



**UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES  
LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE-VACCINOLOGIE**

**ETUDE DE LA TRANSMISSION DU GAMMAHERPESVIRUS MURIN 4 : IMPORTANCE  
DE LA GLYCOPROTEINE 150 ET DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES ANTIVIRALES  
BASEES SUR L'UTILISATION DU CIDOFOVIR.**

**STUDY OF MURID HERPESVIRUS-4 TRANSMISSION : IMPORTANCE OF  
GLYCOPROTEIN GP150 AND DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL STRATEGIES BASED  
ON THE USE OF CIDOFOVIR.**

**Caroline Zeippen  
Promoteur : Prof. Laurent Gillet**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
Docteur en Sciences Vétérinaires**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

*« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs*

*N'a jamais tenté d'innover »*

*Albert Einstein*

*La thèse est loin d'être un long fleuve tranquille, tous les doctorants vous le diront... Il s'agit plutôt d'un chemin sinueux, parsemé d'embûches, avec des moments agréables et ensoleillés mais également des moments pluvieux, où le découragement n'est pas loin... Mais heureusement, de nombreuses personnes m'ont accompagnée sur ce chemin, m'ont relevée lorsque je suis tombée ou se sont réjoui avec moi lorsque tout allait bien... Je tiens ici à remercier toutes ces personnes, qui par leurs paroles ou leurs gestes, m'ont aidé à aller jusqu'au bout de ce chemin.*

*Je voudrais tout d'abord remercier mon promoteur, Laurent, pour son énergie et sa motivation. Chaque jour, il nous communique sa passion pour son métier, et pousse chacun d'entre nous vers l'excellence. Merci à toi, Laurent, pour ta patience, ta gentillesse et tes conseils dont j'ai profité à chaque pas durant ces quatre années.*

*Je remercie également les membres de mon comité d'accompagnement. Merci au Professeur Alain Vanderplasschen, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui par son éloquence sait si bien communiquer sa passion de la science. Ses conseils et sa clairvoyance ont été de précieux atouts durant ces années de thèse. Merci également au Professeur Luc Willems, pour ses conseils avisés et ses remarques constructives sur mes recherches.*

*Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans de nombreuses collaborations, et je tiens ici à remercier l'ensemble des scientifiques qui se sont impliqués dans ce travail. En particulier, merci au Dr Philippe Stevenson pour ses nombreux conseils éclairés, merci au Dr Jan Mast du CODA CERVA pour les analyses de microscopie électronique, merci au Dr Frédéric Farnir pour ses analyses statistiques, et merci au Dr Johan Neyts et au Dr Robert Snoeck, de l'institut Rega de l'Université de Leuven, pour leur collaboration dans la seconde étude de ce travail.*

*Au-delà de l'aspect scientifique, une thèse est une belle expérience humaine et l'occasion de faire d'incroyables rencontres. Je voudrais donc remercier tous les (ex)membres du laboratoire d'immunologie et de virologie qui m'ont accompagnée au cours de cette thèse : le Professeur Etienne Thiry, le Dr Benjamin Dewals, Ravo, William, Ana, Damien, Axel, Michaël, Milena, Natacha, Maxime, Yuan, Françoise, Océane, Ting, Anusyah, Xue, Xiang, Bilal et Bérengère. Merci également à Béné et Céline, pour avoir toujours été présentes pour me reconforter en cas de coup dur, et pour être toujours prêtes à donner un coup de main quand c'était nécessaire ! Merci pour votre enthousiasme, votre gentillesse et votre conversation ! Emeline, merci à toi pour ces nombreuses heures de covoiturage, avec ces longues conversations que j'ai tant appréciées. Merci d'être toujours disponible pour donner un coup de main, et d'avoir été une oreille attentive lorsque j'en avais besoin... Pauline, merci pour ton*

*optimisme à toute épreuve et ton sourire sans faille ! Michaël, merci pour tous tes conseils et ta gentillesse !*

*Je tiens également à remercier notre équipe de techniciens. Merci à Cédric, Lorène, Gladys, Emeline et Aurélie. En particulier, merci à Christina, qui est toujours présente pour nous soutenir et nous aider en cas de coup dur. Et enfin, merci à Justine, pour ta disponibilité et ton sourire, et pour toutes ces longues heures passées à l'IVIS pour moi !*

