions HSV-1 et PRV. Les numéros dans les triangles indiquent (1) enveloppement primaire, (2) le dé-enveloppement et (3) l'enveloppement secondaire. Les lignes solides ou les contacts directs entre les rectangles indiquent des interactions physiques entre les protéines issues des UL alors que les flèches indiquent un effet fonctionnel. Les lignes en pointillés suggèrent une interaction. Les protéines conservées chez les 3 familles d'*Herpesviridae* sont indiquées en orange. La protéine UL3.5 est absente de l'HSV-1 mais présente chez le PRV. D'après Mettenleiter, [299].

3.2.8 Transport des particules virales enveloppées vers la surface cellulaire

L'enveloppement secondaire produit donc des virions entourés d'une double membrane. Dans une cellule non infectée, les membranes dérivées du TGN sont recyclées vers les endosomes qui à leur tour fusionnent avec la membrane plasmique. On peut donc supposer que cette même route d'exocytose permet le transport des vésicules contenant les virions enveloppés vers la surface cellulaire. La fusion entre ces vésicules de transport et la membrane plasmique permet alors le relargage des virions au sein de l'espace extracellulaire. Cette fusion est probablement permise par la machinerie de fusion d'exocytose cellulaire plutôt que par les protéines virales de fusion puisque ces protéines virales sont dans la mauvaise orientation. Après cette fusion, la majorité des particules virales enveloppées se retrouvent attachées à la surface de la cellule plutôt que sous la forme de virions libres. Par ailleurs, il semble que les herpèsvirus modifient profondément

le trafic des vésicules du TGN lors des phases tardives de l'infection [313]. En effet, il a été observé qu'HSV-1 bloquait le transport des endosomes vers le TGN, favorisant de ce fait le transport des virions vers la surface cellulaire et l'espace extracellulaire. À l'approche de la membrane plasmique, les herpèsvirus semblent activer et exploiter les mouvements de la myosine Va afin de transporter ces vésicules au travers de la couche d'actine corticale qui est présente sous la membrane plasmique (Figure 37).

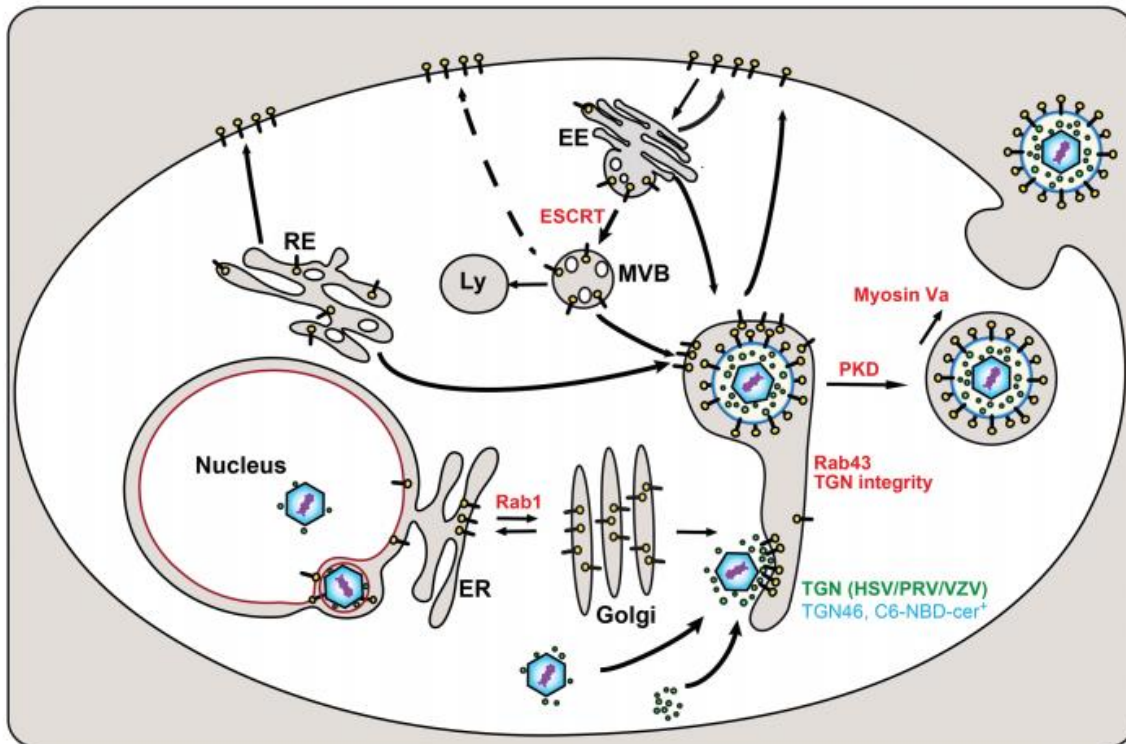


Figure 37. Modèle d'enveloppement final et de relargage des *Alphaherpesvirinae*. Les protéines des capsides des *Herpesviridae*, les protéines de tégument et celles d'enveloppe s'assemblent dans des compartiments qui partagent des marqueurs du TGN (en bleu) dans le cas des *Alphaherpesvirinae* (HSV, VZV et PRV). Après l'enveloppement final, les vésicules contenant un virion quittent le site d'enveloppement et sont relarguées depuis la cellule par fusion avec la membrane plasmique. Les protéines cellulaires qui sont impliquées dans l'enveloppement final et les étapes subséquentes de sortie du virus sont indiquées en rouge. Ce schéma ne prend pas en considération la réorganisation significative de l'architecture cellulaire des *Herpesviridae* car celle-ci est encore actuellement mal définie. ER : réticulum endoplasmique, MVB : corps multivésiculaires ; RE : endosome recyclé ; Ly : lysosome ; ESCRT : complexe de triage endosomal requis pour le transport ; PKD : protéine kinase D. D'après Henaff *et al.*, [314].

Cette représentation simplifiée des dernières étapes de la sortie des herpèsvirus ne tient pas compte que beaucoup d'entre eux infectent des cellules polarisées telles que les cellules épithéliales ou les neurones. Dans ces cellules, des mécanismes permettent que les

virions nouvellement formés soient préférentiellement dirigés vers des membranes spécifiques. Par exemple, dans le cas de l'HSV-1, les particules virales formées dans les cellules épithéliales sont dirigées vers les surfaces latérales de la cellule plutôt que vers la face apicale [315]. Ceci permet sans doute que les virions présents à ces jonctions cellulaires soient positionnés au contact direct des cellules adjacentes, favorisant de ce fait la propagation de cellule à cellule de ces virions. Ceci semble avoir des implications fondamentales pour une famille de virus qui établit des infections latente durant toute la vie de leur hôte et qui génère de fortes réponses immunes. Ainsi, le passage via les jonctions cellulaires permet sans doute aux *Herpesviridae* d'échapper aux effets des anticorps et du complément [251].

3.2.9 Glycoprotéines présentes dans l'enveloppe virale

Les glycoprotéines des *Herpesviridae* interviennent dans plusieurs étapes du cycle viral. En plus de leur rôle dans la formation de la particule virale, dans la sortie du virus et dans la propagation de l'infection virale de cellules à cellules, les glycoprotéines d'enveloppe des *Herpesviridae* sont impliquées dans l'entrée virale comme exposé au début de cette introduction. Elles sont responsables de l'attachement du virus sur son/ses récepteur(s) cellulaire(s) et de sa pénétration dans les cellules sensibles en induisant la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire. Enfin, certaines glycoprotéines virales peuvent perturber les voies de signalisation cellulaire [316] ou encore intervenir dans les processus d'immuno-évasion [317]. Dans ce chapitre, les rôles de ces différentes glycoprotéines seront abordés successivement. Pour des raisons de clarté, seules les glycoprotéines présentes chez les *Rhadinovirus* seront abordées.

On considère généralement qu'il existe 5 glycoprotéines conservées chez tous les *Herpesviridae*, ayant sans doute des fonctions biologiques communes: les glycoprotéines gB, gH, gL, gM et gN [318]. Les autres glycoprotéines traduisent probablement quant à elles des adaptations individuelles aux différentes niches écologiques.

A l'inverse des autres virus enveloppés qui n'utilisent qu'une seule protéine pour l'entrée, les *Herpesviridae* ont un processus d'entrée plus complexe. En effet, de nombreuses glycoprotéines sont impliquées dans l'entrée et chacune d'entre elles remplit

plusieurs fonctions comme indiqué précédemment. Ainsi, différentes glycoprotéines peuvent se lier à plusieurs récepteurs, interagir avec d'autres glycoprotéines et/ou subir des changements conformationnels pour induire la fusion membranaire. Les *Herpesviridae* utilisent une machinerie de fusion virale extrêmement conservée dans laquelle sont impliquées les glycoprotéines gB, gH et gL [319-321].

La glycoprotéine **gB** est la protéine d'enveloppe la plus conservée au sein des *Herpesviridae* [104, 322-324]. Elle est nécessaire à la fusion virale ainsi qu'à la propagation de cellules en cellules mais est insuffisante pour assurer seule ces fonctions. Les *Herpesviridae* utilisent au moins gH et dans une moindre mesure 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 [325]. 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 [323]. Par la suite, des études similaires ont permis de préciser la fonction de gB chez les *Gammaherpesvirinae* [324, 326]. La glycoprotéine gB est présente au niveau de l'enveloppe virale sous la forme de trimères dont chaque protomère est constitué de 5 domaines distincts disposés selon une architecture complexe. Elle présente les caractéristiques d'une protéine membranaire de type I avec 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 [327]. 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 [328].

Comme décrit précédemment, un grand nombre des homologues de gB présents au sein des trois sous-familles d' *Herpesviridae* possède un site de clivage précis, reconnu par la protéase cellulaire furine [166, 329-332]. Dans la particule virale, la plupart des molécules de gB semblent être présentes sous leur forme clivée [333]. L'impact de ce clivage de gB sur l'infection n'est pas élucidé [152] 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 cytomégalovirus humain mais pourrait diminuer la propagation virale de cellules en cellules

[332, 334]. 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. Récemment, l'importance du clivage de gB a été mise en évidence pour l'infection de cellules myéloïdes par le MuHV-4 [153].

Les glycoprotéines **gH** et **gL** sont associées en un complexe conservé chez les *Herpesviridae*. Ce complexe, avec gB, est requis pour l'entrée virale et la propagation de cellule à cellule [104]. 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 [335, 336]. La récente cristallisation du complexe gH-gL de l'HSV-2 [337], de l'EBV [324] et celle partielle de gH du virus de la maladie d'Aujeszky [338] a permis de définir la structure du complexe et de mieux comprendre son rôle au cours de l'infection [326]. De plus le caractère conservé de ce complexe suggère des propriétés communes avec les autres *Herpesviridae* [104, 339]. 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 [340]. 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 [341, 342]. 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 et 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 [324]. Le domaine N-terminal est moins bien défini et semble constituer la région la plus mobile de l'hétérodimère [324].

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-1 [343, 344] tandis qu'aucun domaine fusogénique n'a été identifié chez gL, suggérant un rôle indirect dans la fusion [339]. Des études récentes ont quant à elles suggéré que le complexe gH-gL agissait essentiellement en tant que régulateur de l'activation de gB [324,

337, 345, 346]. Enfin, chez certains herpèsvirus, gL est également impliquée dans l'attachement [118]. De manière intéressante, parmi les récents récepteurs cellulaires des *Gammaherpesvirinae*, le récepteur EphA2 du KSHV a été cité plus haut. Il apparaît qu'il permet de lier le virus à la cellule en s'engageant justement dans le complexe formé par gH/gL [347]. Considérée comme essentielle jusqu'à présent, une étude a récemment montré que la gL du MuHV-4 est non essentielle pour l'infection [348]. Dans une autre étude, une souche de l'herpèsvirus bovin-4 (BoHV-4) déficiente en gL présentait par ailleurs un déficit d'endocytose survenant juste en amont de la fusion membranaire et il semble ainsi que gL joue un rôle de déclencheur de l'endocytose davantage que dans l'incorporation de gH [349]. Des investigations fonctionnelles et structurales plus approfondies sont nécessaires pour préciser le rôle de gH-gL au cours de la fusion [104].

Comme indiqué précédemment, la machinerie de fusion de l'EBV présente 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, gB, gH et 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 [345]. La glycoprotéine gp42 présente plusieurs sites d'interactions protéiques [350] et se complexe avec l'hétérodimère gH/gL via sa région N-terminale [351, 352] (figure 12).

A côté du complexe d'entrée formé par gB, gH, gL, d'autres protéines accessoires participent également à l'entrée des *Herpesviridae*. Parmi celles-ci, la glycoprotéine gp350/220 de l'EBV, codée par le gène BLLF1, est la mieux étudiée. Cette glycoprotéine possède des protéines homologues chez tous les *Gammaherpesvirinae* étudiés (protéine encodée par le gène K8.1 pour le KSH, gp350 pour le BoHV-4). Son homologue chez le MuHV-4 est la glycoprotéine gp150 codée par le gène M7. Elle présente les caractéristiques d'une glycoprotéine de type I. Bien que sa masse moléculaire prédite soit de 47,4 kDa, elle montre pourtant une masse moléculaire apparente 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 [353]. Ces sites de glycosylations pourraient participer à la protection du

virus à l'encontre des anticorps comme récemment montré pour la protéine homologue gp180 chez le BoHV-4 [354]. Des études réalisées chez le MuHV-4 avec des souches n'exprimant plus le gène M7, ont 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. Ces études ont montré que la colonisation de l'hôte infecté était relativement indépendante de gp150 et ont suggéré une possible intervention de gp150 dans la libération des virions néo-formés par interaction avec les GAGs de la surface cellulaire [114]. Par ailleurs, 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 [115, 118, 355] lors des étapes d'infection des cellules GAG+.

gM et **gN** sont deux autres glycoprotéines conservées au sein des *Herpesviridae* qui sont importantes à différents niveaux du cycle viral dans les trois sous-familles. Chez le MuHV-4, gM semble jouer un rôle déterminant dans l'infection lytique [356], ce qui n'est pas le cas chez le PRV [357] ni chez l'HSV-1 [358]. gM est une glycoprotéine de type III contenant de multiples domaines transmembranaires (six à huit) [359-364]. 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 [365]. Chez les *Alphaherpesvirinae*, gM n'est pas essentielle pour la réplication virale, à l'exception du virus de la maladie de Marek [366], mais son absence induit un défaut de croissance [359, 363, 367]. Chez plusieurs virus de sous-familles différentes comme le cytomégalovirus humain [368] ou le MuHV-4 [362], 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 [363, 369]. En conséquence, gM semble jouer des rôles distincts au sein des *Herpesviridae*. Certaines caractéristiques sont cependant partagées. Ainsi, chez un grand nombre d'*Herpesviridae*, gM forme un complexe avec d'autres protéines virales dont gN. gN est requise pour l'acheminement de gM vers l'appareil de Golgi ou vers d'autres compartiments lors de l'assemblage puis la sortie des virions [318, 370, 371]. gM et gN sont liées par un pont disulfure [360, 370, 371] tandis que d'autres interactions non covalentes peuvent également intervenir [371]. Une étude récente chez le VZV a montré que gM était massivement glycosylée et intervenait dans la

propagation du virus de cellules en cellules [372]. De plus, d'autres auteurs ont mis en évidence chez ce même virus que le gène codant pour gM générerait 4 transcrits différents par un phénomène d'épissage alternatif et que la gM transmembranaire décrite jusqu'alors dériverait 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 [373].

Décrite chez le MuHV-4 mais aussi chez l'EBV et le KSHV, l'ORF27 est conservée chez les *Gammapherpesvirinae* et encode une protéine massivement glycosylée, exprimée en surface des cellules. **gp48** intervient dans la dissémination des virions entre les cellules [374]. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II qui est exprimée à la surface des cellules infectées. 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 (**pORF58**) au sein des compartiments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi 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 pORF58 pourrait être simplement le repliement 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 [375].

pORF74 est une glycoprotéine de membrane de type 3, possédant 7 domaines transmembranaires. Il s'agit d'un récepteur aux chémokines couplé à une protéine G dont le rôle évident dans la carcinogenèse induite par le KSHV a été mis récemment en évidence [376-378]. L'activation de ce récepteur induit la sécrétion de facteurs de croissance vasculaires et des voies intracellulaires pro-mitogéniques [379].

Pour terminer, la protéine **gp70** codée par l'ORF4 est une glycoprotéine d'enveloppe de type I contenant 4 domaines transmembranaires. Il s'agit d'une protéine majeure impliquée dans l'attachement aux GAGs [115], alors que, par ailleurs, elle a été définie comme une protéine régulatrice du complément chez le KSHV [380].

3.2.10 Acquisition de protéines cellulaires

Lors de son assemblage intracellulaire, le virion en formation peut incorporer différentes protéines cellulaires. Il a été démontré que de nombreux virions étaient porteurs de protéines cellulaires [70, 381-384]. Le rôle de ces protéines dans la pathogénie virale a même pu être démontré pour certains virus [384]. Pour d'autres, par contre, le rôle est incertain et l'intégration fortuite de certaines d'entre elles pourrait être envisagée. De plus amples études sont nécessaires pour définir d'une part la nature des protéines cellulaires embarquées dans la particule virale et d'autre part la fonction de ces protéines.

Objectifs

Les *Gammaherpesvirinae* sont l'archétype des virus persistants et ont été identifiés dans une grande variété d'animaux et chez l'homme. Ils sont spécifiques de leur hôte et établissent des infections persistantes. Bien que les infections par ces virus soient généralement asymptomatiques, la plupart des *Gammaherpesvirinae* sont associés à des maladies néoplasiques chez des individus immunodéprimés ou sont associés à des maladies lymphoprolifératives lors de transmission inter-espèces [385, 386]. Les *Gammaherpesvirinae* les mieux étudiés sont l'EBV et le KSHV [387], responsables respectivement du lymphome de Burkitt et du sarcome de Kaposi. Ces virus posent donc des problèmes de santé publique et une meilleure compréhension de leur cycle biologique est nécessaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques [388, 389]. Etant donné que l'EBV et le KSHV sont difficilement cultivables *in vitro*, beaucoup d'études abordent ces questions en utilisant certains de leurs homologues animaux, tels que le MuHV-4 utilisé dans ce travail.

Dans un premier temps, nous avons voulu identifier les protéines cellulaires impliquées dans le cycle biologique du MuHV-4 en nous focalisant sur les étapes initiales de l'infection. Nous avons pour cela choisi d'utiliser une globale de screening basée sur les ARNs interférants.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu identifier le protéome structural du MuHV-4 en bénéficiant des récentes avancées techniques en spectrométrie de masse. En effet, bien qu'une étude similaire aient été réalisée auparavant celle-ci n'a permis de mettre en évidence que quatorze protéines structurales [390]. Nous avons donc voulu revisiter cette question afin de connaître la composition exacte de ces virions en protéines virales mais également en éventuelles protéines cellulaires.

Les résultats de ces travaux sont rassemblés dans deux études.

Préambule – Etude 1

Les *Gammaherpesvirinae* sont des virus importants tant en médecine humaine qu'en médecine animale. Au cours de leur évolution, ces virus ont développé un arsenal de stratégies pour non seulement persister au sein de leur hôte mais également pour détourner en leur faveur de nombreux processus physiologiques impliquant des protéines de leur hôte. Une connaissance détaillée des protéines cellulaires influençant positivement ou négativement le cycle biologique de ces virus pourraient dès lors aider à définir de nouvelles stratégies thérapeutiques à leur rencontre.

Une approche pour générer de tels répertoires consiste à inactiver spécifiquement et successivement tous les gènes cellulaires et à en observer les conséquences sur l'infection virale. Dans les cellules de mammifères, l'interférence à ARN (ARNi) est une alternative à la mutagenèse d'insertion ou à la délétion de gènes par recombinaison homologue pour la réalisation de screenings génétiques à large échelle [391, 392]. Une des approches est la transfection de siRNAs chimiquement synthétisés qui permet la suppression de l'expression de certains gènes en culture cellulaire. Bien que ces effets sont transitoires, ils peuvent néanmoins persister plusieurs jours et sont dès lors suffisants pour en étudier les conséquences sur des infections virales. De nombreuses études ont dès lors été réalisées dans le but d'explorer les voies cellulaires utilisées par différents virus au cours de leur cycle biologique [393-397].

Cette première étude est consacrée à l'utilisation d'une librairie commerciale de siRNAs, afin d'évaluer les conséquences de l'inhibition de gènes cellulaires sur le cycle viral du MuHV-4.

A whole-genome RNA interference screen for cellular factors affecting Murid Herpesvirus 4 infection

Sarah Vidick¹, Leonor Palmeira¹, Xue Xiao¹, Christian Tischer², Rainer Pepperkok², Beate Neumann² and Laurent Gillet^{1*}

¹Immunology-Vaccinology, FARA, University of Liège, Belgium

²European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Advanced Light Microscopy Core Facility, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

Short title: Host factors affecting MuHV-4 infection.

*Correspondence: Laurent Gillet

Immunology-Vaccinology, Department of Infectious and Parasitic

Diseases (B43b), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège,

Belgium

Email: L.gillet@ulg.ac.be

Tel: 00-32-4-3664286 Fax: 00-32-4-3664261

Main text: 6892 words

Abstract: 270 words

Number of Figures: 8

Number of supplementary tables: 4

Abstract

Gammaherpesviruses are archetypes of persistent viruses that have been identified in a range of animals from mice to man. They are host-range specific and establish lifelong latency of immunocompetent hosts. Most of the gammaherpesvirinae members are associated with neoplastic diseases. For example, the best studied gammaherpesviruses are Human herpesvirus 4 and 8 that are respectively associated with Burkitt's lymphoma and Kaposi's sarcoma. By opposition to its human counterparts, Murid herpesvirus-4 (MuHV-4) is able to replicate to high titers in cultured cells and is therefore an excellent candidate for studying gammaherpesvirus cycle. RNA interference (RNAi) is a natural process that cells use to turn down, or silence, the activity of specific genes by inhibition of mRNAs. The selective and robust effect of RNAi on gene expression makes it a valuable research tool in cell culture because synthetic dsRNA introduced into cells can induce suppression of specific genes. RNAi may also be used for large-scale screens that systematically shut down each gene in the cell. Here, we describe the use of high throughput screening by reverse transfection of cells of small interfering RNAs (siRNA), which, combined to fluorimetry explored 9,102 human genes (Ambion silencer druggable genome). The data were analysed for each siRNA (3/gene) and the results were obtained by bioinformatics. 65 genes appeared to be necessary for the completion of the MuHV-4 cycle and likely the initial steps of infection. Moreover, silencing of 110 genes increased MuHV-4 infection suggesting a possible anti-viral function. In the future, these results could not only help us to better understand the biology of gammaherpesviruses, but should also reveal new therapeutic targets to fight these infections.

Introduction

Gammaherpesviruses are widespread viruses that infect many mammalian species [398] and represent a significant cause of disease [385, 386]. The best studied gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus (EBV) and the Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV), infect respectively up to 90% [399] and 50% [386] of human populations and are associated with several cancers such as Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Kaposi's sarcoma or Castleman's disease [44, 400, 401].

In order to establish persistent lifelong infection, gammaherpesviruses have developed numerous specific mechanisms to hijack multiple physiological functions of their hosts. This is particularly true during the entry process [402, 403]. Indeed, at the molecular level, entry into the host cell involves multiple successive steps that finally result into the delivery of the herpesvirus genome into the nucleus. The coexistence of different modes of entry for a single virus also enhances the complexity of these mechanisms. While some recent advances have allowed the identification of different receptors and of different pathways involved in gammaherpesvirus entry [121, 122, 124, 404], the vast majority of the host factors involved in this process remain unknown. However, virus entry is a critical step in the viral biology and a better knowledge could lead to the identification of novel therapeutic targets.

Both EBV and KSHV display a limited lytic growth *in vitro*. These characteristics have therefore hampered to address these questions directly with these viruses and promoted the development of alternative models. Murid Herpesvirus 4 (MuHV-4) is a close relative of human gammaherpesviruses which has been isolated in wild rodents and therefore offered the possibility of developing a mouse model of gammaherpesvirus pathogenesis [74, 78, 405]. Moreover, in contrast to its human counterparts, MuHV-4 readily infects many types of cells *in vitro* and replicates to high levels. This virus has therefore been widely used as a model to study the gammaherpesviruses biology in host cells [9].

The development of genome-wide small interfering RNA (siRNA) libraries, has allowed the identification of numerous genes involved in various biological mechanisms. Thus, genome-wide siRNA screens have recently been performed in order to identify cellular genes involved in the cycle of several viruses including Influenza A [394], Human Immunodeficiency virus [395, 406-408], Myxoma virus [409], Vesicular Stomatitis virus [410]

and hepatitis C [396, 411]. However, until now, such analysis has never been reported for gammaherpesviruses.

In this study, we conducted a whole genome siRNA screen in order to identify cellular factors involved in MuHV-4 entry. Altogether, we identified 65 host factors that could participate in the MuHV-4 cycle and possibly in the entry step. Interestingly, our approach also allowed us to identify 110 genes for which silencing increased the proportion of infected cells, suggesting therefore an antiviral function. In the future, this study could not only help us to better understand the biology of gammaherpesviruses, but could also allow the development of new drugs to fight these infections.

Material and Methods

Cells and Virus. Baby Hamster Kidney cells (BHK-21 (ATCC CCL-10)) and HeLa "Kyoto" [412, 413] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% foetal calf serum (FCS), 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 2 mM glutamine and 1% non-essential amino acids (Invitrogen). Virions of the MHV-68 strain of MuHV-4 reconstituted from the pHA3 BAC plasmid [414] were used throughout this study. This viral strain expresses eGFP under control of the immediate early promoter of human cytomegalovirus.

Virus growth and titration. Virus stocks were grown using BHK-21 cells as described [348]. Briefly, infected-cell debris were removed by low-speed centrifugation from infected BHK-21 cell supernatants (1,000xg, 20 min, 4°C); virions were then harvested by ultracentrifugation (100,000 x g, 2h, 4°C). These virions were then titered by plaque assay using BHK-21 cells. Monolayers were fixed in 10% formaldehyde after 5 days and stained with 0.1% toluidine blue. Plaques were counted with a plate microscope.

Growth curves. Cell cultures were infected with MuHV-4 virions at a MOI of 0.01 (multi-step assay). After 1 h of adsorption, the cells were washed then overlaid with DMEM containing 5% FCS. Supernatants of infected cultures or infected cells were harvested at successive intervals and the amount of infectious virus determined by plaque assay on BHK-21 cells.

Indirect immunofluorescent staining of cells adhering on glass coverslips. Cells were fixed paraformaldehyde (PFA) (2% in PBS) for 20 min at 4°C. The cells were then washed with PBS and permeabilized with PBS-triton X-100 0.1% in PBS for 20 min. After washing with PBS, immunofluorescent staining (incubation and washes) was performed in PBS containing 10 % FCS (v/v) (PBSF). Samples were incubated at room temperature for 45 min with a mouse anti-MuHV-4 mAb recognizing glycoprotein N (mAb 3F7, 2µg/ml in PBSF) [415]. After three washes, samples were incubated at room temperature for 30 min with Alexa Fluor 568 goat anti-mouse (GAM) IgG (2 µg/ml; Invitrogen). Finally, nuclei were counterstained with Hoechst (Invitrogen). Fluorescence was then visualized with a Nikon Eclipse TE2000-S microscope and a Leica DC300F CCD camera system.

SiRNA screen. For the genome-wide RNAi screen, a genome-wide library of siRNA was used (Ambion *Silencer*[®] Human Extended Druggable Genome siRNA Library V3). Transfection, under screening conditions, was performed in 384-well glass-bottom plates as described previously [412, 413]. Briefly, the siRNA-gelatine transfection solution was prepared in 384 well plates (NalgeNunc) as described using a Microlab STAR (Hamilton) liquid handling robot. 5µl of siRNA solution (30µM), 3µl Opti-MEM (Invitrogen) containing 0.4M sucrose and 3.5µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) were mixed and incubated for 20 minutes at room temperature. After incubation 7.25µl of 0.2% gelatine and 3.5x10⁻⁴% fibronectin (both Sigma-Aldrich) were added. 5µl of the siRNA transfection solution was mixed with 130µl of water using the manual 96 well liquid handling device Liquidator (Steinbrenner). 15µl of this water diluted siRNA transfection solution was pipetted in 384 well imaging plates (BD) and immediately lyophilized using the concentrator miVAC (Genevac). Several replicates were produced and stored in plastic boxes containing drying pearls orange (Fluka) until usage.

2.10³ HeLa Kyoto cells per well in 50 µl were seeded in the coated 384 well imaging plate using the cell seeding device MultiFlow Cell Dispenser (BioTek) and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 24 h incubation, these cells were infected with MuHV-4 (0.4 PFU/cell in 30 µl per well) and incubated for 48h.

Cells were then fixed on ice for 20 min with PFA (2% in PBS). All following steps were performed at room temperature. Cells were washed (PBS) and permeabilized with PBS-triton X-100 0.1% in PBS (30µl/well) for 20 min. After washing with PBS (50µl/well), cells were incubated at room temperature for 45 min with mAb 3F7, recognizing gN (2µg/ml in 30µl PBSF/well). After washing with PBS (50µl/well), samples were incubated at room temperature for 30 min with Alexa Fluor 568 GAM IgG (1µg/ml in 30µl PBSF/well). After washing with PBS (50µl/well), nuclei were counterstained with Hoescht. The cells were finally washed in PBS (50µl/well), fixed for 20 min with PFA (2% in PBS) and conserved in PBS-NaN₃ 0,05% (100µl/well). The plates were wrapped in parafilm and aluminum and conserved in the dark at 4°C until imaging. The three replicates were performed independently for all the procedure. It has to be noted that the data relative to the expression of gN were not used in this study even if they have been recorded.

Imaging. Plates were imaged on a Synergy MX plate reader (Biotek). Intensities of Hoechst stain, eGFP and Alexa 568 fluorescences were measured successively following manufacturer's recommendations.

Network analysis. The human pathway data was downloaded from Pathway Commons (<http://www.pathwaycommons.org>), which integrates 1477 pathways from nine databases: BioGRID, Cancer Cell Map, HPRD, HumanCyc, IMID, IntAct, MINT, NIC/Nature PID, and Reactome. On this basis, a group of differentially expressed genes that directly related with each other was extracted.

Results

Workflow of the genome-wide siRNA screen used in order to identify host factors required during the first steps of MuHV-4 infection. In order to use an unbiased approach to determine host factors affecting MuHV-4 infection with a particular attention on the first steps of the viral cycle, we used a commercial chemically synthesized siRNA library designed to uniquely target each gene with 2-3 independent sequences (Ambion *Silencer*[®] Human Extended Druggable Genome siRNA Library V3) and targeting 9,102 human genes that have been chosen as the most therapeutically relevant genes in the human genome. In this screen (Fig. 1), a MuHV-4 strain that expresses the eGFP protein (MuHV-4 BAC [414]) was used to infect HeLa Kyoto cells [412, 413] that were transfected 24 h earlier with the siRNA library. 48 hours later, these cells were fixed, stained and the plates were processed for imaging with a fluorescence plate reader.

We chose to use HeLa cells as the solid-phase reverse transfection in multiwell plates had been established for these cells [412]. Despite that the *in vitro* host range of MuHV-4 is relatively large; we firstly validated the usage of these cells. We therefore infected in parallel BHK-21 and HeLa Kyoto cells (Fig. 2A) at a MOI of 1 PFU/ cell for 24 h. We showed that HeLa Kyoto cells appeared to be sensitive (based on the expression of eGFP under the control Human Cytomegalovirus IE promoter) and permissive (based on the expression of glycoprotein N) to MuHV-4 infection. Moreover, the sensitivity of HeLa Kyoto cells appeared to be similar to the one of BHK-21 cells (Fig. 2B). As herpesviruses can infect target cells through various ways [104], we checked if MuHV-4 infection of HeLa Kyoto cells also requires endosomal acidification as it had been showed previously in BHK-21 cells [339, 348, 375, 415]. Briefly, blocking endosomal acidification with ammonium chloride treatment or Bafilomycin blocked MuHV-4 entry similarly in BHK-21 and HeLa Kyoto cells indicating that infection of HeLa Kyoto cells requires endocytosis and acidification as observed in BHK-21 cells (Fig. 2C and D). Altogether, these results suggest that the HeLa Kyoto cells are appropriate for the genome-wide siRNA screen of host factors influencing MuHV-4 infection.

For the genome-wide siRNA screen, we chose to infect cells at an MOI of 0.4, which results in approximately 40 % of cells being infected (Fig. 3A). Indeed, we reasoned that this level of infection could allow us to detect not only genes that are necessary for MuHV-4 to

infect the cells (hereafter called "proviral genes" as their inhibition should result in lower levels of infection), but also those that reduce infection (hereafter called "antiviral genes" as their inhibition should result in higher levels of infection). After 48h post-infection, cells were fixed and the nuclei were stained with Hoechst in order to estimate cell numbers and therefore eliminate a possible bias due to cell toxicity of some siRNAs. Plates were then imaged as described in the methods.

In order to validate our approach, we firstly compared, in a preliminary experiment, eGFP fluorescence detection measured with the plate reader and the percentage of eGFP positive cells measured by FACS analysis (Fig. 3B-C). Briefly, HeLa Kyoto cells were infected in 96 well plates at various MOI in multiple replicates (n=16). Half of the wells were analysed with a plate reader as described above in order to evaluate total eGFP and Hoechst fluorescences. In parallel, the cells of the other wells were harvested, pooled and analysed by FACS. The results obtained showed that eGFP measurement with plate reader is directly proportional to the percentage of eGFP positive cells in the wells (Fig. 3B-C). Moreover, in order to avoid misinterpretation due to a difference in the number of cells per well, we analysed Hoechst signal (Fig. 3D) and expressed the total eGFP measurements relatively to Hoechst signal (Fig. 3E-F). Our results show that the eGFP/Hoechst value is directly proportional to the percentage of eGFP positive cells in the wells (Fig. 3F). Altogether, these results show that our method allow proper estimation of the percentage of eGFP positive cells at least when this percentage is lower than 60 %. Comparison of the single eGFP measurement with the eGFP/Hoechst value seems to indicate that the eGFP value is less variable (Fig. 3 C and F) probably due to some variation of the Hoechst fluorescence measurement. However, even if it could reduce the accuracy of the measurements, we choose to use the eGFP/Hoechst value in order to remove the bias that small cell numbers could introduce.

Identification of host factors affecting either positively or negatively MuHV-4 infection of HeLa Kyoto cells. We next screened the siRNA library as described above. This screen was performed in triplicates (each replicate was conducted independently). In all plates, several replicates of siRNAs targeting eGFP or scrambled siRNAs were used as controls. Data analysis showed small local and interplate variation. Therefore, in order to normalize the values, a bioinformatical correction was performed. Briefly, we computed the $\log_2(\text{EGFP}/\text{Hoechst})$ ratios for each well and fitted a sigmoid curve to

each row of each plate. We used this fit to correct the data for local biases. Based on these corrected values, we normalized each plate by all values of a given replicate (plate 1-81) which yielded score S values. Interestingly, most of the wells containing a siRNA targeting eGFP displayed a reduction of the corrected EGFP/Hoechst value (Fig. 4 and 5), indicating that our protocol was reliable. Finally, we selected the siRNAs which for each round, had a score S under a -1.5 threshold or above a 2 threshold and identified as candidates all genes which were targeted by at least one siRNA from this selected list. We used two different thresholds (-1.5 and +2) in order to increase our capacity to detect proviral genes as it was the initial goal of our study. Indeed, only a small number of those genes would have been selected with a threshold of -2, therefore, for proviral genes, we choose a threshold of -1.5. In total, we identified 65 proviral genes that favour MuHV-4 infection as the inhibition of their expression is associated with a decrease of the corrected EGFP/Hoechst value > 1.5 (Fig. 4 and Table S1). In parallel, 110 antiviral genes appeared to affect negatively MuHV-4 expression as the inhibition of their expression increased the EGFP/Hoechst value at least 2 times (Fig. 5 and Table S2).

Analysis of hits. These hits were categorized using the PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) classification system [416]. We compared the lists of putative proviral and antiviral genes against a reference list that contains all the genes in the human genome, categorized as to putative or known functions. Biological pathways were thus identified for proviral and antiviral gene hits (Fig. 6A and 7A). The identified gene hits in the different biological pathways are listed in Table S3 and S4. Finally, the gene hits were further analysed to create interaction networks as described in the methods. Interaction networks were created for proviral and antiviral gene hits (Fig. 6B and 7B) as well as for proviral and antiviral gene hits taken together (Fig. 8).

Discussion

In this study, we identified several cellular genes affecting, either positively or negatively, MuHV-4 infection of HeLa Kyoto cells. The majority of these host genes are poorly characterized and a better understanding of their function in MuHV-4 cycle is likely to help deciphering their natural cellular roles. However, while we do not yet fully understand the function of these selected hits, several of them have promising implications on the MuHV-4 lifecycle.

On one hand, we have identified 65 host genes for which the silencing by siRNA resulted in reduction of MuHV-4 infection as detected by the eGFP/Hoechst value. We have therefore named these genes "proviral genes". Using information from existing gene ontology and from that of related proteins, their function in MuHV-4 lifecycle can be hypothesized. Thus, the CD36 is a member of the class B scavenger receptor found on the surface of many cell types in vertebrate animals [417]. These proteins are localization in plasma membrane caveolae-like domains and facilitate lipid exchange and cell signalling. Interestingly, CD36 is involved in various endocytosis processes and very close proteins participate in entry of different viruses such as hepatitis C [418] and enterovirus 71 [419]. The role of CD36 as a cell surface receptor for MuHV-4 should therefore be tested further. Claudin-19 is another protein that would deserve further attention. Indeed, this also a cell surface protein and another member of the claudin family, claudin-1, is involved in hepatitis C virus entry [420]. MFSD4 and MFSD5 (major facilitator superfamily domain containing 4 and 5 proteins) are other cell surface proteins but their role in the cell is poorly known. Other proviral gene hits could also be interesting. Thus, CPNE7 (Copine-7) is a member of the copine family which is thought to be involved in membrane-trafficking phenomena [421]. ATP6V1G2 encodes a subunit of vacuolar ATPase (V-ATPase), a multisubunit enzyme that mediates acidification of intracellular compartments of eukaryotic cells. It could therefore participate to the acidification of the endosome which is essential for MuHV-4 entry [117, 339, 348, 415]. Another gene hits, NAT8, encodes a probable N-acetyltransferase that could be involved in acetylation of important proteins for virus penetration. The implication of these different candidates in MuHV-4 entry will have to be investigated further.

On another hand, our siRNA genome-wide screen allowed the identification of 110 antiviral gene hits. Interestingly, these hits appeared to be more interconnected than the

proviral gene hits, suggesting that they could be involved in some antiviral cellular pathways in response to MuHV-4 (Fig. 6-8). This is especially true for the TAF1 protein (Fig. 7 and Table S2). TAF1 is the largest component of transcription factor II D (TFIID) that is composed of TATA binding protein (TBP) and multiple TBP-associated factors (TAFs). Interestingly, TBP and TAF-13 are two other antiviral gene hits (Table S2). TFIID is thought to regulate transcription of RNAPII dependent genes by binding to the TATA box *via* its TBP subunit [422] and on the other hand serves as a platform for the recruitment of other components of the transcription preinitiation complex. How TFIID inhibition could favour MuHV-4 replication is still unknown. One explanation could reside in the fact that TFIID could be involved in the expression of some antiviral cellular genes. Expression of viral genes could not be affected by these depletions as some viral proteins could mimic the activity of some TFIID components. Thus, interaction of viral proteins with proteins of this complex is possible as shown for human papillomavirus 16 E2 protein [423]. Interestingly, a very recent study highlighted the fact that KSHV ORF24 could replace TBP in the viral late genes preinitiation complexes [424].

Another antiviral hit in direct contact with TAF1 in our network is IRAK1 (Interleukin-1 receptor activated kinase-1) (Fig. 7). IRAKs are key mediators in the signaling pathways of TLRs/IL-1Rs. By means of their kinase and adaptor functions, IRAKs initiate a cascade of signaling events eventually leading to induction of inflammatory target gene expression [425]. Interestingly, it has recently been shown that KSHV miR-K9 and other miRNAs inhibit IRAK1 expression [426]. This reinforces the hypothesis that IRAK1 plays an important role in the innate immune response against gammaherpesviruses. This will need to be investigated further.

TRIM24 (TIF1- α) is another gene with potential antiviral functions. The tripartite motif (TRIM) family is a diverse family of RING finger domain-containing proteins, which are involved in a variety of cellular functions. Importantly, recent studies have shown that they are also involved in the regulation of innate immune responses through the modulation of PRR signalling pathways [427]. Interestingly, these proteins have been recently shown to display antiviral properties [428-430]. The importance of TRIM proteins in antiviral responses is highlighted by the fact that several viruses target proteins of the TRIM family in order to disable their antiviral functions [431] as recently shown for human cytomegalovirus [432].

Surprisingly, the gene encoding subunit G3 of the V-ATPase was found as an antiviral gene hit (Table S2) although the gene encoding subunit G2 has been found as a proviral gene (Table S1). Subunits G, along with subunit E, form a ~150 Å long complex on the side of the V-ATPase [433]. Recently, the peripheral stalks of V-ATPases have been proposed to provide transient elastic energy during the rotary catalytic cycle of the enzyme [433]. The roles of the different isoforms of the G subunit are however poorly known until now. One hypothesis explaining our result could be that these two isoforms regulate either positively or negatively the activity of the enzyme. Further experiments will be required to test this hypothesis.