*Partager un travail aussi intense qu'une thèse, ça rapproche... Avec le temps, certaines collègues sont devenues de véritables amies... En particulier, je voudrais adresser un clin d'œil à Catherine, Léa, Justine, Louisa et Marion. Merci à vous pour ces longues pauses dans les couloirs à essayer de déterminer lequel de nos animaux de compagnie était le plus mignon, merci pour toutes ces glaces à Tilff et ces pic-nics sur les pelouses de la fac... Catherine, merci pour ton amitié sans faille. Tu es une oreille attentive pour tes amis, et tu n'hésites pas à donner de ton temps pour les gens que tu aimes. Merci pour tous ces moments passés ensemble durant ces quatre années : les ballades avec Navy et Lune, les concerts et les festivals. Tous ces souvenirs sont à jamais gravés dans ma mémoire. Merci à Léa et Justine, pour leur gentillesse, leur qualité d'écoute, et toutes ces heures passées à parler de mariage ! Merci à Louisa, qui nous fait découvrir la culture allemande et qui s'applique à apprendre toutes les subtilités de la langue française ! Finalement, merci à Marion, pour ta sensibilité, ta gentillesse et ta bonne humeur !*

*J'aimerais également remercier tous mes amis en dehors de la faculté. Anne-Catherine, toi qui est dans ma vie depuis si longtemps et me connais si bien, je te remercie pour nos moments de complicité et nos longues conversations qui m'ont permis de me changer les idées pendant les moments les plus compliqués de ma thèse. Antonella, merci pour ton enthousiasme, ton optimisme à toute épreuve, ton sourire contagieux et ta gentillesse. Merci à toi, Pauline, pour ta gentillesse et ta spontanéité. Merci à vous, Aurélie et Céline, pour toutes ces soirées passées en votre compagnie. Merci à vous tous enfin, qui m'avez donné l'élan et le courage de poursuivre ce travail jusqu'au bout.*

*J'aimerais également accorder une pensée à l'ensemble des membres de ma famille qui m'ont accordé leur soutien durant ces années. En particulier, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien sans faille et leurs encouragements. Merci de m'avoir écouté durant toutes ces années, de m'avoir conseillé et aidé quand c'était nécessaire. En particulier, ces derniers mois ont été plus qu'intenses, et vous avez prouvé encore une fois à quel point vous étiez des parents extraordinaires ! Merci pour tous ces petits plats préparés avec amour pour moi et François lorsque j'étais débordée par la rédaction de*

*ma thèse, merci pour tous ces messages et coups de fils d'encouragement lorsqu'à la veille de ma défense, j'étais au bord de la panique, merci d'être toujours présents quelques soient les circonstances...*

*Enfin, merci à toi, François, qui quotidiennement depuis 4 ans supporte tous mes grands discours sur mes expériences en cours, toi qui par ton optimisme incroyable me porte tous les jours et m'aide à atteindre des objectifs que j'aurais probablement abandonnés seule. Merci pour tous ces projets concrétisés à deux durant ces années...L'année 2017 aura été mouvementée : un mariage, une thèse... Une nouvelle aventure s'ouvre à nous, et je suis impatiente de voir ce que l'avenir nous réserve...*

*Ce travail a été réalisé grâce au mandat d'Aspirant que le Fonds National de la Recherche scientifique m'a octroyé. Je remercie cette institution de m'avoir permis de réaliser cette thèse.*

*Abréviations*

<b>ACV</b>	Acyclovir
<b>ADN/DNA</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AIHV-1</b>	Alcelaphine herpesvirus-1
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>ANP</b>	<i>Acyclic Nucleoside Phosphonate</i>
<b>ARN/RNA</b>	Acide Ribonucléique
<b>Asn</b>	Asparagine
<b>BAC</b>	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
<b>Bcl</b>	<i>B cell lymphoma</i>
<b>BCR</b>	<i>B cell receptor</i>
<b>BCV</b>	<i>Brincidofovir</i>
<b>BHK-21</b>	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
<b>BoHV-4</b>	<i>Bovine Herpesvirus-4</i>
<b>BVDU</b>	Brivudine
<b>CCD</b>	<i>Charge coupled device</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDV</b>	Cidofovir
<b>Cdk6</b>	<i>Cyclin-dependant kinase 6</i>
<b>CMC</b>	<i>Carboxymethylcellulose</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CMX001</b>	Brincidofovir
<b>CR2</b>	<i>Complement receptor 2</i>
<b>CSF 1</b>	<i>Colony stimulating factor 1</i>
<b>CXCR4</b>	<i>Chemokine receptor type 4</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic cell specific intracellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) grabbing non-integrin</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dubelcco's modified eagle medium</i>
<b>E</b>	<i>Early (syn. <math>\beta</math>)</i>
<b>EBNA</b>	<i>Epstein Barr nuclear antigen</i>
<b>EBV</b>	Epstein Barr Virus
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<b>FAM</b>	<i>Carboxyfluorescein</i>
<b>Fc</b>	Fragment crystallizable
<b>FcR</b>	Fragment crystallizable receptor
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycans
<b>galK</b>	Galactokinase
<b>gB</b>	Glycoprotéine B
<b>gB NT</b>	Partie N terminale de gB
<b>GC</b>	<i>Germinal center</i>
<b>GCV</b>	Ganciclovir
<b>gH</b>	Glycoprotéine H
<b>gL</b>	Glycoprotéine L
<b>gM</b>	Glycoprotéine M
<b>gN</b>	Glycoprotéine N
<b>Gp150</b>	Glycoprotéine 150