It has been shown that activation of caspase-2 occurs in a complex that contains the death domain-containing protein PIDD, whose expression is induced by p53, and the adaptor protein RAIDD/CRADD. Despite two decades of research, the role of caspase-2 in physiology and disease is still poorly understood and controversial [434]. However, caspase-2 activation has also recently been observed in the apoptotic response to infection by viruses such as Maraba virus or vesicular stomatitis virus (VSV) after induction of a strong ER or unfolded protein stress response [435]. Interestingly, such response can induced following gammaherpesvirus lytic replication [436, 437] and could reduce viral replication. A similar effect is therefore possible after MuHV-4 infection and would explain why inhibition of RAIDD/CRADD increased the eGFP/Hoescht value that we measured in our assay.

In conclusion, the genome-wide siRNA screen that we performed has potentially allowed detecting several genes that affect either positively or negatively MuHV-4 replication. This could therefore allow us to better understand the cycle of this virus but also to identify some potential targets for therapeutic action. However, the results obtained in our study and in siRNA screens in general need to be interpreted with caution and should only be considered as a rough guide to understand viral and cellular biology. This has particularly be well illustrated in a recent meta-analysis of siRNA screen data coming from three independent study designed to identify host factors affecting HIV cycle [393, 395, 406, 408]. This revealed that only a small subset of the genes was identified in all the studies, suggesting therefore a high rate of either false-positive or false-negative hits. The results of this study open therefore new ways of investigation but will firstly require extensive confirmation.

Acknowledgements-Fundings

This work was supported by the following grants: starting grant (C-11/57) of the University of Liège (<http://www.ulg.ac.be>), Scientific impulse grant (n° F.4510.10) and FRFC grant (2.4622.10) of the F.R.S. – FNRS (<http://www.frs-fnrs.be>), and the belgian federal BELVIR Interuniversity attraction pole. S.V. is a Research Fellow of the “Fonds de la Recherche Scientifique - Fonds National Belge de la Recherche Scientifique” (F.R.S. - FNRS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Figure legends

Fig. 1: Strategy of the genome-wide siRNA screen that has been used in the study.

The screening was performed in 384-well glass-bottom plates containing the Ambion *Silencer*[®] Human Extended Druggable Genome siRNA Library V3 mixed with a transfection solution and lyophilized. $2 \cdot 10^3$ HeLa Kyoto cells per well in 50 μ l were seeded in the coated 384 well imaging plate and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. These cells were then infected with a MuHV-4 strain expressing eGFP (0.4 PFU/cell in 30 μ l per well) and incubated for 48h. Cells were then fixed and stained as described in the methods before imaging with a fluorescence plate reader. The experiment was performed in three independent replicates.

Fig. 2: Characterization of MuHV-4 infection of HeLa Kyoto cells. (A) BHK-21 cells and HeLa Kyoto cells were cultured on glass coverslips and infected with the MuHV-4 eGFP strain (MOI of 1). 24h post-infection cells were fixed and stained for expression of glycoprotein N as described in the methods. Nuclei were counterstained with Hoechst. Images are representative of at least 3 experiments. (B) Comparison of BHK-21 and HeLa Kyoto cells sensitivity to MuHV-4 infection. BHK-21 and HeLa Kyoto cells were infected with various MOI of the MuHV-4 eGFP strain. Viral infection was assayed by measuring eGFP expression 18 h later by FACS analysis as described in the methods. Each value presented is the average \pm SEM (error bars) for the measurement of 3 replicates. The data were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests, and no significant difference was observed. (C-D) Dependence of MuHV-4 virions on endocytosis and lysosomal acidification in BHK-21 and HeLa Kyoto cells. Cells were incubated for 1 h with NH₄Cl (C) or Bafilomycin (D) and then exposed to MuHV-4 eGFP virions (0.5 PFU per cell). Drug treatment was maintained throughout the course of infection. Infection rates were determined by a flow cytometric assay of viral eGFP expression after 18 h. The data presented are the averages of triplicate measurements \pm standard errors of the means and were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests. No significant difference was observed between BHK-21 and HeLa Kyoto cells.

Fig. 3: Validation of the screening method. In order to validate our measurements, values measured with the plate reader were compared to the percentage of eGFP positive cells measured by FACS analysis. HeLa Kyoto cells were infected in 96 well plates at various MOI in multiple replicates (n=16). 24h post-infection, half of the wells were analysed with a

plate reader as described in the methods in order to evaluate total eGFP and Hoechst fluorescences. In parallel, the cells of the other wells were harvested, pooled and analysed by FACS. (A-B) Percentages of eGFP positive cells (measured by FACS) and eGFP fluorescence (measured with the plate reader) were plotted relatively to the MOI used. (C) The measured eGFP fluorescence was expressed in function of the percentage of eGFP positive cells. (D) Hoechst fluorescence (measured with the plate reader) was plotted relatively to the MOI used. (E-F) The eGFP/Hoechst value was plotted relatively to the MOI (E) or relatively to the percentage of eGFP positive cells detected by FACS (F). When error bars are present the data are mean values ($n=8$) \pm standard errors of the means.

Fig. 4: Identification of cellular genes that favour MuHV-4 infection ("proviral genes"). Normalized eGFP/Hoechst values (S score) were plotted individually for each well relatively to the mean of all normalized eGFP/Hoechst values taken as 0. Only the genes for which at least one siRNA had a score S under a -1.5 threshold in the three independent replicates were selected as potential proviral genes and were represented on the figure. The curve represents the proportion of all values for a given S score. The different replicates are represented by different shapes. The different siRNAs (3/gene) are represented by different colors. The -1.5 threshold is represented by a wide grey vertical line.

Fig. 5: Identification of cellular genes that decrease MuHV-4 infection ("antiviral genes"). Normalized eGFP/Hoechst values (S score) were plotted individually for each well relatively to the mean of all normalized eGFP/Hoechst values taken as 0. Only the genes for which at least one siRNA had a score S above a 2 threshold in the three independent replicates were selected as potential proviral genes and were represented on the figure. The curve represents the proportion of all values for a given S score. The different replicates are represented by different shapes. The different siRNAs (3/gene) are represented by different colors. The 2 threshold is represented by a wide grey vertical line.

Fig. 6: Pathway and network analysis of proviral gene hits. (A) PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) was used to look for relationships between the genes identified as favouring MuHV-4 infection. The values in parentheses indicate the number of gene hits in each pathway. GO, Gene Ontology. (B) Network between proviral genes that directly related with each other was extracted as described in the methods.

Within the group, genes are coloured according to the effect of their inactivation on the normalized eGFP/Hoechst values. The darker genes are the ones for which the inactivation by siRNA reduces the most the normalized eGFP/Hoechst values.

Fig. 7: Pathway and network analysis of antiviral gene hits. (A) PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) was used to look for relationships between the genes identified as reducing MuHV-4 infection. The values in parentheses indicate the number of gene hits in each pathway. GO, Gene Ontology. (B) Network between antiviral genes that directly related with each other was extracted as described in the methods. Within the group, genes are coloured according to the effect of their inactivation on the normalized eGFP/Hoechst values. The darker genes are the ones for which the inactivation by siRNA increases the most the normalized eGFP/Hoechst values.

Fig. 8: Network analysis of proviral and antiviral gene hits. Network between proviral and antiviral genes that directly related with each other was extracted as described in the methods. Within the group, genes are coloured according to the effect of their inactivation on the normalized eGFP/Hoechst values. Red dots represent antiviral genes, while green dots represent proviral genes. The darker genes are the ones for which the inactivation by siRNA affects the most the normalized eGFP/Hoechst values.

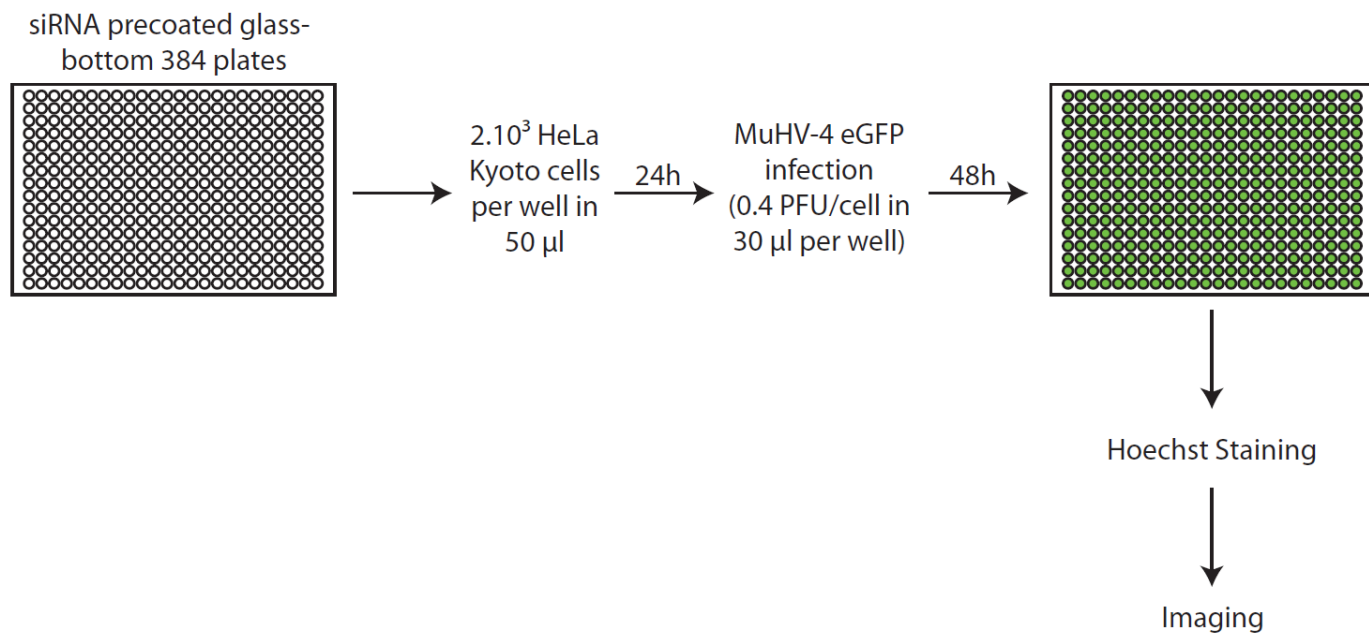
Fig. 1

Fig. 2

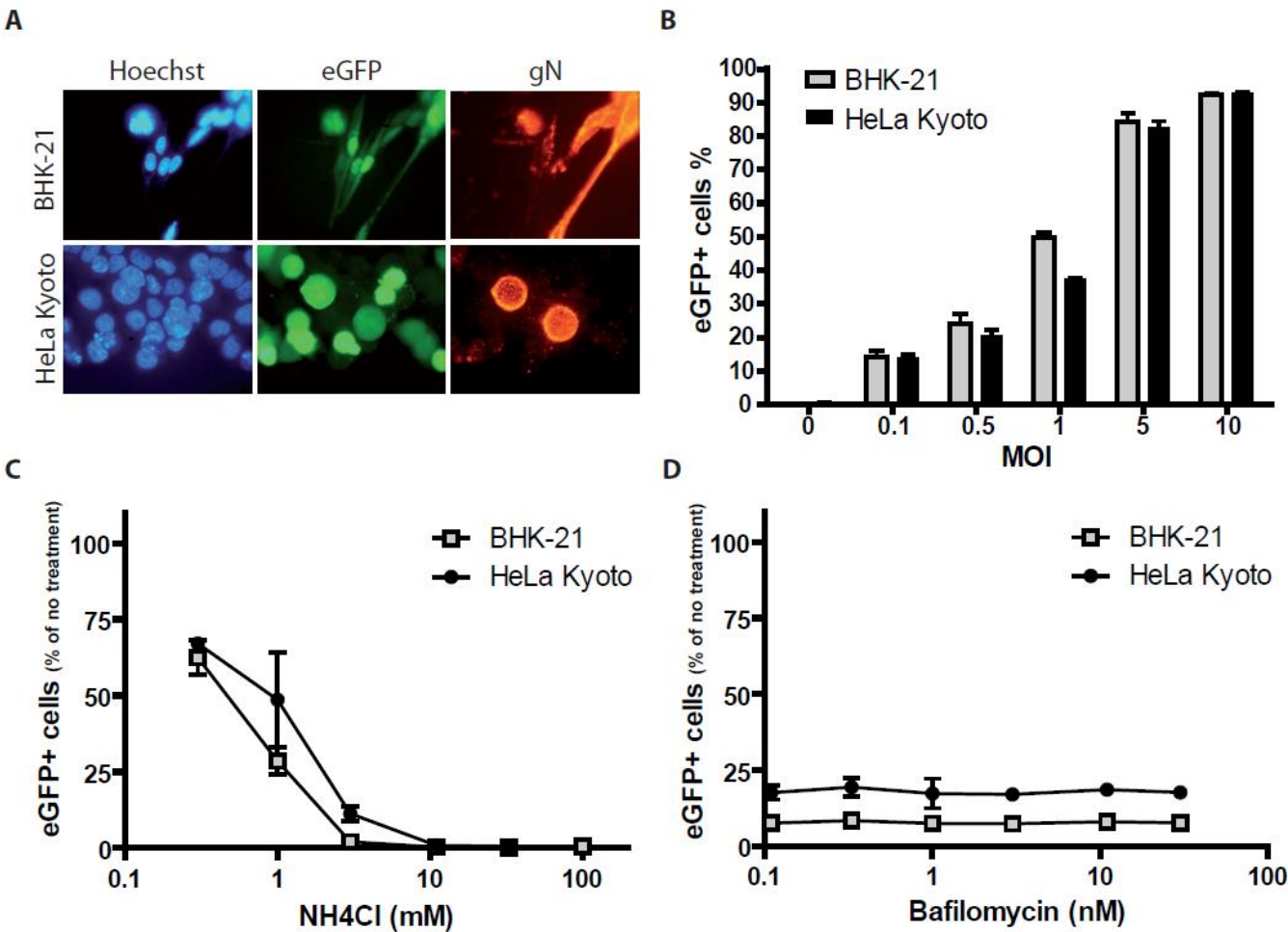


Fig. 3

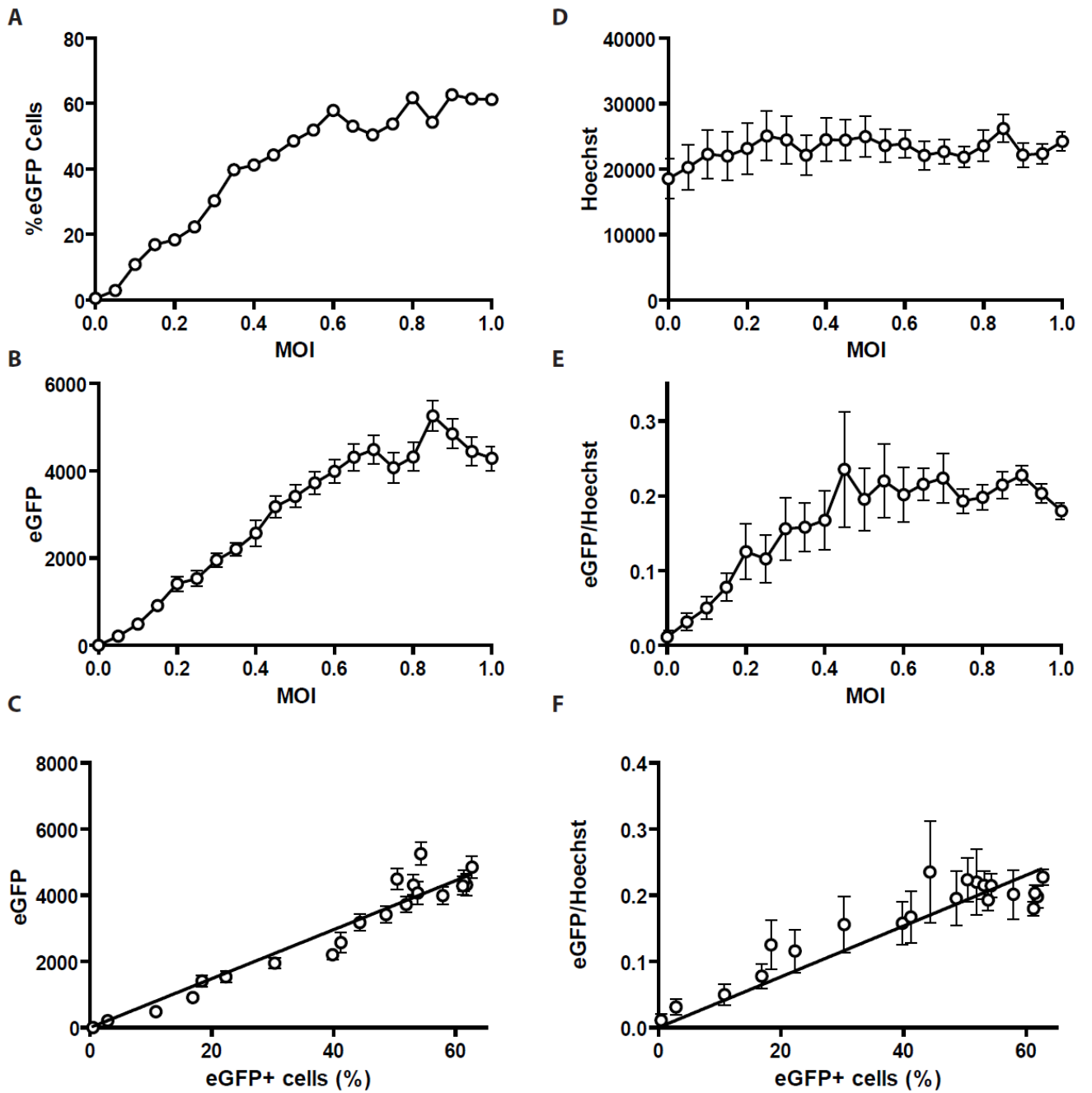


Fig. 4

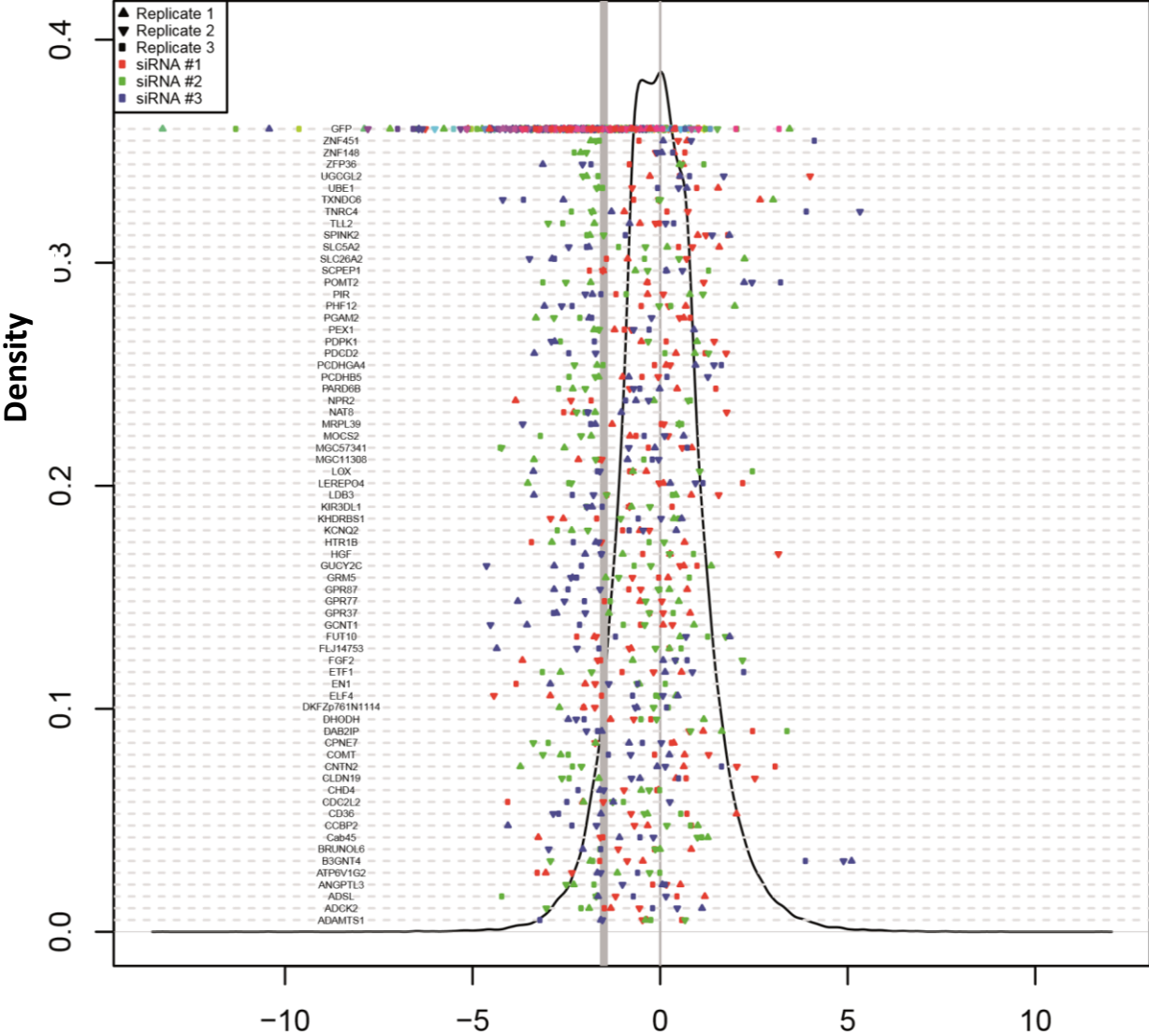


Fig. 5

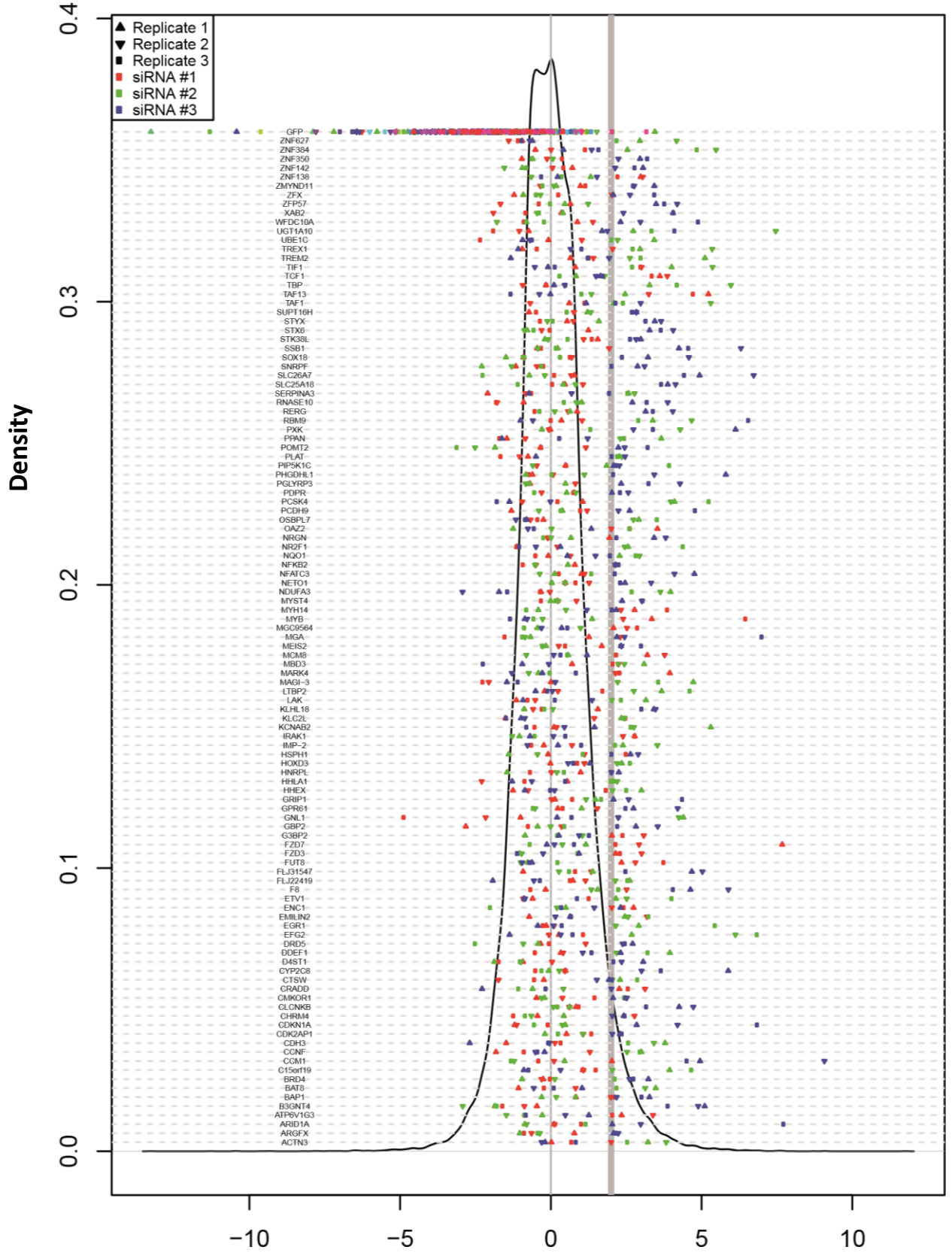
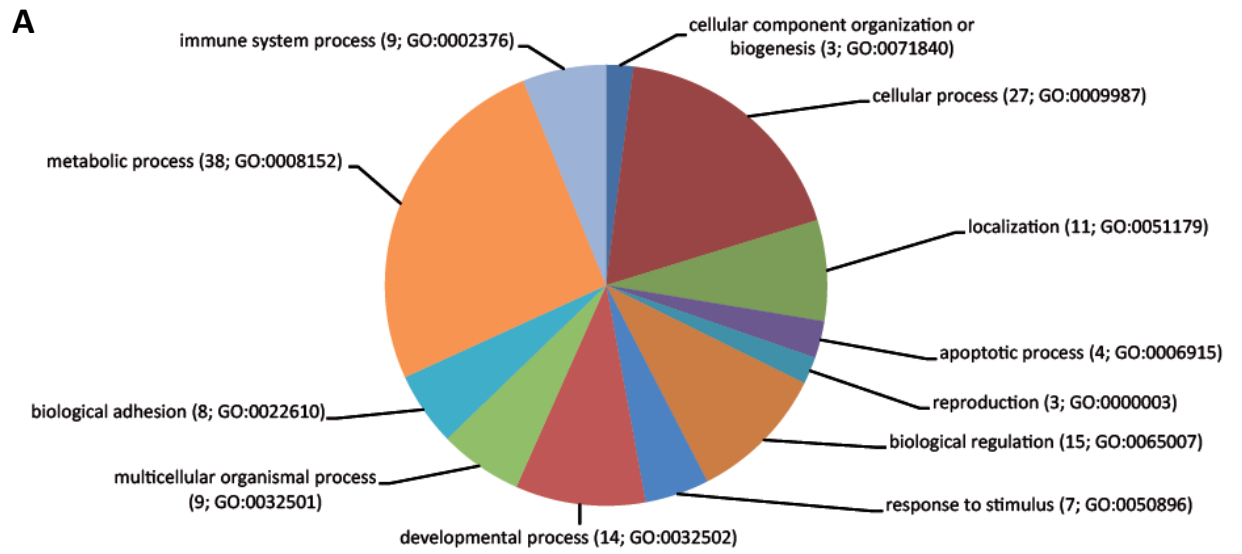


Fig. 6



B

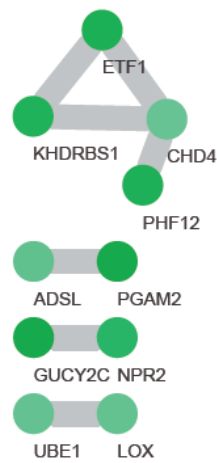
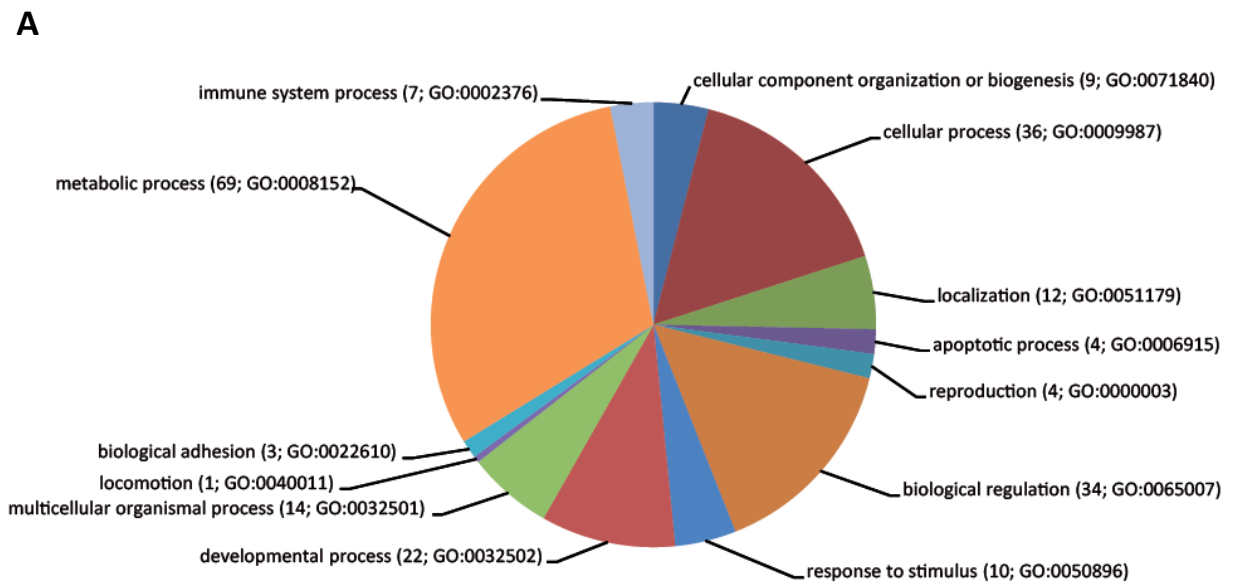


Fig. 7



B

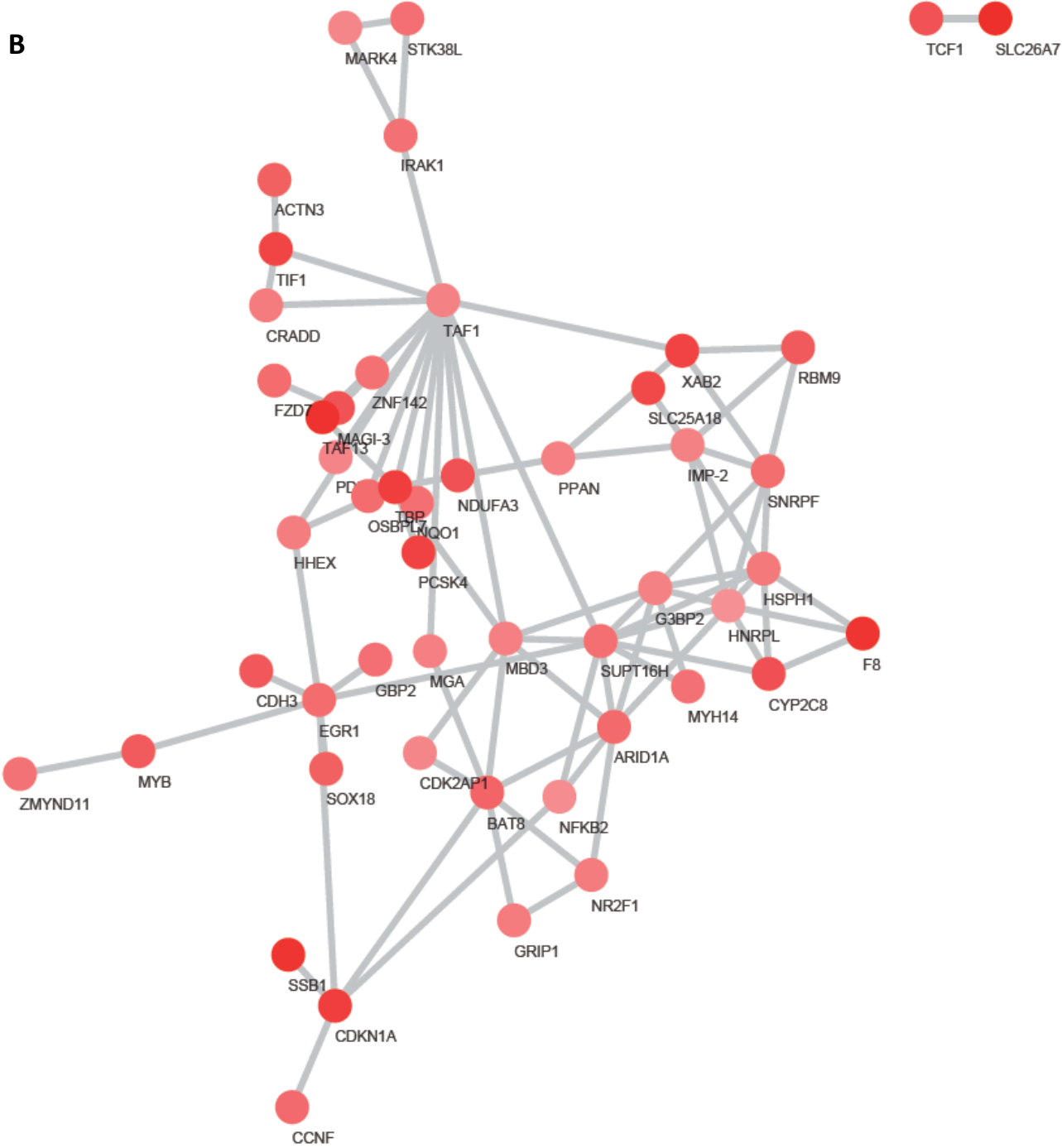


Fig. 8

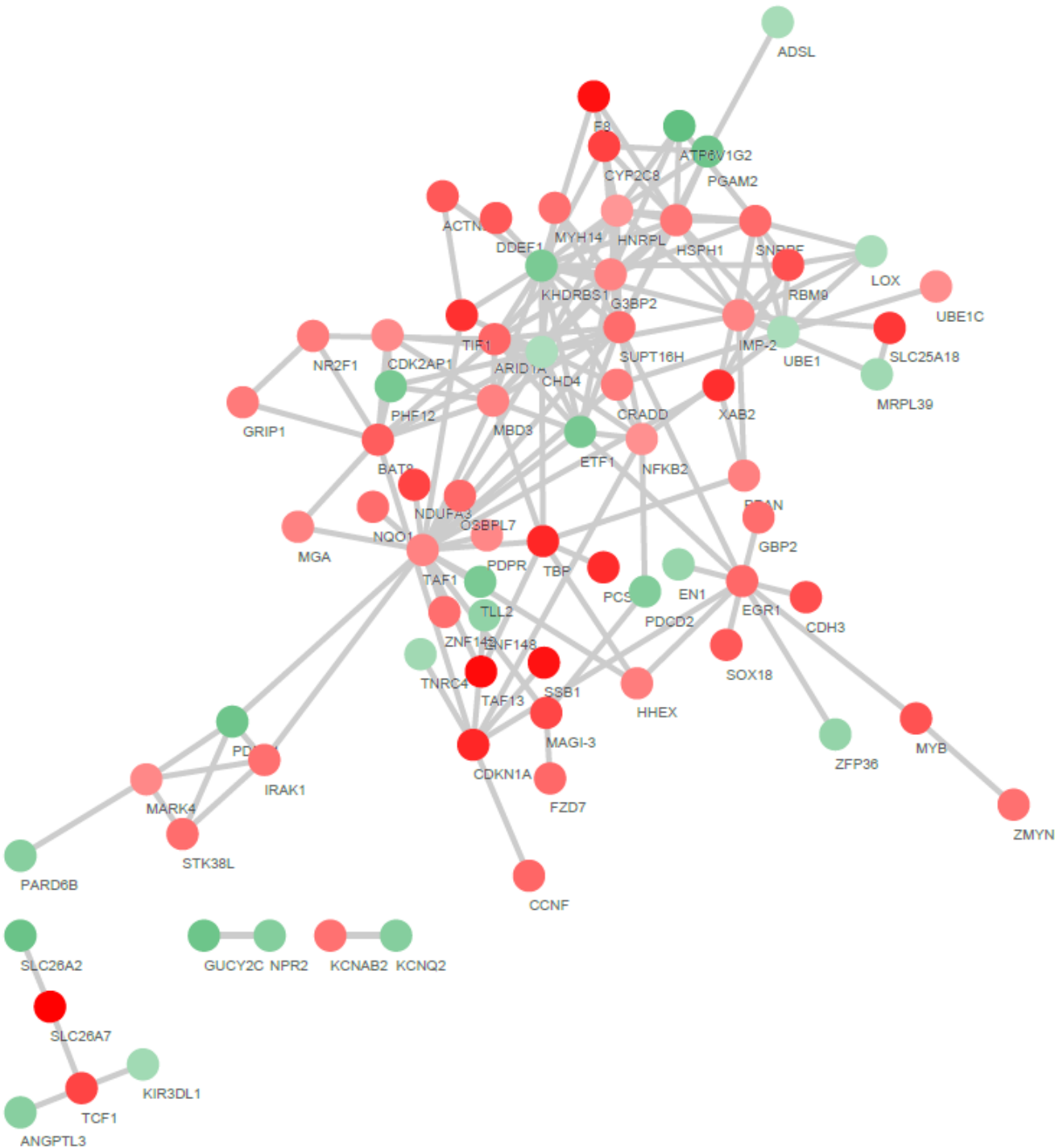


Table S1: Description of proviral gene hits identified in the genome-wide siRNA screen.

Gene	Gene Name	GO Annotation
ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	fertilization; proteolysis; cell communication; cell-matrix adhesion; cell-cell adhesion; ectoderm development; mesoderm development; skeletal system development; angiogenesis; nervous system development; muscle organ development; regulation of catalytic activity
ADCK2	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 2	oxidative phosphorylation; respiratory electron transport chain
ADSL	Adenylosuccinate lyase	purine nucleobase metabolic process; cellular amino acid metabolic process
ANGPTL3	Angiopoietin-related protein 3	cell communication; cell-matrix adhesion; cell-cell adhesion; angiogenesis
ATP6V1G2	V-type proton ATPase subunit G 2	nucleobase-containing compound metabolic process; cation transport
BRUNOL6 (CELF6)	CUGBP Elav-like family member 6	cytoplasm; regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome
Cab45 (SDF4)	45 kDa calcium-binding protein	protein binding; UV protection; Golgi apparatus; plasma membrane; Golgi lumen; late endosome; response to ethanol; zymogen granule exocytosis; calcium ion binding; cerebellum development; identical protein binding; cytoplasm; membrane; calcium ion-dependent exocytosis; fat cell differentiation; extracellular vesicular exosome
CCBP2	Chemokine-binding protein 2	immune response; cell communication; neurological system process; response to stimulus
CD36	Platelet glycoprotein 4	macrophage activation; apoptotic process; lipid metabolic process; cellular process; cell adhesion; apoptotic process; lipid transport
CDC2L2 (CDK11A)	Cyclin-dependent kinase 11A	cytoplasm; regulation of transcription, DNA-templated; mitotic nuclear division; protein kinase activity; protein serine/threonine kinase activity; apoptotic process; nucleoplasm; protein phosphorylation; nucleus; regulation of mRNA processing; ATP binding; regulation of cell growth
CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	DNA repair; DNA recombination; transcription from RNA polymerase II promoter; cellular process; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; chromatin organization
CLDN19	Claudin-19	cellular process
CNTN2	Contactin-2	immune system process; induction of apoptosis; cellular protein modification process; cell cycle; cell-cell signaling; cell-cell adhesion; muscle contraction; neurological system process; ectoderm development; mesoderm development; induction of apoptosis; angiogenesis; nervous system development; muscle organ development
COMT	Catechol O-methyltransferase	metabolic process
CPNE7	Copine-7	intracellular protein transport
DAB2IP	Disabled homolog 2-interacting protein	phosphate-containing compound metabolic process; nitrogen compound metabolic process; catabolic process; nucleobase-containing compound metabolic process; cell communication; response to stimulus; regulation of nucleobase-containing

		compound metabolic process; regulation of phosphate metabolic process; regulation of catalytic activity
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	respiratory electron transport chain; nitrogen compound metabolic process; pyrimidine nucleobase metabolic process; cellular amino acid biosynthetic process; ferredoxin metabolic process; vitamin transport
DKZp761N114 (MFSD4)	major facilitator superfamily domain containing 4	integral component of membrane; transmembrane transport
ELF4	ETS-related transcription factor Elf-4	B cell mediated immunity; macrophage activation; transcription from RNA polymerase II promoter; cell cycle; cell communication; endoderm development; mesoderm development; hemopoiesis; cellular defense response; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
EN1	Homeobox protein engrailed-1	transcription from RNA polymerase II promoter; ectoderm development; nervous system development; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ETF1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	cytoplasm; translation release factor activity, codon specific; translational termination;
FGF2	Fibroblast growth factor 2	cell-cell signaling
FLJ14753 (HIATL1)	hippocampus abundant transcript-like 1	transporter activity; plasma membrane; integral component of membrane; transmembrane transport;
FUT10	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10	protein glycosylation
GCNT1	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	polysaccharide metabolic process; protein glycosylation
GPR37	Probable G-protein coupled receptor 37	immune system process; monosaccharide metabolic process; cell communication; muscle contraction; blood circulation; sensory perception; ectoderm development; nervous system development; response to stress; cellular glucose homeostasis; regulation of vasoconstriction
GPR77	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor C5L2	immune system process; cellular component movement; cell communication; muscle contraction
GPR87	G-protein coupled receptor 87	cellular process
GRM5	Metabotropic glutamate receptor 5	cell communication; neurological system process
GUCY2C	Heat-stable enterotoxin receptor	cyclic nucleotide metabolic process
HGF	Hepatocyte growth factor	apoptotic process; metabolic process; apoptotic process
HTR1B	5-hydroxytryptamine receptor 1B	cellular process; blood circulation; neurological system process
KCNQ2	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 2	cellular process; cation transport; regulation of biological process
KHDRBS1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	spermatogenesis; RNA splicing, via transesterification reactions; mRNA splicing, via spliceosome; RNA splicing, via transesterification reactions
KIR3DL1	Killer cell immunoglobulin-like	natural killer cell activation; cell-cell signaling; response to

	receptor 3DL1	stimulus
LDB3	LIM domain-binding protein 3	transcription from RNA polymerase II promoter; cellular component movement; muscle contraction; mesoderm development; cellular component morphogenesis; heart development; muscle organ development; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; cellular component organization
(LEREPO4) ZC3H15	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	protein binding; poly(A) RNA binding; cytoplasm; nucleolus
LOX	Protein-lysine 6-oxidase	macrophage activation; apoptotic process; proteolysis; cell communication; cell-cell adhesion; apoptotic process; cellular defense response; extracellular transport; negative regulation of apoptotic process
MGC11308 (MFSD5)	major facilitator superfamily domain containing 5	membrane
MGC57341 (TMPRSS12)	Transmembrane protease serine 12	serine-type endopeptidase activity; proteolysis
MOCS2	Molybdopterin synthase catalytic subunit	sulfur compound metabolic process
MRPL39	39S ribosomal protein L39, mitochondrial	tRNA metabolic process; protein metabolic process
NAT8	Probable N-acetyltransferase 8	protein acetylation
NPR2	Atrial natriuretic peptide receptor 2	cyclic nucleotide metabolic process
PARD6B	Partitioning defective 6 homolog beta	cell cycle; cell communication; asymmetric protein localization
PCDHB5	Protocadherin beta-5	cell communication; cell-cell adhesion; ectoderm development; nervous system development
PCDHGA4	Protocadherin gamma-A4	cell communication; cell-cell adhesion; ectoderm development; nervous system development
PDCD2	Programmed cell death protein 2	protein binding; positive regulation of apoptotic process; activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; apoptotic process; enzyme binding; extracellular vesicular exosome;
PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	protein phosphorylation; cellular process; cellular component organization
PEX1	Peroxisome biogenesis factor 1	protein metabolic process; intracellular protein transport; exocytosis
PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	carbohydrate metabolic process; pathogenesis; gluconeogenesis; glucose metabolic process; small molecule metabolic process; glycolytic process; cytosol less;
PHF12	PHD finger protein 12	transcription from RNA polymerase II promoter; proteolysis; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
PIR	Pirin	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
SCPEP1	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	proteolysis; cellular process
SLC26A2	Sulfate transporter	sulfur compound metabolic process; anion transport; extracellular transport
SLC5A2	Sodium/glucose	carbohydrate metabolic process; cellular amino acid metabolic

	cotransporter 2	process; cation transport; extracellular transport; amino acid transport
SPINK2	Serine protease inhibitor Kazal-type 2	proteolysis; regulation of catalytic activity
TLL2	Tolloid-like protein 2	immune system process; proteolysis; synaptic transmission; cell-cell adhesion; visual perception; sensory perception; ectoderm development; mesoderm development; skeletal system development; angiogenesis; nervous system development; heart development; blood coagulation; lipid transport; intracellular protein transport; endocytosis; vitamin transport; regulation of catalytic activity
TNRC4 (CELF3)	CUGBP Elav-like family member 3	RNA splicing; positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome; cytoplasm; regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome; mRNA splicing, via spliceosome; RNA binding; nucleus; mRNA binding
TXNDC6 (NME9)	TXNDC6 protein NME/NM23 family member 9	nucleoside diphosphate phosphorylation; CTP biosynthetic process; UTP biosynthetic process; GTP biosynthetic process; nucleoside diphosphate kinase activity; cell redox homeostasis; ATP binding
UBE1 (UBA1)	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	protein binding; desmosome; heterochromatin; ubiquitin-protein transferase activity; protein ubiquitination; ubiquitin activating enzyme activity; nucleus; lysosomal membrane; cellular response to DNA damage stimulus; cytosol; mitochondrion; poly(A) RNA binding; cytoplasm; modification-dependent protein catabolic process; rough endoplasmic reticulum membrane; endosome membrane; extracellular vesicular exosome
UGGT2 (UGCGL2)	UGCGL2 protein UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase activity; protein glycosylation; UDP-glucosylation
ZFP36	Tristetraprolin	RNA catabolic process; mitosis; cell communication
ZNF148	Zinc finger protein 148	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF451	Zinc finger protein 451	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Table S2: Description of antiviral gene hits identified in the genome-wide siRNA screen.

Gene	Gene Name	GO Annotation
ACTN3	Alpha-actinin-3	muscle filament sliding; cytosol
ARGFX	Arginine-fifty homeobox	transcription from RNA polymerase II promoter; segment specification; segment specification; ectoderm development; mesoderm development; skeletal system development; nervous system development; muscle organ development; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	protein binding; ligand-dependent nuclear receptor binding; nBAF complex; nuclear chromatin; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; transcription coactivator activity; nucleus; nucleosome disassembly; DNA binding; npBAF complex; SWI/SNF complex; glucocorticoid receptor signaling pathway; nucleosome mobilization; chromatin remodeling; nucleoplasm; positive regulation of transcription, DNA-templated; chromatin-mediated maintenance of transcription; androgen receptor signaling pathway; intracellular estrogen receptor signaling pathway;
ATP6V1G3	V-type proton ATPase subunit G 3	nucleobase-containing compound metabolic process; cation transport
BAP1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase BAP1	proteolysis
BAT8 (EHMT2)	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	chromatin organization; cellular response to stress; nucleoplasm
BRD4	Bromodomain-containing protein 4	transcription from RNA polymerase II promoter; cellular process; chromatin organization
CCM1 (KRIT1)	Krev interaction trapped protein 1	microtubule binding; protein binding; plasma membrane; small GTPase mediated signal transduction; microtubule; regulation of establishment of cell polarity; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; extracellular space; protein complex binding; negative regulation of endothelial cell migration; small GTPase regulator activity; regulation of catalytic activity; negative regulation of endothelial cell proliferation; cell-cell junction; negative regulation of angiogenesis; cell redox homeostasis; negative regulation of endothelial cell apoptotic process
C15orf19 (RPU5D2)	RNA pseudouridylate synthase domain containing 2	poly(A) RNA binding; biological_process; cellular_component
CCNF	Cyclin-F	metabolic process; mitosis; regulation of catalytic activity
CDH3	Cadherin-3	cellular process; visual perception; sensory perception of sound; mesoderm development; nervous system development; heart development; muscle organ development
CDK2AP1	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1	DNA replication; cellular protein modification process; cell cycle; cell communication; regulation of catalytic activity
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	metabolic process; cell cycle; regulation of catalytic activity
CHRM4	Muscarinic acetylcholine receptor M4	immune system process; cell-cell signaling; neurological system process; response to stress
CLCNKB	Chloride channel protein ClC-Kb	anion transport

CMKOR1 (ACKR3)	atypical chemokine receptor 3	plasma membrane
CRADD	Death domain-containing protein CRADD	regulation of apoptotic process
CTSW	Cathepsin W	proteolysis
CYP2C8	Cytochrome P450 2C8	iron ion binding; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; heme binding; oxidation-reduction process ;
D4ST1 (CHST14)	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 14	carbohydrate biosynthetic process; sulfotransferase activity; integral component of membrane
DDEF1 (ASAP1)	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	protein binding; cilium morphogenesis
DRD5	D(1B) dopamine receptor	cell-cell signaling
EFG2 (GFM2)	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	GTP catabolic process; mitochondrial translational elongation; mitochondrial translation; GTPase activity; ribosome disassembly; translation elongation factor activity;
EGR1	Early growth response protein 1	transcription from RNA polymerase II promoter; cell cycle; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
EMILIN2	EMILIN-2	cellular process
ENC1	Ectoderm-neural cortex protein 1	cellular component movement; ectoderm development; nervous system development
ETV1	ETS translocation variant 1	B cell mediated immunity; macrophage activation; transcription from RNA polymerase II promoter; cell cycle; cell communication; mesoderm development; hemopoiesis; cellular defense response; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
F8	Coagulation factor VIII	immune system process; proteolysis; synaptic transmission; cell-cell adhesion; visual perception; sensory perception; ectoderm development; mesoderm development; skeletal system development; angiogenesis; nervous system development; heart development; blood coagulation; lipid transport; intracellular protein transport; endocytosis; vitamin transport; regulation of catalytic activity
FLJ22419 (ZNF385D)	zinc finger protein 385D	nucleus; zinc ion binding; nucleic acid binding
FLJ31547 (CES5A)	carboxylesterase 5A	carboxylic ester hydrolase activity; metabolic process; extracellular space
FUT8	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	Golgi membrane; cellular protein metabolic process; post-translational protein modification; protein N-linked glycosylation via asparagine;
FZD3	Frizzled-3	reproduction; phosphate-containing compound metabolic process; nitrogen compound metabolic process; biosynthetic process; cyclic nucleotide metabolic process; cellular component movement; cell communication; cell proliferation; single-multicellular organism process; cellular component morphogenesis; embryo development; cell differentiation; nervous system development; locomotion; response to external stimulus; regulation of nucleobase-containing compound metabolic process; regulation of phosphate

		metabolic process; regulation of catalytic activity; cellular component organization
FZD7	Frizzled-7	reproduction; phosphate-containing compound metabolic process; nitrogen compound metabolic process; biosynthetic process; cyclic nucleotide metabolic process; cell communication; single-multicellular organism process; cellular component morphogenesis; cell differentiation; nervous system development; response to stimulus; regulation of nucleobase-containing compound metabolic process; regulation of phosphate metabolic process; regulation of catalytic activity; cellular component organization
G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	transport
GBP2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2	response to interferon-gamma; macrophage activation; metabolic process; response to stimulus
GNL1	Guanine nucleotide-binding protein-like 1	phosphate-containing compound metabolic process; nitrogen compound metabolic process; catabolic process; nucleobase-containing compound metabolic process; cellular process; cellular component biogenesis
GPR61	Probable G-protein coupled receptor 61	cell communication
GRIP1	Glutamate receptor-interacting protein 1	metabolic process; synaptic transmission; neurological system process
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox protein HHEX	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
HHLA1	HERV-H LTR-associating protein 1	extracellular region
HNRPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	RNA splicing, via transesterification reactions; mRNA splicing, via spliceosome; RNA splicing, via transesterification reactions
HOXD3	Homeobox protein Hox-D3	female gamete generation; transcription from RNA polymerase II promoter; segment specification; segment specification; ectoderm development; digestive tract mesoderm development; skeletal system development; angiogenesis; nervous system development; muscle organ development; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	immune system process; protein folding; protein complex assembly; response to stress; protein complex biogenesis
IMP-2 (SPPL3)	signal peptide peptidase like 3	rough endoplasmic reticulum; Golgi-associated vesicle membrane; integral component of luminal side of endoplasmic reticulum membrane; integral component of; cytoplasmic side of endoplasmic reticulum membrane; membrane protein ectodomain proteolysis; aspartic endopeptidase activity, intramembrane cleaving; protein homodimerization activity
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	immune system process; protein phosphorylation; cell communication
KCNAB2	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	metabolic process; cation transport
KLC2L (KLC3)	Kinesin light chain 3	microtubule binding; neuron projection; kinesin complex; cytoplasm; motile cilium; ciliary rootlet; metabolic process;

		microtubule; axon cargo transport; kinesin binding; microtubule motor activity
KLHL18	Kelch-like protein 18	
LAK (ALPK1)	Alpha-protein kinase 1	protein serine/threonine kinase activity; protein phosphorylation; ATP binding
LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	cell communication; skeletal system development
MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	intracellular signal transduction; protein binding; membrane; nucleotide phosphorylation; guanylate kinase activity; apoptotic process;
MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	protein phosphorylation; cell communication; cellular component morphogenesis; cellular component organization
MBD3	Methyl-CpG-binding domain protein 3	transcription from RNA polymerase II promoter
MCM8	DNA helicase MCM8	DNA replication; cell cycle
MEIS2	Homeobox protein Meis2	transcription from RNA polymerase II promoter
MGA	MAX gene-associated protein	transcription from RNA polymerase II promoter; mesoderm development; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
MGC9564 (SLC46A1)	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	heme transport; cytoplasm; apical plasma membrane; heme transporter activity; integral component of membrane; brush border membrane; methotrexate; transporter activity; methotrexate transport; transmembrane transport
MYB	Transcriptional activator Myb	apoptotic process; purine nucleobase metabolic process; transcription from RNA polymerase II promoter; rRNA metabolic process; cellular amino acid biosynthetic process; cell cycle; apoptotic process; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; negative regulation of apoptotic process
MYH14	Myosin-14	metabolic process; cytokinesis; cellular component movement; mitosis; cell communication; muscle contraction; sensory perception of sound; sensory perception; mesoderm development; cellular component morphogenesis; muscle organ development; intracellular protein transport; vesicle-mediated transport; regulation of catalytic activity; cellular component organization
MYST4 (KAT6B)	K(lysine) acetyltransferase 6B	chromatin organization; nucleoplasm
NDUFA3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	mitochondrial respiratory chain complex I
NETO1	Neuropilin and tolloid-like protein 1	immune system process; proteolysis; synaptic transmission; cell-cell adhesion; visual perception; sensory perception; ectoderm development; mesoderm development; skeletal system development; angiogenesis; nervous system development; heart development; blood coagulation; lipid transport; intracellular protein transport; endocytosis; vitamin transport; regulation of catalytic activity
NFATC3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3	transcription from RNA polymerase II promoter; cellular defense response; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

NFKB2	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	apoptotic process; transcription from RNA polymerase II promoter; cell cycle; cell communication; apoptotic process; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; negative regulation of apoptotic process
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	cellular nitrogen compound metabolic process; regulation of cellular amino; acid metabolic process; small molecule metabolic process; cytosol
NR2F1	COUP transcription factor 1	transcription from RNA polymerase II promoter; lipid metabolic process; cell cycle; cell communication; visual perception; sensory perception; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
NRGN	Neurogranin	signal transduction; calmodulin binding; nervous system development
OAZ2	Ornithine decarboxylase antizyme 2	apoptotic process; metabolic process; apoptotic process; regulation of catalytic activity
OSBPL7	Oxysterol-binding protein-related protein 7	cholesterol metabolic process; lipid transport
PCDH9	Protocadherin-9	cellular process; visual perception; sensory perception of sound; mesoderm development; nervous system development; heart development; muscle organ development
PCSK4	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	metabolic process
PDPR	Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial	respiratory electron transport chain; cellular amino acid catabolic process; lipid metabolic process; protein metabolic process
PGLYRP3	Peptidoglycan recognition protein 3	apoptotic process; carbohydrate metabolic process; apoptotic process
PHGDHL1 (UBAC2)	Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	endoplasmic reticulum; protein localization to endoplasmic reticulum
PIP5K1C	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	phospholipid metabolic process; phospholipid metabolic process; cell communication
PLAT	Tissue-type plasminogen activator	proteolysis; blood coagulation
PPAN	Suppressor of SWI4 1 homolog	mRNA splicing, via spliceosome
PXK	PX domain-containing protein kinase-like protein	metabolic process; cell communication
RBM9 (RBFOX2)	RNA binding protein fox-1 homolog 2	protein binding; RNA metabolic process; transcription corepressor activity; RNA binding; nucleus; poly(A) RNA binding; cytoplasm; regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome; regulation of cell proliferation; nucleoplasm; negative regulation of transcription, DNA-templated; intracellular estrogen receptor signaling pathway; transcription factor binding
RERG	Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor	metabolic process; synaptic transmission; cell adhesion; neurological system process; intracellular protein transport; receptor-mediated endocytosis
RNASE10	Inactive ribonuclease-like protein 10	RNA catabolic process; mesoderm development; angiogenesis; regulation of catalytic activity
SERPINA3	Alpha-1-antichymotrypsin	proteolysis; regulation of biological process; regulation of

		catalytic activity
SLC25A18	Mitochondrial glutamate carrier 2	phosphate-containing compound metabolic process; nucleobase-containing compound metabolic process; lipid metabolic process; cation transport; phosphate ion transport; lipid transport; nucleobase-containing compound transport
SLC26A7	Anion exchange transporter	sulfur compound metabolic process; anion transport; extracellular transport
SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F	RNA splicing, via transesterification reactions; mRNA splicing, via spliceosome; RNA splicing, via transesterification reactions
SOX18	Transcription factor SOX-18	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
SSB1 (NABP2)	nucleic acid binding protein 2	cytoplasm; nucleoplasm
STK38L	Serine/threonine-protein kinase 38-like	protein phosphorylation; cell cycle; cell communication; cellular component morphogenesis; cellular component organization
STX6	Syntaxin-6	cellular process; protein transport; vesicle-mediated transport; protein localization; organelle organization
STYX	Serine/threonine/tyrosine-interacting protein	phosphate-containing compound metabolic process; cellular protein modification process; cellular process
SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	transcription from RNA polymerase II promoter; cell cycle; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
TAF1	Transcription initiation factor TFIID subunit 1	phosphate-containing compound metabolic process; transcription from RNA polymerase II promoter; protein phosphorylation; cell cycle; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
TAF13	Transcription initiation factor TFIID subunit 13	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
TBP	TATA-box-binding protein	transcription from RNA polymerase II promoter
TCF1 (HNF1A)	HNF1 homeobox A	nucleoplasm
TIF1 (TRIM24)	tripartite motif containing 24	cytosol
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	intracellular membrane-bounded organelle
TREX1	Three prime repair exonuclease 1	nucleolus; nucleus
UBE1C (UBA3)	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	protein binding; protein heterodimerization activity
UGT1A10	UDP-glucuronosyltransferase 1-10	polysaccharide metabolic process; steroid metabolic process
WFDC10A	WAP four-disulfide core domain protein 10A	proteolysis; regulation of catalytic activity
XAB2	Pre-mRNA-splicing factor SYF1	RNA splicing, via transesterification reactions; mRNA splicing, via spliceosome; RNA splicing, via transesterification reactions; ectoderm development; nervous system development
ZFP57	Zinc finger protein 57 homolog	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZFX	Zinc finger X-chromosomal protein	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

ZMYND11	Zinc finger MYND domain-containing protein 11	transcription from RNA polymerase II promoter; proteolysis; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF138	Zinc finger protein 138	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF142	Zinc finger protein 142	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF350	Zinc finger protein 350	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF384	Zinc finger protein 384	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
ZNF627	Zinc finger protein 627	transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Table S3: Distribution of proviral gene hits among the identified gene ontology pathways.

Gene Ontology pathway	Gene hits
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	PDPK1, CHD4, LDB3
cellular process (GO:0009987)	CD36, CLDN19, GPR77, GRM5, PDPK1, CHD4, DAB2IP, GPR37, KIR3DL1, PARD6B, ELF4, SCPEP1, CNTN2, FGF2, ADAMTS1, ANGPTL3, LOX, TLL2, PCDHB5, ZFP36, HTR1B, PCDHGA4, B3GNT4, CCBP2, GPR87, KCNQ2, LDB3
localization (GO:0051179)	CD36, SLC5A2, ATP6V1G2, CPNE7, PARD6B, DHODH, PEX1, SLC26A2, LOX, TLL2, KCNQ2
apoptotic process (GO:0006915)	CD36, CNTN2, HGF, LOX
reproduction (GO:0000003)	ADAMTS1, B3GNT4, KHDRBS1
biological regulation (GO:0065007)	CHD4, DAB2IP, GPR37, ELF4, EN1, PHF12, ADAMTS1, LOX, SPINK2, TLL2, ZNF148, ZNF451, PIR, KCNQ2, LDB3
response to stimulus (GO:0050896)	DAB2IP, GPR37, KIR3DL1, ELF4, LOX, TLL2, CCBP2
developmental process (GO:0032502)	CD36, GPR37, ELF4, EN1, CNTN2, ADAMTS1, ANGPTL3, HGF, LOX, TLL2, PCDHB5, PCDHGA4, B3GNT4, LDB3
multicellular organismal process (GO:0032501)	GPR77, GRM5, GPR37, CNTN2, TLL2, HTR1B, B3GNT4, CCBP2, LDB3
biological adhesion (GO:0022610)	CD36, CNTN2, ADAMTS1, ANGPTL3, LOX, TLL2, PCDHB5, PCDHGA4
metabolic process (GO:0008152)	ADSL, CD36, GUCY2C, MRPL39, PDPK1, SLC5A2, ATP6V1G2, CHD4, DAB2IP, FUT10, GPR37, ADCK2, DHODH, ELF4, EN1, MOCS2, PEX1, SCPEP1, SLC26A2, CNTN2, NAT8, PHF12, ADAMTS1, COMT, HGF, LOX, NPR2, SPINK2, TLL2, ZNF148, ZNF451, PIR, ZFP36, GCNT1, POMT2, B3GNT4, KHDRBS1, LDB3
immune system process (GO:0002376)	CD36, GPR77, GPR37, KIR3DL1, ELF4, CNTN2, LOX, TLL2, CCBP2
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	PDPK1, CHD4, LDB3

Table S4: Distribution of antiviral gene hits among the identified gene ontology pathways.

Gene Ontology pathway	Gene hits
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	HSPH1, MYH14, FZD7, MARK4, FZD3, BRD4, GNL1, STK38L, STX6
cellular process (GO:0009987)	CDH3, CDK2AP1, GPR61, CDKN1A, ENC1, LTBP2, MYH14, NR2F1, ETV1, MCM8, RERG, STYX, CCNF, DRD5, FZD7, MARK4, EMILIN2, FZD3, PCDH9, BRD4, EGR1, F8, GNL1, GRIP1, MYB, NFKB2, STK38L, CHRM4, IRAK1, NETO1, TAF1, B3GNT4, PIP5K1C, PXX, STX6, SUPT16H
localization (GO:0051179)	CLCNKB, MYH14, SLC25A18, OSBPL7, RERG, F8, G3BP2, SLC26A7, ATP6V1G3, NETO1, KCNAB2, STX6
apoptotic process (GO:0006915)	OAZ2, MYB, NFKB2, PGLYRP3
reproduction (GO:0000003)	FZD7, HOXD3, FZD3, B3GNT4
biological regulation (GO:0065007)	CDK2AP1, NFATC3, OAZ2, RNASE10, ZFX, ZNF350, CDKN1A, MYH14, NR2F1, SOX18, WFDC10A, ETV1, ZNF142, CCNF, FZD7, HOXD3, TAF13, FZD3, EGR1, F8, MYB, NFKB2, ZNF627, NETO1, TAF1, ZMYND11, ZNF384, ARGFX, HHEX, MGA, SERPINA3, SUPT16H, ZFP57, ZNF138
response to stimulus (GO:0050896)	NFATC3, PLAT, HSPH1, ETV1, FZD7, FZD3, F8, GBP2, CHRM4, NETO1
developmental process (GO:0032502)	CDH3, OAZ2, RNASE10, ENC1, LTBP2, MYH14, ETV1, FZD7, HOXD3, MARK4, FZD3, PCDH9, F8, MYB, NFKB2, STK38L, NETO1, PGLYRP3, ARGFX, B3GNT4, MGA, XAB2
multicellular organismal process (GO:0032501)	CDH3, MYH14, NR2F1, RERG, FZD7, HOXD3, FZD3, PCDH9, F8, GRIP1, CHRM4, NETO1, ARGFX, B3GNT4
locomotion (GO:0040011)	FZD3
biological adhesion (GO:0022610)	RERG, F8, NETO1
metabolic process (GO:0008152)	CDK2AP1, NFATC3, OAZ2, PLAT, RNASE10, ZFX, ZNF350, CDKN1A, HSPH1, MYH14, NR2F1, PCSK4, SLC25A18, SOX18, TBP, WFDC10A, CTSW, ETV1, MCM8, OSBPL7, RERG, STYX, UGT1A10, ZNF142, CCNF, FZD7, HOXD3, MARK4, MEIS2, TAF13, FZD3, PDPR, PPAN, SNRPF, BRD4, EGR1, F8, GBP2, GNL1, GRIP1, HNRPL, MYB, NFKB2, SLC26A7, STK38L, ZNF627, ATP6V1G3, IRAK1, MGA, NETO1, PGLYRP3, POMT2, TAF1, ZMYND11, ZNF384, ARGFX, B3GNT4, BAP1, HHEX, KCNAB2, MBD3, MGA, PIP5K1C, PXX, SERPINA3, SUPT16H, XAB2, ZFP57, ZNF138
immune system process (GO:0002376)	HSPH1, ETV1, F8, GBP2, CHRM4, IRAK1, NETO1
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	HSPH1, MYH14, FZD7, MARK4, FZD3, BRD4, GNL1, STK38L, STX6

Préambule – Etude 2

Le protéome structural d'un virus correspond à l'ensemble des protéines qui compose sa structure. La composition de cet assemblage de composants viraux et potentiellement cellulaires est importante puisqu'elle détermine de nombreuses propriétés biologiques de la particule virale telles que son tropisme ou sa résistance aux facteurs solubles du système immunitaire tels que le complément ou les anticorps.

Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse a émergé comme outil important en virologie. Les applications de la spectrométrie pour étudier le cycle des virus sont en effet importantes et vont de l'étude de la régulation de la transcription à l'étude du secrétome viro-induit en passant par l'étude d'interactions entre protéines de l'hôte et protéines cellulaires.

Dans cette étude, nous avons voulu caractériser par spectrométrie de masse la composition protéique des particules virales du MuHV-4. En effet, bien que la caractérisation de protéomes structuraux d'herpèsvirus par spectrométrie de masse avaient été réalisées plusieurs fois, certaines études n'avaient identifié que peu de protéines, notamment en ce qui concerne le MuHV-4 [390], et une grande disparité existait entre les études, notamment en ce qui concerne les *Gammaherpesvirinae*. Cette étude avait donc pour objectif de préciser la nature du protéome structural des *Gammaherpesvirinae*, en prenant le MuHV-4 comme modèle.

Proteomic characterization of Murid Herpesvirus 4 extracellular virions

Sarah Vidick¹, Baptiste Leroy², Leonor Palmeira¹, Bénédicte Machiels¹, Jan Mast³, Sylvie François¹, Ruddy Wattiez², Alain Vanderplasschen¹ and Laurent Gillet^{1*}

¹Department of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

²Department of Proteomics and Microbiology, Research Institute for Biosciences Interdisciplinary Mass Spectrometry Center (CISMa), University of Mons, Mons, Belgium

³Electron Microscopy Unit, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, Belgium

*Correspondence: Laurent Gillet

Immunology-Vaccinology, Department of Infectious and Parasitic Diseases (B43b), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium

Email: L.gillet@ulg.ac.be

Tel: 00-32-4-3664286

Fax: 00-32-4-3664261

Main text: 6858 words

Abstract: 218 words

Number of Figures: 6

Number of tables: 3

Supplemental Figures: 3

Supplemental Tables: 2

Abstract

Gammaherpesvirinae, such as the human Epstein-Barr virus (EBV) and the Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) are highly prevalent pathogens that have been associated with several neoplastic diseases. As EBV and KSHV are host-range specific and replicate poorly *in vitro*, animal counterparts such as Murid herpesvirus-4 (MuHV-4) have been widely used as models. In this study, we used MuHV-4 in order to improve the knowledge about proteins that compose gammaherpesviruses virions. To this end, MuHV-4 extracellular virions were isolated and structural proteins were identified using liquid chromatography tandem mass spectrometry-based proteomic approaches. These analyses allowed the identification of 31 structural proteins encoded by the MuHV-4 genome which were classified as capsid (8), envelope (9), tegument (13) and unclassified (1) structural proteins. In addition, we estimated the relative abundance of the identified proteins in MuHV-4 virions by using exponentially modified protein abundance index analyses. In parallel, several host proteins were found in purified MuHV-4 virions including Annexin A2. Although Annexin A2 has previously been detected in different virions from various families, its role in the virion remains controversial. Interestingly, despite its relatively high abundance in virions, Annexin A2 was not essential for the growth of MuHV-4 *in vitro*. Altogether, these results extend previous work aimed at determining the composition of gammaherpesvirus virions and provide novel insights for understanding MuHV-4 biology.

Introduction

The *Herpesviridae* is a large family of DNA viruses, including eight identified human herpesviruses. The *gammaherpesvirinae* is one of the three subfamilies of the *Herpesviridae*. Two gammaherpesviruses are known to infect humans, Epstein-Barr virus (EBV) and the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), which are associated with various types of cancer such as Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Kaposi's sarcoma or Castleman's disease [44, 400]. Both EBV and KSHV have a very narrow host range *in vivo* and display limited lytic growth *in vitro*. These characteristics have hampered studies on these viruses and promoted the development of alternative models.

Murid Herpesvirus 4 (MuHV-4) is a relative of EBV and KSHV which has been isolated in wild rodents [74]. MuHV-4 offered therefore the possibility of developing a mouse model of gammaherpesvirus pathogenesis [74, 78, 405]. Moreover, in contrast to its human counterparts, MuHV-4 readily infects many types of cells *in vitro* and replicates to high levels. This virus has therefore been widely used as a model to study the gammaherpesviruses biology in host cells [9].

The MuHV-4 genome is estimated to encode at least 80 genes and is largely colinear with those of KSHV and EBV [79]. MuHV-4 virions display a morphological organisation which is typical of herpesviruses [283]. Briefly, infectious virions contain a double-stranded DNA genome which is incorporated in a large (diameter >100 nm) icosahedral nucleocapsid. This capsid is assembled in the nucleus from at least 8 different conserved proteins [241] and is surrounded by a thick proteinaceous tegument compartment which is acquired in both the nucleus and the cytoplasm. The tegument is probably the least understood part of herpesviruses although it plays important roles during entry, virion assembly and egress [251, 271, 438]. Recent studies have attempted to decipher its complex architecture [7]. The cytoplasmic capsids with tegument are finally enclosed within a lipid bilayer envelope spiked with glycoproteins to form mature infectious virus particles (diameter ~ 200 nm). MuHV-4 encodes at least 9 envelope glycoproteins involved in virion entry and egress from the cell [115, 118, 339, 374, 375, 415, 439, 440]. Among these glycoproteins, gB, gH, gL, gM and gN are shared by all the members of the *Herpesviridae* family [104].

In addition to virally encoded structural proteins, several cellular host proteins have also been reported in herpesvirus virions. While some of these proteins appear to be unique to a virus species, others are shared by several members of the *Herpesviridae* family. Although some cellular proteins incorporated in virions have been shown to be important for the biology of viruses from other families [384], the function of these proteins is still largely unknown in herpesviruses. A precise knowledge of herpesvirus composition is therefore likely to allow better understanding of various processes such as virus production, virion entry or immune evasion.

The usage of mass spectrometry-based analyses (MS) has allowed the deciphering of the composition of different herpesvirus virions [70, 166, 168, 233, 275, 276, 291, 390, 441-445]. Such an approach has been applied more than ten years ago to MuHV-4 virions [390]. However, this pioneering work revealed only 14 structural viral proteins whereas herpesvirus virions likely contain more than 30 different proteins [70]. Moreover, this study identified products of genes ORF20, ORF24 and ORF29 as virion proteins although their homologues were not found in most of the analyses of virions of related species. For example, ORF29 encodes a component of the viral terminase which is thought to dissociate from the capsid after genome packaging and therefore to not be incorporated in mature extracellular virions [291]. The composition of extracellular mature MuHV-4 virions deserves therefore new analyses.

In this study, 31 structural MuHV-4 proteins were identified by a recently described mass-spectrometry-based proteomic approach. In parallel, a small number of host proteins were also detected although their significance remains unclear. Altogether, these results extend our knowledge about gammaherpesvirus virion composition and provide novel insights for understanding MuHV-4 biology.

Materials and Methods

Cells and Virus. Baby Hamster Kidney cells (BHK-21 (ATCC CCL-10)) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% foetal calf serum (FCS), 2% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 2 mM glutamine and 1% non-essential amino acids (Invitrogen). Mouse embryonic fibroblasts (MEF) from wild-type (WT) and Annexin A2-null mice [446] were kindly provided by Prof. Katherine A. Hajjar (Weill Cornell Medical College, New York, NY, United States) and were cultured in the same culture medium containing 1mM sodium pyruvate. Virions of the MHV-68 strain of MuHV-4 reconstituted from the pHA3 BAC plasmid [414] were used throughout this study. This viral strain therefore expresses eGFP under control of the immediate early promoter of human cytomegalovirus.

Production and purification of MuHV-4 virions. BHK-21 cells were infected with MHV-68 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 plaque-forming unit (PFU) per cell. To reduce cellular contaminants, the supernatant was harvested after 72 hours post-infection (hpi) before complete cell lysis. Extracellular virions were purified from the cell supernatant as described previously [70]. Briefly, after removal of the cell debris by low-speed centrifugation (1,000 *g*, 10 min at 4°C), virions present in the infected cell supernatant (~1-5×10⁶ PFU/mL) were harvested by ultracentrifugation (100,000 *g*, 2 h at 4°C) through a 30% *weight/volume* (w/v) sucrose cushion. Virions were then banded by isopycnic gradient ultracentrifugation in a continuous 20 to 50% (w/v) potassium tartrate gradient in PBS (100,000 *g*, 2 h at 4°C). The band containing virions was collected (~3mL), diluted ten fold in PBS and pelleted by ultracentrifugation (100,000 *g*, 2 h at 4°C). The virion pellet was finally resuspended in PBS and virus enriched preparations (~1-5×10⁸ PFU/mL) were stored at -80°C.

Protease treatment. Virions were treated with proteinase K as described previously [444]. Briefly, after ultracentrifugation through the sucrose cushion described above, the viral pellet was resuspended in 1 ml of MNT buffer (30 mM morpholineethanesulfonic acid [MES], 10 mM NaCl, and 20 mM Tris-HCl [pH 7.4]) containing 10 µg/ml proteinase K (Roche, Mannheim, Germany), incubated for 45 min at room temperature and subsequently treated with 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Fluka) prior to density gradient centrifugation on a 20 to 50% (w/v) potassium tartrate gradient in PBS (100,000 *g*, 2 h at

4°C). The band containing virions was collected (~3mL), diluted ten fold in PBS and pelleted by ultracentrifugation (100,000 *g*, 2 h at 4°C). Proteinase K-treated virions were finally resuspended in PBS and stored at -80°C.

Western Blotting. Purified virions were lysed and denatured by heating (95°C, 5 min) in Laemmli sample buffer (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 12.5% (w/v) glycerol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue). Proteins were resolved by electrophoresis on Mini-PROTEAN TGX (Tris-Glycine eXtended) precast 4-15% resolving gels (Bio-Rad) in an 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% (w/v) non-fat milk in PBS/0.1% (w/v) Tween-20, and then incubated in the same buffer with rabbit polyserum [78] or mouse monoclonal antibodies (mAb) recognizing MuHV-4. We used the following mAbs: 3F7, anti-gN IgG_{2a} [447]; T1A1, anti-gp150 IgG_{2a} [448]; 58-16D2, anti-gp70 IgG_{2a} [115]; MG-4D11, anti-gB IgG_{2a}; MG-2C10, anti-gB IgM [449]. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG pAb or 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.

Fractionation of MuHV-4 virions. Lipid envelopes were removed from capsid-teguments by incubation with a non-ionic detergent as described previously [450]. Briefly, virions enriched preparations were sonicated and lysed in PBS containing 1% (v/v) NP-40 for 20 min on ice. Capsids associated with tegument were then pelleted by centrifugation (15,000 *g*, 30 min at 4°C). The supernatant was discarded and the procedure was repeated two times on the capsid-tegument pellet. After the last centrifugation, the capsid-tegument pellet was finally resuspended in PBS and stored at -80°C until further use.

Negative staining and electron microscopy. Copper grids (400 mesh; Agar Scientific) covered by a thin film of pioloform were incubated for 10 min with 1% Alcian blue 8G solution (Gurr Microscopy Materials, BHD) to add positive charges. After washing, virion-enriched or capsid-tegument preparations were adsorbed to the grids for 10 min. Viral particles were then stained by incubation on a 2% uranyl acetate solution for 10 s (Agar

Scientific). Samples were observed using a transmission electron microscope (FEI Tecnai Spirit).

Oligosaccharide digestion. The deglycosylated extract was obtained by treating virion-enriched preparations with an Enzymatic Protein Deglycosylation kit (Sigma) following the instructions of the manufacturer. Viral proteins were successively denatured for 5 min at 100°C in a denaturation solution, and treated with Triton X-100, peptide:*N*-glycosidase *F*, *O*-glycosidase, α (2-3,6,8,9)neuraminidase, β (1,4)-galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase for 3 h at 37 °C. This extract was then submitted to the one dimensional gel electrophoresis / Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry approach (1D gel/nanoLC-MS/MS approach).

1D gel/nanoLC-MS/MS approach. Proteins from virion-enriched (treated or not with proteinase K, deglycosylated or not) and from capsid-tegment preparations were extracted in Laemmli sample buffer and heated for 5 min at 95°C. The samples were then separated by SDS-PAGE on 4-20% acrylamide 7 cm gels (Invitrogen). Separated proteins in the gel were excised in 30 serial slices along the lane. Gel slices were submitted to in-gel digestion with sequencing grade modified trypsin as described previously [70, 445]. Briefly, gels were washed successively with 50 mM ammonium bicarbonate (ABC) buffer and ABC buffer/acetonitrile (ACN) 50% (v/v). Proteins were reduced and alkylated using dithiothreitol and iodoacetamide followed by washing with ABC and ABC/ACN. Resulting peptides were analysed by nanoLC-MS/MS using a 40 min ACN gradient as described [451].

MS/MS analyses. Peptides were analysed using the 'peptide scan' option of the HCT Ultra ion trap (Bruker), consisting of a full-scan MS and MS/MS scan spectrum acquisitions in ultrascan mode (26000 m/z s^{-1}). Peptide fragment mass spectra were acquired in data-dependent AutoMS(2) mode with a scan range of 100–2800 m/z , three means and four precursor ions selected from the MS scan 300–1500 m/z . Precursors were actively excluded within a 0.5 min window, and all singly charged ions were excluded. Peptide peaks were detected and deconvoluted automatically using Mascot distiller 2.3.3 and submitted to database search using an in-house mascot search engine (2.2 version). The default search parameters used were the following: Enzyme = Trypsin; Maximum missed cleavages = 2; Fixed modifications = Carbamidomethyl (C); Variable modifications = Oxidation (M); Peptide

tolerance ± 1.5 Dalton (Da); MS/MS tolerance ± 0.5 Da; Peptide charge = 2+ and 3+; Instrument = ESI-TRAP. All data were searched against the NCBI Rodents database in order to detect host proteins or against a MuHV-4 database [452] to detect viral proteins. Proteins were only considered if reaching a p-value for identification lower than 0.05. Only peptides with a mascot score higher than 30 were taken into account. Identifications based on single peptide were validated manually considering that a continuous series of at least 5 b or y ions had to be present and that selected ions had to be among the top 15 ions of the spectrum. For each approach, the exponentially modified protein abundance index (emPAI) [453] was calculated to estimate protein relative abundance for the complete virion extracts. The protein abundance index (PAI) is defined as the number of observed peptides divided by the number of observable peptides per protein. The exponentially modified PAI ($10^{\text{PAI}} - 1$) is proportional to protein content in a protein mixture in LC-MS/MS experiments.

Proteogenomic mapping. The complete nucleotide sequence of MuHV-4 (GenBank: AF105037.1) was translated *in silico* in all 6 frames. The mass lists obtained in the different complete virion analyses were searched against these 6 frames with no mismatches allowed. Detected peptides were then mapped onto the original MuHV-4 genome sequence (GenBank: AF105037.1 and [79]). The results were generated and visualized using R [454] and the seqinr package [455].

Growth curves. Cell cultures were infected with MuHV-4 virions at a MOI of 0.01 (multi-step assay). After 1 h of adsorption, the cells were washed then overlaid with Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% FCS. Supernatants of infected cultures or infected cells were harvested at successive intervals and the amount of infectious virus determined by plaque assay on BHK-21 cells.

Results

Purification of extracellular MuHV-4 virions. The purification of extracellular mature virions is very important for the characterization of viral structural proteomes. Indeed, it has to be very pure to avoid detection of non-structural proteins but in the same time to be highly concentrated. In the present study, we used a strategy recently used for the characterization of BoHV-4 virions [70]. Briefly, MuHV-4 extracellular virions were harvested and purified from the supernatant of BHK-21 infected cells before complete lysis as described in the Materials and Methods. Transmission electron microscopic (TEM) analysis of negatively stained samples was used to evaluate both the concentration and the purity of all the preparations (Fig. 1). In all samples, typical herpesvirus virions were observed. These appear as spherical to slightly pleomorphic, relatively electron-lucent features of 120-200 nm in diameter. These virions with an intact envelope displayed no specific internal and surface features in negative staining. Because of the drying during the negative staining, some of the virions collapsed such that the envelope was penetrated by the stain (Fig. 1, panel ii). In that case, the nucleocapsids were observable, surrounded by the integument and the envelope. Only a few nucleocapsids without envelope were found (1 to 5% in the different samples). Most likely, these had no envelope or lost their envelope during virus purification. We did not observe any contamination by cell debris, suggesting that the virion samples were very pure. This therefore indicates that our virion purification strategy could be considered as successful, at least as evaluated by TEM.

Viral protein composition of MuHV-4 virions. In order to analyse MuHV-4 virion composition, virion proteins were separated by SDS-PAGE, digested in gel with trypsin and analysed by mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). This approach allows association of the identified protein with the apparent molecular mass assessed by SDS-PAGE. This approach was performed on untreated virions or on intact virions treated with proteinase K (proteinase K - 1D gel/nanoLC-MS/MS). We also applied the same protocol on deglycosylated virion extracts.