<b>Gp180</b>	Glycoprotéine 180
<b>Gp350/220</b>	Glycoprotéine 350/220
<b>Gp42</b>	Glycoprotéine 42
<b>Gp70</b>	Glycoprotéine 70
<b>gpK8.1</b>	Glycoprotéine K8.1
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HAART</b>	<i>Highly active retroviral therapy</i>
<b>HCMV</b>	<i>Human Cytomegalovirus</i>
<b>HHV-4</b>	<i>Human Herpesvirus-4</i>
<b>HHV-7</b>	<i>Human herpesvirus-7</i>
<b>HHV-8</b>	<i>Human Herpesvirus-8</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leucocyte antigen</i>
<b>HPMPC</b>	Hydroxy 2-Phosphonomethoxy Propyl Cytosine / Cidofovir
<b>HS</b>	Heparan sulfate
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus
<b>HVS</b>	Herpesvirus Saimiri
<b>ICTV</b>	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
<b>IE</b>	<i>Immediate early (syn. <math>\alpha</math>)</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IM</b>	<i>Infectious Mononucleosis</i>
<b>IRBP</b>	<i>Interstitial retinoid binding protein</i>
<b>IR<sub>L</sub></b>	<i>Long internal repeat</i>
<b>IR<sub>S</sub></b>	<i>Short internal repeat</i>
<b>IVIS</b>	<i>In vivo imaging system</i>
<b>KGD</b>	<i>Motif Lys-Gly-Asp (Lysine-Glycine-Acide aspartique)</i>
<b>KS</b>	<i>Kaposi Sarcoma</i>
<b>KSHV</b>	<i>Kaposi Sarcoma Associated Herpesvirus</i>
<b>L</b>	<i>Late (syn. <math>\gamma</math>)</i>
<b>LANA</b>	<i>Latency associated nuclear antigen</i>
<b>LMP</b>	<i>Latent membrane protein</i>
<b>miARN</b>	<i>Micro-ARN</i>
<b>MuHV-4</b>	<i>Murid Herpesvirus-4</i>
<b>MZ</b>	Marginal zone
<b>MZ MF</b>	<i>Marginal zone macrophage</i>
<b>NDP</b>	Nucleoside diphosphate
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>NTP</b>	Nucleoside triphosphate
<b>OAT</b>	<i>Organic anion transporter</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>OvHV-2</b>	<i>Ovine herpesvirus-2</i>
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered saline
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chaine reaction</i>
<b>PFU</b>	<i>Plaque Forming Unit</i>
<b>PGV</b>	Penciclovir
<b>pH</b>	Potential hydrogène
<b>PI 3-K</b>	<i>Kinase phosphatidylinositol 3</i>
<b>PK</b>	Protéine Kinase
<b>RGD</b>	Motif Arg-Gly-Asp (Arginine – Glycine – Acide aspartique)
<b>RLV</b>	<i>Rhesus Monkey lymphocryptovirus</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell park memorial institute</i>
<b>RRV</b>	<i>Rhesus Monkey rhadinovirus</i>
<b>SCLN</b>	<i>Superficial cervical lymph node</i>

---

<b>SEP</b>	Sclérose en plaque
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>TeV-3</b>	<i>Testudinid Herpesvirus 3</i>
<b>TEM</b>	<i>Transmission electronic microscopy</i>
<b>TGN</b>	<i>Trans golgian network</i>
<b>TK</b>	Thymidine Kinase
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>tRNA</b>	<i>ARN de transfert</i>
<b>TR<sub>L</sub></b>	<i>Long Terminal repeat</i>
<b>TR<sub>S</sub></b>	<i>Short terminal repeat</i>
<b>U<sub>L</sub></b>	<i>Long unique region</i>
<b>U<sub>S</sub></b>	<i>Short unique region</i>
<b>U<sub>T</sub></b>	<i>Third unique region</i>
<b>vFLIP</b>	<i>Viral FLICE inhibitory protein</i>
<b>VIH/HIV</b>	Virus d'Immunodéficience Humaine
<b>VZV</b>	Varicella zoster virus
<b>WMHV</b>	<i>Wood Mouse Herpesvirus</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>



---

<b>Résumé</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>Préambule général</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Les <i>Herpesvirales</i></b> .....	<b>7</b>
1.1. Nomenclature et classification .....	7
1.2. Le cycle viral .....	8
1.2.1. Le cycle lytique .....	9
1.2.2. Le cycle latent .....	11
<b>2. Les <i>gammaherpesvirinae</i></b> .....	<b>13</b>
2.1. Les virus humains .....	13
2.1.1. Le virus d'Epstein Barr .....	13
2.1.2. Le virus associé au sarcoma de Kaposi .....	14
2.2. Les modèles animaux non murins .....	15
2.2.1. Le rhesus monkey rhadinovirus et l'herpèsvirus saimiri .....	16
2.2.2. Le rhesus monkey lymphocryptovirus .....	16
2.2.3. L'herpèsvirus bovin 4 .....	16
<b>3. L'Herpèsvirus murin 4</b> .....	<b>17</b>
3.1. Spectre d'hôtes .....	17
3.2. Génome viral .....	18
3.3. Pathogénie .....	20
3.4. Transmission .....	21
<b>4. Glycoprotéines virales impliquées dans l'entrée et l'évasion de la réponse humorale</b> .....	<b>23</b>
4.1. Les glycoprotéines du MuHV-4 et leurs homologues chez les gammaherpèsvirus humains .....	23
4.2. Glycoprotéines des gammaherpèsvirus impliquées dans l'attachement à la cellule .....	24
4.2.1. Liaison aux récepteurs cellulaires .....	25
4.2.2. Mécanismes de modification de tropsime .....	27
4.3. Evasion de la réponse humorale .....	29
4.3.1. Multiplicité des épitopes de liaison .....	29

---

4.3.2. Camouflage des épitopes de liaison en surface du virion .....	30
4.3.3. Infection des cellules en exploitant les récepteurs cellulaires Fc.....	31
4.3.4. Faible immunogénicité des cibles majeures de neutralisation .....	31
4.3.5. Changement de conformation post-endocytose .....	32
<b>5. Les moyens de lutte .....</b>	<b>32</b>
5.1. Problèmes majeurs pour le développement de vaccins efficaces contre les gammaherpèsvirus .....	33
5.2. Les anti-viraux .....	34
5.2.1. Les analogues de nucléoside .....	35
5.2.2. Les analogues de nucléotide .....	36
5.2.3. Les analogues de pyrophosphate.....	38
5.2.4. Nouvelles molécules .....	39
5.2.5. Utilisation des anti-viraux dans le cadre des infections à gammaherpèsvirus .....	40
<b>Objectifs .....</b>	<b>43</b>
<b>Section expérimentale .....</b>	<b>48</b>
<b>Etude 1:</b>	
<b>The major envelope glycoprotein of Murid Herpesvirus-4 promotes sexual transmission .....</b>	<b>48</b>
<b>Etude 2:</b>	
<b>Blockage of a gammaherpèsvirus sexual transmission by the nucleotide analogue cidofovir ...</b>	<b>65</b>
<b>Discussion – perspectives .....</b>	<b>79</b>
<b>Références .....</b>	<b>94</b>

---

# Résumé - Abstract

---

## *Résumé*

Les gammaherpèsvirus sont des pathogènes importants en médecine humaine. En effet, le virus d'Epstein Barr et le virus associé au Sarcome de Kaposi sont responsables de nombreuses maladies lymphoprolifératives et autres cancers. L'herpèsvirus murin-4 (MuHV-4) est couramment utilisé comme modèle pour l'étude de ces virus. Jusqu'à ce jour, une limitation majeure à son utilisation était l'absence de transmission observée chez les animaux de laboratoire. Récemment, un modèle de transmission du MuHV-4 par voie sexuelle a été décrit chez la souris de laboratoire. Ce modèle permet, d'une part, d'étudier les mécanismes impliqués dans la transmission des gammaherpèsvirus, notamment en termes de tropisme cellulaire, de protéines virales engagées ou encore de mécanismes immunitaires impliqués. D'autre part, il permet de tester des moyens de lutte pour réduire la transmission du virus. En effet, les herpèsvirus persistent à l'état latent de manière définitive, une fois l'hôte infecté. Etudier leur cycle biologique, ainsi que la manière dont on peut utiliser ces connaissances pour prévenir la transmission est donc primordial pour lutter contre ces infections.

Dans la première étude, les mécanismes sous-jacents à la transmission ont été étudiés. Plus précisément, nous avons déterminé la pertinence biologique d'observations décrites auparavant *in vitro*. En effet, une glycoprotéine du MuHV-4, gp150, est impliquée dans différentes fonctions nécessaires pour une transmission efficace : elle participerait non seulement à la libération des particules virales depuis les cellules infectées, mais également à la protection du virus contre la réponse humorale. Cette étude nous a permis de démontrer l'importance de gp150 dans un contexte de transmission naturelle, gp150 favorisant la libération des particules infectieuses à partir des cellules épithéliales vaginales. Ces résultats ont été publiés dans la revue « *Journal of Virology* » en juillet 2017.