This approach enabled us to identify 31 virally encoded proteins in the MuHV-4 particle. These proteins are listed in Table 1 according to their position in the viral genome. This number is consistent with the numbers previously reported for other members of the

Herpesviridae family. Moreover, it substantially improved a previous analysis of MuHV-4 virions that identified 14 virally encoded structural proteins [390].

Despite our multistep purification protocol, detection of some proteins could result from non-specific sticking to the virion rather than true integration into the particle. To address this issue, we treated virions with proteinase K, in the absence of detergent, prior to density centrifugation as described previously [70, 233, 444]. We validated this treatment by western blotting (Fig. 2). As herpesviruses are enveloped within a phospholipid bilayer, only proteins that are exposed at the viral surface are accessible to protease digestion. Immunoblotting with MuHV-4 specific monoclonal antibodies confirmed that some epitopes disappeared after proteinase K treatment while some others were not affected (Fig. 2). Thus, the epitope recognized by mAb T1A1 (recognizing gp150) was detected only in untreated virions while it was undetectable in proteinase-K treated virions (Fig. 2). This therefore suggests that our proteinase K treatment was efficacious. In contrast, the viral surface epitope recognized by mAb 3F7 raised against gN, which is a small (61 aa among which only 29 aa are exposed at the cell surface) type I membrane protein lying probably very close to the envelope, did not appear to be affected by the treatment (Fig. 2).

Among the 31 proteins described in Table 1, only pORF55 was not detected in the proteinase K - treated sample. Analysis of the peptide sequence coverage of viral proteins identified by mass spectrometry revealed that, although some MuHV-4 envelope glycoprotein epitopes were sensitive to proteinase K digestion (Fig. 2), proteinase K treatment did not affect the detection of most of the viral proteins even those that are exposed at the surface of the virion. Thus, the peptide sequence coverage of gB, which is the envelope protein detected by the bigger number of unique peptides (Table 1), was 51.8% and 53% respectively in untreated and proteinase K-treated virions. Finally, no additional protein was specifically detected after proteinase K treatment.

Estimation of protein abundance in MuHV-4 virion. We previously used the emPAI value (exponentially modified protein abundance index) developed by Ishihama *et al.* to estimate the protein contents in our samples [70, 453, 456]. In order to relatively quantify viral proteins in virions, emPAI values were expressed as percentages of the emPAI value obtained for pORF25, the major capsid protein (Table 1). Based on these relative emPAI

values, the tegument protein encoded by ORF52 was, by far, the most abundant protein detected in MuHV-4 virions. It was more than 20 times more abundant than pORF25. This apparent abundance could not be biased through the enhanced detection of a single peptide as 12 different pORF52 peptides were detected in similar proportions by our analyses (Table 1).

Identification of viral capsid and capsid associated tegument components. In order to identify capsid proteins and tegument proteins associated with capsids, we purified viral capsid-tegument fractions as described in the Materials and Methods. We estimated the purity and concentration of the purified capsid-tegument preparation by TEM (Fig. 1, panels iii and iv). As expected, the sample contained only isolated capsids and no trace of intact virions or envelope debris.

The 1D gel/nanoLC-MS/MS approach revealed the presence of 18 viral proteins in this sample (Table 2). As expected, no predicted viral envelope glycoprotein (encoded by ORF4, ORF8, ORF22, ORF27, ORF28, ORF39, ORF47, ORF51 and ORF58) was detected in this sample confirming the quality of our purification procedure. Moreover, proteins encoded by M3, ORF38, ORF45 and ORF55 were also not detected in this sample although they had been detected in complete virions. For ORF38, ORF45 and ORF55, the absence of detection could be associated with their low abundance as very few peptides derived from these proteins were detected in intact virions. The absence of detection could also reflect the fact that they are not directly associated with capsids. In this case they could be considered as outer tegument proteins. Regarding M3, as it is a secreted protein, its absence from tegument was expected.

As performed above for entire virions, the relative protein abundances were estimated by emPAI values. These values were expressed as percentages of the emPAI value obtained for pORF25, the major capsid protein (Table 2). As observed for intact virions, the tegument protein encoded by ORF52 was by far the most abundant protein detected in this preparation.

Proteogenomic mapping. Our identification of MuHV-4 structural proteins by mass spectrometry is based on the ORFs annotations of the MuHV-4 genome. In order to identify possible MuHV-4 virions proteins that had not been annotated, we generated a database

containing the entire genome of MuHV-4 translated in the 6 frames. The mass lists obtained in the different complete virions analyses were searched against this database as described in the Materials and Methods. Finally, the detected peptides were graphically mapped onto the MuHV-4 genome (Fig. 3). The results obtained showed that all peptides identified by our analyses mapped into previously annotated ORFs.

This approach allowed us to easily analyse the localization of detected peptides within protein sequences. This was particularly useful for the ORF17-17.5 proteins (Fig. 3 and S1). Rhadinoviruses ORF17.5 encode the homolog of HSV-1 VP22a which serves as a scaffold protein during capsid maturation and is therefore mainly found in procapsids and B capsids [241]. As observed in other herpesviruses, the coding sequence of this protein is entirely contained within and in frame with a larger open reading frame, called ORF17 in rhadinoviruses. This larger open reading frame encodes a protease (homologous to HSV-1 VP24) involved in capsid maturation by degrading scaffold proteins. Interestingly, analysis of the ORF17-17.5 peptides distribution showed that these peptides were located into the ORF17 specific N-terminal region. These results suggest therefore that the pORF17 protease was the major ORF17-17.5 product present in our virion preparation. However, it has to be noted that some ORF17.5 peptides were found in the capsid-tegument preparation, some trace of the scaffold protein were therefore detected.

Glycosylation of virion components. In order to improve the sensitivity of our approach, we performed the 1D gel/nanoLC-MS/MS analysis on deglycosylated virion proteins as described in the Materials and Methods. We validated this treatment by western blotting (Fig. S2). The apparent molecular mass of glycoprotein gp70 and of the C- and N-terminal parts of gB appeared to be reduced while the total protein content revealed by an anti-MuHV-4 polyserum did not appear to be affected (Fig. S2). However, compared to the analysis of intact virions, we were not able to detect any new viral structural protein (Table 1). In contrast, peptides corresponding to proteins encoded by M3, ORF17, ORF45 and ORF55 were not detected in the deglycosylated sample.

The comparison of results obtained by the 1D gel/nanoLC-MS/MS approaches performed on untreated and deglycosylated samples run in parallel allowed us to predict glycosylation of several virion proteins. We limited our analysis on detected envelope

proteins as most of them are predicted to be N- and/or O-glycosylated (Fig. S3). Briefly, both samples were submitted to 1D gel electrophoresis as described in the Materials and Methods. After protein migration, the gels were cut in 30 slices and protein composition of each of the 30 slices was determined as described. Distribution across the gel was then determined for each protein and compared between deglycosylated or untreated sample.

In comparison with their theoretical mass (calculated from amino acid composition), all the proteins, excepted gL, displayed a higher apparent molecular mass, suggesting important posttranslational modifications (Fig. 4). We considered that there were differences of glycosylation when detection profiles differed by more than one positive box. In the case of the proteins encoded by ORF4 (gp70), ORF8 (gB), ORF22 (gH), ORF27 (gp48), ORF47 (gL) and ORF58, the deglycosylation procedure induced a decrease of the apparent molecular mass, suggesting that these proteins are glycosylated. It should be noted that MuHV-4 gB has a theoretical molecular mass (MM) of ~96 kDa. However, MuHV-4 gB has a furin consensus cleavage sequence at amino acids 424 to 427 (RRKR) [457]. It has been shown experimentally that the cleavage is indispensable for virion incorporation and results in two derived products of respectively 55 and 65 kDa [457].

Although N- and/or O-glycosylation had previously been shown for pORF28 and pORF51 (gp150), our experimental procedure did not allow us to detect it. In the case of pORF51 (gp150), this is probably associated with an aberrant migration of the protein. This could be due to the high proline content (23%) of the protein, which is known to increase the apparent molecular mass on SDS-PAGE gels [353]. pORF39 (gM) and pORF58 also migrate to aberrant positions. This could be associated with the multiple transmembrane domains of these proteins [375, 447]. This could also reflect the formation of protein aggregates due to the conditions used in SDS-PAGE preparation as it has previously been shown for KSHV gM [370].

Although peptides corresponding to pM3 had been observed in all the replicate analyses that were performed on intact virions, no M3-derived peptides were detected in the deglycosylated sample (Table 1 and Fig. 4).

Host proteins associated with MuHV-4 extracellular virions. Several host proteins have been detected in mature herpesvirus virions. We therefore also searched for proteins of non-viral origin in the 1D gel/nanoLC-MS/MS analyses performed on intact virions. In total, we identified 31 cellular proteins that were detected in at least two of the three replicates (Table 3). Among these proteins, only 11 proteins were still detected after proteinase K-treatment (Table 3). Manual categorization of the identified proteins according to their previously known molecular function was performed as described for analyses of BoHV-4 [349] and PRV virions [444]. As for these viruses, many proteins involved in cellular signalling, cytoskeleton organization and membrane organization and trafficking were found (Table 3).

We have chosen to investigate more in depth the role of Annexin A2 in the MuHV-4 cycle for the following reasons: (i) the estimation of protein abundance by emPAI revealed that Annexin A2 is one of the more abundant host proteins detected in MuHV-4 virions; (ii) among the host proteins that were still detected after proteinase K treatment, only Annexin A2 had previously been associated with MuHV-4 virions [390]; (iii) finally, Annexin A2 is the protein that is the most frequently associated with herpesvirus virions (Table 3). Based on these observations, it was therefore plausible that Annexin A2 plays a role in MuHV-4 biology. Interestingly, mouse deficient for Annexin A2 have been generated previously [446]. This was therefore a unique opportunity to investigate more in depth the role of this protein in the MuHV-4 cycle.

To address this question, we compared the growth of WT MuHV-4 virus on WT or Annexin A2 deficient MEF cells. The results obtained showed that MuHV-4 grew to similar titers in WT and Annexin A2 deficient-MEF cells (Fig. 5). Finally, as Annexin A2 has been proposed to play a role in the entry of different viruses including herpesviruses, we examined MuHV-4 entry into WT and Annexin A2 deficient MEF cells. Briefly, we incubated WT or Annexin A2 deficient MEF cells with a BoHV-4 WT strain expressing eGFP (0.4 PFU/cell) for various times before washing the cells with PBS or with an acidic solution (PBS pH3). The cells were then incubated in complete medium and the numbers of infected cells (eGFP+) were then determined by flow cytometry 18 h later. We did not observe any difference in MuHV-4 entry between the two cell types (data not shown).

Discussion

The composition of herpesvirus virions has already been addressed by several studies. However the diversity of the purification and mass spectrometry procedures used has led to variable results. While analyses of Herpes-Simplex (HSV-1) and Pseudorabies (PRV) virions identified respectively 44 and 47 viral structural proteins [291, 444], analyses of *rhadinoviruses* gave much more variable results. Thus, 37, 33, 25 and 14 viral structural proteins were revealed in BoHV-4 [70], Rhesus rhadinovirus (RRV) [233], KSHV [275, 276] and MuHV-4 [390] extracellular virions respectively. Moreover, only 10 proteins were common between the different analyses. As mass spectrometry approaches are continuously evolving, we have reassessed the composition of MuHV-4 virions. Our analyses allowed the identification of 31 structural proteins encoded by the MuHV-4 genome which were classified as capsid (8), envelope (9), tegument (13) and unclassified (1) structural proteins. Among these 31 proteins, 27 were also found in at least three of the four rhadinovirus virions characterized to date (BoHV-4, KSHV and RRV) (Supplemental table 1).

Capsid proteins. Despite considerable sequence divergence, the structure and arrangement of the capsid proteins is remarkably conserved across *Herpesviridae* [241, 458]. Herpesviruses have a T16 icosahedral capsid. The main component of the capsid is the major capsid protein (MCP), encoded by ORF25 in rhadinoviruses. MCP makes up both capsomere structures, the pentons (n=11) and hexons (n=150), which contain five and six MCP monomers, respectively. In the capsid, the hexons form the faces and edges while pentons are located at 11 of the vertices of the icosahedron. The last vertice is unique and consists of 12 copies of a portal protein (ORF43 in rhadinoviruses). These portal proteins are arranged as a ring through which viral DNA is encapsidated. The pentons and hexons are bridged together by 320 triplexes which are composed, in rhadinoviruses, of two copies of pORF26 and one copy of pORF62. The capsid is firstly assembled (procapsid) around a morphogenic scaffolding core made of pORF17.5 which undergoes proteolysis by pORF17 during maturation. Finally, a small basic capsid protein (pORF65) is added only after procapsid maturation. Two additional minor capsid proteins, pORF19 and pORF32, associate with capsid triplexes and form the capsid vertex-specific complex (CVSC) which is necessary for viral DNA cleavage and packaging. In this study, we identified all of these proteins (Tables 1

and 2). Analysis of the protein abundances (based on emPAI) conformed to the theoretical values excepted for pORF43, pORF62 and pORF65 which were more abundant than expected. We do not have any explanation for this high relative abundance compared to the other capsid proteins. However, ORF65 encodes the small capsid protein of rhadinoviruses which decorates the hexon configuration of the major capsid protein. On the basis of full occupancy, it should be a very abundant capsid protein. Our results are therefore in accordance with this hypothesis. In contrast, we had shown that pORF65 was not abundant in BoHV-4 virion [70]. This could reveal different roles of this protein in these two species. Interestingly, pORF65 homologues are non-essential in *alpha*- and *beta*-herpesvirinae, but KSHV pORF65 is required for capsid formation [459]. The roles of pORF65 in BoHV-4 and MuHV-4 could therefore be different and will require further investigation.

Similarly to what we observed with BoHV-4, none of the viral terminase components, pORF7, pORF29 and pORF67.5, were detected in our analysis of mature MuHV-4 virions in contrast with KSHV and human cytomegalovirus (HCMV) and with the previous analysis on MuHV-4 virions (Supplemental table 2) [168, 275, 390]. This result reinforces therefore the model in which the herpesvirus terminase complexes dissociate from the C-capsid after genome encapsidation. Moreover, the absence of the terminase complex, the high levels of pORF65 and the very low levels of pORF17.5 (homologous to HSV-1 VP22a) (Fig. S1) suggest that our virus preparations contained mostly mature extracellular virions.

Tegument proteins. In contrast to the capsid, herpesvirus tegument remains largely undefined. The first step toward the understanding of its organization is therefore the identification of all of its components. Our analysis identified 13 potential viral tegument proteins associated with MuHV-4 virions (proteins encoded by ORFs 11, 21, 23, 33, 36, 38, 45, 52, 55, 63, 64, 75c and 75b). Among these proteins, proteins encoded by ORFs 11, 21, 33, 45, 52, 63, 64 and 75c have all been detected in KSHV tegument [274-276] while proteins encoded by ORFs 23, 36, 38, 55 and 75b were not. Although being conserved among gammaherpesviruses, the function of ORF23 is unknown and a recent study of MuHV-4 showed that pORF23 was not essential for *in vitro* or *in vivo* growth [460]. Its presence in the MuHV-4 virion is possible based on its similarity with the tegument protein pUL21 of alphaherpesviruses which is involved in egress of capsids from the nucleus [461]. ORF36 encodes a conserved gammaherpesvirus protein kinase [462, 463] which has also been

detected in BoHV-4 [70] and RRV [233]. Proteins encoded by ORF38 and ORF55 are fatty acylated proteins conserved throughout the herpesvirus family. They have been detected in the tegument of many herpesviruses and are involved in virion envelopment and/or egress [464, 465]. Finally, pORF75b has been described as a virion component [466]. All these proteins, except pORF55, were detected after proteinase K treatment of virions (Table 1) and should therefore be considered as real tegument components. pORF55 was only detected by two peptides and its absence in proteinase K treated virions likely reflects its low abundance in viral particles.

In contrast to these proteins, our analyses did not detect proteins encoded by ORFs 6, 20, 35, 42, 48, 50, 67 and 75a which had previously been described as potential tegument proteins in KSHV [274]. In particular, pORF20 [390], pORF42 [301] and pORF75a [466] had previously been associated with MuHV-4 virions. Our results suggest that these proteins are absent or extremely rare in MuHV-4 virions. The absence of pORF75a was quite surprising as its two homologues, pORF75c and pORF75b, were among the most abundant proteins of MuHV-4 virions (on the basis of the emPAI values). This therefore suggests that these proteins have diverged to acquire new functions as proposed by Gaspar *et al.* who observed that these proteins do not substitute functionally.

As observed in our analysis of BoHV-4 virions [70], the most abundant MuHV-4 virion protein is encoded by ORF52 (Table 1). ORF52 is conserved in *gammaherpesvirinae* and encodes a small protein of ~20 kDa. In MuHV-4, ORF52 is essential for tegumentation and secondary envelopment [273, 298, 301, 390]. pORF52 seems to function as a dimer and the N-terminal α -helix is likely involved in interactions with other virion components [467] such as pORF33, pORF75, gM and gN in KSHV [292] and pORF42 in MuHV-4 [301]. Even if pORF52 is a very abundant component of MuHV-4 virion [298], its abundance in MuHV-4 could be overestimated by the emPAI value. Indeed, emPAI calculation integrates an intrinsic property of a protein which is the number of peptides that will be generated through trypsin digestion. However, the nature of the tryptic peptides and in particular their capacity to get ionized in the mass spectrometer ion source is not taken into account. pORF52 is a highly basic protein (pI around 10) and its tryptic peptides could be more efficiently ionized. These peptides could therefore appear as more abundant during mass spectrometry analysis. EmPAI has therefore to be considered as an estimation of the abundance. Within a sample,

the relative proportions have to be mainly used to classify proteins based on their abundance.

Based on emPAI analysis MuHV-4 pORF52 appears even tenfold more abundant in virion than BoHV-4 pORF52. However, mass spectrometry relies on *on the flight* selection by the instrument of most abundant peptides to be fragmented and identified. This selection can thus be biased by numerous experimental condition factors such as the efficiency of protein extraction or the method used for their separation. Therefore, comparison of quantitative data concerning different proteins in different biological matrices (BoHV-4 pORF52 and MuHV-4 pORF52) has to be considered cautiously and can be subject to numerous experimental bias. The main conclusion that can therefore be drawn from the analysis of pORF52 abundance in MuHV-4 and BoHV-4 [70] virion analyses is that pORF52 is the most abundant protein in virions of both species.

Finally, among these potential tegument proteins, 11 were copurified with capsids (Table 2). The two proteins that were not detected after removal of envelopes are pORF38 and pORF55. This could be linked to their low abundance as only a few peptides corresponding to these proteins were detected in entire virion samples. However, pORF38 was also not detected in a similar BoHV-4 capsid-tegument preparation [70]. This could be explained by the association of pORF38 with some envelope glycoproteins, as observed for its HSV-1 homologue pUL11 [468].

Envelope proteins. The approach used in this study allowed the detection of 9 MuHV-4 envelope proteins encoded by ORFs 4, 8, 22, 27, 28, 39, 47, 51 and 58. These proteins were categorized as such based on the extensive literature about them, on the presence of at least one predicted transmembrane domain (excepted for gL encoded by ORF47) and on their disappearance after removal of virus envelope (Tables 1 and 2). Comparison of the relative abundance of these proteins suggests that pORF4 (gp70), pORF8 (gB), pORF22 (gH), pORF27 (gp48), pORF28 and pORF39 (gM) have comparable abundance as their relative emPAI values (in comparison with pORF25, the major capsid protein) range from 19 to 46%. In contrast, the relative abundance of pORF47 (gL) was lower. As observed in other viruses, MuHV-4 gL associates with gH to form a heterodimer that plays a central role in virus binding

[118] and in membrane fusion [348]. Our previous results suggested that gH exists in two distinct forms at the surface of MuHV-4 virions, either in association or not with gL [348]. This fact could explain the difference of abundance between the two proteins that we observed in this study. The relative abundance of pORF51 (gp150) and pORF58 was also very low. In the case of gp150, this apparent low abundance could be due to the high degree of glycosylation of this protein as proposed for the homologous BoHV-4 gp180 [70]. Concerning pORF58, this could be linked to the low penetration of the protein in the electrophoresis gel (Fig. 4) or to the formation of protein aggregates as described above. Most of the detected envelope proteins appeared to be glycosylated (Fig. 4).

Similar to what we observed with BoHV-4 [70], we did not detect any peptide corresponding to gN which is encoded by ORF53 (Supplemental table 2). gN and gM form a complex in herpesviruses [447, 469] and gN is needed for the proper processing of gM. gN could dissociate from gM in mature virions as suggested for HCMV [168]. However, it is not the case here as gN was readily detected by western blotting on MuHV-4 virions even after proteinase K treatment (Fig. 2). The absence of gN in our analysis is therefore likely due to a detection failure by our mass spectrometry approach. Similarly to what was observed for KSHV and RRV, the viral G-protein coupled receptor encoded by ORF74 has not been found in MuHV-4 virions.

Finally, the protein encoded by the M3 gene was found in all our analyses of complete virions ($n > 10$) even after proteinase K treatment but not after deglycosylation (Table 1). M3 encodes a MuHV-4 specific secreted 44 kDa which is highly expressed during lytic infection [470]. This protein has a broad chemokine-binding activity [471, 472] and could prevent the migration of CD8⁺ T cells into sites where immunogenic latency antigens are expressed. In accord with this suggestion, M3 disruption resulted in reduced amplification of latently infected B cells [473, 474]. However, the effect on lytic replication was less clear [474, 475]. Our results suggest that M3 could be associated with the surface of MuHV-4 virions. Interestingly, glycoproteins G of alphaherpesviruses are chemokine-binding proteins that are present on the viral particle and on the plasma membrane of infected cells [476, 477]. Although gGs are virulence factors [478], the mechanisms beneath this phenotype remain unclear. Some reports highlighted a role in virus entry [479, 480]. MuHV-

4 M3 disruption did not lead to an apparent binding deficit in the cell-types that have been tested so far. In the future, binding of M3-deficient virions to a range of cell types will have to be tested.

Host proteins associated with MuHV-4 extracellular virions. Host proteins are frequently associated with the structure of virions from various families [381, 383]. Despite some exceptions [384], the functions of these proteins in virus biology are poorly characterized. Host proteins have also been found in most of the analyses of herpesvirus virion composition [70, 166, 168, 233, 275, 276, 291, 390, 441-445]. In our analysis of MuHV-4 virions, we found 31 cellular proteins that were detected in at least two of the three replicates (Table 3). Only 11 of these proteins were still detected after proteinase K-treatment (Table 3) and their relative abundances were quite low. Our results suggest therefore that cellular proteins are minor components of MuHV-4 virions. However, several of these proteins are small GTPases (Rab-1A, Rab-6A, Rab-14) or proteins linked to membrane organization and trafficking (VAMP3, Annexin A2) that could reveal the egress pathway used by MuHV-4.

Interestingly, Annexin A2 was also proposed as a constituent of several other herpesviruses (including KSHV, BoHV-4, AIHV-1, HSV-1, PRV and HCMV) as well as influenza [382], HIV-1 [481], papillomavirus [482] and Hepatitis C [483]. Annexin A2 is a 36 kDa Ca²⁺-regulated phospholipid binding protein which exists both free in the cytoplasm and associated with plasma membrane surfaces. Annexins can function as organizers of membrane domains and membrane recruitment platforms for proteins with which they interact [484]. The role of Annexin A2 in herpesvirus infection has mainly been studied with HCMV. Thus, Annexin A2 has been shown to associate with HCMV virions [485, 486] through specific interaction with gB [487, 488]. Although this association is well established, its functional importance is still subject to controversies. Some studies showed that virion incorporated Annexin A2 could accelerate fusion of membranes during entry [489] in accordance with the observation that some Annexin A2 specific antibodies could inhibit HCMV infection [490]. In contrast, other studies showed that Annexin A2 has no effect on HCMV entry into fibroblasts [491]. Our results similarly showed that despite being incorporated in MuHV-4 virions, Annexin A2 does not influence growth of this virus in mouse embryonic fibroblasts (Fig. 5). In the future, these results will have to be confirmed in other

cell types as the effect of Annexin A2 on MuHV-4 biology could be cell-specific as recently observed for HIV-1 [492].

In summary, we extended our comprehension of the composition of MuHV-4 virions in particular and of rhadinoviruses virions in general. We identified 31 viral proteins as constituents of MuHV-4 virions. Among these proteins, 30 were resistant to proteinase-K treatment. Based on the literature, it appears that this composition is very similar to those of BoHV-4 [70] and of RRV virions [233]. This therefore allowed us to draw a schematic MuHV-4 particle (Fig. 6) which is likely representative of the general architecture of rhadinoviruses. Moreover, we identified 31 cellular proteins as potential structural components of MuHV-4 virions. However these proteins were not abundant and one of them, Annexin A2, which has been detected in many herpesviruses, was non-essential to viral growth *in vitro*. In the future, these results could improve our knowledge about different steps of the biology of gammaherpesviruses.

Acknowledgements

We thank Prof. Katherine A. Hajjar (Weill Cornell Medical College, New York, NY, United States) for having kindly provided MEF cells from WT and Annexin A2-null mice. The authors thank Dr Philip Stevenson for helpful discussion and the technical team of the laboratory for excellent assistance.

Figure legends

Fig. 1: Assessment of MuHV-4 virion purity. The purity of the virions (i and ii) and capsid-tegument fractions (iii and iv) preparations was assessed by negative staining and electron microscopy. Scale bars are shown on the images.

Fig. 2: Sensitivity of viral proteins to proteinase K treatment of virions. Western blotting analysis of viral proteins in purified virions from mock (-) and proteinase K (+) treated samples. Gp150 and gN are type I transmembrane proteins which have a N-terminal domain predicted to be sensitive to proteinase K digestion.

Fig. 3: Proteogenomic map of MuHV-4 structural peptides. The 6 possible frames of the MuHV-4 genome (AF105037.1) translation are shown with rectangle indicating annotated ORFs. Red and blue ORFs represent forward and reverse frames respectively. Detected peptides are shown by bars whose the height is proportional to the number of detections. Genomic positions in bp are indicated.

Fig. 4: Analysis of MuHV-4 structural protein glycosylation. Control or deglycosylated proteins of purified MuHV-4 virions were separated by SDS-PAGE. After migration, each sample was divided in 30 serial slices along the lane and proteins of each slice were identified as described in the Materials and Methods. For the two treatments, slices containing M3, ORF4 (gp70), ORF8 (gB), ORF22 (gH), ORF27 (gp48), ORF28, ORF39 (gM), ORF47 (gL), ORF51 (gp150) and ORF58 proteins are shown with color intensity indicating the mean relative abundance (emPAI). For each lane, the abundances are expressed relatively to the band displaying the highest emPAI which is taken as 1. For each protein, predicted molecular mass is shown (theoretical lane). For the gB protein, the dashed slice indicated the predicted position of gB proteins before potential cleavage by cellular furin. The position of a MM standard is shown on the left.

Fig. 5: Growth of MuHV-4 on Annexin A2 deficient mouse embryonic fibroblasts. MEF cells from WT and Annexin A2-null mice were infected with BAC+ MuHV-4 virions at a MOI of 0.01 for multi-step assay as described in the Materials and Methods. Supernatants of infected cultures or infected cells were harvested at successive intervals and the amount of infectious virus determined by plaque assay on BHK-21 cells. Plaques were visualized by fluorescent detection of eGFP. The data presented are the average \pm SEMs for triplicate measurements. The data were analyzed by 2way ANOVA and Bonferroni posttests. MuHV-4 growths on these two different cell types were not statistically different.

Fig. 6: Schematic representation of the protein composition of mature extracellular MuHV-4 virions. Capsid proteins are represented as hexagons, tegument proteins as circles, envelope proteins as triangles. As the location of the M3 protein is unknown, it is represented as a putative structural protein (square). The predicted protein mass is directly proportional to their surface. The mean relative abundance (emPAI) determined by the different analyses of complete virions is indicated in color intensity (see scale).

Supporting information legends

Figure S1: Analysis of peptides identified in the different expression products of MuHV-4 ORF17-17.5 locus. The predicted product of expression of ORF17 and ORF17.5 and their respective cleavage products are represented by rectangles. Black bars indicate the tryptic fragments identified by mass spectrometry. Open triangles indicate protease cleavage sites.

Figure S2: Deglycosylation of MuHV-4 virions. Purified MuHV-4 virions were either left untreated (/) or deglycosylated (N-/O-) as indicated in the Materials and Methods. The samples were then immunoblotted with mAbs 3F7 (anti-gN), 58-16D2 (anti-gp70), MG-4D11 (anti-gB C-terminal end), MG-2C10 (anti-gB N-terminal end) or with rabbit polyserum raised against MuHV-4 virions.

Figure S3: Prediction of N-glycosylation sites for the different MuHV-4 protein sequences detected by our approach using the NetNglyc 1.0 and NetOglyc 3.1 algorithms. The red lines indicate significative threshold. Vertical blue lines indicate potential glycosylation sites.

Table S1: Comparison of MuHV-4 proteins identified in virions with other herpesviruses.

Table S2: Comparison of MuHV-4 proteins non-identified in virions with observations in other herpesviruses.

Fig. 1

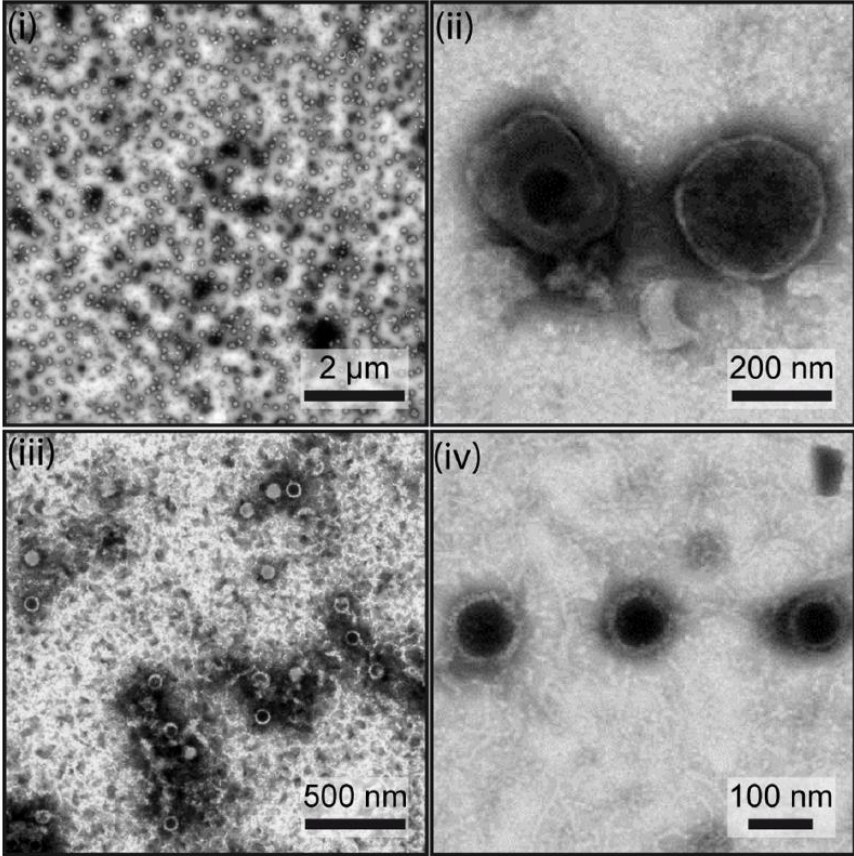


Table 1

ORF	Protein description	Predicted MM (kDa)	pK ^b	1D nanoLC-MS/MS ^a				Deglyco-1D nanoLC-MS/MS			
				No. of peptides ^c	Prot matches ^d	Coverage (%) ^e	empAI (% of max) ^{f,g}	No. of peptides ^c	Prot matches ^d	Coverage (%) ^e	empAI (% of max) ^{f,g}
M3	Chemokine binding protein	44.94	+	11	27	36.45	19				
ORF4	Glycoprotein gp70	42.98	+	9	72	22.68	28	1	3	2,58	2
ORF8^h	Glycoprotein B	96.53	+	33	121	53.00	28	29	141	49,12	58
ORF11	Potential tegument protein	43.07	+	12	64	53.09	27	4	10	20,10	9
ORF17	Minor scaffold protein (protease)	59.37	+	3	5	5.33	2				
ORF19	Capsid vertex-specific complex protein	57.71	+	8	23	20.93	9	4	9	12,79	6
ORF21	Thymidine kinase, potential tegument protein	72.85	+	39	471	68.01	80	14	65	29,04	25
ORF22	Glycoprotein H	83.75	+	29	173	40.96	46	15	82	31,10	22
ORF23	Egress protein	42.97	+	18	99	72.97	68	10	22	46,19	34
ORF25	Major capsid protein	154.38	+	76	526	71.30	100	49	554	51,27	100
ORF26	Triplex component	33.84	+	13	99	61.20	127	11	58	60,87	142
ORF27	Glycoprotein gp48	29.65	+	9	86	36.61	43	5	10	24,80	23
ORF28	Potential glycoprotein	8.59	+	1	17	18.67	19	1	3	18,67	21
ORF32	Capsid vertex-specific complex protein	50.64	+	2	17	8.78	2	2	2	6,98	3
ORF33	Teg. myristoylated protein binding protein	36.70	+	13	205	46.48	90	10	83	44,34	58
ORF36	Kinase	49.93	+	3	5	9.61	2	1	1	2,97	1
ORF38	Tegument myristoylated protein	8.34	+	1	4	10.67	7	1	2	10,67	9
ORF39	Glycoprotein M	43.91	+	9	137	19.84	36	7	60	18,80	19
ORF43	Capsid portal protein	64.61	+	2	2	4.23	1	1	1	4,06	1
ORF45	IRF-7 binding prot. pot. tegument protein	22.51	+	3	8	42.23	6				
ORF47	Glycoprotein L	15.35	+	4	15	48.18	14	2	10	24,82	26
ORF51	Glycoprotein gp150	50.03	+	1	30	5.18	3	1	3	5,18	1
ORF52	Tegument protein	14.85	+	12	417	64.44	5298	8	133	60,74	2312
ORF55	Tegument palmitoylated protein	21.01	-	2	4	25.79	4				
ORF58	Glycoprotein	40.62	+	2	2	6.05	1	1	1	3,17	2
ORF62	Triplex component	36.98	+	27	137	88.99	177	16	60	66,97	116
ORF63	Large tegument protein binding protein	103.31	+	2	3	2.66	1	1	1	1,77	1
ORF64	Tegument protein	274.62	+	15	32	12.94	2	6	20	3,62	2
ORF65	Small capsomer interacting protein	19.99	+	15	121	85.56	503	8	17	52,69	67
ORF75C	Tegument protein/v-FGAM-synthetase	147.26	+	52	656	54.35	46	36	478	39,47	52
ORF75B	Tegument protein/v-FGAM-synthetase	144.37	+	36	390	46.27	25	25	202	30,12	30

^aThis approach was accomplished in three independent biological replicates and results were pooled.

^bProteinase K treatment. +, proteins detected in the Proteinase K - 1D gel/nanoLC-MS/MS.

^cNumber of unique peptides identified per protein.

^dNumber of peptides detected per protein.

^eValues shown are the percentages of coverage of proteins by peptides.

^fempAI values were calculated as described by Ishihama *et al.* [42].

^gRelative empAI values were calculated as percentages of pORF25 abundance for each individual replicate and mean values were calculated.

^hProteins previously identified in MuHV-4 virions [26] are highlighted in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0083842.t001

Fig. 2

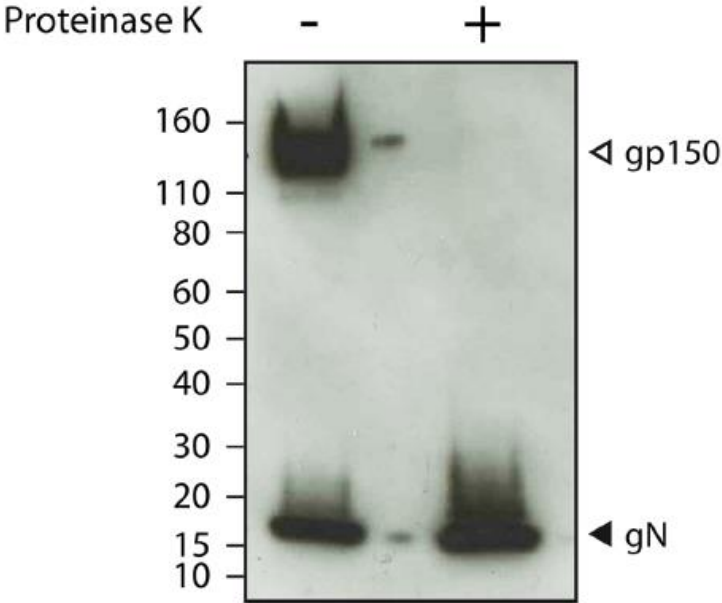


Table 2

ORF	Protein description	Predicted MM (kDa)	Proteinase K ^a	No. of peptides ^b	Prot matches ^c	Covergae ^d	emPAI (% of max) ^f	Expected relative abundance in capsid (%) ^g
ORF11	Potential tegument protein	43.07	+	11	31	52,32	14,04	
ORF17^h	Minor scaffold protein (protease)	59.37	+	7	35	14,34	3,16	15.7
ORF19	Capsid vertex-specific complex protein	57.71	+	10	28	31,20	7,02	up to 6.28
ORF21	Thimidine kinase	72.85	+	23	200	50,31	24,97	
ORF23	Egress protein	42.97	+	14	44	51,71	24,02	
ORF25	Major capsid protein	154.38	+	70	527	70,65	100,00	100
ORF26	Capsid triplex component	33.84	+	11	73	60,87	91,32	67
ORF32	Viral DNA cleavage/packaging protein (Capsid vertex-specific complex)	50.64	+	6	19	20,72	5,97	up to 6.28
ORF33	Tegument protein	36.70	+	9	45	44,04	12,79	
ORF36	Kinase	49.93	+	6	11	17,16	3,31	
ORF43	Portal protein	64.61	+	20	29	47,97	16,45	1.25
ORF52	Tegument protein	14.85	+	10	129	69,63	1066,10	
ORF62	Capsid triplex component	36.98	+	20	96	86,54	175,63	33.5
ORF63	Tegument protein	103.31	+	14	33	21,82	3,46	
ORF64	Tegument protein	274.62	+	41	78	25,56	3,96	
ORF65	Small capsomer interacting protein	20.00	+	11	77	75,81	282,00	94.2 ⁱ
ORF75C	Tegument protein/v-FGAM-synthetase	147.26	+	39	287	45,95	14,99	
ORF75B	Tegument protein/v-FGAM-synthetase	144.37	+	32	147	41,33	9,43	

^aProteinase K treatment. +, proteins detected in the Proteinase K - 1D gel/nanolC-MS/MS analysis of virions.

^bNumber of unique peptides identified per protein.

^cNumber of peptides detected per protein.

^dValues shown are the percentages of coverage of proteins by peptides.

^eemPAI values were calculated as described by Ishihama *et al.*, [42].

^fRelative emPAI values were calculated as percentages of pORF25 abundance.

^gAs described for HSV-1B- capsids by Baines *et al.*, [9].

^hPredicted capsid proteins are highlighted in bold.