Dans une seconde étude, le même modèle a été utilisé afin de tester l'efficacité d'une molécule anti-virale dans le but de réduire le taux de transmission par voie sexuelle du MuHV-4. Un analogue de nucléotide, le cidofovir, a été administré à des souris infectées ou saines selon différents protocoles. L'utilisation journalière de cidofovir a permis non seulement de réduire significativement la réexcrétion génitale du virus, mais également de prévenir complètement l'infection de souris saines exposées au virus par contact sexuel. Finalement, une injection unique, administrée 24h après exposition au virus, a permis de réduire considérablement la transmission. Cette étude démontre donc l'efficacité de cette molécule *in vivo* à l'encontre du MuHV-4, mais surtout son intérêt potentiel dans le cadre d'une utilisation préventive.

L'ensemble de ce travail a donc permis d'exploiter un modèle de transmission physiologique d'un gammaherpèsvirus, et d'approfondir deux sujets très différents : le premier, plus fondamental, a

permis d'élucider un aspect des mécanismes impliquant les glycoprotéines virales au moment de la transmission, tandis que le second, plus appliqué, a mis en exergue la capacité de molécules anti-virales à prévenir la transmission d'un gammaherpèsvirus par voie sexuelle.

## *Abstract*

Gammaherpèsviruses are important pathogens in human medicine. Indeed, Epstein Barr virus and Kaposi Sarcoma associated herpesvirus are responsible for numerous lymphoproliferative diseases and cancers. Murid Herpesvirus-4 (MuHV-4) is usually used as a model for human gammaherpèsviruses. Until now, the major limitation of this model was the absence of transmission in laboratory animals. Recently, a sexual transmission of MuHV-4 has been described in laboratory mice. This observation allows, on the one hand, to study mechanisms underlying natural transmission, such as cellular tropism, importance of viral proteins, or immunity response during this part of the cycle. On the other hand, this transmission model allows to test efficiency of measures to reduce transmission. Indeed, herpesvirus are archetype of persistent viruses as infection persists lifelong once established. Studying mechanisms underlying transmission and how to use these mechanisms to reduce it efficiently is therefore of primordial importance.

In a first study, we focussed on the biological relevance of mechanisms described previously *in vitro*. Indeed, a MuHV-4 glycoprotein, gp150, has been shown to participate to the release of infectious particles from cells and to evasion of humoral immunity, two functions that could be important for the virus during transmission. Our results showed that gp150 is essential for an efficient sexual transmission of the MuHV-4. Indeed, gp150 promotes the release of infectious particles from infected vaginal epithelial cells. These results has been published in *Journal of Virology* in July 2017.

In a second study, the same model was used to test efficiency of an antiviral molecule to reduce sexual transmission of the MuHV-4. A nucleotide analogue, the cidofovir, was administrated to mice according to different protocols. A daily administration of cidofovir reduced drastically genital shedding, but also prevent completely infection of naive mice after sexual contact. Finally, a single injection of cidofovir, administered 24 hours after sexual contact, reduced significantly transmission.

Altogether, in this work, we used a transmission model of a gammaherpèsvirus in two different studies: the first focused on glycoprotein implicated during the transmission and established the importance of a single viral glycoprotein for an efficient transmission. The second study highlighted the efficiency of antiviral drugs to prevent infection by gammaherpèsviruses.

---

# Préambule général

---

## ***Préambule général***

Les *Gammapherpesvirinae* sont une sous famille de l'ordre des *Herpesvirales*. Parmi ceux-ci, on retrouve deux virus particulièrement importants en médecine humaine. Le premier, le virus d'Epstein Barr (EBV), est distribué partout à travers le monde et a une prévalence de plus de 90 %. Le second est le virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), dont la distribution est plus hétérogène. Sa prévalence peut ainsi atteindre 50% dans certaines régions du monde. Comme l'ensemble des herpesvirus, ils persistent à l'état latent au sein de l'organisme. Leur longue co-évolution avec leur hôte les ont ainsi armés pour contrer efficacement la réponse immunitaire, permettant au virus de se réactiver, d'être excrétés et transmis en présence d'une immunité spécifique.

Leur capacité à échapper à la réponse immunitaire, ainsi que les oncogènes qu'ils véhiculent dans leur génome en font un problème majeur en médecine humaine. En effet, bien que la primo-infection soit largement asymptomatique, ils peuvent être associés à des maladies néoplasiques importantes pendant la phase de latence, tels que des troubles lymphoprolifératifs, mais également d'autres cancers. Ces pathologies apparaissent principalement en cas de troubles immunitaires, et représentent dès lors un problème majeur en particulier dans le cadre d'une co-infection avec le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou encore en cas de greffe d'organe.

Développer des moyens de lutte efficace contre ces virus est dès lors un véritable challenge de la médecine actuelle. Pour cela, comprendre plus en détails leur cycle biologique est d'une importance primordiale. Cependant, les études en laboratoire sur ces virus sont limitées étant donné leur spectre d'hôtes étroit et leur faible croissance en culture cellulaire. L'étude des gammaherpèsvirus passe donc souvent par l'utilisation d'un modèle. L'herpèsvirus murin 4 (MuHV-4) est un modèle largement reconnu pour l'étude de ces virus. Récemment, il a été démontré que le MuHV-4 était capable de se transmettre sexuellement chez les souris de laboratoire, ouvrant de nombreuses perspectives concernant l'étude des mécanismes impliqués dans la transmission des gammaherpèsvirus ainsi que les moyens de la bloquer.

Ce travail présente en premier lieu une revue de la littérature sur les connaissances actuelles concernant les gammaherpèsvirus. Il s'en suit deux études originales, se concentrant d'une part sur les mécanismes sous-jacents lors de la transmission, et d'autre part sur les moyens permettant de la bloquer. La première étude démontre l'importance d'une glycoprotéine virale particulière dans la transmission du MuHV-4, cette protéine participant à la libération des particules infectieuses depuis la muqueuse. La seconde étude se penche sur l'utilisation d'une molécule anti-virale comme moyen de lutte pour limiter la transmission sexuelle du MuHV-4. Enfin, une discussion générale du travail ainsi que ses perspectives sont présentées.



---

# Introduction

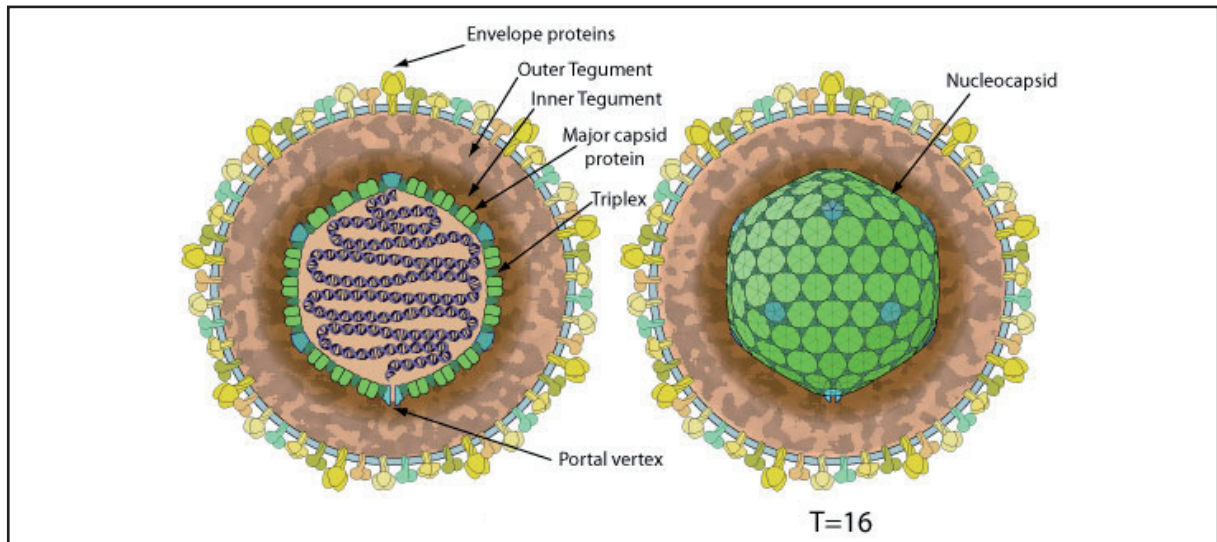
---

## 1. Les *Herpesvirales*

### 1.1. Nomenclature et classification

L'ordre des *Herpesvirales* représente un large groupe, rassemblant des virus infectant de nombreuses espèces, depuis les bivalves jusqu'à l'homme. Cet ordre est divisé en 3 familles : les *Alloherpesviridae*, qui infectent les poissons et les amphibiens ; les *Malacoherpesviridae*, dont les hôtes sont des mollusques ; et finalement la famille la plus large, les *Herpesviridae*, qui infectent des mammifères, des oiseaux et des reptiles (Davison, 2010, 2011; Davison et al., 2009). Dans le monde animal, la plupart des espèces sont infectables par un voire plusieurs herpèsvirus. Sachant que la majorité des herpèsvirus sont spécifiques d'une seule, ou d'un nombre restreint d'espèces, cela démontre l'ampleur de cette famille (Virgin et al., 2009). Leur spécificité d'hôte et leur large dispersion dans le monde des vivants indiquent une longue co-évolution avec l'espèce infectée, ce qui leur a permis de s'adapter à celle-ci. Cela signifie également que le système immunitaire a évolué en fonction de ces infections et est adapté à la présence de ces virus.