ⁱOn the basis of full occupancy, i.e. one copy decorating each of 6 hexon tips.

doi:10.1371/journal.pone.0083842.t002

Fig. 3

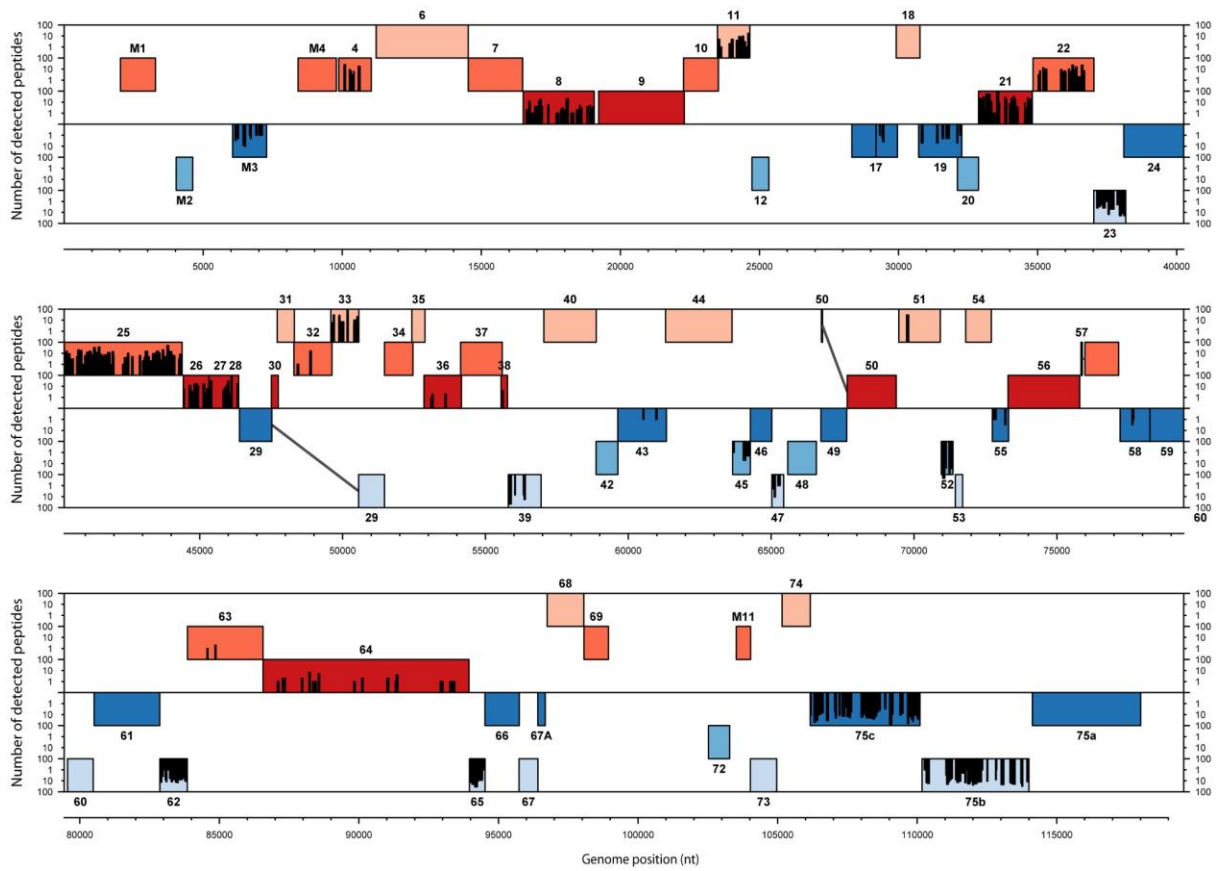


Fig. 4

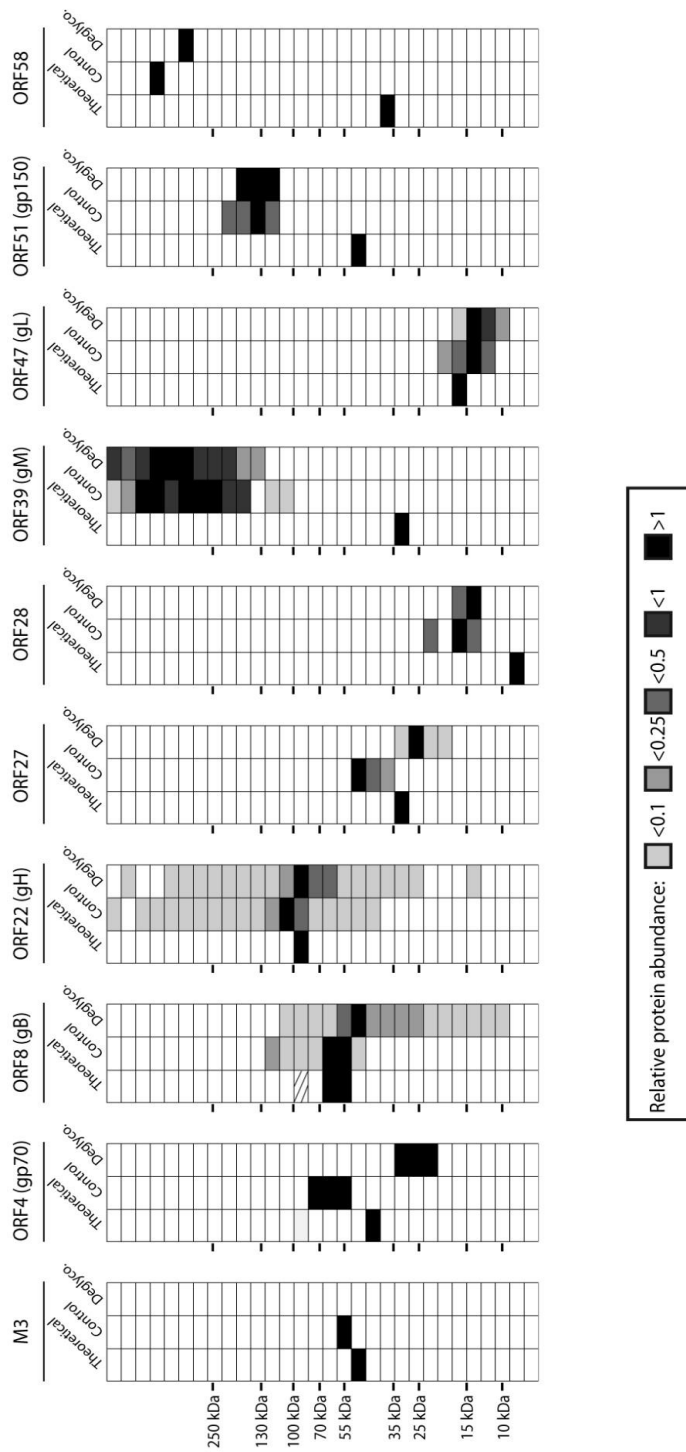


Table 3.

Protein description	Acc. N°	Relative eMPAI (%) ^a	pK ^d	<i>Gammapherpesvirinae</i>			<i>Alphaherpesvirinae</i>		<i>Beta</i> ^b	
				Rhadinoviruses		Maca ^b	Lymph ^b	Simpl ^b	Varicel ^b	Cyto ^b
				KSHV ^e	BoHV-4 ^e	AIHV-1 ^e	EBV ^e	HSV-1 ^e	PRV ^e	HCMV ^e
<i>Small GTPases</i>										
Rab-1A isoform 1	gi 4758988	9.7	-				+			
Rab-6A isoform 2	gi 13195674	10.3	+				+	+		
Rab GDP diss.inhib.beta-like	gi 354465044	0.9	+						+	
Immunity-ass.nucleotide 4	gi 13569476	1.2	-							
Vesicle transport protein	gi 344256341	2.0	-							
ADP-ribosylation factor 2	gi 6671571	8.7	-					+		
Ras-related protein Rab-14	gi 16758368	4.3	+					+		
<i>Signalling</i>										
Casein kinase II subunit beta	gi 7106277	3.1	-				+	+	+	
Annexin A3	gi 344255510	1.3	+							
CD 81 antigen	gi 194135609	10.5	-							
S/T-protein Pase PP1-alpha	gi 4506003	5.3	+					+	+	
Thy-1 membrane glycoprotein	gi 344240805	3.0	-					+		
<i>Cytoskeleton</i>										
Cofilin-2	gi 6671746	3.6	-				+		+	
Microtubule-ass prot.RP	gi 7106301	3.1	-							
Protein 88B	gi 109463441	0.4	-							
Moesin	gi 344240889	1.4	-	+			+			
Tetraspanin	gi 685221	1.8	-							
<i>DNA binding</i>										
Histone H2A type 1	gi 344240017	14.9	+							
Histone H4	gi 344240018	3.7	-			+				
<i>Membrane organization and trafficking</i>										
VAMP 3	gi 6678553	12.3	+					+		
Annexin A2 ^f	gi 6996913	8.3	+	+	+	+	+	+	+	
Annexin 1	gi 235879	2.0	-	+	+	+	+	+	+	
<i>Metabolism</i>										
GAPDH	gi 56188	2.2	+	+			+	+		
F1-ATPase beta subunit	gi 203033	1.3	-							
<i>Ion channel</i>										
VDAC-1	gi 344238883	2.8	-							
<i>Cell adhesion</i>										
Protein CLEC16A-like	gi 348584902	0.4	-							
<i>Protein folding and protease</i>										
PPIase A	gi 351706205	13.0	+							
Anionic trypsin-1 precursor	gi 6981420	4.3	+							
Polyubiquitin	gi 1050930	4.7	-						+	
GroEL-like type I chaperonin	gi 51452	0.8	-							
<i>Immunity</i>										
C4BP	gi 354471099	0.6	-							

^aRelative eMPAI values were calculated as the eMPAI values calculated for each analysis relatively to the abundance of pORF25 taken as 100%.

^bBeta-, Beta-herpesvirinae; Maca-, Macaviruses; Lymph-, lymphocryptoviruses; Simpl-, simplexviruses; Varicel-, varicelloviruses; Cyto-, cytomegaloviruses.

^cpK: Proteinase K treatment. +, proteins detected in the Proteinase K - 1D gel/nanoLC-MS/MS.

^dBased on previously published studies.

^eProteins previously identified in MuHV-4 virions [26] are highlighted in bold.

Fig. 5

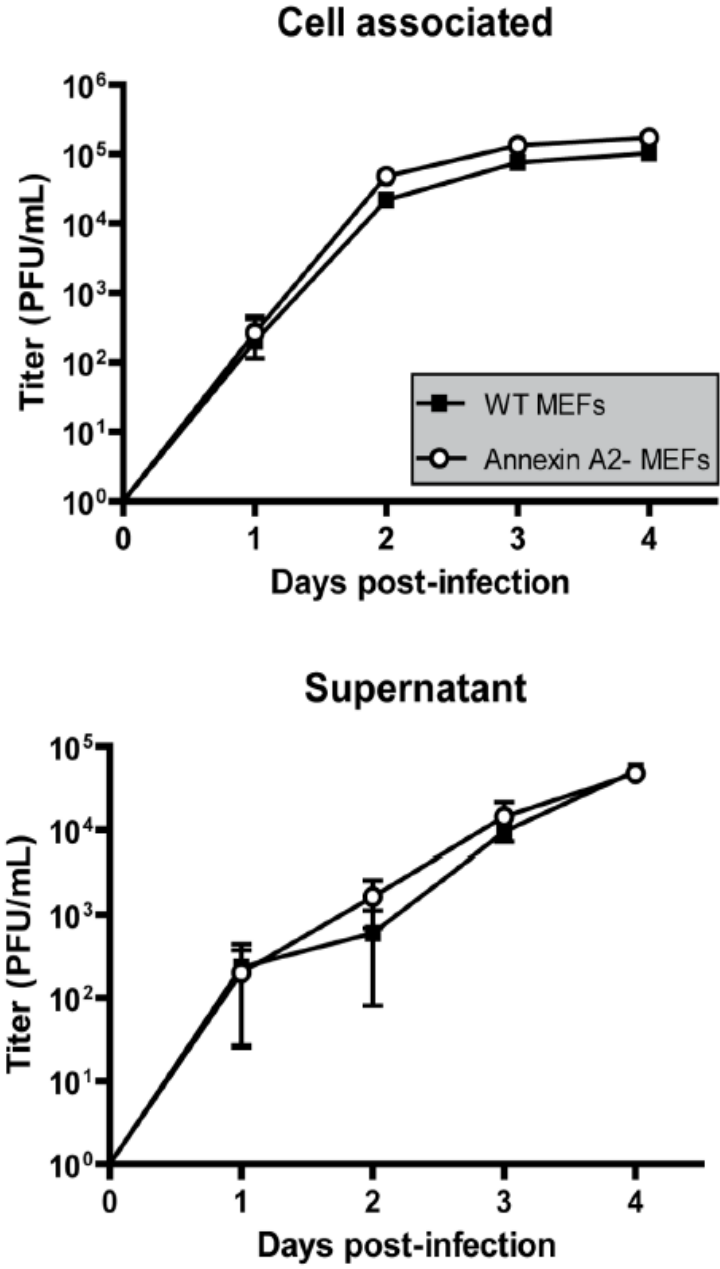


Fig. 6

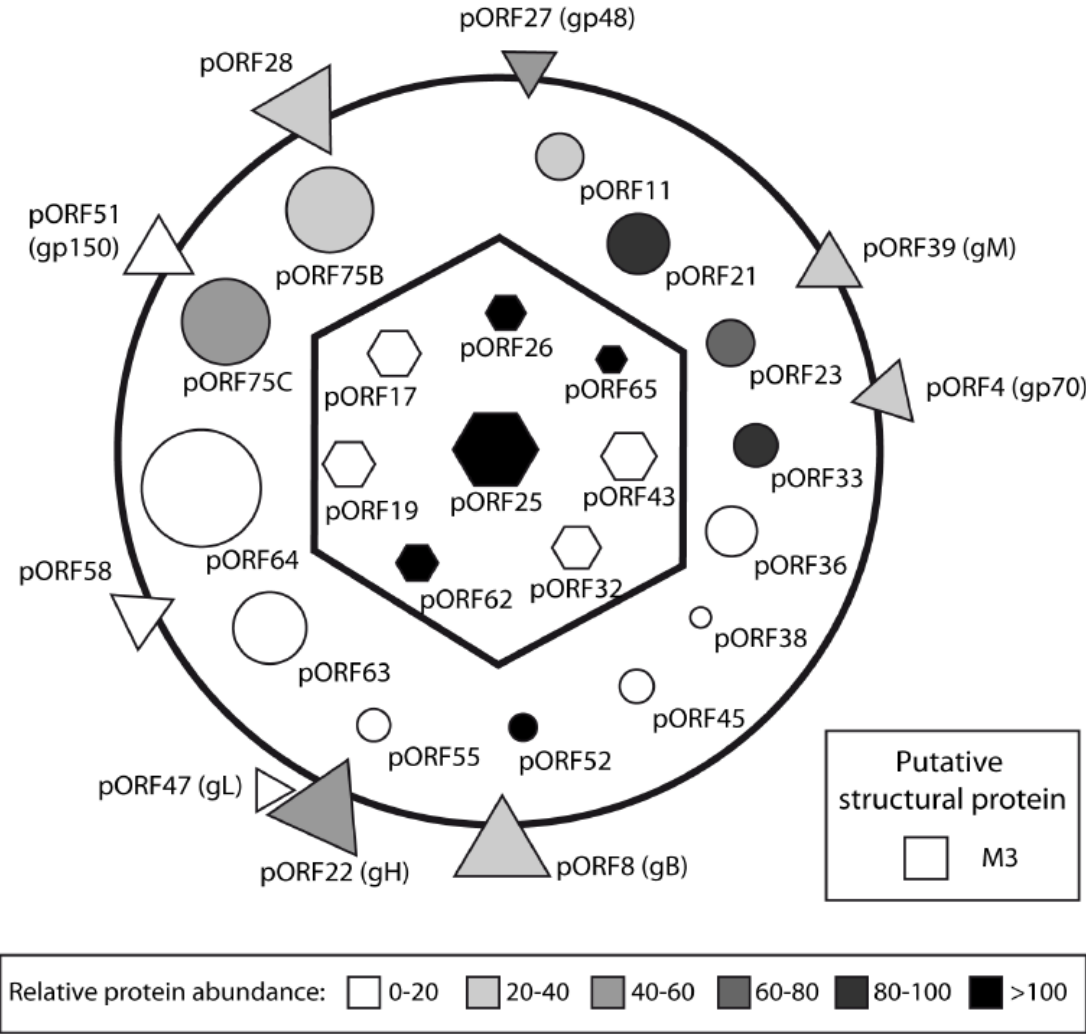


Fig. S1

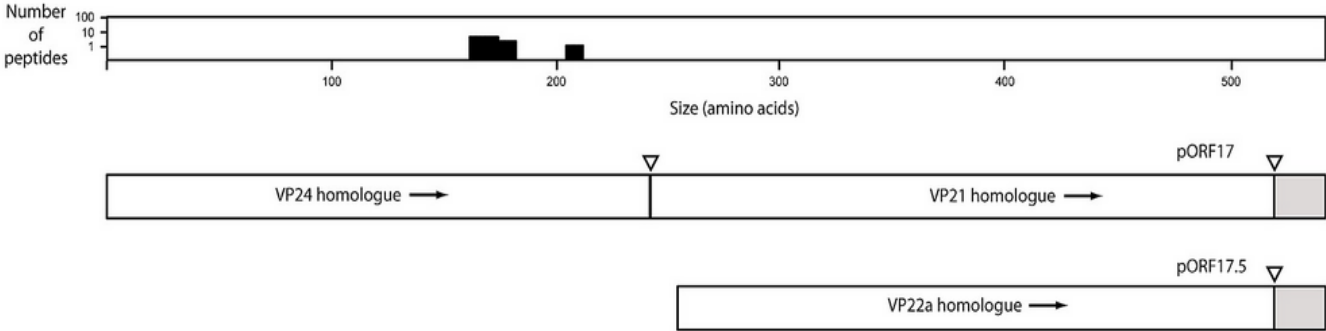


Fig. S2

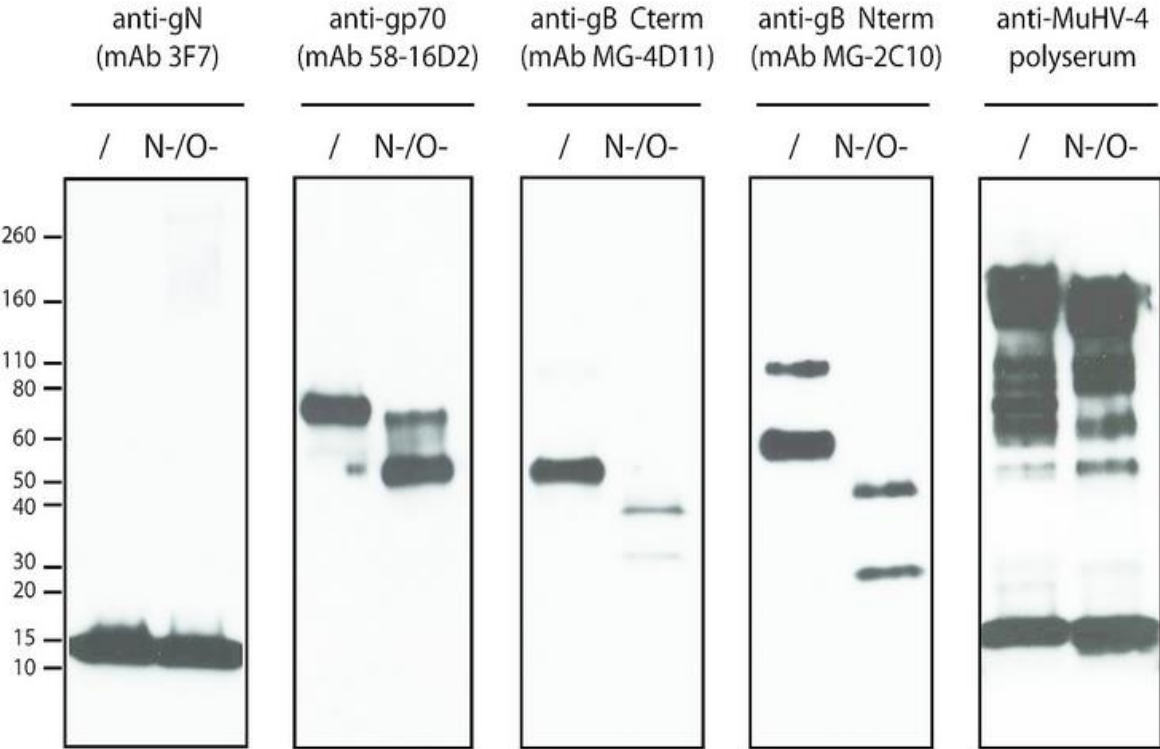


Fig. S3

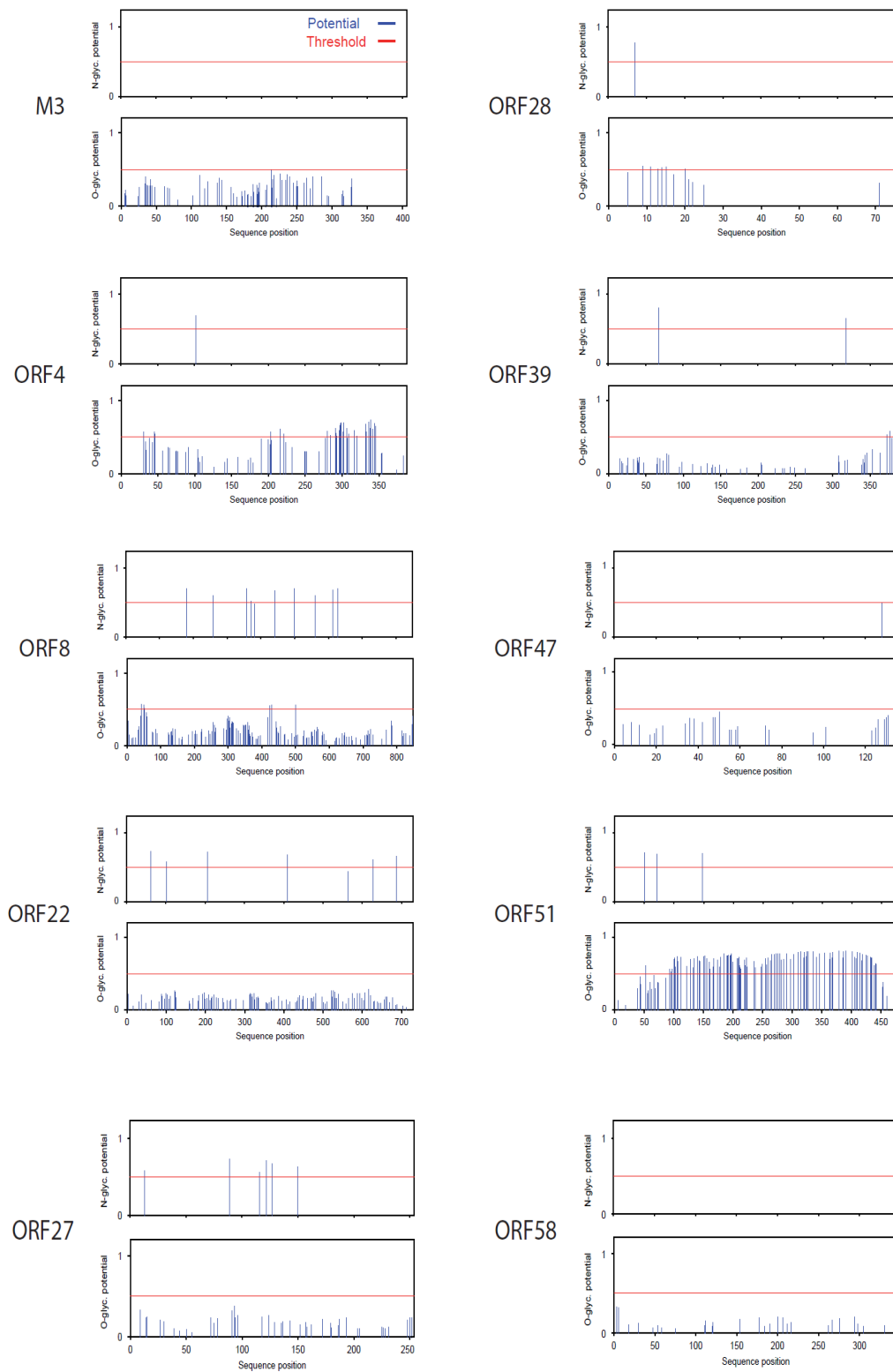


Table S1

ORF	Protein description	pK ^c	<i>Gamma-herpesvirinae</i>					<i>Alpha-herpesvirinae</i>		<i>Beta^b</i>
			Rhadinoviruses			Maca- ^b	Lymph- ^b	Simplex- ^b	Varicel- ^b	Cyto- ^b
			KSHV ^d	BoHV-4 ^d	RRV ^d	AIHV-1 ^d	EBV ^d	HSV-1 ^d	PRV ^d	HCMV ^d
<i>Capsids</i>										
ORF 17	minor scaffold protein (protease)	+	ORF17	ORF17	ORF17	ORF17	BVRF2	UL26	UL26	UL80
ORF 17.5	major scaffold protein	+	ORF17.5	ORF17.5	ORF17.5	ORF17.5	BdRF1	UL26.5	UL26.5	UL80.5
ORF 19	capsid vertex-specific complex protein	+	ORF19	ORF19	ORF19	ORF19	BVRF1	UL25	UL25	UL77
ORF 25 ^e	major capsid protein	+	ORF25	ORF25	ORF25	ORF25	BcLF1	UL19	UL19	UL86
ORF 26	triplex component	+	ORF26	ORF26	ORF26	ORF26	BDLF1	UL18	UL18	UL85
ORF 32	capsid vertex-specific complex protein	+	ORF32	ORF32	ORF32	ORF32	BGLF1	UL17	UL17	UL93
ORF 43	capsid portal protein	+	ORF43	ORF43	ORF43	ORF43	BBRF1	UL6	UL6	UL104
ORF 62	triplex component	+	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	BORF1	UL38	UL38	UL46
ORF 65	small capsomer interacting protein	+	ORF65	ORF65	ORF65	ORF65	BFRF3	UL35	UL35	UL48.5
<i>Envelope</i>										
ORF 4	Glycoprotein gp70	+	ORF4	n/e	ORF4	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e
ORF 8	glycoprotein B	+	ORF8	ORF8	ORF8	ORF8	BALF4	UL27	UL27	UL55
ORF 22	glycoprotein H	+	ORF22	ORF22	ORF22	ORF22	BXLF2	UL22	UL22	UL75
ORF 27	Glycoprotein gp48	+	ORF27	n/e	ORF27	ORF27	BDLF2	n/e	n/e	n/e
ORF 28	potential glycoprotein	+	ORF28	Bo9	ORF28	n/e	BDLF3	n/e	n/e	n/e
ORF 39	glycoprotein M	+	ORF39	ORF39	ORF39	ORF39	BBRF3	UL10	UL10	UL100
ORF 47	glycoprotein L	+	ORF47	ORF47	ORF47	ORF47	BKRF2	UL1	UL1	UL115
ORF 51	glycoprotein gp150	+	K8.1	Bo10	R8.1	A8	BLLF1	n/e	n/e	n/e
ORF 58	glycoprotein	+	ORF58	ORF58	ORF58	ORF58	BMRF2	n/e	n/e	n/e
<i>Tegument and unknown</i>										
M3	Chemokine-binding protein	+	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e
ORF 11	Potential tegument protein	+	ORF11	n/e	ORF11	ORF11	BILF4	n/e	n/e	n/e
ORF 21	thymidine kinase, potential tegument protein	+	ORF21	ORF21	ORF21	ORF21	BXLF1	UL23	UL23	n/e
ORF 23	Egress protein, tegument	+	ORF23	ORF23	ORF23	ORF23	BTRF1	UL21	UL21	UL88
ORF 33	Teg. myristoylated protein binding protein	+	ORF33	ORF33	ORF33	ORF33	BGLF2	UL16	UL16	UL94
ORF 36	kinase	+	ORF36	ORF36	ORF36	ORF36	BGLF4	UL13	UL13	UL97
ORF 38	tegument myristoylated protein	+	ORF38	ORF38	ORF38	ORF38	BBLF1	UL11	UL11	UL99
ORF 45	IRF-7 binding prot., pot. tegument protein	+	ORF45	ORF45	ORF45	ORF45	BKRF4	n/e	n/e	n/e
ORF 48	potential tegument protein	+	ORF48	ORF48	ORF48	ORF48	BRRF2	n/e	n/e	n/e
ORF 52	tegument protein	+	ORF52	ORF52	ORF52	ORF52	BLRF2	n/e	n/e	n/e
ORF 55	tegument palmitoylated protein	-	ORF55	ORF55	ORF55	ORF55	BSRF1	UL51	UL51	UL71
ORF 63	large tegument protein binding protein	+	ORF63	ORF63	ORF63	ORF63	BOLF1	UL37	UL37	UL47
ORF 64	tegument protein	+	ORF64	ORF64	ORF64	ORF64	BPLF1	UL36	UL36	UL48
ORF 75C	tegument protein/v-FGAM-synthetase	+	ORF75	ORF75	ORF75	ORF75	BNRF1	n/e	n/e	n/e
ORF 75B	tegument protein/v-FGAM-synthetase	+	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e

^a Proteins identified in other virions are highlighted in black. Proteins highlighted in grey have been detected in very low abundance.

^b *Beta-*, *Beta-herpesvirinae*; *Maca-*, Macaviruses; *Lymph-*, lymphocryptoviruses; *Simplex-*, simplexviruses; *Varicel-*, varicelloviruses; *Cyto-*, cytomegaloviruses.

^c Proteinase K treatment. +, proteins detected in the proteinase K – 1D gel/nanoLC-MS/MS analysis.

^d based on previously published studies [24-36].

^e Proteins previously identified in MuHV-4 virions [26] are highlighted in light grey.

Table S2

ORF	Protein description	Gammaherpesvirinae					Alphaherpesvirinae		Beta- ^b
		Rhadinoviruses			Maca- ^b	Lymph- ^b	Simplex- ^b	Varicel- ^b	Cyto- ^b
		KSHV ^c	BoHV-4 ^c	RRV ^c	AIHV-1 ^c	EBV ^c	HSV-1 ^c	PRV ^c	HCMV ^c
<i>Envelope</i>									
ORF 53	Glycoprotein N	ORF53	ORF53	ORF53	ORF53	BLRF1	UL49.5	UL49.5	UL73
<i>Tegument and unknown</i>									
ORF 6	Single-stranded DNA-binding protein MDBP	ORF6	ORF6	ORF6	ORF6	BALF2	UL29	UL29	UL57
ORF 7	Terminase	ORF7	ORF7	ORF7	ORF7	BALF3	UL28	UL28	UL56
K3	Homolog of KSHV K5 (E3 ubiquitin ligase)	K5	Bo5	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e
ORF 9	DNA polymerase	ORF9	ORF9	ORF9	ORF9	BALF5	UL30	UL30	UL54
ORF 10	dUTPase related protein	ORF10	ORF10	ORF10	ORF10	n/e	n/e	n/e	n/e
ORF 20 ^d		ORF20	ORF20	ORF20	ORF20	BXRF1	UL24	UL24	UL76
ORF 24		ORF24	ORF24	ORF24	ORF24	BcRF1	n/e	n/e	UL87
ORF 29	Terminase	ORF29	ORF29	ORF29	ORF29	BGRF1	UL15	UL15	UL89
ORF 35	Potential tegument protein (UL14 homol)	ORF35	ORF35	ORF35	ORF35	BGLF3.5	UL14	UL14	UL95
ORF 42	Potential tegument protein (UL7 homologue)	ORF42	ORF42	ORF42	ORF42	BBRF2	UL7	UL7	UL103
ORF 46	Uracyl DNA glycosylase	ORF46	ORF46	ORF46	ORF46	BKRF3	UL2	UL2	UL114
ORF 48	Potential tegument protein	ORF48	ORF48	ORF48	ORF48	BRF2	n/e	n/e	n/e
ORF 49		ORF49	ORF49	ORF49	ORF49	BRF1	n/e	n/e	n/e
ORF 54	dUTPase	ORF54	ORF54	ORF54	ORF54	BLLF3	UL50	UL50	UL72
ORF 57	Posttranscriptional regulatory protein	ORF57	ORF57	ORF57	ORF57	BMLF1	UL54	UL54	UL69
ORF 59	DNA replication protein (Processivity factor)	ORF59	ORF59	ORF59	ORF59	BMRF1	UL42	UL42	UL44
ORF 60	Ribonucleotide reductase small subunit	ORF60	ORF60	ORF60	ORF60	BaRF1	UL40	UL40	n/e
ORF 61	Ribonucleotide reductase large subunit	ORF61	ORF61	ORF61	ORF61	BORF2	UL39	UL39	UL45
ORF 67	Tegument protein	ORF67	ORF67	ORF67	ORF67	BFRF1	UL34	UL34	UL50
ORF 67.5	Terminase	ORF67.5	ORF67.5	ORF67.5	ORF67.5	BBRF1	UL33	UL33	UL51
ORF 68		ORF68	ORF68	ORF68	ORF68	BFLF1	UL32	UL32	UL52

^a Proteins identified in other virions are highlighted in black. Proteins highlighted in grey have been detected in very low abundance.

^b Beta-, Beta-herpesvirinae ; Maca-, Macaviruses ; Lymph-, lymphocryptoviruses ; Simplex, simplexviruses ; Varicel-, varicelloviruses ; Cyto-, cytomegaloviruses.

^c based on previously published studies [24-36].

^d Proteins previously identified in MuHV-4 virions [26] are highlighted in light grey.

Discussion

Les *Gammapherpesvirinae* sont responsables de pathologies importantes tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine justifiant que la communauté scientifique tente de développer de nouvelles approches pour contrer ces infections. De manière générale, les stratégies antivirales prophylactiques et thérapeutiques se basent majoritairement sur la vaccination et sur l'utilisation de molécules antivirales respectivement.

Dans le cadre des *Gammapherpesvirinae*, aucun vaccin n'est actuellement sur le marché bien qu'un vaccin soit actuellement en développement à l'encontre de l'EBV. Celui-ci est basé sur la glycoprotéine gp350 qui est une protéine parmi les plus abondantes de l'enveloppe virale. Dans une étude de phase II, ce vaccin a permis de réduire significativement l'incidence de la mononucléose infectieuse (se manifestant lors d'infections primaires à EBV) mais n'a pas permis de réduire le taux d'infection chez les personnes vaccinées [493]. Ceci peut être mis en parallèle avec le fait qu'une souche virale n'exprimant pas gp350 ne présente pas de défaut d'infection pour les cellules épithéliales et que par ailleurs des anticorps dirigés contre gp350 augmentent même l'infection de ces cellules [494, 495]. Il faut par ailleurs souligner que, malgré de nombreux efforts, le seul vaccin commercialisé à ce jour à l'encontre d'un herpesvirus est une souche vaccinale atténuée Oka du virus de la varicelle et du zona. Il est en effet fort difficile de développer un vaccin à l'encontre de ces virus étant donné leur phase silencieuse de latence et les nombreux mécanismes d'immuno-évasion qu'ils ont développés. Le développement de vaccins à l'encontre des gammaherpèsvirus est donc un challenge particulièrement difficile [496].

En ce qui concerne les antiviraux, les traitements prédominant pour traiter les infections à *Herpesviridae* sont des analogues nucléosidiques qui agissent uniquement pendant la phase lytique du cycle viral. Ils sont activés au sein du virus par la thymidine kinase virale ou les protéines kinases sérine/thréonine, c'est le cas de l'acyclovir ou du gancyclovir. Ces drogues ne sont pas efficaces durant la latence et n'ont donc que peu d'effet sur les cancers associés aux infections virales herpétiques puisque ceux-ci sont eux-

mêmes associés à la phase latente (phase pendant laquelle les protéines virales cibles et la thymidine kinase ne sont pas exprimées) [497]. Par ailleurs, un des problèmes majeur de ces molécules est le développement de résistances à leur rencontre, ce qui est observé relativement fréquemment pour les l'HSV-1, l'HHV-3 et l'HCMV [498]. Bien que des souches d'EBV ou de KSHV résistantes à ces traitements n'aient pas encore été isolées de patients infectés, le développement de résistances est néanmoins également possible chez les *Gammaherpesvirinae* comme récemment démontré *in vitro* [499].

Le développement de nouvelles stratégies à l'encontre de ces virus est donc essentiel. Ainsi de nouvelles molécules thérapeutiques ciblent les protéines kinases cellulaires impliquées dans le cycle des *herpesviridae* (Figure 38). C'est le cas par exemple du Dasatinib, un inhibiteur du récepteur kinase EphA2 du KSHV [121, 124] et de différentes kinases intervenant dans le cycle biologique de l'EBV, qui a été utilisé récemment en phase I dans le cadre de maladie cancéreuse de type lymphome, dont les lymphomes dérivés de l'EBV [497]. Le Sorafenib, également inhibiteur de récepteurs tyrosine kinase (Platelets derived growth factors ou PDGRFs) endothéliaux, a été testé en phase I/II pour le traitement des cancers associés au KSHV [500]. Par ailleurs, certaines protéines kinases virales sont actuellement testées comme cibles thérapeutiques en phase III. C'est le cas en ce qui concerne le Maribavir, un inhibiteur de l'UL97 du HCMV (homologue de l'ORF36 du KSHV et du BGLF4 de l'EBV) [501].

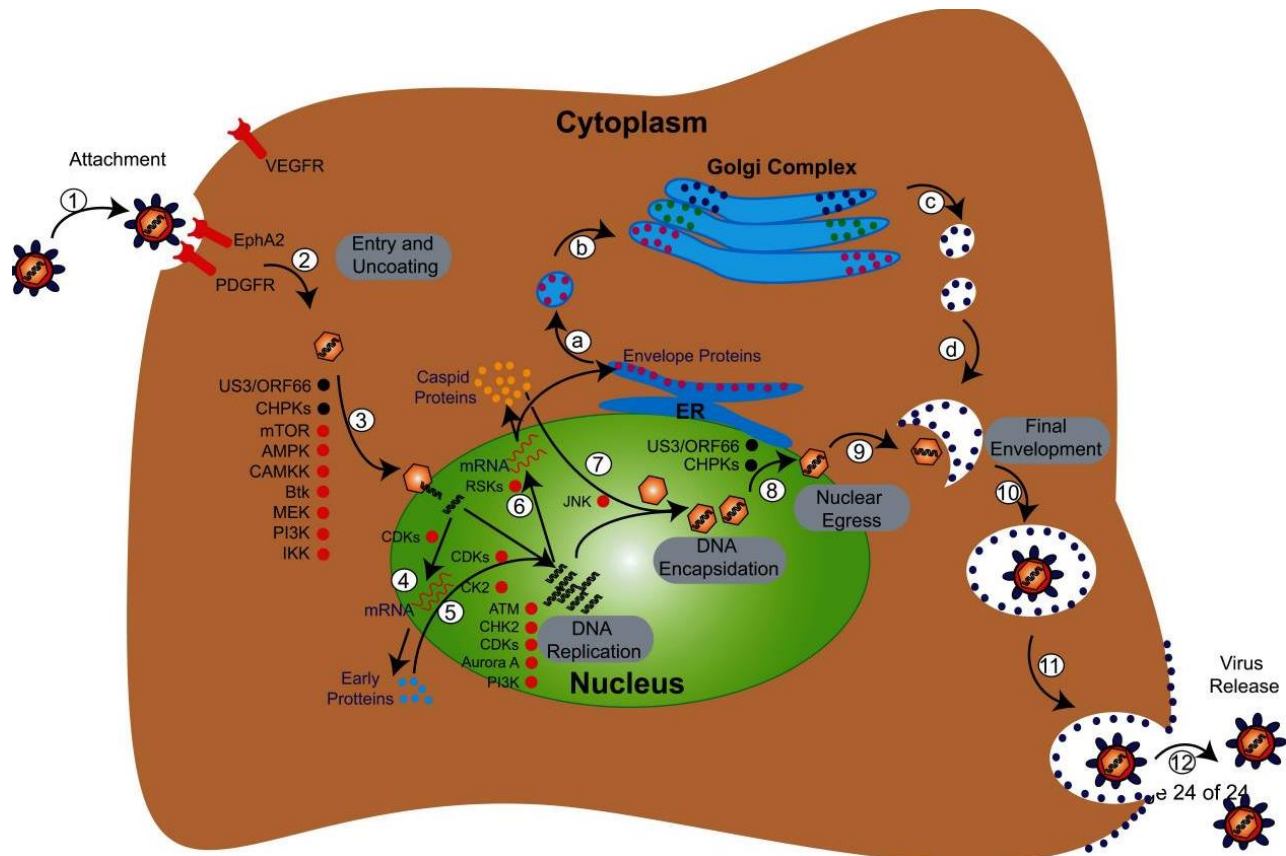


Figure 38. Les protéines kinases impliquées dans le cycle des *Herpesviridae*. 1. Les glycoprotéines virales lient les récepteurs cellulaires membranaires (tyrosine kinase PDGFR et EphA2 qui sont les récepteurs du HCMV et du KSHV respectivement). 2. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. 3. La nucléocapside associée aux éléments du cytosquelette transite vers le noyau où elle interagit avec les pores nucléaires et libère le génome viral dans le noyau. 4. L'ADN viral est transcrit précocement en ARNm qui est transporté vers le cytoplasme pour assurer la synthèse des protéines précoces. 5. Ces protéines sont importées dans le noyau pour promouvoir la réplication de l'ADN viral. 6. L'ADN viral est ensuite transcrit en ARNm tardifs codant pour les protéines tardives (protéines de capsid et d'enveloppe). (a-d : les protéines d'enveloppe - cercles roses, verts et bleus - subissent des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et le golgi). 7. Les protéines de capsid sont importées dans le noyau pour empaqueter le génome viral. 8-10. Ces capsides sortent ensuite du noyau via des vésicules d'exocytose selon un processus d'enveloppement - dé-enveloppement- ré-enveloppement. Les virions enveloppés se retrouvant alors dans des vésicules d'exocytose. 11. Ces vésicules migrent alors et fusionnent avec la membrane de la cellule. 12. Les virus infectieux sont ainsi libérés hors de la cellule. Seules les protéines kinases virales (en noir) et cellulaires (cercles rouges) impliquées dans le cycle viral sont indiquées (étape 2-9). Les protéines virales et cellulaires impliquées dans les étapes a-d et 10-12 doivent encore être identifiées. A titre d'exemple, l'Everolimus, un inhibiteur de mTOR, est actuellement étudié en phase I dans le traitement des maladies liées à l'EBV ; le PCI-32765, un inhibiteur de la protéine Btk, est utilisé en phase II et III, toujours pour contrer l'EBV ; le Sorafenib (BAY 43-9006) décrit dans le texte, est en phase I pour les pathologies liées au KSHV; ou encore le Gleevec (ou Glivec), depuis plusieurs années déjà employé comme traitement reconnu dans la leucémie myéloïde chronique, est actuellement à l'étude en phase II pour les pathologies liées au KSHV. D'après Li. et al. [497].

Comme l'illustre la Figure 38, une connaissance détaillée des différentes étapes du cycle viral et des protéines cellulaires impliquées est un préalable essentiel au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'encontre des *Gammaherpesvirinae*. Néanmoins, la plupart d'entre eux sont difficilement étudiables étant donné leur croissance limitée *in vitro* ou l'absence de modèle *in vivo* facilement accessible au laboratoire. Le MuHV-4 offre la possibilité d'étudier *in vitro* et *in vivo* la pathogenèse des *Gammaherpesvirinae* comme cela a largement été décrit dans l'introduction de ce travail [74, 78]. Bien qu'étudié depuis de nombreuses années, peu de choses sont connues en ce qui concerne les récepteurs impliqués dans l'entrée de ce virus, les protéines intracellulaires impliquées dans le cycle viral ou les protéines hôtes embarquées au sein de la particule virale. Dans ce travail, nous avons souhaité identifier d'une part les protéines cellulaires impliquées soit dans l'entrée soit dans le parcours intracellulaire du virus par la technique de l'interférence à ARN. D'autre part, nous avons voulu identifier de manière précise par spectrométrie de masse, les protéines virales et cellulaires composant la particule virale du MuHV-4.