Malgré cette diversité, tous conservent des caractéristiques communes. Premièrement, l'ensemble des herpèsvirus exhibe une morphologie similaire. Il s'agit de grands virus sphériques, mesurant de 150 à 200 nm. Ils contiennent un ADN linéaire double brin, mesurant entre 125 et 295 kpb selon les espèces (Jochum et al., 2012; Terhune et al., 2004). Cet ADN est encapsulé dans une capsidie icosahédrique composée de 162 capsomères (150 hexons et 12 pentons), qui est elle-même entourée d'une matrice protéique appelée tégment. Finalement, une membrane lipidique dérivée de la membrane cellulaire lors de la maturation du virion enveloppe la particule. Différentes protéines virales y sont ancrées, glycosylées pour la plupart (**Figure 1**) (McGeoch et al., 2006). Deuxièmement, les herpèsvirus partagent différentes caractéristiques biologiques. D'abord, ils codent pour un arsenal de protéines impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et la réplication de l'ADN. De plus, la synthèse de l'ADN viral ainsi que son encapsidation ont lieu au niveau du noyau cellulaire, et la production de particules infectieuses mène invariablement à la lyse de la cellule. Finalement, les herpèsvirus sont capables de s'établir à l'état latent dans l'organisme de l'hôte infecté. Cette latence s'établit spécifiquement dans certains types cellulaires, dépendant de l'espèce virale, et correspond à un état où le nombre de protéines produites est limité, permettant uniquement le maintien du génome viral au sein de la cellule, sans production de particules virales. Cet état permet au virus de se maintenir au sein de l'organisme infecté jusqu'à la mort de son hôte. De manière intéressante, on peut utiliser le terme latence aussi bien du point de vue de l'infection de la cellule que de l'hôte : une cellule est infectée de façon latente lorsque l'infection permet uniquement le maintien du génome viral, associé à l'expression d'un panel spécifique de protéines, tandis que l'hôte est infecté de manière latente lorsqu'aucune réplication lytique, résultat de l'infection primaire ou de la réactivation, n'est observée (Barton et al., 2011).



**Figure 1 : Morphologie des herpèsvirus.** La particule virale est composée d'un ADN double brin linéaire, contenu dans une capsidie protéique. Cette capsidie, de forme icosaédrique, est composée de 162 capsomères : 150 hexons (en vert) et 11 pentons (en bleu), les pentons étant placés aux pointes de la structure. Les protéines portales (en bleu clair) permettent l'encapsidation de l'ADN. La capsidie est entourée d'un tégument protéique. Finalement, une membrane d'origine cellulaire, dans laquelle sont ancrées différentes glycoprotéines virales, enveloppe l'ensemble de la particule ([http://viralzone.expasy.org/176?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species)).

Historiquement, les *Herpesviridae* ont été divisés en trois sous-familles sur base de leurs propriétés biologiques : les *Alpha-*, les *Beta-*, et les *Gammaherpesvirinae*. Cette classification distingue les virus selon leur spectre d'hôte, la durée du cycle répliatif, mais également selon le type cellulaire capable de maintenir la latence. De manière remarquable, les avancées technologiques et l'analyse par séquençage des génomes ont confirmé cette première classification. Les *Alphaherpesvirinae* ont un large spectre d'hôte, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et ont un cycle répliatif court. Ils sont neurotropes, c'est-à-dire que la latence s'établit dans des populations neuronales spécifiques. Les *Betaherpesvirinae* ont quant à eux un spectre d'hôte plus spécifique, souvent limité à une espèce ou un genre. Leur cycle répliatif est plus long, et la latence s'établit dans le système lymphoréticulaire ou les glandes sécrétoires. La majorité des cellules infectées par les *Alpha-* ou les *Betaherpesvirinae* supportent une infection lytique tandis que seules quelques cellules spécifiques peuvent être infectées de manière latente. A l'inverse, les *Gammaherpesvirinae* établissent préférentiellement une infection latente, l'infection lytique ne concernant qu'une faible proportion des cellules infectées. Leur spectre d'hôte est restreint *in vivo* et *in vitro*, et la durée de leur cycle est variable. Le principal site de latence des *Gammaherpesvirinae* est le lymphocyte B (Barton et al., 2011; Cohrs and Gildden, 2001).