High throughput screening par ARNs interférents.

Les avancées récentes dans les technologies de screening à haut débit (*High throughput screening* ou HTS) ont accéléré l'identification et la caractérisation de facteurs potentiellement impliqués dans les interactions hôtes-virus et orientant vers des axes thérapeutiques prometteurs. Ainsi, la dernière décennie a fourni une pléthore d'exemples d'HTS visant à identifier les protéines cellulaires impliquées dans les cycles de différents virus. Beaucoup de ces études ont utilisé la technique des ARNs interférents [502]. Plusieurs techniques sont disponibles pour utiliser l'interférence à ARN dans les cellules de mammifères. Bien que nous n'ayons présenté qu'une seule technique dans cette thèse, deux approches ont été utilisées et sont résumées à la figure 39.

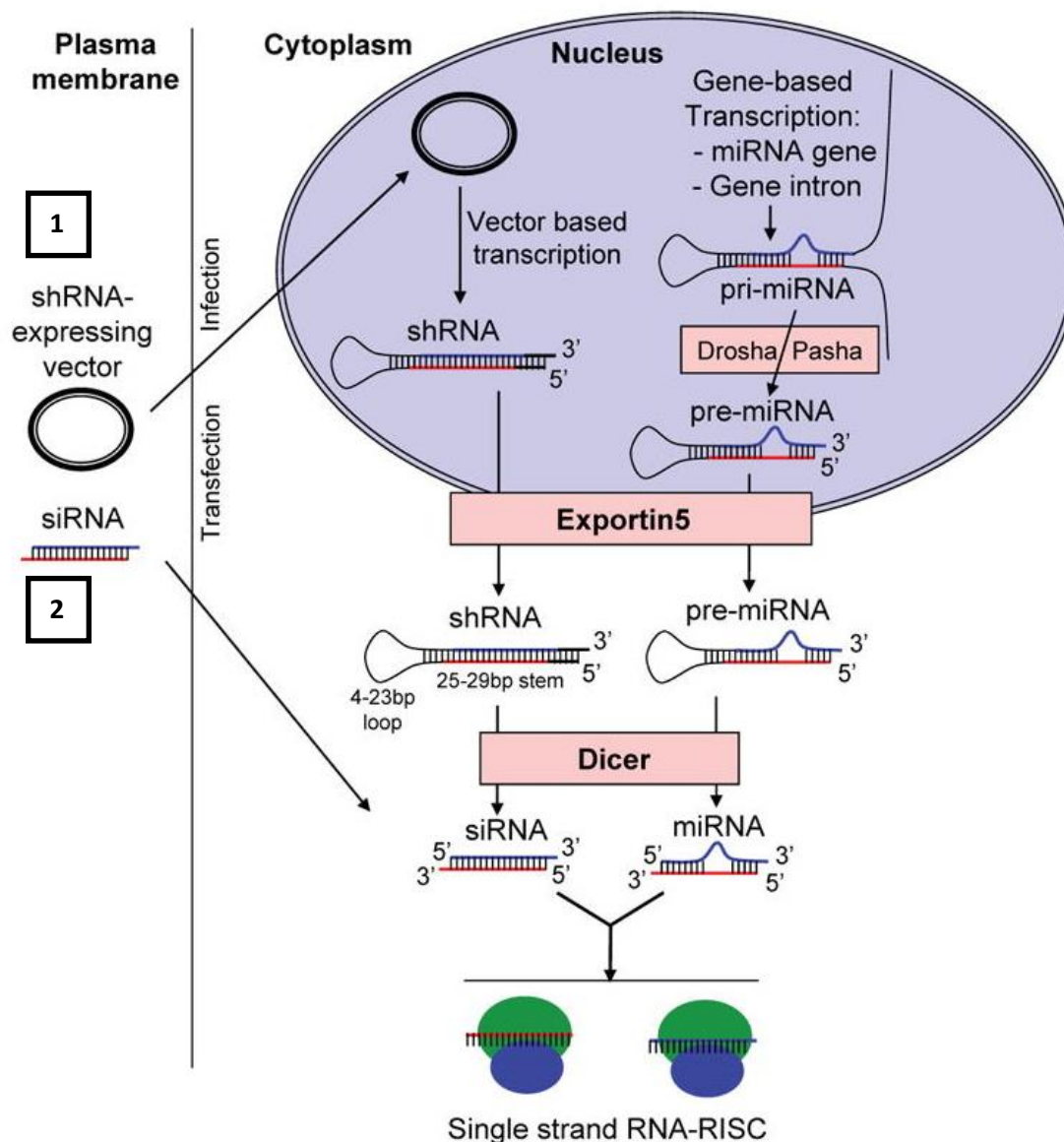


Figure 39. Modèles d'ARN interférences dans les cellules de mammifères. Les molécules d'ARN impliquées dans les voies d'ARN interfèrent d'origine artificielle incluent la transfection de siRNA et l'expression de shRNA à partir de vecteurs ou de sources endogènes dans lesquelles les gènes des miRNAs codent pour un pré-miRNA. Le complexe protéique Drosha/Pasha clive le pri-miRNA pour générer un ou plusieurs pré-miRNA. Les shRNA et les pré-miRNA sont transportés dans le cytoplasme par un mécanisme impliquant l'exportine 5. La RNAase III du complexe Dicer clive ensuite les shRNA et le pré-miRNAs en siRNA matures et miRNA matures respectivement. siRNA et miRNA simples brins sont incorporés dans le complexe RISC et servent de support au clivage de l'ARNm cible, pour l'inhibition de sa traduction ou sa destruction, selon le degré et le type de complémentarité. Les deux méthodes que nous avons testées dans ce travail sont indiquées par des chiffres. 1. GeneNet lentiviral SiRNA library, System Biosciences, basée sur la transfection de vecteurs shRNA. 2. La transfection de siRNA par rétrotransfection via des plaques précoatées synthétisées par le laboratoire européen de biologie moléculaire de Heidelberg (EMBL, Prof. R. Peperrekok, Allemagne). D'après Sigoillot et al. [503].

Afin d'identifier les protéines cellulaires impliquées dans le cycle du MuHV-4, nous avons successivement utilisé deux approches. Dans un premier temps, nous avons utilisé une librairie commerciale de shRNAs dirigés contre l'ensemble des gènes murins (GeneNet lentiviral SiRNA library, System Biosciences, <http://www.systembio.com/rnai-libraries>) [504]. Dans cette approche, un « pool » de différents shRNAs ciblant l'entièreté des gènes exprimés par une cellule a été introduit aléatoirement dans une population cellulaire (3T3) via des vecteurs lentiviraux reconstitués. Après infection par une souche de MuHV-4 recombinante exprimant l'eGFP, les cellules non infectées (eGFP négatives) ont alors été triées par cytométrie en flux, ces cellules étant en effet potentiellement résistantes à l'infection. Après amplification clonale de ces cellules triées et purification de leur ADN génomique, nous avons tenté d'identifier les séquences de ces shRNAs à l'aide de deux couples d'amorces externes à ces séquences fournies par la firme. Les résultats n'ont pas répondu à nos attentes. Premièrement, nous n'avons obtenu qu'un nombre limité de clones cellulaires résistants à l'infection contrairement à ce qui pouvait être supposé. Deuxièmement, l'étude de ces cellules a montré que dans tous les cas, c'est l'attachement du virus à la cellule hôte qui était compromis (Figure 40). Ceci nous a surpris compte tenu de la variabilité génétique de la banque et de la variabilité des quelques gènes identifiés. Il était en effet peu probable que chacun de ces gènes intervienne dans l'attachement du virus à la cellule cible. Cette observation est potentiellement due au fait que les cellules résistantes ont dû être amplifiées avant et après le tri alors que le protocole expérimental ne nécessitait pas, en théorie, cette étape. De ce fait, nous avons probablement introduit un biais dans

l'étude et sélectionné des clones résistants à l'infection qui n'avaient pas incorporé de shRNA. Cette résistance à l'infection étant potentiellement due à une moindre expression de molécules d'héparan sulfate comme observé précédemment dans une étude de *gene-trapping* [505]. Une explication potentielle de ces mauvais résultats pourrait résider dans le design des shRNAs incorporés dans cette banque. En effet, ceux-ci ont été définis sur base de leur homologie avec les séquences des sondes reprises au sein d'une puce de microarray (Affymetrix mouse GeneChip array) normalement utilisée pour identifier les shRNAs d'intérêt à la fin du protocole expérimental. Ceci entraîne donc une contrainte et on peut donc supposer que le design des shRNAs n'est pas optimal. Il faut à ce titre souligner le nombre relativement réduit de publications pour une technique à priori fort séduisante.

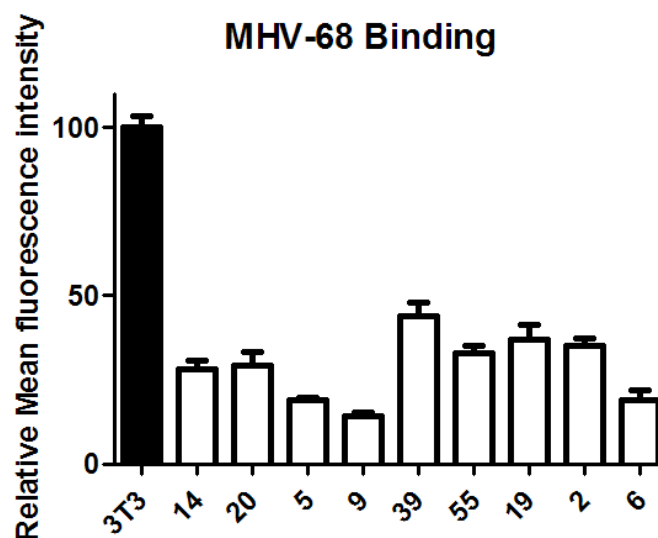


Figure 40. Etude de l'attachement du MuHV-4 aux différents clones obtenus lors de l'étude utilisant la GeneNet lentiviral SiRNA library. Des cellules 3T3 sauvages ou triées et clonées sur base de leur résistance à l'infection par le MuHV-4 (les différents clones sont identifiés par des numéros) ont été détachées de leur support et incubées à 4°C avec une souche de MuHV-4 exprimant l'eGFP en association avec la glycoprotéine M, donnant ainsi lieu à des particules virales fluorescentes (MOI=30). Cette incubation à basse température permet aux virus de s'attacher mais pas de pénétrer dans la cellule. Après deux heures d'incubation, les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et analysées par cytométrie en flux. Les intensités moyennes de fluorescences sont représentées relativement à l'intensité moyenne de fluorescence mesurée pour les cellules sauvages. Les données présentées sont des moyennes de triplicats réalisés en parallèles +/- l'erreur standard de la moyenne.

Dans un deuxième temps, face aux difficultés rencontrées lors de la première approche, nous avons voulu réaliser un screening plus classique basé sur la transfection de manière individuelle d'une banque de siRNAs synthétiques ciblant l'entièreté des gènes

cellulaires (première étude de cette thèse). Bien que conceptuellement plus simple, cette méthode est néanmoins plus chère et requiert une grande expertise technique. Nous avons donc voulu réaliser cette approche en collaboration avec le Prof. R. Pepperkok (*EMBL and ViroQuant-CellNetworks RNAi screening core facility*, Université d'Heidelberg, Allemagne), qui est un des expert dans le domaine [412, 413]. Différentes mises au point ont été réalisées parmi lesquelles la validation de l'étude d'un virus murin sur des cellules humaines (HeLa Kyoto fournies par le laboratoire pour lesquelles la technique avait été validée [413]).

Pour étudier la sensibilité cellulaire à l'infection virale, nous avons mesuré l'expression de l'eGFP directement sur les cellules transfectées par les siRNA. En effet, l'eGFP est sous la dépendance du promoteur IE de l'HCMV et est donc exprimée par la cellule infectée dès l'injection du matériel génomique viral dans le noyau et ainsi, durant la phase précoce de l'infection.

Notre étude a permis d'identifier plusieurs dizaines de gènes dont l'inhibition influence positivement ou négativement la réplication virale. Bien que certaines étapes de validations ont déjà été entreprises, il sera nécessaire dans un futur proche de compléter cette approche par l'analyse détaillée de ces gènes, ce qui, dans le cadre de cette thèse, n'était pas faisable ni dans le temps ni dans le budget impartis. Une discussion au sujet de ces différentes protéines cellulaires a déjà été entreprise dans la discussion de cette étude et ne sera donc pas reprise ici. Par contre, certaines critiques peuvent être adressées à la technique. En effet, bien que cette technique ait été souvent utilisée avec succès pour identifier des facteurs hôtes requis par de nombreux virus, elle est également connue pour comprendre certains biais et induire l'identification de nombreux faux positifs et faux négatifs. Les résultats fournis par ces études doivent donc être considérés avec précaution [502].

Premièrement, une des limites de notre approche est qu'elle utilise des cellules d'origine humaine alors que le MuHV-4 est un virus de rongeur. Cependant, le MuHV-4 est classiquement cultivé en cellules BHK-21, qui sont des cellules de hamster et donc pas des cellules de l'hôte naturel dont l'identité demeure à ce jour controversée [78]. Sur base de ces informations, nous avons donc considéré que, bien que réalisée sur des cellules humaines,

l'utilisation d'une technique éprouvée pouvait apporter plus d'avantages que d'inconvénients pour notre approche.

Deuxièmement, nous pouvons faire remarquer que l'application de cette technique à l'étude d'une infection virale ne doit pas s'aborder de la même façon qu'une étude portant sur des processus cellulaires physiologiques. Ceci est sans doute particulièrement vrai pour l'étude du cycle biologique des herpèsvirus. En effet, ceux-ci ont la capacité d'utiliser différentes voies d'entrée au sein de la cellule infectée. Dès lors, une technique basée sur l'inactivation de l'expression de gènes uniques peut être inappropriée pour ces virus puisque ceux-ci sont sans doute capables de se servir de voies d'entrée alternatives et multiples pour se répliquer. Une technique capable d'identifier des différences faibles de taux d'infection ou de réplication est donc sans doute indispensable. Cette remarque générale pourrait expliquer que bien que les herpèsvirus constituent une famille importante de virus en médecine humaine ou vétérinaire, aucune étude basée sur un screening à haut débit utilisant la technique d'interférence à ARN n'a été publiée à ce jour pour ces virus.

Troisièmement, les résultats obtenus grâce à l'interférence à ARN doivent être interprétés avec prudence et considérés comme des résultats frustes. En effet, ceci est illustré notamment par une méta-analyse réalisée sur les gènes humains impliqués dans la réplication du HIV reprenant 3 études indépendantes [506]. La première étude, celle de Brass et al. [393], parue dans *Sciences*, a identifié 274 gènes sur un pool de 21000 siRNAs. 237 gènes sur les 274 n'étaient pas connus pour avoir un lien avec la réplication du HIV. Dans la seconde étude, publiée dans *Cell*, König et al. [395] identifièrent 2400 gènes impliqués dans l'infection par le HIV et, en utilisant successivement différents types de filtres, ils ont retenu 295 gènes dont la déplétion par un siRNA inhibait l'infection par le HIV de plus de 45% par rapport au screening initial. La troisième étude parue dans *Cell Host and Microbe* [408] a permis à Zhou *et al.* d'identifier 224 gènes. Les gènes identifiés dans ces trois études sont impliqués dans des fonctions biologiques aussi diverses que la voie de signalisation par le NF- κ B, la fonction mitochondriale, le métabolisme énergétique, les complexes protéiques concernant la transcription par la polymérase-II, ou encore le transport golgien, la glycosylation ou l'autophagie. Au premier abord, ces études semblent séduisantes. En effet, dans chacune des 3 études, 200 à 300 gènes ont été identifiés et ensemble, ils se classent

dans des variétés de fonctions qui, toutes, peuvent jouer un rôle essentiel à différentes étapes de la réplication virale du HIV.

Néanmoins, lorsque l'on compare ces études, un nombre très limité de gènes se retrouve dans plusieurs études. Ainsi, seuls 13 gènes sont communs aux études de Brass et de König. Ceci pourrait être dû aux différentes conditions expérimentales utilisées puisque, par exemple, Brass *et al.* ont utilisé des HeLa et des virions d'HIV-1 compétents pour la réplication alors que König *et al.* ont utilisé des 293T et des vecteurs HIV-1. Les conditions de traitement par siRNA et d'infection virale étaient aussi différentes. Brass et al. ont traité les cellules avec les siRNAs 72h avant l'infection et mesuré l'effet sur l'infection virale 48h après l'infection alors que König et al. ont traité les cellules 48h avant infection et mesuré l'effet 24h après. Brass et al. ont probablement identifié des gènes impliqués dans les stades tardifs de l'infection ou codant pour des protéines relativement stables dans la cellule et qui nécessitent un certain délai entre le traitement par siRNA et le moment où leur taux intracellulaire chute. A l'opposé, dans l'étude de König et al., il est probable que les gènes identifiés soient impliqués dans les stades précoces de l'infection ou dans la synthèse de protéines à demi-vie courte. La comparaison des études de Brass et al. et Zhou et al. n'est pas plus aisée. Entre les 273 gènes identifiés dans la première étude et les 224 dans la seconde, seuls 15 sont communs aux deux études. Pourtant, dans ce cas, les conditions d'études étaient très similaires : même cellule cible (HeLa) et utilisation de virus HIV-1 compétents. Par contre, le mode de production des virus était dissemblable et les temps post-incubation avec les siRNA différents également. L'étude de Zhou a identifié l'impact de l'inhibition des gènes sur l'infection 24h seulement après la transfection par les siRNAs contre 72h pour Brass et al. Dès lors, alors que les 3 études ont le même but et utilisent globalement la même technique, les gènes découverts sont très différents, et un taux de concordance de seulement 7% est observé entre les 3 études [506]. La variabilité des réponses obtenues peut être expliquée notamment par les effets *off-target* régulièrement obtenus lors de l'usage des siRNAs [507]. Ainsi, non seulement l'implication des gènes identifiés dans ces différentes études peut être discutée mais on peut également supposer que d'autres conditions expérimentales vont générer des résultats différents et que ceux obtenus jusqu'ici sont incomplets.

Dans notre étude, des cellules HeLa kyoto ont été incubées avec les siRNAs 24h avant infection et les cellules ont été fixées et marquées 48h post-infection. Ce screening cible donc essentiellement les protéines à courte demi-vie. Parmi les protéines identifiées, seules 65 semblent influencer positivement l'infection virale (proviral genes) et 110 semblent l'influencer négativement (antiviral genes). Ces nombres de gènes peuvent sembler peu importants compte tenu des 9102 gènes ciblés par la méthode, mais correspondent à respectivement 0.71% et 1.20% des gènes étudiés, ce qui de l'ordre de grandeur de ce qui est observé dans les études similaires portant sur d'autres virus. Cependant, on peut supposer que comme dans le cas du virus HIV, le protocole expérimental que nous avons choisi a fortement conditionné les résultats que nous avons obtenus. Nous espérons néanmoins que les résultats obtenus tant pour les gènes proviraux que pour les gènes antiviraux pourront être confirmés dans un avenir proche et pourront nous amener à mieux comprendre le cycle biologique des *Gammaherpesvirinae*.

Approche protéomique

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons voulu déterminer le protéome structural des virions de MuHV-4. En effet, les *Herpesviridae* ont une composition particulièrement complexe qui a, de ce fait, été déjà à plusieurs reprises explorée par spectrométrie de masse [70, 166, 168, 233, 275, 276, 291, 390, 441-445]. Ces études incluent notamment l'HSV-1 et le *pseudorabies virus* (PRV) [291, 444], les *Human et Murine Cytomegaloviruses* (HCMV et MCMV, respectivement) [168, 443] et parmi les *Gammaherpesvirinae*, le KSHV, le MuHV-4, l'EBV, et l'AIHV-1 [166, 275, 276, 390, 442]. Une telle approche a donc déjà été utilisée il y a plus de 10 ans sur le MuHV-4 [390]. Cependant, ce travail initial n'a permis de mettre en évidence que 14 protéines structurales alors que les virions de la famille des *Herpesviridae* en contiennent plus de 30 différentes en moyenne [70]. De plus, cette étude a identifié les produits des gènes ORF20, ORF24 et ORF29 comme protéines constitutives du virions alors que leurs homologues n'ont pas été retrouvés dans la plupart des analyses sur des espèces proches. Par exemple, l'ORF29 code pour un composant de la terminase virale qui est dissocié de la capsid après encapsidation du génome et, de ce fait, n'est pas incorporé dans le virion mature [291]. De nouvelles investigations étaient donc nécessaires.

D'une manière générale, plusieurs facteurs peuvent contribuer aux variations observées entre ces différentes études. Tout d'abord, la préparation des échantillons (par exemple la digestion sur gel versus la digestion liquide couplée à la chromatographie) peut mener à la mise en évidence de différentes populations de peptides tryptiques. La sensibilité des spectromètres de masse et l'abondance des protéines dans un échantillon sont d'autres éléments qui influencent la détection des peptides. L'abondance relative en peptides est elle-même influencée par la complexité des échantillons dans lesquels plusieurs protéines peuvent échapper à l'identification. Ensuite, chaque protéine possède des propriétés bien différentes (ionisation, résolution en gel SDS-PAGE, ...) qui peuvent interagir avec leur détection. C'est le cas par exemple des protéines de type SNARES qui sont transmembranaires et résistent à l'extraction au SDS [508, 509]. Il est fort probable que les méthodes de détection et de purification ne permettent pas de détecter toutes les protéines embarquées par les virions. Cependant, c'est vraisemblablement le processus de purification des particules virales d'*Herpesviridae* et plus précisément la technique d'enrichissement qui risque de générer des contaminants dans les particules virales. Plusieurs protéines hôtes pourraient en effet être associées aux particules virales de grandes tailles de manière non spécifique. C'est une des raisons pour lesquelles nous avons attaché un soin particulier à la purification de nos échantillons et à leur manipulation afin d'éviter de les contaminer par des protéines présentes dans l'environnement telles que les kératines liées à la présence de cheveux ou de peau dans les échantillons dont la purification a été peu soignée. On ne peut néanmoins pas exclure que dans certains cas, l'actine, de même que la kératine, soit impliquée d'une façon ou d'une autre dans l'infection virale.

Protéines virales

Notre analyse nous a permis d'identifier des protéines virales et cellulaires entrant dans la composition des différentes parties de la particule de MuHV-4. Ainsi, notre analyse a permis l'identification de 31 protéines structurales codées par le MuHV-4, parmi lesquelles 8 protéines de capsid, 9 protéines d'enveloppe, 13 protéines de tégument et une protéine inclassable (M3). Au sein de ces 31 protéines, 27 avaient préalablement été détectées au moins une fois au sein des 4 autres *Rhadinovirus* caractérisés à ce jour (BoHV-4, KSHV, PRV et l'étude du MuHV-4 de Bortz et al.) [70, 276, 390, 444]. Notre étude a donc permis de

dresser un bilan des différentes études, de les confronter à nos résultats afin de déterminer la composition de base partagée par les différents *Gammaherpesvirinae* étudiés jusqu'ici.

Le détail des différentes protéines virales entrant dans la composition des virions de MuHV-4 ne sera pas rediscuté dans cette partie du travail. Néanmoins, une attention particulière sera accordée à la présence de la protéine M3. La protéine codée par le gène M3 est une chemokine *binding* protein (CBP) de 44kDa abondamment sécrétée essentiellement durant la phase lytique de l'infection. *In vivo*, lors de l'inoculation intranasale de MuHV-4, M3 module la réponse inflammatoire via ses propriétés de CBP (Chemokine Binding Protein) en diminuant notamment le taux de protéines RANTES au niveau pulmonaire. D'autres observations montrent que la réaction inflammatoire est également diminuée au niveau pulmonaire et splénique suite à l'action de M3 [473, 474].

De manière surprenante, cette protéine a été retrouvée dans toutes nos analyses sur virions complets, même après digestion à la protéinase K. Cependant, elle n'a plus été détectée dans ces mêmes virions après traitement avec des glycosidases. La présence de M3 en tant que constituant potentiel de la particule virale est interpellante. En effet, la façon dont M3 pourrait être incorporée dans le virion reste inconnue. Plusieurs hypothèses pourraient permettre d'expliquer la présence de M3 au sein de la particule de MuV-4. Premièrement, certaines formes de M3 pourraient comprendre un domaine transmembranaire. Ces formes particulières de la protéine pourraient être générées après épissage alternatif de l'ARN messager. Nous avons tenté de mettre en évidence l'existence de ces formes mais sans succès jusqu'à présent. Une autre hypothèse, telle qu'illustrée à la figure 41, serait la liaison de M3 à la particule virale via des structures héparans sulfates puisque ces structures sont liées par certaines CBPs comme la protéine M-T1 du virus Myxoma [510]. Ces structures pourraient être des molécules d'héparans sulfates solubles liées à certaines glycoprotéines virales telles que l'hétérodimère gH/gL ou la glycoprotéine gp70. Ces deux protéines sont en effet connues pour lier les héparans sulfates de la surface cellulaire [118, 355]. Une expérience à réaliser afin d'investiguer cette hypothèse serait de traiter des virions à l'héparinase II, capable de décrocher les héparans sulfates et les glycans de leur ancrage sur les protéines de membranes et de voir si ce traitement permet à lui seul de décrocher M3. Il est possible d'imaginer une influence potentielle de M3 en surface du

virion pour moduler l'action des chimiokines inflammatoires de même qu'on ne peut exclure un rôle potentiel dans l'attachement. En effet, à l'image de ce qui se passe pour la glycoprotéine G (gG) du FeHV-1 (*Felid herpesvirus 1*), on peut imaginer que M3 fonctionne à la fois comme une CBP sécrétée et à la fois comme ligand de surface dans l'enveloppe du virion [477, 511].

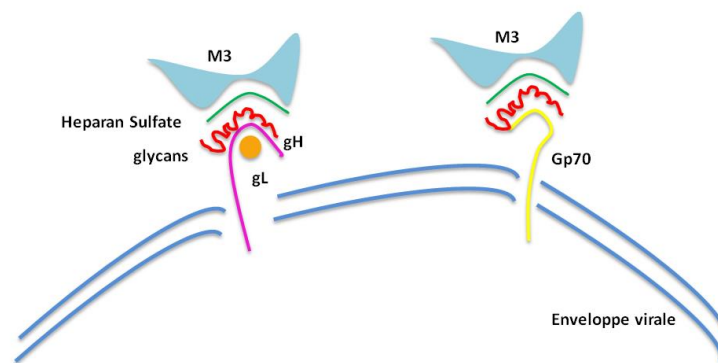


Figure 41. Modèle proposé pour expliquer la présence de M3 dans la particule virale. M3 pourrait être lié à la surface du virion par l'intermédiaire de structures de type héparan sulfates potentiellement liées à certaines glycoprotéines de l'enveloppe virale (ici, gH/gL et gp70).

Protéines cellulaires

De façon intéressante, toutes les études sur les protéines structurales des *Herpesviridae* ont détecté des protéines cellulaires dans les préparations virales. L'étude de Loret *et al.* [291] évalue à 49 le nombre de protéines cellulaires identifiées dans leurs échantillons d'HSV-1, les études sur le PVR et l'EBV rapportent 48 et 43 protéines respectivement [166, 444], alors que Varnum *et al.* en détectent plus de 70 dans les préparations de HCMV [168]. Bien que plusieurs protéines cellulaires aient été détectées dans d'autres types de virus, il semble que les *Herpesviridae* ont une propension particulière à incorporer des protéines cellulaires. Il est tentant de penser que certains virus peuvent avoir une capacité plus importante à « voler » des protéines de l'hôte de par leur taille. En effet, les *Herpesviridae* sont de larges virus contenant notamment un tégument de grande taille qui peut s'accommoder de nombreuses protéines non virales. Certaines protéines cellulaires peuvent être incorporées de manière aléatoire ou être de simples reliquats du processus final d'enveloppement alors que d'autres sont probablement sélectionnées pour

assurer une réplication virale optimale. Ainsi, parmi les quelques 200 protéines différentes détectées dans les *Herpesviridae*, on trouve par exemple la famille des protéines 14-3-3 (regroupant des protéines à sérine-thréonine intervenant dans la signalisation intracellulaire et dans les régulations métaboliques [512]), les annexines, l'actine, la cofiline, des facteurs de transcription, la GAPDH, des *heat-shock* protéines, la pyruvate kinase M2 et des variétés de Rab GTPases. De manière intéressante, plusieurs protéines cellulaires sont retrouvées dans plusieurs *Herpesviridae*, suggérant de ce fait que ces protéines pourraient jouer un rôle commun dans ces virus.

Pour chaque protéine cellulaire identifiée au sein de ces particules virales, se pose la question de la signification biologique et du mode d'action. La nature de la relation entre le virus et la cellule hôte suggère qu'il est probablement plus intéressant pour les *Herpesviridae* (comme d'autres virus d'ailleurs) de dérober certains modulateurs cellulaires plutôt que de coder pour des protéines homologues. Une question est de savoir pourquoi les virus ont besoin d'intégrer ces protéines cellulaires dans les virions matures alors que ces protéines existent dans la cellule. Plusieurs options, à l'heure actuelle toujours hypothétiques, peuvent être considérées. Tout d'abord, il se peut que le virus incorpore des isoformes bien précises, des variants splicés ou des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles qui confèrent à la protéine des rôles distincts au sein du virus par rapport aux protéines se trouvant dans la cellule qui va être infectée. Ensuite, l'incorporation d'une protéine cellulaire provenant d'un certain type de cellule peut permettre au virus d'infecter un autre type de cellule. Pour finir, les protéines hôtes peuvent complexer avec les protéines virales et ces complexes peuvent être actifs pour promouvoir l'infection.

Un des aspects à souligner et lié à l'incorporation de protéines hôtes dans le virion est l'implication de certaines d'entre elles dans le trafic intracellulaire. De nombreux travaux ont montré que la machinerie cellulaire était employée par les virions [135, 513-516]. Il s'agit d'un processus essentiel pour que les protéines et les particules atteignent leur destination finale, par exemple, les sites de réplication virale, d'assemblage ou d'enveloppement. Les protéines SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*), les Rab et Arf GTPases sont des régulateurs majeurs du trafic à travers la cellule [145, 517, 518]. Ainsi, VAMP3, une protéine SNARE, a été identifiée dans le PRV [444] et certaines

d'entre elles ont été rapportées comme utiles pour l'enveloppement du MCMV [519]. Par contre, un grand nombre de protéines de type Rab ont aussi été identifiées dans les études relatives aux *Herpesviridae*, notamment concernant le HSV-1 et le PRV, ainsi que dans notre étude (Rab1 et Rab6). Les protéines Rab et Arf modulent collectivement différentes étapes impliquées dans le transport intracellulaire et il est possible qu'elles interviennent dans plusieurs étapes de l'infection. Par exemple, Rab 1 trouvé dans nos purifications virales ainsi que dans l'étude de Loret et al. sur l'HSV-1 [291], en conjonction avec Rab 43, sont des partenaires pour l'enveloppement de l'HSV-1 [520]. De la même façon, Rab 6, qu'on retrouve dans notre étude mais aussi dans les virions extracellulaires purifiés d'HSV-1 et de PRV [291, 444], est nécessaire pour l'assemblage du HCMV [521]. Il serait maintenant intéressant de savoir si ces GTPases participent activement au cycle viral ou non. En effet, peut être indiquent-elles uniquement l'origine du virus.

Le trafic moléculaire n'est pas seulement dépendant des protéines du groupe SNARE, des Rab ou Arf, mais également directement lié au cytosquelette. Ce n'est donc pas surprenant que les *Herpesviridae* consacrent une partie de leurs ressources à réguler cette machinerie cellulaire centrale. Les *Herpesviridae* réorganisent de façon significative les filaments d'actines et les microtubules, à la fois aux niveaux cellulaires et nucléaires [176, 522-524]. Ils voyagent aussi le long des microtubules à la fois pendant l'entrée et la sortie en utilisant de nombreux moteurs cellulaires, de même que des filaments d'actine nucléaire et corticaux [181, 525-527]. Beaucoup de membres de la famille des *Herpesviridae* incorporent des filaments d'actine ou de la tubuline dans les particules virales [3, 528]. Dans les virions de MuHV-4 que nous avons analysés, on retrouve plusieurs éléments associés au cytosquelette mais pas d'actine. Notre étude suggère dès lors que la présence de molécules d'actine dans la particule virale extracellulaire mature est davantage liée à une incorporation fortuite plutôt qu'à un phénomène spécifique. Il faut néanmoins souligner que l'actine semble apparaître dans certaines études dans les particules virales « en compensation » d'autres protéines de tégument perdues, par exemple dans le PRV [529, 530], et semble donc un élément important de la composition de certains virus même si son rôle exact est difficile à évaluer.

La production de virions sur cellules déficientes en certaines protéines cellulaires permet évidemment de faire la différence entre une protéine cellulaire dont le virus peut se passer et une protéine indispensable à sa croissance ou sa maturation. C'est ce qui a été réalisé dans notre étude avec l'Annexine 2. De façon intéressante, l'Annexine 2 a aussi été proposée comme un constituant de plusieurs autres virus dont des *Herpesviridae* (tels que le KSHV, le BoHV-4, l'AIHV-1, l'HSV-1, le PRV et l'HCMV) de même que le virus Influenza [382], l'HIV-1 [481], le papillomavirus [482] et le virus de l'hépatite C [483]. Comme décrit préalablement, l'Annexine 2 appartient à la famille ubiquitaire des Annexines caractérisées par des liaisons réversibles aux phospholipides membranaires de façon calcium-dépendante. L'Annexine 2 existe sous deux formes : un monomère de 36 kDA (p36) et un hétérotétramère (A2t) qui consiste en deux sous-unités de p36 liées par des ponts non covalents par un dimère de p11, une protéine de la famille des protéines S100 (S100-1A) [531, 532]. Les Annexines jouent des rôles dans le trafic membranaire, dans la signalisation durant la mitose, le réarrangement du cytosquelette, dans la formation des *lipid rafts* impliqués dans l'entrée du HCV [483, 484, 533]. Le rôle de l'Annexine 2 chez les *Herpesviridae* a surtout été étudié chez l'HCMV, chez lequel elle a été retrouvée associée aux virions [485, 486] à travers des interactions spécifiques avec gB [487, 488]. Dans ce cas, un immunomarquage des virions d'HCMV avait été réalisé et avait mis en évidence l'Annexine 2 en surface des particules virales. Un marquage similaire a été réalisé sur nos virions purifiés avec des anticorps monoclonaux anti-Annexine 2 mais dans notre cas, sans succès bien que la protéine ait été détectée par spectrométrie de masse. Ceci peut être lié à la sensibilité des techniques utilisées (sensibilité moindre de l'immunomarquage par rapport à la spectrométrie), au processing de l'Annexine 2 avant d'être insérée dans la membrane du virion et à l'exposition d'autres épitopes que ceux reconnus par l'anticorps. Cependant, ce pourrait également simplement refléter l'absence de l'Annexine 2 en surface de la particule virale. A ce titre, nous avons réalisé un western blot anti-Annexine 2 sur des fractions de virions MuHV-4 purifiés comme indiqué à la figure 42. Cette expérience confirme la présence de l'Annexine 2 dans la particule virale mais pas au niveau de l'enveloppe. Bien que l'association entre l'Annexine 2 et les particules virales des *Herpesviridae* soit bien documentée, son importance fonctionnelle reste sujette à de nombreuses controverses. Plusieurs études montrent, qu'incorporée aux virions, l'Annexine 2 accélérerait la fusion entre les membranes durant l'entrée [489] en accord avec le fait que des anticorps anti-

Annexine 2 parviennent à inhiber l'infection par le HCMV [490]. Au contraire, d'autres études montrent que l'Annexine 2 n'aurait aucun impact sur l'entrée de l'HCMV dans les fibroblastes [491]. De même, nos résultats montrent que la présence d'Annexine 2 dans nos virions ne semble pas influencer la croissance du virus dans les fibroblastes embryonnaires [534]. Le rôle potentiel de l'Annexine 2 au sein de la particule virale reste donc à préciser.

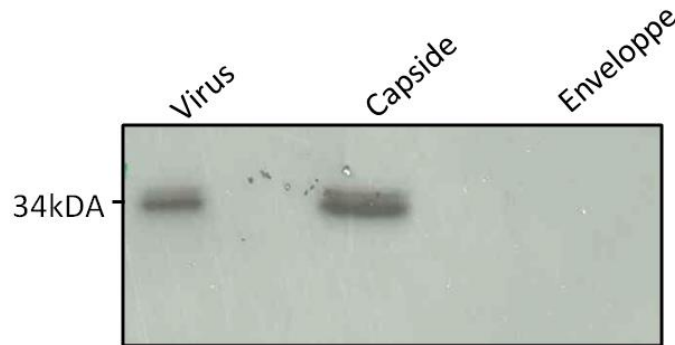


Figure 42. Détection de l'Annexine 2 au sein de différentes fractions de virions de MuHV-4 purifiés. Les enveloppes lipidiques ont été séparées de la fraction capsides-téguments par incubation avec un détergent non-ionique comme décrit précédemment [450]. Brièvement, les fractions de virions concentrées ont été soniquées et lysées dans du PBS contenant 1% (v/v) de NP40 pendant 20 minutes sur glace. Les fragments de capsides associés aux téguments ont ensuite été centrifugés (15000g, 30 min, à 40°C). Le surnageant a été éliminé et la procédure répétée deux fois sur le culot. Après la dernière centrifugation, la fraction capsides-téguments a été resuspendue dans du PBS et conservé à -80°C pour analyse ultérieure. Un anticorps IgG1 anti-Annexine 2 (Invitrogen) a été utilisé pour mettre en évidence la protéine.

Autres applications de la protéomique

Durant leur co-évolution avec leur hôte, les virus ont développé de nombreux mécanismes pour manipuler les processus cellulaires en vue de favoriser leur réplication et leur transmission. Par ailleurs, en réponse à l'infection, la cellule infectée déploie une série de mécanismes de défense intrinsèques en vue de bloquer la réplication virale en son sein et d'induire et/ou de recruter des mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire. Les infections virales induisent donc des changements importants à différents niveaux cellulaires. Le développement des techniques de spectrométrie de masse ainsi que leur association avec différentes techniques, notamment moléculaires, biochimiques, génomiques, microscopiques ou autres, permettent de générer une vue du système

biologique dans son ensemble et de mieux comprendre le cycle de multiplication virale. Plusieurs de ces approches émergentes seront discutées ci-dessous (Figure 43).

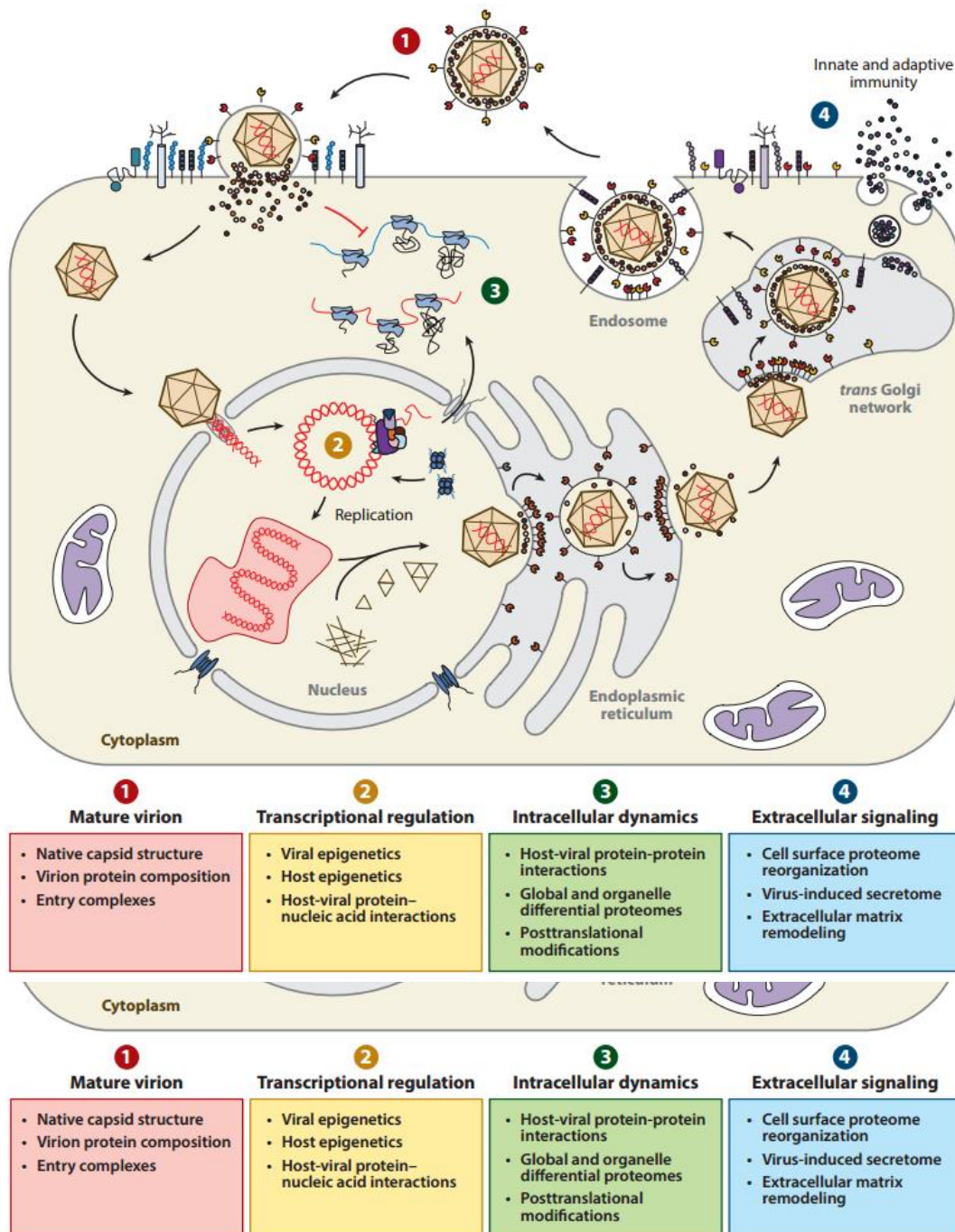


Figure 43. Contribution de la protéomique par spectrométrie de masse (MS) à la compréhension des infections virales. L'infection productive d'un virus HSV-1 est prise comme exemple. Les aspects clés du cycle viral qui peuvent être étudiés par protéomique basée sur la MS sont désignés par des nombres. Brièvement, la composition et la structure d'un virion mature peut être caractérisée par MS en tandem et par MS native respectivement (1). L'*Affinity purification (AP)-MS* peut apporter des éclaircissements sur les interactions entre les constituants viraux et hôtes qui permettent l'entrée de la particule virale au sein de la cellule (1) ; sur la régulation de la transcription nucléaire, la réplication

du génome et l'assemblage de la capsid (2) ; sur la sortie et l'assemblage dans le cytosol (3). La MS quantitative peut mesurer les modifications post-traductionnelles et les modifications de l'expression des protéines, induites par le virus (3), ainsi que les sécrétions de médiateurs antiviraux qui initient la réponse immunitaire innée ou adaptative (4). Les protéines virales sont représentées en rouge et jaune, et les protéines cellulaires en bleu et mauve. D'après Greco et al. [535].

Premièrement, la caractérisation du protéome structural d'un virion reste l'application la plus usuelle de la protéomique virale. Des développements technologiques récents ont permis que la spectrométrie de masse puisse contribuer à la détermination de la structure de la particule virale. Ainsi, la spectrométrie de masse "native" permet la détection de complexes de plusieurs millions de Daltons [536, 537]. Cette technique, en association avec d'autres, permet de déterminer la taille et la forme de capsides virales à différentes étapes de leur formation ou en fonction des conditions d'environnement telles que le pH [538-543]. Il est donc probable qu'avec les avancées en termes de résolution et de vitesse d'acquisition, la spectrométrie de masse va permettre l'analyse de structures virales de plus en plus complexes et hétérogènes.

Une autre approche relative à la composition de la particule virale est la spectrométrie de masse comparative. Cette approche est basée sur une quantification des différents peptides viraux présents au sein des échantillons et permet par exemple d'étudier l'influence de la présence ou non d'une protéine sur l'abondance d'autres protéines au sein de la particule virale. Une telle approche a été investiguée dans notre travail. En effet, lors de la caractérisation du protéome structural du MuHV-4, nous avons constaté l'absence de pORF75a dans le virion, alors que ses deux homologues, pORF75b et pORF75c étaient abondamment présents. Les protéines pORF75 sont des homologues de la protéine FGARAT (formyl-glycineamide-phosphorybosyl-amidetransférase) qui catalyse la 4^e réaction enzymatique de la voie de synthèse des purines [544]. Tous les *Gammaherpesvirinae* codent pour un homologue de cette protéine cellulaire. Ceci suggère que les *Gammaherpesvirinae* ont capturé ce gène cellulaire très précocement dans leur évolution, mais, au sein de cette sous-famille, la fonction de cette enzyme n'est pas bien élucidée. Par ailleurs, le BoHV-4 possède 2 copies [545] alors que le MuHV-4 en possède 3 (nommées a, b et c) et que l'EBV n'en possède qu'une seule, la protéine BNRF1 [546]. Une étude plus récente sur les 3 copies de l'ORF75 chez le MuHV-4 montre que pORF75c est très importante pour la réplication mais

pas pORF75a ni pORF75b [82]. Dans cette étude, Gaspar et al. ont développé des anticorps monoclonaux dirigés contre les 3 pORF75 (a, b et c), ont mis en évidence la présence des 3 protéines dans le virion du MuHV-4 et ont étudié la fonction de ces protéines. Ils ont conclu qu'aucune d'entre elles ne possédait d'activité FGARAT et que ces trois protéines présentaient potentiellement des activités biologiques distinctes.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes dès lors demandé si l'absence de pORF75b ou de pORF75c (détectées toutes deux dans le virion) modifiait la présence des deux autres homologues. Nous avons dès lors exploré le protéome de virions MuHV-4 mutants pour les protéines 75b et 75c ainsi que leur révertant (tous les mutants ont été fournis par le Prof. Philip Stevenson, Université de Cambridge, UK). Les virus mutants ont été produits, purifiés et concentrés en triplicats biologiques de la même façon que ce qui est décrit dans notre deuxième étude. Il est à noter que les virus ORF75b- ne présentent pas de déficit de croissance majeur alors que les virus ORF75c- ont une croissance ralentie par rapport à la souche sauvage. Les virions mutants produits ont été vérifiés par marquage des plages de lyse grâce aux anticorps monoclonaux développés dans l'étude de Gaspar et al [466]. La qualité des préparations a été vérifiée par microscopie électronique à transmission. Lors de notre analyse comparative par spectrométrie de masse, le mutant ORF75b- n'a pas montré de différence significative au niveau de sa composition par rapport aux souches sauvage et révertante (résultats non montrés). A l'inverse certaines différences ont pu être mises en évidence lors de la comparaison des protéines observées dans les mutants ORF75c- versus celles observées dans le virus sauvage ou révertant (figure 44). Dans ces graphiques, l'axe des abscisses indique la présence relative de chaque protéine au sein des deux types de virions, et la *p value* associée à chaque mesure est indiquée à droite de la figure. On remarque tout d'abord que la protéine pORF75c est bien absente, ce qui confirme la nature de nos souches virales et la validité de la technique. Ensuite, M3 est toujours présente dans cette analyse, ce qui tend à confirmer sa présence dans la particule même si la signification biologique de cette présence est toujours incomprise. M3 fait partie des protéines dont la concentration se modifie de façon significative entre le mutant et le virus sauvage ou le révertant, au même titre que les protéines pORF11, pORF17 et pORF27. Néanmoins, seule la protéine pORF11 varie de façon très significative et de manière similaire entre les deux graphes. pORF11 est un immunomodulateur bloquant la production d'IFN β [547]. On peut

supposer que la disparition de pORF75c au sein de la particule virale puisse être compensée par une augmentation de l'abondance de certaines protéines, pORF11 par exemple. Des études complémentaires doivent encore être réalisées, notamment en utilisant un virus délété ORF11 afin de vérifier si la « compensation » protéique est réciproque dans les deux mutants, ou bien seulement dans le délété ORF75c. Par contre l'absence de pORF75c ou de pORF75b n'a pas été compensée par une augmentation de l'abondance d'un des deux autres homologues.

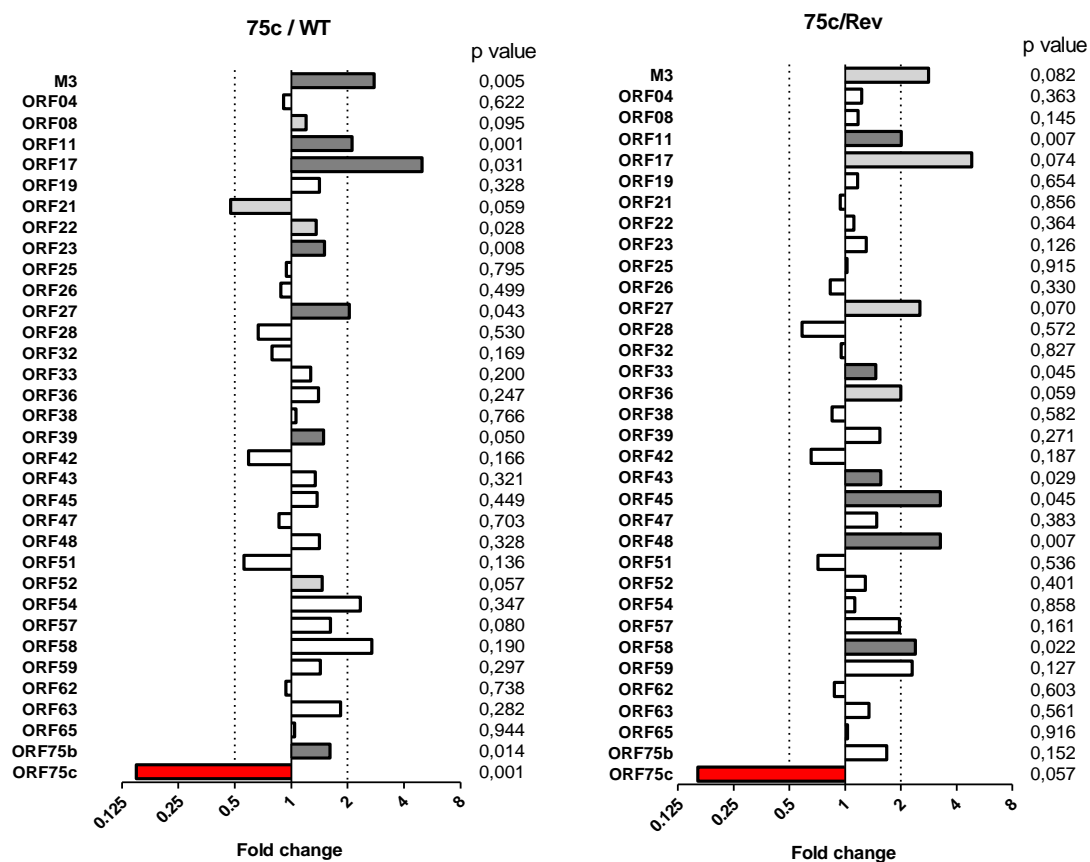


Figure 44. Comparaison du contenu en protéines des virions pORF75c- par rapport aux virions WT et révertant. Le nom des protéines est indiqué par l'ORF correspondant. La diminution ou l'augmentation de l'abondance relative en protéine (calculée en emPAI par 1D gel/nanoLC-MS/MS) est représentée. Les *p values* sont indiquées à droite : celles qui sont inférieures à 0,05 sont en gris foncé, alors que celles inférieures à 0,1 sont en gris clair. La différence relative de l'abondance de pORF75c est représentée en rouge.

Une autre application de l'approche protéomique est d'identifier les protéines induites en réponse à l'infection virale. En effet, les cytokines sécrétées par les cellules infectées, les effecteurs de l'inflammation, et les molécules d'adhésion recrutent et activent

les leucocytes circulant et alertent les cellules du voisinage. Ces événements initient la destruction des tissus endommagés et les programmes cellulaires antiviraux à l'épicentre de l'infection, empêchant ainsi la dissémination virale. Etant donné que des modifications de la présence et de l'abondance de certaines protéines au sein de compartiments cellulaires déterminés reflètent la réponse de l'hôte à l'infection, plusieurs études ont utilisé des procédés de fractionnement cellulaire ou d'isolement en conjonction avec la spectrométrie de masse afin de caractériser le protéome d'organelles définies. Des études de ce type ont par exemple été réalisées pour le *mouse hepatitis virus* [548], pour l'HSV-1 [549], le virus Influenza [550], des adénovirus [551] ou le virus respiratoire syncytial humain [552].

Les infections virales modifient donc significativement le protéome au niveau des espaces extracellulaires. En effet, approximativement 10% du génome humain code pour des protéines qui sont sécrétées [553]. Dans le cadre d'une infection virale, ces protéines sécrétées contribuent à la mise en place des défenses immunitaires innées et adaptatives comme indiqué ci-dessus. C'est l'étude du sécrétome par spectrométrie qui en permet l'analyse. Des analyses de ce type ont par exemple été réalisées afin d'identifier les protéines sécrétées par les macrophages en réponse à différents virus tels que l'HSV-1 [554], l'HIV [555, 556] ou le virus Influenza [557].

Parmi les autres applications de la spectrométrie de masse, l'utilisation d'une approche protéogénomique peut permettre d'identifier de nouvelles protéines qui n'auraient pas été annotées sur le génome. Dans notre étude, les peptides détectés ont été repérés sur le génome du MuHV-4. Les résultats obtenus ont cependant montré que tous les peptides de notre analyse correspondaient aux ORFs connus du MuHV-4. Une approche similaire a par contre permis d'identifier récemment de nouveaux transcrits au sein de la séquence génomique du cytomégalovirus humain [558]. Cette approche permet également de valider la construction de certains mutants délétés non-sens. En effet, un gène annoté dans le génome peut, en réalité, en cacher un autre. La synthèse de protéines troquées est également possible. La spectrométrie de masse permet d'adresser ces questions, comme cela a récemment été démontré dans notre laboratoire lors de la genèse d'un mutant MuHV-4 délété pour l'ORF63 (M. Bilal Latif, résultats non publiés).

La progression des infections virales dépend dans un grand nombre de cas, d'interactions entre protéines cellulaires et virales. L'identification de ces interactions est possible grâce aux techniques d'immuno-précipitation. Le couplage de celles-ci à l'analyse par spectrométrie de masse a permis de révéler de nombreuses interactions sans à priori. Ici aussi, ces études peuvent être réalisées à différents moments de l'infection ou sur des fractions particulières de la cellule infectée [535]. Ainsi ce type d'approche a permis de montrer que la protéine pUL83 de l'HCMV inhibe l'induction de l'inflammasome par la protéine nucléaire IFI16 en réponse à l'infection [559, 560]. Des approches similaires sont également réalisées lors d'expériences d'immuno-précipitation de la chromatine.

En plus des changements dans la localisation ou l'abondance des protéines, les infections virales peuvent également induire des changements de modification post-traductionnelle. La connaissance de ces modifications au cours de l'infection virale peut sans aucun doute fournir des informations importantes afin de comprendre différents processus cellulaires et viraux. A cette fin, des techniques de spectrométrie de masse ont été développées afin de pouvoir identifier et localiser ces modifications au cours du temps. Ainsi, des changements de phosphorylation et d'ubiquitination ont pu être mis en évidence dans des protéines d'HSV-1 importantes notamment pour des fonctions d'immuno-évasion [561]. Des modifications post-traductionnelles de protéines cellulaires ont également pu être mises en évidence, telles que l'acétylation de IFI16 qui modifie sa localisation subcellulaire [560]. Sur base d'autres études, il est d'ailleurs tentant de penser que l'acétylation joue un rôle particulier dans la régulation des voies de signalisation liées aux réponses immunes [535].

Dans le futur, le développement des techniques de spectrométrie de masse et de la bioinformatique pourraient encore étendre les champs d'application de ces approches pour améliorer la compréhension des infections virales en général et des infections par les *Gammaherpesvirinae* en particulier.

Conclusion générale

Les nombreuses pathologies dont sont responsables les membres de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* et le nombre réduit de stratégies prophylactiques ou thérapeutiques actuellement sur le marché justifient une meilleure compréhension du cycle biologique de ces virus. Dans ce travail, nous avons utilisé deux techniques de screening à haut débit en vue de développer les connaissances relatives au cycle de l'herpèsvirus murin 4, utilisé comme modèle pour d'autres virus tels que l'EBV ou le KSHV. D'une part, à l'aide d'un screening *whole genome* utilisant l'interférence à ARN, nous avons pu dresser une liste de 65 gènes cellulaires dont les produits d'expression favorisent l'infection virale (*proviral genes*) et de 110 gènes cellulaires limitant potentiellement l'infection (*antiviral genes*). Dans un avenir proche, la validation de ces cibles pourrait nous permettre de mieux comprendre la biologie de ces infections et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou prophylactiques. Par ailleurs, la réalisation de ce screening et l'analyse des résultats générés auront permis l'acquisition d'un savoir-faire qui pourra être mis à profit par le laboratoire d'accueil dans le cadre d'autres projets de recherche. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons analysé la composition des particules virales extracellulaires de MuHV-4. Cette étude, qui faisait suite à plusieurs études du même type sur d'autre *Gammaherpesvirinae*, nous a permis d'améliorer très significativement notre connaissance de la composition des virions de MuHV-4 en particulier et des *Gammaherpesvirinae* en général. En effet, les résultats générés par ce type d'étude est souvent tributaire de la qualité de préparation des échantillons et de grandes variations existaient entre les données publiées. Par ailleurs, le développement des techniques de spectrométrie de masse améliore constamment la qualité des résultats générés. Sur base des études préalables sur le sujet, nous avons pu développer un protocole expérimental qui nous a permis d'identifier 31 protéines de structure encodées par le génome du MuHV-4 dont nous avons déterminé l'abondance relative. Par ailleurs, différentes protéines cellulaires ont également pu être identifiées, bien que celles-ci soient proportionnellement moins abondantes. Ces données nous ont permis de dresser une comparaison des différents protéomes structuraux des *Gammaherpesvirinae* et d'en identifier les protéines communes. Dans le futur, l'ensemble de ces résultats devraient nous permettre de mieux comprendre le cycle biologique de ces virus et de développer de nouveaux projets de recherche fondamentale et/ou appliquée.

1. Davison, A.J., et al., *The order Herpesvirales*. Arch Virol, 2009. **154**(1): p. 171-7.
2. Ackermann, M., *Herpesviruses: a brief overview*. Methods Mol Biol, 2004. **256**: p. 199-219.
3. Grunewald, K., et al., *Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography*. Science, 2003. **302**(5649): p. 1396-8.
4. Zhou, Z.H., et al., *Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3210-8.
5. Mettenleiter, T.C., *Herpesvirus assembly and egress*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1537-47.
6. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
7. Bohannon, K.P., et al., *Differential protein partitioning within the herpesvirus tegument and envelope underlies a complex and variable virion architecture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. E1613-20.
8. Baker, M.L., et al., *Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14967-70.
9. Peng, L., et al., *Three-dimensional visualization of gammaherpesvirus life cycle in host cells by electron tomography*. Structure, 2010. **18**(1): p. 47-58.
10. Cohen, J.I., *Epstein-Barr virus infection*. N Engl J Med, 2000. **343**(7): p. 481-92.
11. Dukers, N.H., et al., *Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(3): p. 213-24.
12. Grulich, A.E., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a sexually transmissible infection?* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1999. **20**(4): p. 387-93.
13. Marcelin, A.G., et al., *Fatal disseminated Kaposi's sarcoma following human herpesvirus 8 primary infections in liver-transplant recipients*. Liver Transpl, 2004. **10**(2): p. 295-300.
14. Arvin, A.M., *Varicella-zoster virus: molecular virology and virus-host interactions*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(4): p. 442-9.
15. Barton, E., P. Mandal, and S.H. Speck, *Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 351-97.
16. McVoy, M.A., et al., *The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1587-92.
17. Knipe, H., Griffin, et al. Roizman, B. and Pellett *The family Herpesviridae: a brief introduction the family Herpesviridae: a brief introduction*, I.F. Virology, Editor. 2001. p. pp. 2381-2397.
18. Jackson, S.A. and N.A. DeLuca, *Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7871-6.
19. Morissette, G. and L. Flamand, *Herpesviruses and chromosomal integration*. J Virol, 2010. **84**(23): p. 12100-9.
20. Vogel, B., et al., *Episomal replication timing of gamma-herpesviruses in latently infected cells*. Virology, 2010. **400**(2): p. 207-14.
21. Garber, A.C., J. Hu, and R. Renne, *Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeat, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27401-11.
22. Griffiths, R., et al., *Mapping the minimal regions within the ORF73 protein required for herpesvirus saimiri episomal persistence*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 11): p. 2843-50.
23. Blake, N., *Immune evasion by gammaherpesvirus genome maintenance proteins*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 4): p. 829-46.
24. Ohsaki, E. and K. Ueda, *Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partitioning, and Maintenance in Latency*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 7.
25. Cai, X., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5570-5.
26. Burnside, J., et al., *Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8778-86.

27. Umbach, J.L., et al., *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 780-3.
28. Gregory, S.M., et al., *Toll-like receptor signaling controls reactivation of KSHV from latency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11725-30.
29. Gargano, L.M., J.C. Forrest, and S.H. Speck, *Signaling through Toll-like receptors induces murine gammaherpesvirus 68 reactivation in vivo*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1474-82.
30. Cesarman, E., *Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 163-74.
31. Russell, G.C., J.P. Stewart, and D.M. Haig, *Malignant catarrhal fever: a review*. Vet J, 2009. **179**(3): p. 324-35.
32. Alba, M.M., et al., *VIDA: a virus database system for the organization of animal virus genome open reading frames*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 133-6.
33. Holzerlandt, R., et al., *Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome*. Genome Res, 2002. **12**(11): p. 1739-48.
34. Ganem, D., *KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning?* Cell, 1997. **91**(2): p. 157-60.
35. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
36. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA*. Lancet, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
37. Andersson, J., *An Overview of Epstein-Barr Virus: from Discovery to Future Directions for Treatment and Prevention*. Herpes, 2000. **7**(3): p. 76-82.
38. Nadir, I., B. Kasapoglu, and C. Turkyay, *Differential clinical presentations of Epstein-Barr virus infection and a brief literature review*. Gastroenterol Nurs, 2012. **35**(4): p. 286-9.
39. Stevenson, P.G., et al., *Virus-specific CD8(+) T cell numbers are maintained during gamma-herpesvirus reactivation in CD4-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15565-70.
40. Stevenson, P.G., et al., *A battle for survival: immune control and immune evasion in murine gamma-herpesvirus-68 infection*. Microbes Infect, 2002. **4**(11): p. 1177-82.
41. Leen, A.M., et al., *Adoptive immunotherapy for herpesviruses*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007, Cambridge University Press 2007: Cambridge.
42. Hsu, J.L. and S.L. Glaser, *Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **34**(1): p. 27-53.
43. Chang, Y., et al., *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma*. Science, 1994. **266**(5192): p. 1865-9.
44. Mesri, E.A., E. Cesarman, and C. Boshoff, *Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 707-19.
45. Luppi, M., et al., *Severe pancytopenia and hemophagocytosis after HHV-8 primary infection in a renal transplant patient successfully treated with foscarnet*. Transplantation, 2002. **74**(1): p. 131-2.
46. Riva, G., et al., *Human Herpesvirus 8 (HHV8) Infection and Related Diseases in Italian Transplant Cohorts*. Am J Transplant, 2013. **13**(6): p. 1619-20.
47. Ensoli, B., et al., *Biology of Kaposi's sarcoma*. Eur J Cancer, 2001. **37**(10): p. 1251-69.
48. Lebbe, C., C. Legendre, and C. Frances, *Kaposi sarcoma in transplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2008. **22**(4): p. 252-61.
49. Ojala, P.M. and T.F. Schulz, *Manipulation of endothelial cells by KSHV: Implications for angiogenesis and aberrant vascular differentiation*. Semin Cancer Biol, 2014. **26C**: p. 69-77.
50. Cousins, E. and J. Nicholas, *Molecular biology of human herpesvirus 8: novel functions and virus-host interactions implicated in viral pathogenesis and replication*. Recent Results Cancer Res, 2014. **193**: p. 227-68.

51. Cancian, L., A. Hansen, and C. Boshoff, *Cellular origin of Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced cell reprogramming*. Trends Cell Biol, 2013.
52. Dai, L., et al., *Emmprin and KSHV: new partners in viral cancer pathogenesis*. Cancer Lett, 2013. **337**(2): p. 161-6.
53. Paul, A.G., B. Chandran, and N. Sharma-Walia, *Cyclooxygenase-2-prostaglandin E2-eicosanoid receptor inflammatory axis: a key player in Kaposi's sarcoma-associated herpes virus associated malignancies*. Transl Res, 2013. **162**(2): p. 77-92.
54. Grundhoff, A. and D. Ganem, *Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 124-36.
55. Ballestas, M.E. and K.M. Kaye, *The latency-associated nuclear antigen, a multifunctional protein central to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency*. Future Microbiol, 2011. **6**(12): p. 1399-413.
56. Ye, F., X. Lei, and S.J. Gao, *Mechanisms of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency and Reactivation*. Adv Virol, 2011. **2011**.
57. Niller, H.H., H. Wolf, and J. Minarovits, *Viral hit and run-oncogenesis: genetic and epigenetic scenarios*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 200-17.
58. Zhao, Y., et al., *Critical role of the virus-encoded microRNA-155 ortholog in the induction of Marek's disease lymphomas*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001305.
59. Ballon, G. and E. Cesarman, eds. Castleman's disease. P.A. Volberding, J.Palefsky ed. Viral and Immunological Malignancies. 2006.
60. Waterston, A. and M. Bower, *Fifty years of multicentric Castleman's disease*. Acta Oncol, 2004. **43**(8): p. 698-704.
61. Chadburn, A., et al., *Immunophenotypic analysis of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma and clinical implications in patients from AIDS Malignancies Consortium clinical trials 010 and 034*. J Clin Oncol, 2009. **27**(30): p. 5039-48.
62. Glaser, S.L., et al., *Population-based patterns of human immunodeficiency virus-related Hodgkin lymphoma in the Greater San Francisco Bay Area, 1988-1998*. Cancer, 2003. **98**(2): p. 300-9.
63. Nador, R.G., et al., *Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*. Blood, 1996. **88**(2): p. 645-56.
64. Nelson, B.P., et al., *Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity?* Am J Surg Pathol, 2000. **24**(3): p. 375-85.
65. Ambinder, R.F., *Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 1-3.
66. McAllister, S.C. and A.V. Moses, *Endothelial cell- and lymphocyte-based in vitro systems for understanding KSHV biology*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **312**: p. 211-44.
67. Nealon, K., et al., *Lytic replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus results in the formation of multiple capsid species: isolation and molecular characterization of A, B, and C capsids from a gammaherpesvirus*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2866-78.
68. O'Connor, C.M. and D.H. Kedes, *Rhesus monkey rhadinovirus: a model for the study of KSHV*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **312**: p. 43-69.
69. Simas, J.P. and S. Efstathiou, *Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis*. Trends Microbiol, 1998. **6**(7): p. 276-82.
70. Lete, C., et al., *Proteomic characterization of bovine herpesvirus 4 extracellular virions*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11567-80.
71. Machiels, B., et al., *The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 1011-24.
72. Rajcani, J. and M. Kudelova, *Murine herpesvirus pathogenesis: a model for the analysis of molecular mechanisms of human gamma herpesvirus infections*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2005. **52**(1): p. 41-71.

73. Stevenson, P.G. and S. Efstathiou, *Immune mechanisms in murine gammaherpesvirus-68 infection*. *Viral Immunol*, 2005. **18**(3): p. 445-56.
74. Blaskovic, D., et al., *Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents*. *Acta Virol*, 1980. **24**(6): p. 468.
75. Blasdell, K., et al., *The wood mouse is a natural host for Murid herpesvirus 4*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 1): p. 111-3.
76. Telfer, S., et al., *The dynamics of murid gammaherpesvirus 4 within wild, sympatric populations of bank voles and wood mice*. *J Wildl Dis*, 2007. **43**(1): p. 32-9.
77. Hughes, D.J., et al., *Characterization of a novel wood mouse virus related to murid herpesvirus 4*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 4): p. 867-79.
78. Francois, S., et al., *Comparative study of murid gammaherpesvirus 4 infection in mice and in a natural host, bank voles*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 10): p. 2553-63.
79. Virgin, H.W.t., et al., *Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68*. *J Virol*, 1997. **71**(8): p. 5894-904.
80. Efstathiou, S., Y.M. Ho, and A.C. Minson, *Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome*. *J Gen Virol*, 1990. **71** (Pt 6): p. 1355-64.
81. Macrae, A.I., et al., *Analysis of a novel strain of murine gammaherpesvirus reveals a genomic locus important for acute pathogenesis*. *J Virol*, 2001. **75**(11): p. 5315-27.
82. Song, M.J., et al., *Identification of viral genes essential for replication of murine gamma-herpesvirus 68 using signature-tagged mutagenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(10): p. 3805-10.
83. Fodor, W.L., et al., *The complement control protein homolog of herpesvirus saimiri regulates serum complement by inhibiting C3 convertase activity*. *J Virol*, 1995. **69**(6): p. 3889-92.
84. Jung, J.U., M. Stager, and R.C. Desrosiers, *Virus-encoded cyclin*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(11): p. 7235-44.
85. Bais, C., et al., *G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator*. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 86-9.
86. Sarid, R., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 293-8.
87. Nayar, U., et al., *Targeting the Hsp90-associated viral oncoproteome in gammaherpesvirus-associated malignancies*. *Blood*, 2013. **122**(16): p. 2837-47.
88. Bowden, R.J., et al., *Murine gammaherpesvirus 68 encodes tRNA-like sequences which are expressed during latency*. *J Gen Virol*, 1997. **78** (Pt 7): p. 1675-87.
89. Bogerd, H.P., et al., *A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs*. *Mol Cell*, 2010. **37**(1): p. 135-42.
90. Zhu, J.Y., et al., *Identification and analysis of expression of novel microRNAs of murine gammaherpesvirus 68*. *J Virol*, 2010. **84**(19): p. 10266-75.
91. Pfeffer, S., et al., *Identification of microRNAs of the herpesvirus family*. *Nat Methods*, 2005. **2**(4): p. 269-76.
92. Sullivan, C.S. and D. Ganem, *MicroRNAs and viral infection*. *Mol Cell*, 2005. **20**(1): p. 3-7.
93. Canny, S.P., et al., *Latent gammaherpesvirus 68 infection induces distinct transcriptional changes in different organs*. *J Virol*, 2014. **88**(1): p. 730-8.
94. Canny, S.P., et al., *Pervasive transcription of a herpesvirus genome generates functionally important RNAs*. *MBio*, 2014. **5**(2): p. e01033-13.
95. Cheng, B.Y., et al., *Tiled microarray identification of novel viral transcript structures and distinct transcriptional profiles during two modes of productive murine gammaherpesvirus 68 infection*. *J Virol*, 2012. **86**(8): p. 4340-57.
96. Krug, L.T., *Complexities of gammaherpesvirus transcription revealed by microarrays and RNAseq*. *Curr Opin Virol*, 2013. **3**(3): p. 276-84.
97. Johnson, L.S., E.K. Willert, and H.W. Virgin, *Redefining the genetics of murine gammaherpesvirus 68 via transcriptome-based annotation*. *Cell Host Microbe*, 2010. **7**(6): p. 516-26.

98. Sunil-Chandra, N.P., et al., *Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 9): p. 2347-56.
99. Milho, R., et al., *In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 21-32.
100. Connolly, S.A., et al., *Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 369-81.
101. Spear, P.G. and R. Longnecker, *Herpesvirus entry: an update*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10179-85.
102. Yamauchi, Y. and A. Helenius, *Virus entry at a glance*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 6): p. 1289-95.
103. Sedy, J.R., P.G. Spear, and C.F. Ware, *Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 861-73.
104. Heldwein, E.E. and C. Krummenacher, *Entry of herpesviruses into mammalian cells*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1653-68.
105. Szakonyi, G., et al., *Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(11): p. 996-1001.
106. Young, K.A., et al., *Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21)*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36614-25.
107. Tugizov, S.M., J.W. Berline, and J.M. Palefsky, *Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 307-14.
108. Xiao, J., et al., *The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells*. Virology, 2008. **370**(2): p. 430-42.
109. Xiao, J., et al., *Characterization of the Epstein-Barr virus glycoprotein BMRF-2*. Virology, 2007. **359**(2): p. 382-96.
110. Hutt-Fletcher, L.M. and L.S. Chesnokova, *Integrins as triggers of Epstein-Barr virus fusion and epithelial cell infection*. Virulence, 2010. **1**(5): p. 395-8.
111. Akula, S.M., et al., *Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells*. Cell, 2002. **108**(3): p. 407-19.
112. Akula, S.M., et al., *Human herpesvirus 8 envelope-associated glycoprotein B interacts with heparan sulfate-like moieties*. Virology, 2001. **284**(2): p. 235-49.
113. Wang, F.Z., et al., *Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate*. J Virol, 2001. **75**(16): p. 7517-27.
114. de Lima, B.D., J.S. May, and P.G. Stevenson, *Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5103-12.
115. Gillet, L., H. Adler, and P.G. Stevenson, *Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection*. PLoS One, 2007. **2**(4): p. e347.
116. Mark, L., et al., *The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein (KCP) binds to heparin and cell surfaces via positively charged amino acids in CCP1-2*. Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1665-75.
117. Gill, M.B., et al., *Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 6): p. 1465-75.
118. Gillet, L., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *The murid herpesvirus-4 gH/gL binds to glycosaminoglycans*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1669.
119. Prodinger, W.M., *Complement receptor type two (CR2,CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping*. Immunol Res, 1999. **20**(3): p. 187-94.
120. Kaleeba, J.A. and E.A. Berger, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1921-4.
121. Hahn, A.S., et al., *The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 961-6.
122. Chakraborty, S., M.V. Veettil, and B. Chandran, *Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 6.

123. Greene, W. and S.J. Gao, *Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000512.
124. Chakraborty, S., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with EphrinA2 receptor to amplify signaling essential for productive infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(19): p. E1163-72.
125. Daecke, J., et al., *Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1581-94.
126. Miyauchi, K., et al., *HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes*. Cell, 2009. **137**(3): p. 433-44.
127. Nicola, A.V., A.M. McEvoy, and S.E. Straus, *Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5324-32.
128. Marsh, M. and R. Bron, *SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 1): p. 95-103.
129. Sodeik, B., *Mechanisms of viral transport in the cytoplasm*. Trends Microbiol, 2000. **8**(10): p. 465-72.
130. Marsh, M. and A. Helenius, *Virus entry into animal cells*. Adv Virus Res, 1989. **36**: p. 107-51.
131. Griffin, B.D., M.C. Verweij, and E.J. Wiertz, *Herpesviruses and immunity: the art of evasion*. Vet Microbiol, 2010. **143**(1): p. 89-100.
132. Gagescu, R., et al., *The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(8): p. 2775-91.
133. Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright, *Lysosomes: fusion and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 622-32.
134. Mellman, I., *Endocytosis and molecular sorting*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 575-625.
135. Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius, *Virus entry by endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 803-33.
136. Nichols, B., *Caveosomes and endocytosis of lipid rafts*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 23): p. 4707-14.
137. Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(11): p. 424-8.
138. Mercer, J. and A. Helenius, *Virus entry by macropinocytosis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(5): p. 510-20.
139. Raghu, H., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4895-911.
140. Braulke, T. and J.S. Bonifacino, *Sorting of lysosomal proteins*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(4): p. 605-14.
141. Mukherjee, S. and F.R. Maxfield, *Lipid and cholesterol trafficking in NPC*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1685**(1-3): p. 28-37.
142. Pfeffer, S. and D. Aivazian, *Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 886-96.
143. Rink, J., et al., *Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes*. Cell, 2005. **122**(5): p. 735-49.
144. Vonderheit, A. and A. Helenius, *Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes*. PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e233.
145. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 107-17.
146. Piper, R.C. and D.J. Katzmman, *Biogenesis and function of multivesicular bodies*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 519-47.
147. Roche, S., et al., *Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1716-28.
148. Weissenhorn, W., A. Hinz, and Y. Gaudin, *Virus membrane fusion*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2150-5.

149. Kielian, M. and F.A. Rey, *Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(1): p. 67-76.
150. Shelly, S.S., et al., *The membrane-proximal region (MPR) of herpes simplex virus gB regulates association of the fusion loops with lipid membranes*. MBio, 2012. **3**(6).
151. Hosaka, M., et al., *Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12127-30.
152. Sorem, J. and R. Longnecker, *Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 591-5.
153. Glauser, D.L., et al., *Glycoprotein B cleavage is important for murid herpesvirus 4 to infect myeloid cells*. J Virol, 2013. **87**(19): p. 10828-42.
154. Chernomordik, L.V., et al., *The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation*. J Cell Biol, 1998. **140**(6): p. 1369-82.
155. Gaudin, Y., *Rabies virus-induced membrane fusion pathway*. J Cell Biol, 2000. **150**(3): p. 601-12.
156. Zaitseva, E., et al., *Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins*. J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 167-77.
157. Chernomordik, L., M.M. Kozlov, and J. Zimmerberg, *Lipids in biological membrane fusion*. J Membr Biol, 1995. **146**(1): p. 1-14.
158. Paulissen, G., et al., *ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen-induced airway inflammation*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 380-91.
159. Verkman, A.S., *Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 27-33.
160. Radtke, K., et al., *Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1000991.
161. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
162. Falk, D.L., et al., *Shared, unique and redundant functions of three members of the class I myosins (MyoA, MyoB and MyoF) in motility and chemotaxis in Dictyostelium*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 19): p. 3985-99.
163. Valiya Veettil, M., et al., *Interaction of c-Cbl with myosin IIA regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001238.
164. Clement, C., et al., *A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 1009-21.
165. Cudmore, S., I. Reckmann, and M. Way, *Viral manipulations of the actin cytoskeleton*. Trends Microbiol, 1997. **5**(4): p. 142-8.
166. Johannsen, E., et al., *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16286-91.
167. Valencia, S.M. and L.M. Hutt-Fletcher, *Important but differential roles for actin in trafficking of Epstein-Barr virus in B cells and epithelial cells*. J Virol, 2012. **86**(1): p. 2-10.
168. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
169. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6577-87.
170. Dammermann, A., A. Desai, and K. Oegema, *The minus end in sight*. Curr Biol, 2003. **13**(15): p. R614-24.
171. Ovechkina, Y. and L. Wordeman, *Unconventional motoring: an overview of the Kin C and Kin I kinesins*. Traffic, 2003. **4**(6): p. 367-75.
172. Susalka, S.J. and K.K. Pfister, *Cytoplasmic dynein subunit heterogeneity: implications for axonal transport*. J Neurocytol, 2000. **29**(11-12): p. 819-29.

173. Schroer, T.A., *Dynactin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 759-79.
174. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
175. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
176. Sharma-Walia, N., et al., *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*. J Virol, 2004. **78**(8): p. 4207-23.
177. Dohner, K., C.H. Nagel, and B. Sodeik, *Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins*. Trends Microbiol, 2005. **13**(7): p. 320-7.
178. Bandyopadhyay, C., et al., *CIB1 synergizes with EphrinA2 to regulate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus macropinocytic entry in human microvascular dermal endothelial cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003941.
179. Smith, G.A., S.P. Gross, and L.W. Enquist, *Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3466-70.
180. Douglas, M.W., et al., *Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28522-30.
181. Wolfstein, A., et al., *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-37.
182. Dodding, M.P. and M. Way, *Coupling viruses to dynein and kinesin-1*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3527-39.
183. Mohr, D., et al., *Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes*. EMBO J, 2009. **28**(17): p. 2541-53.
184. Gorlich, D. and U. Kutay, *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 607-60.
185. Ribbeck, K. and D. Gorlich, *Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1320-30.
186. Kalderon, D., et al., *Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen*. Nature, 1984. **311**(5981): p. 33-8.
187. Gorlich, D., et al., *Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import*. Cell, 1994. **79**(5): p. 767-78.
188. Moroianu, J., G. Blobel, and A. Radu, *Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2008-11.
189. Moroianu, J., G. Blobel, and A. Radu, *The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6572-6.
190. Wen, W., et al., *Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus*. Cell, 1995. **82**(3): p. 463-73.
191. Guttler, T., et al., *NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(11): p. 1367-76.
192. Bischoff, F.R., et al., *RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2587-91.
193. Alber, F., et al., *The molecular architecture of the nuclear pore complex*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 695-701.
194. Ribbeck, K. and D. Gorlich, *The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion*. EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2664-71.
195. Frey, S. and D. Gorlich, *A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes*. Cell, 2007. **130**(3): p. 512-23.

196. Burns, L.T. and S.R. Wentz, *Trafficking to uncharted territory of the nuclear envelope*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(3): p. 341-9.
197. Kobiler, O., et al., *Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier*. *Nucleus*, 2012. **3**(6): p. 526-39.
198. Ojala, P.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(13): p. 4922-31.
199. Newcomb, W.W., F.P. Booy, and J.C. Brown, *Uncoating the herpes simplex virus genome*. *J Mol Biol*, 2007. **370**(4): p. 633-42.
200. Copeland, A.M., W.W. Newcomb, and J.C. Brown, *Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment*. *J Virol*, 2009. **83**(4): p. 1660-8.
201. Padeloup, D., et al., *Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25*. *J Virol*, 2009. **83**(13): p. 6610-23.
202. Batterson, W., D. Furlong, and B. Roizman, *Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle*. *J Virol*, 1983. **45**(1): p. 397-407.
203. Jovasevic, V., L. Liang, and B. Roizman, *Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3311-9.
204. Preston, V.G., et al., *The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome*. *J Virol*, 2008. **82**(13): p. 6654-66.
205. Trus, B.L., et al., *Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12668-71.
206. Newcomb, W.W., et al., *Polarized DNA ejection from the herpesvirus capsid*. *J Mol Biol*, 2009. **392**(4): p. 885-94.
207. Shahin, V., et al., *The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 1): p. 23-30.
208. Liashkovich, I., et al., *Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome*. *J Mol Recognit*, 2011. **24**(3): p. 414-21.
209. Poffenberger, K.L. and B. Roizman, *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*. *J Virol*, 1985. **53**(2): p. 587-95.
210. Muylaert, I., K.W. Tang, and P. Elias, *Replication and recombination of herpes simplex virus DNA*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(18): p. 15619-24.
211. Alfieri, C., M. Birkenbach, and E. Kieff, *Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes*. *Virology*, 1991. **181**(2): p. 595-608.
212. Sun, R., et al., *Sp1 binds to the precise locus of end processing within the terminal repeats of Epstein-Barr virus DNA*. *J Virol*, 1997. **71**(8): p. 6136-43.
213. Alberter, B. and A. Ensser, *Histone modification pattern of the T-cellular Herpesvirus saimiri genome in latency*. *J Virol*, 2007. **81**(5): p. 2524-30.
214. Pilot, T., et al., *Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes*. *J Virol*, 2001. **75**(8): p. 3948-59.
215. Padgett, R.A., D.F. Moore, and D.T. Kingsbury, *Herpes simplex virus nucleic acid synthesis following infection of non-permissive XC cells*. *J Gen Virol*, 1978. **40**(3): p. 605-14.
216. Robinson, R.A. and D.J. O'Callaghan, *A specific viral DNA sequence is stably integrated in herpesvirus oncogenically transformed cells*. *Cell*, 1983. **32**(2): p. 569-78.
217. Sullivan, D.C., et al., *Oncogenic transformation of primary hamster embryo cells by equine herpesvirus type 3*. *Virus Res*, 1986. **5**(2-3): p. 201-12.
218. King, W., et al., *Epstein-Barr virus RNA. V. Viral RNA in a restringently infected, growth-transformed cell line*. *J Virol*, 1980. **36**(2): p. 506-18.

219. Klein, G. and L. Dombos, *Relationship between the sensitivity of EBV-carrying lymphoblastoid lines to superinfection and the inducibility of the resident viral genome*. *Int J Cancer*, 1973. **11**(2): p. 327-37.
220. Hurley, E.A., et al., *When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates*. *J Virol*, 1991. **65**(3): p. 1245-54.
221. Anvret, M., A. Karlsson, and G. Bjursell, *Evidence for integrated EBV genomes in Raji cellular DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1984. **12**(2): p. 1149-61.
222. Delecluse, H.J., et al., *Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines*. *J Virol*, 1993. **67**(3): p. 1292-9.
223. Chang, Y., S.D. Cheng, and C.H. Tsai, *Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells*. *Head Neck*, 2002. **24**(2): p. 143-50.
224. Kripalani-Joshi, S. and H.Y. Law, *Identification of integrated Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma using pulse field gel electrophoresis*. *Int J Cancer*, 1994. **56**(2): p. 187-92.
225. Wu, T.T., et al., *Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency*. *J Virol*, 2000. **74**(8): p. 3659-67.
226. Ebrahimi, B., et al., *Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 1): p. 99-109.
227. Townsley, A.C., B.M. Dutia, and A.A. Nash, *The m4 gene of murine gammaherpesvirus modulates productive and latent infection in vivo*. *J Virol*, 2004. **78**(2): p. 758-67.
228. Li, X., et al., *Tpl2/AP-1 enhances murine gammaherpesvirus 68 lytic replication*. *J Virol*, 2010. **84**(4): p. 1881-90.
229. Jacob, R.J., L.S. Morse, and B. Roizman, *Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA*. *J Virol*, 1979. **29**(2): p. 448-57.
230. Weller, S.K. and D.M. Coen, *Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(9): p. a013011.
231. Schrag, J.D., et al., *Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid*. *Cell*, 1989. **56**(4): p. 651-60.
232. Zhou, Z.H., et al., *Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å*. *Science*, 2000. **288**(5467): p. 877-80.
233. O'Connor, C.M. and D.H. Kedes, *Mass spectrometric analyses of purified rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins*. *J Virol*, 2006. **80**(3): p. 1574-83.
234. Deng, B., et al., *Direct visualization of the putative portal in the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsid by cryoelectron tomography*. *J Virol*, 2007. **81**(7): p. 3640-4.
235. Lo, P., et al., *Three-dimensional localization of pORF65 in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsid*. *J Virol*, 2003. **77**(7): p. 4291-7.
236. Germi, R., et al., *Three-dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid*. *J Gen Virol*, 2012. **93**(Pt 8): p. 1769-73.
237. Spencer, J.V., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 3944-51.
238. Thomsen, D.R., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes*. *J Virol*, 1995. **69**(6): p. 3690-703.
239. Gao, M., et al., *The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth*. *J Virol*, 1994. **68**(6): p. 3702-12.
240. Nicholson, P., et al., *Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a*. *J Gen Virol*, 1994. **75** (Pt 5): p. 1091-9.
241. Baines, J.D., *Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target*. *Trends Microbiol*, 2011. **19**(12): p. 606-13.
242. Newcomb, W.W., F.L. Homa, and J.C. Brown, *Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10540-6.

243. Kim, H.S., et al., *A domain in the herpes simplex virus 1 triplex protein VP23 is essential for closure of capsid shells into icosahedral structures*. J Virol, 2011. **85**(23): p. 12698-707.
244. Cardone, G., et al., *Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions*. Adv Exp Med Biol, 2012. **726**: p. 423-39.
245. Martinez, R., et al., *Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2075-85.
246. McNab, A.R., et al., *The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1060-70.
247. Yu, X.K., et al., *Three-dimensional structures of the A, B, and C capsids of rhesus monkey rhadinovirus: insights into gammaherpesvirus capsid assembly, maturation, and DNA packaging*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13182-93.
248. Rixon, F.J. and M.F. Schmid, *Structural similarities in DNA packaging and delivery apparatuses in Herpesvirus and dsDNA bacteriophages*. Curr Opin Virol, 2014. **5C**: p. 105-110.
249. Visalli, R.J. and M. van Zeijl, *DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy*. Antiviral Res, 2003. **59**(2): p. 73-87.
250. Mettenleiter, T.C., et al., *The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress*. Cell Microbiol, 2013. **15**(2): p. 170-8.
251. Johnson, D.C. and J.D. Baines, *Herpesviruses remodel host membranes for virus egress*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 382-94.
252. Forest, T., S. Barnard, and J.D. Baines, *Active intranuclear movement of herpesvirus capsids*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 429-31.
253. Pante, N. and M. Kann, *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 425-34.
254. Cohen, S., S. Au, and N. Pante, *How viruses access the nucleus*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(9): p. 1634-45.
255. Morrison, L.A. and G.S. DeLassus, *Breach of the nuclear lamina during assembly of herpes simplex viruses*. Nucleus, 2011. **2**(4): p. 271-6.
256. Desai, P.J., et al., *Reconstitution of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus nuclear egress complex and formation of nuclear membrane vesicles by coexpression of ORF67 and ORF69 gene products*. J Virol, 2012. **86**(1): p. 594-8.
257. Shiba, C., et al., *The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2397-405.
258. Chang, Y.E. and B. Roizman, *The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6348-56.
259. Fuchs, W., et al., *The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions*. J Virol, 2002. **76**(1): p. 364-78.
260. Reynolds, A.E., L. Liang, and J.D. Baines, *Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5564-75.
261. Muranyi, W., et al., *Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina*. Science, 2002. **297**(5582): p. 854-7.
262. Klupp, B.G., H. Granzow, and T.C. Mettenleiter, *Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product*. J Virol, 2000. **74**(21): p. 10063-73.
263. Lee, C.P. and M.R. Chen, *Escape of herpesviruses from the nucleus*. Rev Med Virol, 2010. **20**(4): p. 214-30.
264. Yang, K. and J.D. Baines, *Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14276-81.

265. Newcomb, W.W., F.L. Homa, and J.C. Brown, *Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6286-94.
266. Granzow, H., et al., *Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2072-82.
267. Toropova, K., et al., *The herpes simplex virus 1 UL17 protein is the second constituent of the capsid vertex-specific component required for DNA packaging and retention*. J Virol, 2011. **85**(15): p. 7513-22.
268. Dai, X., et al., *Organization of Capsid-associated Tegument Components in Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus*. J Virol, 2014.
269. Fossum, E., et al., *Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks*. PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000570.
270. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Res, 2009. **145**(2): p. 173-86.
271. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
272. Meckes, D.G., Jr. and J.W. Wills, *Structural rearrangement within an enveloped virus upon binding to the host cell*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10429-35.
273. Guo, H., et al., *Open reading frame 33 of a gammaherpesvirus encodes a tegument protein essential for virion morphogenesis and egress*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10582-95.
274. Sathish, N., X. Wang, and Y. Yuan, *Tegument Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Related Gamma-Herpesviruses*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 98.
275. Zhu, F.X., et al., *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 800-11.
276. Bechtel, J.T., R.C. Winant, and D. Ganem, *Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4952-64.
277. Vittone, V., et al., *Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9566-71.
278. Leelawong, M., J.I. Lee, and G.A. Smith, *Nuclear egress of pseudorabies virus capsids is enhanced by a subspecies of the large tegument protein that is lost upon cytoplasmic maturation*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6303-14.
279. Granzow, H., B.G. Klupp, and T.C. Mettenleiter, *The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1314-23.
280. Reynolds, A.E., et al., *Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8939-52.
281. Padula, M.E., M.L. Sydnor, and D.W. Wilson, *Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4757-65.
282. Chen, D.H., et al., *Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus*. Virology, 1999. **260**(1): p. 10-6.
283. Dai, W., et al., *Unique structures in a tumor herpesvirus revealed by cryo-electron tomography and microscopy*. J Struct Biol, 2008. **161**(3): p. 428-38.
284. Torrisi, M.R., et al., *Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 554-61.
285. Skepper, J.N., et al., *Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5697-702.
286. Farnsworth, A., et al., *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10187-92.

287. Wright, C.C., et al., *Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11847-56.
288. Klupp, B., et al., *Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6299-309.
289. Ott, M., et al., *Functional characterization of the essential tail anchor of the herpes simplex virus type 1 nuclear egress protein pUL34*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 12): p. 2734-45.
290. Schuster, F., et al., *Structural determinants for nuclear envelope localization and function of pseudorabies virus pUL34*. J Virol, 2012. **86**(4): p. 2079-88.
291. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
292. Rozen, R., et al., *Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 4742-50.
293. Bernhard, O.K., R.J. Diefenbach, and A.L. Cunningham, *New insights into viral structure and virus-cell interactions through proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2005. **2**(4): p. 577-88.
294. Calderwood, M.A., et al., *Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7606-11.
295. Zhang, Y. and J.L. McKnight, *Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1482-92.
296. Chevillotte, M., et al., *Major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2480-90.
297. Michael, K., et al., *Efficient incorporation of tegument proteins pUL46, pUL49, and pUS3 into pseudorabies virus particles depends on the presence of pUL21*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 1048-51.
298. Bortz, E., et al., *Murine gammaherpesvirus 68 ORF52 encodes a tegument protein required for virion morphogenesis in the cytoplasm*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 10137-50.
299. Mettenleiter, T.C., *Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle*. Vet Microbiol, 2006. **113**(3-4): p. 163-9.
300. Fuchs, W., et al., *Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11879-89.
301. Wang, L., et al., *Distinct domains in ORF52 tegument protein mediate essential functions in murine gammaherpesvirus 68 virion tegumentation and secondary envelopment*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1348-57.
302. Jia, Q., et al., *Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 45 plays an essential role during the immediate-early phase of viral replication*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 5129-41.
303. Gregory, S.M., et al., *Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome*. Science, 2011. **331**(6015): p. 330-4.
304. Gonzalez, C.M., L. Wang, and B. Damania, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a viral deubiquitinase*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 10224-33.
305. Klupp, B.G., et al., *Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1510-22.
306. Lyman, M.G. and L.W. Enquist, *Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2058-66.
307. Sathish, N., F.X. Zhu, and Y. Yuan, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 interacts with kinesin-2 transporting viral capsid-tegument complexes along microtubules*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000332.
308. Zhu, Z., et al., *Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7951-9.
309. Harley, C.A., A. Dasgupta, and D.W. Wilson, *Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1236-51.

310. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
311. Hollinshead, M., et al., *Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus*. EMBO J, 2012. **31**(21): p. 4204-20.
312. Bowzard, J.B., et al., *Membrane targeting properties of a herpesvirus tegument protein-retrovirus Gag chimera*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8692-9.
313. Wisner, T.W. and D.C. Johnson, *Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11519-35.
314. Henaff, D., K. Radtke, and R. Lippe, *Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment*. Traffic, 2012. **13**(11): p. 1443-9.
315. Johnson, D.C., et al., *Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 821-33.
316. D'Addario, M., et al., *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, 2001. **308**(3): p. 501-14.
317. Favoreel, H.W., et al., *Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies*. Vet Microbiol, 2006. **113**(3-4): p. 257-63.
318. Lake, C.M., S.J. Molesworth, and L.M. Hutt-Fletcher, *The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3*. J. Virol., 1998. **72**(7): p. 5559-64.
319. Herrold, R.E., et al., *Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 2049-54.
320. Molesworth, S.J., et al., *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, 2000. **74**(14): p. 6324-32.
321. Pertel, P.E., P.G. Spear, and R. Longnecker, *Human herpesvirus-8 glycoprotein B interacts with Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein 110 but fails to complement the infectivity of EBV mutants*. Virology, 1998. **251**(2): p. 402-13.
322. Backovic, M., R. Longnecker, and T.S. Jardetzky, *Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2880-5.
323. Heldwein, E.E., et al., *Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1*. Science, 2006. **313**(5784): p. 217-20.
324. Matsuura, H., et al., *Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(52): p. 22641-6.
325. McShane, M.P. and R. Longnecker, *Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(50): p. 17474-9.
326. Sathiyamoorthy, K., et al., *Assembly and Architecture of the EBV B Cell Entry Triggering Complex*. PLoS Pathog, 2014. **10**(8): p. e1004309.
327. Pertel, P.E., *Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4390-400.
328. Backovic, M. and T.S. Jardetzky, *Class III viral membrane fusion proteins*. Adv Exp Med Biol, 2011. **714**: p. 91-101.
329. Babcock, G.J., et al., *EBV persistence in memory B cells in vivo*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 395-404.
330. Baghian, A., et al., *Glycoprotein B of human herpesvirus 8 is a component of the virion in a cleaved form composed of amino- and carboxyl-terminal fragments*. Virology, 2000. **269**(1): p. 18-25.

331. Britt, W.J. and L.G. Vugler, *Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 403-10.
332. Okazaki, K., *Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication, but required for syncytium formation of pseudorabies virus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 7): p. 1859-65.
333. Backovic, M., et al., *Characterization of EBV gB indicates properties of both class I and class II viral fusion proteins*. Virology, 2007. **368**(1): p. 102-13.
334. Kopp, A., et al., *Proteolytic cleavage of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or pseudorabies virus*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1667-74.
335. Cole, N.L. and C. Grose, *Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus*. Rev Med Virol, 2003. **13**(4): p. 207-22.
336. Kinzler, E.R. and T. Compton, *Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7827-37.
337. Chowdary, T.K., et al., *Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(7): p. 882-8.
338. Backovic, M., et al., *Structure of a core fragment of glycoprotein H from pseudorabies virus in complex with antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(52): p. 22635-40.
339. Gillet, L., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *The Murid Herpesvirus-4 gL regulates an entry-associated conformation change in gH*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2811.
340. Dubin, G. and H. Jiang, *Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes*. J Virol, 1995. **69**(7): p. 4564-8.
341. Peng, T., et al., *Structural and antigenic analysis of a truncated form of the herpes simplex virus glycoprotein gH-gL complex*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 6092-103.
342. Hutchinson, L., et al., *A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2240-50.
343. Galdiero, S., et al., *Fusogenic domains in herpes simplex virus type 1 glycoprotein H*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28632-43.
344. Gianni, T., et al., *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*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2931-40.
345. Hutt-Fletcher, L.M., *Epstein-Barr virus entry*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7825-32.
346. Wu, L. and L.M. Hutt-Fletcher, *Point mutations in EBV gH that abrogate or differentially affect B cell and epithelial cell fusion*. Virology, 2007. **363**(1): p. 148-55.
347. Hahn, A.S. and R.C. Desrosiers, *Binding of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus to the Ephrin Binding Surface of the EphA2 Receptor and its Inhibition by a Small Molecule*. J Virol, 2014.
348. Gillet, L., et al., *Glycoprotein L disruption reveals two functional forms of the murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein H*. J Virol, 2007. **81**(1): p. 280-91.
349. Lete, C., et al., *Bovine herpesvirus type 4 glycoprotein L is nonessential for infectivity but triggers virion endocytosis during entry*. J Virol, 2012. **86**(5): p. 2653-64.
350. Mullen, M.M., et al., *Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 375-85.
351. Kirschner, A.N., et al., *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*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9444-54.
352. Kirschner, A.N., et al., *Structure of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 suggests a mechanism for triggering receptor-activated virus entry*. Structure, 2009. **17**(2): p. 223-33.
353. Stewart, J.P., et al., *Identification and characterization of murine gammaherpesvirus 68 gp150: a virion membrane glycoprotein*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 3528-35.

354. Machiels, B., et al., *Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002387.
355. Gillet, L., J.S. May, and P.G. Stevenson, *In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murid herpesvirus-4 infection*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 602-13.
356. May, J.S., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *Glycoprotein M Is an Essential Lytic Replication Protein of the Murine Gammaherpesvirus 68*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3459-3467.
357. Brack, A.R., et al., *Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5364-72.
358. Browne, H., S. Bell, and T. Minson, *Analysis of the requirement for glycoprotein m in herpes simplex virus type 1 morphogenesis*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 1039-41.
359. Dijkstra, J.M., et al., *Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component*. J. Virol., 1996. **70**(8): p. 5684-8.
360. Jons, A., J.M. Dijkstra, and T.C. Mettenleiter, *Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex*. J. Virol., 1998. **72**(1): p. 550-7.
361. MacLean, C.A., L.M. Robertson, and F.E. Jamieson, *Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 6): p. 975-83.
362. May, J.S., et al., *An essential role for the proximal but not the distal cytoplasmic tail of glycoprotein M in murid herpesvirus 4 infection*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2131.
363. Osterrieder, N., et al., *The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 4110-5.
364. Wu, S.X., X.P. Zhu, and G.J. Letchworth, *Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3029-36.
365. Singer, S.J., *The structure and insertion of integral proteins in membranes*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 247-96.
366. Tischer, B.K., et al., *The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells*. J. Gen. Virol., 2002. **83**(Pt 5): p. 997-1003.
367. Dijkstra, J.M., et al., *Different point mutations within the conserved N-glycosylation motif of pseudorabies virus glycoprotein M result in expression of a nonglycosylated form of the protein*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 4): p. 851-4.
368. Krzyzaniak, M., M. Mach, and W.J. Britt, *The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10316-28.
369. Davis-Poynter, N., et al., *Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7586-90.
370. Koyano, S., et al., *Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 6): p. 1485-91.
371. Mach, M., et al., *Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2160-70.
372. Yamagishi, Y., et al., *Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 795-804.
373. Sadaoka, T., et al., *Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M*. J Virol, 2010. **84**(7): p. 3488-502.
374. May, J.S., et al., *The murine gammaherpesvirus 68 ORF27 gene product contributes to intercellular viral spread*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 5059-68.
375. Gill, M.B., et al., *A gamma-herpesvirus glycoprotein complex manipulates actin to promote viral spread*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1808.

376. Jham, B.C. and S. Montaner, *The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor: Lessons on dysregulated angiogenesis from a viral oncogene*. J Cell Biochem, 2010. **110**(1): p. 1-9.
377. Sandford, G., Y.B. Choi, and J. Nicholas, *Role of ORF74-encoded viral G protein-coupled receptor in human herpesvirus 8 lytic replication*. J Virol, 2009. **83**(24): p. 13009-14.
378. McLean, K.A., et al., *Similar activation of signal transduction pathways by the herpesvirus-encoded chemokine receptors US28 and ORF74*. Virology, 2004. **325**(2): p. 241-51.
379. Estep, R.D., M.K. Axthelm, and S.W. Wong, *A G protein-coupled receptor encoded by rhesus rhadinovirus is similar to ORF74 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 1738-46.
380. Kapadia, S.B., et al., *Murine gammaherpesvirus 68 encodes a functional regulator of complement activation*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7658-70.
381. Santos, S., et al., *Virus-producing cells determine the host protein profiles of HIV-1 virion cores*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 65.
382. Shaw, M.L., et al., *Cellular proteins in influenza virus particles*. PLoS Pathog, 2008. **4**(6): p. e1000085.
383. Moerdyk-Schauwecker, M., S.I. Hwang, and V.Z. Grdzlishvili, *Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach*. Virol J, 2009. **6**: p. 166.
384. Vanderplasschen, A., et al., *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, 1998. **95**(13): p. 7544-9.
385. Thorley-Lawson, D.A. and A. Gross, *Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas*. N Engl J Med, 2004. **350**(13): p. 1328-37.
386. Verma, S.C. and E.S. Robertson, *Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **222**(2): p. 155-63.
387. Coscoy, L., *Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 391-401.
388. Law, M. and L. Hangartner, *Antibodies against viruses: passive and active immunization*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 486-92.
389. Karlsson Hedestam, G.B., et al., *The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 143-55.
390. Bortz, E., et al., *Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13425-32.
391. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *The druggable genome*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(9): p. 727-30.
392. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
393. Brass, A.L., et al., *Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen*. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
394. Konig, R., et al., *Human host factors required for influenza virus replication*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 813-7.
395. Konig, R., et al., *Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication*. Cell, 2008. **135**(1): p. 49-60.
396. Li, Q., et al., *A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16410-5.
397. Sessions, O.M., et al., *Discovery of insect and human dengue virus host factors*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1047-50.
398. Ackermann, M., *Pathogenesis of gammaherpesvirus infections*. Vet Microbiol, 2006. **113**(3-4): p. 211-22.
399. Henle, G., et al., *Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups*. J Natl Cancer Inst, 1969. **43**(5): p. 1147-57.

400. Raab-Traub, N., *Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis*. *Curr Opin Virol*, 2012. **2**(4): p. 453-8.
401. Cesarman, E., *Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 349-72.
402. Eisenberg, R.J., et al., *Herpes virus fusion and entry: a story with many characters*. *Viruses*, 2012. **4**(5): p. 800-32.
403. Krummenacher, C., et al., *Entry of herpesviruses into cells: the enigma variations*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **790**: p. 178-95.
404. Dutta, D., et al., *EphrinA2 regulates clathrin mediated KSHV endocytosis in fibroblast cells by coordinating integrin-associated signaling and c-Cbl directed polyubiquitination*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(7): p. e1003510.
405. Francois, S., et al., *Illumination of murine gammaherpesvirus-68 cycle reveals a sexual transmission route from females to males in laboratory mice*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003292.
406. Bushman, F.D., et al., *Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000437.
407. Pache, L., R. Konig, and S.K. Chanda, *Identifying HIV-1 host cell factors by genome-scale RNAi screening*. *Methods*, 2011. **53**(1): p. 3-12.
408. Zhou, H., et al., *Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication*. *Cell Host Microbe*, 2008. **4**(5): p. 495-504.
409. Teferi, W.M., et al., *A whole-genome RNA interference screen for human cell factors affecting myxoma virus replication*. *J Virol*, 2013. **87**(8): p. 4623-41.
410. Lee, A.S., R. Burdeinick-Kerr, and S.P. Whelan, *A genome-wide small interfering RNA screen identifies host factors required for vesicular stomatitis virus infection*. *J Virol*, 2014. **88**(15): p. 8355-60.
411. Ng, T.I., et al., *Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology*. *Hepatology*, 2007. **45**(6): p. 1413-21.
412. Erfle, H., et al., *Work flow for multiplexing siRNA assays by solid-phase reverse transfection in multiwell plates*. *J Biomol Screen*, 2008. **13**(7): p. 575-80.
413. Neumann, B., et al., *Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes*. *Nature*, 2010. **464**(7289): p. 721-7.
414. Adler, H., et al., *Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome*. *J Virol*, 2000. **74**(15): p. 6964-74.
415. Gillet, L., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *Glycoprotein B switches conformation during murid herpesvirus 4 entry*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(Pt 6): p. 1352-63.
416. Thomas, P.D., et al., *PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function*. *Genome Res*, 2003. **13**(9): p. 2129-41.
417. Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein, *Scavenger receptors in homeostasis and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(9): p. 621-34.
418. Scarselli, E., et al., *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. *EMBO J*, 2002. **21**(19): p. 5017-25.
419. Yamayoshi, S., et al., *Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71*. *Nat Med*, 2009. **15**(7): p. 798-801.
420. Evans, M.J., et al., *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 801-5.
421. Tomsig, J.L. and C.E. Creutz, *Copines: a ubiquitous family of Ca(2+)-dependent phospholipid-binding proteins*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(9): p. 1467-77.
422. Kandiah, E., et al., *More pieces to the puzzle: recent structural insights into class II transcription initiation*. *Curr Opin Struct Biol*, 2014. **24**: p. 91-7.
423. Centeno, F., et al., *TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation*. *Intervirology*, 2008. **51**(2): p. 137-43.

424. Davis, Z.H., et al., *Global Mapping of Herpesvirus-Host Protein Complexes Reveals a Transcription Strategy for Late Genes*. Mol Cell, 2014.
425. Gottipati, S., N.L. Rao, and W.P. Fung-Leung, *IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity*. Cell Signal, 2008. **20**(2): p. 269-76.
426. Abend, J.R., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs target IRAK1 and MYD88, two components of the toll-like receptor/interleukin-1R signaling cascade, to reduce inflammatory-cytokine expression*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11663-74.
427. Kawai, T. and S. Akira, *Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 513-27.
428. Rajsbaum, R., A. Garcia-Sastre, and G.A. Versteeg, *TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity*. J Mol Biol, 2014. **426**(6): p. 1265-84.
429. Versteeg, G.A., et al., *InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(5): p. 563-76.
430. Versteeg, G.A., et al., *The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 384-98.
431. Munir, M., *TRIM proteins: another class of viral victims*. Sci Signal, 2010. **3**(118): p. jc2.
432. Scherer, M., et al., *Crystal Structure of Cytomegalovirus IE1 Protein Reveals Targeting of TRIM Family Member PML via Coiled-Coil Interactions*. PLoS Pathog, 2014. **10**(11): p. e1004512.
433. Marshansky, V., J.L. Rubinstein, and G. Gruber, *Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(6): p. 857-79.
434. Fava, L.L., et al., *Caspase-2 at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 24): p. 5911-5.
435. Mahoney, D.J., et al., *Virus-tumor interactome screen reveals ER stress response can reprogram resistant cancers for oncolytic virus-triggered caspase-2 cell death*. Cancer Cell, 2011. **20**(4): p. 443-56.
436. Taylor, G.M., et al., *Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5528-39.
437. Leung, H.J., et al., *Activation of the unfolded protein response by 2-deoxy-D-glucose inhibits Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and gene expression*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5794-803.
438. Guo, H., et al., *Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress*. Protein Cell, 2010. **1**(11): p. 987-98.
439. Gillet, L. and P.G. Stevenson, *Evidence for a multiprotein gamma-2 herpesvirus entry complex*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 13082-91.
440. May, J.S., et al., *Intercellular gamma-herpesvirus dissemination involves co-ordinated intracellular membrane protein transport*. Traffic, 2005. **6**(9): p. 780-93.
441. Baldick, C.J., Jr. and T. Shenk, *Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6097-105.
442. Dry, I., et al., *Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5390-7.
443. Kattenhorn, L.M., et al., *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11187-97.
444. Kramer, T., et al., *Proteomic characterization of pseudorabies virus extracellular virions*. J Virol, 2011. **85**(13): p. 6427-41.
445. van Beurden, S.J., et al., *Identification and localization of the structural proteins of anguillid herpesvirus 1*. Vet Res, 2011. **42**(1): p. 105.
446. Ling, Q., et al., *Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 38-48.
447. May, J.S., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3459-67.
448. Gillet, L., et al., *The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e705.

449. Gillet, L., et al., *Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein B presents a difficult neutralization target to monoclonal antibodies derived from infected mice*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 12): p. 3515-27.
450. Davison, A.J. and M.D. Davison, *Identification of structural proteins of channel catfish virus by mass spectrometry*. Virology, 1995. **206**(2): p. 1035-43.
451. Mastroleo, F., et al., *Shotgun proteome analysis of Rhodospirillum rubrum S1H: integrating data from gel-free and gel-based peptides fractionation methods*. J Proteome Res, 2009. **8**(5): p. 2530-41.
452. Palmeira, L., et al., *Sequencing of bovine herpesvirus 4 v.test strain reveals important genome features*. Virol J, 2011. **8**: p. 406.
453. Ishihama, Y., et al., *Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(9): p. 1265-72.
454. Team, R.D.C., *R: A Language and Environment for Statistical Computing 2010*, Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
455. Charif, D. and J. Lobry, *SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis*. 2007, New-York: Springer Verlag.
456. Rappsilber, J., et al., *Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome*. Genome Res, 2002. **12**(8): p. 1231-45.
457. Lopes, F.B., et al., *Characterization of murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein B*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13370-5.
458. Brown, J.C. and W.W. Newcomb, *Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(2): p. 142-149.
459. Perkins, E.M., et al., *Small capsid protein pORF65 is essential for assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsids*. J Virol, 2008. **82**(14): p. 7201-11.
460. Ohno, S., et al., *ORF23 of murine gammaherpesvirus 68 is non-essential for in vitro and in vivo infection*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 5): p. 1076-80.
461. Le Sage, V., et al., *The herpes simplex virus 2 UL21 protein is essential for virus propagation*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 5904-15.
462. Hwang, S., et al., *Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(2): p. 166-78.
463. Mounce, B.C., et al., *A conserved gammaherpesvirus protein kinase targets histone deacetylases 1 and 2 to facilitate viral replication in primary macrophages*. J Virol, 2013. **87**(13): p. 7314-25.
464. Nozawa, N., et al., *Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6947-56.
465. Baines, J.D. and B. Roizman, *The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5168-74.
466. Gaspar, M., et al., *Multiple functions for ORF75c in murid herpesvirus-4 infection*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2781.
467. Benach, J., et al., *Structural and functional studies of the abundant tegument protein ORF52 from murine gammaherpesvirus 68*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31534-41.
468. Han, J., et al., *Interaction and interdependent packaging of tegument protein UL11 and glycoprotein e of herpes simplex virus*. J Virol, 2011. **85**(18): p. 9437-46.
469. Jons, A., J.M. Dijkstra, and T.C. Mettenleiter, *Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 550-7.
470. van Berkel, V., et al., *Identification and initial characterization of the murine gammaherpesvirus 68 gene M3, encoding an abundantly secreted protein*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4524-9.
471. Parry, C.M., et al., *A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 573-8.

472. van Berkel, V., et al., *Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6741-7.
473. Hughes, D.J., et al., *Chemokine binding protein M3 of murine gammaherpesvirus 68 modulates the host response to infection in a natural host*. PLoS Pathog, 2011. **7**(3): p. e1001321.
474. Bridgeman, A., et al., *A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus-68 is necessary for the establishment of a normal latent load*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. 301-12.
475. van Berkel, V., et al., *Critical role for a high-affinity chemokine-binding protein in gamma-herpesvirus-induced lethal meningitis*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 905-14.
476. Bryant, N.A., et al., *Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 833-46.
477. Costes, B., et al., *Both soluble and membrane-anchored forms of Felid herpesvirus 1 glycoprotein G function as a broad-spectrum chemokine-binding protein*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 12): p. 3209-14.
478. Balan, P., et al., *An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 6): p. 1245-58.
479. Adamiak, B., et al., *Herpes simplex virus type 2 glycoprotein G is targeted by the sulfated oligo- and polysaccharide inhibitors of virus attachment to cells*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13424-34.
480. Tran, L.C., et al., *A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1818-22.
481. Chertova, E., et al., *Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 9039-52.
482. Woodham, A.W., et al., *The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43519.
483. Saxena, V., et al., *Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft*. J Virol, 2012. **86**(8): p. 4139-50.
484. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 449-61.
485. Wright, J.F., et al., *Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4784-91.
486. Wright, J.F., A. Kurosky, and S. Wasi, *An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(3): p. 983-9.
487. Bold, S., et al., *Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 9): p. 2297-302.
488. Pietropaolo, R.L. and T. Compton, *Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9803-7.
489. Raynor, C.M., et al., *Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes*. Biochemistry, 1999. **38**(16): p. 5089-95.
490. Derry, M.C., et al., *Annexin 2-mediated enhancement of cytomegalovirus infection opposes inhibition by annexin 1 or annexin 5*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 19-27.
491. Pietropaolo, R. and T. Compton, *Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 7): p. 1807-16.
492. Rai, T., A. Mosoian, and M.D. Resh, *Annexin 2 is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle production but plays a cell type-dependent role in regulating infectivity*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9783-92.
493. Sokal, E.M., et al., *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, 2007. **196**(12): p. 1749-53.
494. Shannon-Lowe, C.D., et al., *Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7065-70.
495. Turk, S.M., et al., *Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells.* J Virol, 2006. **80**(19): p. 9628-33.
496. Wu, T.T., et al., *Vaccine prospect of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus.* Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 482-8.
497. Li, R. and S.D. Hayward, *Potential of protein kinase inhibitors for treating herpesvirus-associated disease.* Trends Microbiol, 2013. **21**(6): p. 286-95.
498. Gilbert, C., J. Bestman-Smith, and G. Boivin, *Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms.* Drug Resist Updat, 2002. **5**(2): p. 88-114.
499. Coen, N., et al., *Spectrum of activity and mechanisms of resistance of various nucleoside derivatives against gammaherpesviruses.* Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(12): p. 7312-23.
500. Michaelis, M., et al., *The multi-targeted kinase inhibitor sorafenib inhibits human cytomegalovirus replication.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(6): p. 1079-90.
501. Marty, F.M., et al., *Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial.* Lancet Infect Dis, 2011. **11**(4): p. 284-92.
502. Ou, L., et al., *The application of high throughput siRNA screening technology to study host-pathogen interactions.* Comb Chem High Throughput Screen, 2012. **15**(4): p. 299-305.
503. Sigoillot, F.D. and R.W. King, *Vigilance and validation: Keys to success in RNAi screening.* ACS Chem Biol, 2011. **6**(1): p. 47-60.
504. Hattori, H., et al., *RNAi screen identifies UBE2D3 as a mediator of all-trans retinoic acid-induced cell growth arrest in human acute promyelocytic NB4 cells.* Blood, 2007. **110**(2): p. 640-50.
505. Jarousse, N. and L. Coscoy, *Selection of mutant CHO clones resistant to murine gammaherpesvirus 68 infection.* Virology, 2008. **373**(2): p. 376-86.
506. Goff, S.P., *Knockdown screens to knockout HIV-1.* Cell, 2008. **135**(3): p. 417-20.
507. Chen, X., P. Liu, and H.H. Chou, *Whole-genome thermodynamic analysis reduces siRNA off-target effects.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58326.
508. Yang, B., et al., *SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity.* J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5649-53.
509. Kubista, H., H. Edelbauer, and S. Boehm, *Evidence for structural and functional diversity among SDS-resistant SNARE complexes in neuroendocrine cells.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 6): p. 955-66.
510. Seet, B.T., et al., *Glycosaminoglycan binding properties of the myxoma virus CC-chemokine inhibitor, M-T1.* J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30504-13.
511. Costes, B., et al., *Felid herpesvirus 1 glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope.* Microbes Infect, 2006. **8**(11): p. 2657-67.
512. Uhart, M. and D.M. Bustos, *Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins.* Front Genet, 2014. **5**: p. 10.
513. Simons, K. and G. Warren, *Semliki Forest virus: a probe for membrane traffic in the animal cell.* Adv Protein Chem, 1984. **36**: p. 79-132.
514. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., P. Matsudaira, Baltimore, D., and J. Darnell, *Viruses: Structure, Function, and Uses.* Molecular Cell Biology. 4th Edn. ed. 2000.
515. Sollner, T.H., *Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 429-35.
516. Greber, U.F. and M. Way, *A superhighway to virus infection.* Cell, 2006. **124**(4): p. 741-54.
517. Sollner, T.H. and J.E. Rothman, *Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion.* Experientia, 1996. **52**(12): p. 1021-5.

518. Mizuno-Yamasaki, E., F. Rivera-Molina, and P. Novick, *GTPase networks in membrane traffic*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 637-59.
519. Cepeda, V. and A. Fraile-Ramos, *A role for the SNARE protein syntaxin 3 in human cytomegalovirus morphogenesis*. *Cell Microbiol*, 2011. **13**(6): p. 846-58.
520. Zenner, H.L., et al., *Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment*. *J Virol*, 2011. **85**(16): p. 8012-21.
521. Indran, S.V. and W.J. Britt, *A role for the small GTPase Rab6 in assembly of human cytomegalovirus*. *J Virol*, 2011. **85**(10): p. 5213-9.
522. Simpson-Holley, M., et al., *Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection*. *J Virol*, 2005. **79**(20): p. 12840-51.
523. De Regge, N., et al., *Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(2): p. 267-75.
524. Saksena, M.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons*. *J Virol*, 2006. **80**(7): p. 3592-606.
525. Smith, I.L., M.A. Hardwicke, and R.M. Sandri-Goldin, *Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression*. *Virology*, 1992. **186**(1): p. 74-86.
526. Marozin, S., U. Prank, and B. Sodeik, *Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 4): p. 775-86.
527. Lee, G.E., et al., *Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro*. *J Virol*, 2006. **80**(9): p. 4264-75.
528. Wong, M.L. and C.H. Chen, *Evidence for the internal location of actin in the pseudorabies virion*. *Virus Res*, 1998. **56**(2): p. 191-7.
529. del Rio, T., C.J. DeCoste, and L.W. Enquist, *Actin is a component of the compensation mechanism in pseudorabies virus virions lacking the major tegument protein VP22*. *J Virol*, 2005. **79**(13): p. 8614-9.
530. Michael, K., et al., *Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E*. *J Virol*, 2006. **80**(3): p. 1332-9.
531. Kwon, M., et al., *S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors*. *Front Biosci*, 2005. **10**: p. 300-25.
532. Rescher, U. and V. Gerke, *S100A10/p11: family, friends and functions*. *Pflugers Arch*, 2008. **455**(4): p. 575-82.
533. Backes, P., et al., *Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles*. *J Virol*, 2010. **84**(11): p. 5775-89.
534. Vidick, S., et al., *Proteomic characterization of murid herpesvirus 4 extracellular virions*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83842.
535. Todd M. Greco, B.A.D., and Ileana M. Cristea, *The Impact of Mass Spectrometry-Based Proteomics on Fundamental Discoveries in Virology*. *Annual Review of Virology*, 2014. **Vol. 1**: **581-604**.
536. Uetrecht, C., et al., *Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry*. *Nat Chem*, 2011. **3**(2): p. 126-32.
537. Uetrecht, C. and A.J. Heck, *Modern biomolecular mass spectrometry and its role in studying virus structure, dynamics, and assembly*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. **50**(36): p. 8248-62.
538. Alexander, C.G., et al., *Thermodynamic origins of protein folding, allostery, and capsid formation in the human hepatitis B virus core protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(30): p. E2782-91.
539. Voros, J., et al., *Large-scale production and structural and biophysical characterizations of the human hepatitis B virus polymerase*. *J Virol*, 2014. **88**(5): p. 2584-99.

540. Shepherd, D.A., et al., *Probing bunyavirus N protein oligomerisation using mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2014. **28**(7): p. 793-800.
541. Shepherd, D.A., et al., *Using ion mobility spectrometry-mass spectrometry to decipher the conformational and assembly characteristics of the hepatitis B capsid protein*. Biophys J, 2013. **105**(5): p. 1258-67.
542. Shoemaker, G.K., et al., *Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1742-51.
543. Snijder, J., et al., *Probing the biophysical interplay between a viral genome and its capsid*. Nat Chem, 2013. **5**(6): p. 502-9.
544. Patterson, D., et al., *Human phosphoribosylformylglycineamide amidotransferase (FGARAT): regional mapping, complete coding sequence, isolation of a functional genomic clone, and DNA sequence analysis*. Gene, 1999. **239**(2): p. 381-91.
545. Zimmermann, W., et al., *Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1186-94.
546. Feederle, R., et al., *Epstein-Barr virus BNRF1 protein allows efficient transfer from the endosomal compartment to the nucleus of primary B lymphocytes*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9435-43.
547. Kang, H.R., et al., *Murine gammaherpesvirus 68 encoding open reading frame 11 targets TANK binding kinase 1 to negatively regulate the host type I interferon response*. J Virol, 2014. **88**(12): p. 6832-46.
548. Vogels, M.W., et al., *Identification of host factors involved in coronavirus replication by quantitative proteomics analysis*. Proteomics, 2011. **11**(1): p. 64-80.
549. Santamaria, E., et al., *Identification of replication-competent HSV-1 Cgal⁺ strain signaling targets in human hepatoma cells by functional organelle proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(4): p. 805-15.
550. Emmott, E., et al., *Quantitative proteomics using SILAC coupled to LC-MS/MS reveals changes in the nucleolar proteome in influenza A virus-infected cells*. J Proteome Res, 2010. **9**(10): p. 5335-45.
551. Lam, Y.W., et al., *Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected cells*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(1): p. 117-30.
552. Munday, D.C., et al., *Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2438-59.
553. Pavlou, M.P. and E.P. Diamandis, *The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers?* J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1896-906.
554. Miettinen, J.J., S. Matikainen, and T.A. Nyman, *Global secretome characterization of herpes simplex virus 1-infected human primary macrophages*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 12770-8.
555. Ciborowski, P., et al., *Diminished matrix metalloproteinase 9 secretion in human immunodeficiency virus-infected mononuclear phagocytes: modulation of innate immunity and implications for neurological disease*. J Neuroimmunol, 2004. **157**(1-2): p. 11-6.
556. Ciborowski, P., et al., *Investigating the human immunodeficiency virus type 1-infected monocyte-derived macrophage secretome*. Virology, 2007. **363**(1): p. 198-209.
557. Lietzen, N., et al., *Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza A virus-infected human primary macrophages*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1001340.
558. Stern-Ginossar, N., et al., *Decoding human cytomegalovirus*. Science, 2012. **338**(6110): p. 1088-93.
559. Li, T., J. Chen, and I.M. Cristea, *Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(5): p. 591-9.
560. Li, T., et al., *Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10558-63.
561. Bell, C., et al., *Proteomics analysis of herpes simplex virus type 1-infected cells reveals dynamic changes of viral protein expression, ubiquitylation, and phosphorylation*. J Proteome Res, 2013. **12**(4): p. 1820-9.