Les *Gammaherpesvirinae* sont divisés en quatre genres (**Tableau 1**). Les *Lymphocryptovirus* comprennent à ce jour 8 espèces virales, toutes spécifiques de l'homme et des primates. L'espèce type de ce genre est l'EBV ou herpèsvirus humain 4 (HHV-4). Les *Rhadinovirus* rassemblent 9 espèces spécifiques des mammifères. L'espèce type est l'herpèsvirus saimiri (HVS), qui infecte le singe écureuil. Dans ce groupe, on retrouve le KSHV et le MuHV-4. Deux autres genres ont récemment été ajoutés aux *Gammaherpesvirinae*. Le premier, les *Macavirus*, a été officialisé en 2009 par l'ICTV et regroupe 9 espèces virales. Son nom provient de la contraction des termes « *Malignant* » et « *Catarrhal fever* ». En effet, parmi les espèces décrites dans ce groupe, on retrouve le virus associé à la fièvre catarrhale maligne des gnous (AIHV-1), et le virus associé à la fièvre catarrhale maligne des ovidés (OvHV-2), responsables respectivement des formes africaine et européenne de la fièvre catarrhale maligne. Finalement, le genre des *Percavirus*, également créé en 2009, comprend 3 espèces. Ce nom provient de la contraction des termes « *Perissodactyl* » et « *Carnivore* », dont font partie les espèces cibles de ces virus (Davison, 2010).

## 1.2. Cycle viral

Le cycle des herpèsvirus est divisé en deux parties distinctes, différenciables par le set de gènes exprimés : le cycle lytique et le cycle latent.

Nom taxonomique officiel	Nom commun	Acronyme
<b>Ordre <i>Herpesvirales</i></b> <b>Famille <i>Herpesviridae</i></b>		
<b>Sous-famille</b> <b>Gammaherpesvirinae</b>		
<b>Genre <i>Lymphocryptovirus</i></b> <i>Callitrichine herpesvirus</i> 3 <i>Cercopithecine herpesvirus</i> 14 <i>Gorilline herpesvirus</i> 1 <b><i>Human herpesvirus</i> 4*</b> <i>Macacine herpesvirus</i> 4 <i>Panine herpesvirus</i> 1 <i>Papiine herpesvirus</i> 1 <i>Pongine herpesvirus</i> 2	Lymphocryptovirus du marmouset Virus EBV-like du singe vert africain Herpèsvirus du gorille Virus d'Epstein Barr Lymphocryptovirus du singe rhésus Herpèsvirus pan Herpèsvirus papio 1 Herpèsvirus de l'orang-outan	CaIHV-3 CeHV-14 GoHV-1 HHV-4 McHV-4 PnHV-1 PaHV-1 PoHV-2
<b>Genre <i>Macavirus</i></b> <b><i>Alcelaphine herpesvirus</i> 1*</b> <i>Alcelaphine herpesvirus</i> 2 <i>Bovine herpesvirus</i> 6 <i>Caprine herpesvirus</i> 2 <i>Hippotragine herpesvirus</i> 1 <i>Ovine herpesvirus</i> 2 <i>Suid herpesvirus</i> 3 <i>Suid herpesvirus</i> 4 <i>Suid herpesvirus</i> 5	Virus de la fièvre catarrhale maligne associée au gnou Virus de la fièvre catarrhale maligne associée à l'antilope bubale Herpèsvirus lymphotrope bovin Herpèsvirus caprin 2 Herpèsvirus de l'antilope rouanne Virus de la fièvre catarrhale maligne associée au mouton Herpèsvirus lymphotrope porcine 1 Herpèsvirus lymphotrope porcine 2 Herpèsvirus lymphotrope porcine 3	AIHV-1 AIHV-2 BoHV-6 CpHV-2 HiHV-1 OvHV-2 SuHV-3 SuHV-4 SuHV-5
<b>Genre <i>Percavirus</i></b> <b><i>Equid herpesvirus</i> 2*</b> <i>Equid herpesvirus</i> 5 <i>Mustelid herpesvirus</i> 1	Herpèsvirus équin 2 Herpèsvirus équin 5 Herpèsvirus du blaireau	EHV-2 EHV-5 MusHV-1
<b>Genre <i>Rhadinovirus</i></b> <i>Ateline herpesvirus</i> 2 <i>Ateline herpesvirus</i> 3 <i>Bovine herpesvirus</i> 4 <i>Cricetid herpesvirus</i> 2 <i>Human herpesvirus</i> 8 <i>Macacine herpesvirus</i> 5 <i>Murid herpesvirus</i> 4 <i>Murid herpesvirus</i> 7 <b><i>Saimiriine herpesvirus</i> 2*</b>	Herpèsvirus de l'atèle souche 810 Herpèsvirus de l'atèle Herpèsvirus bovin 4 Herpèsvirus du hamster Herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi Rhadinovirus du singe rhésus Herpèsvirus murin 68 Herpèsvirus du mulot sylvestre Herpèsvirus saimiri	AtHV-2 AtHV-3 BoHV-4 CrHV-2 HHV-8 McHV-5 MuHV-4 MuHV-7 SaHV-2
<b>Genre non attribué</b> <i>Equid herpesvirus</i> 7 <i>Phocid herpesvirus</i> 2 <i>Saguinine herpesvirus</i> 1	Herpèsvirus asinien 2 Herpèsvirus du phoque de type 2 Herpèsvirus saguinus	EHV-7 PhoHV-2 SgHV-1

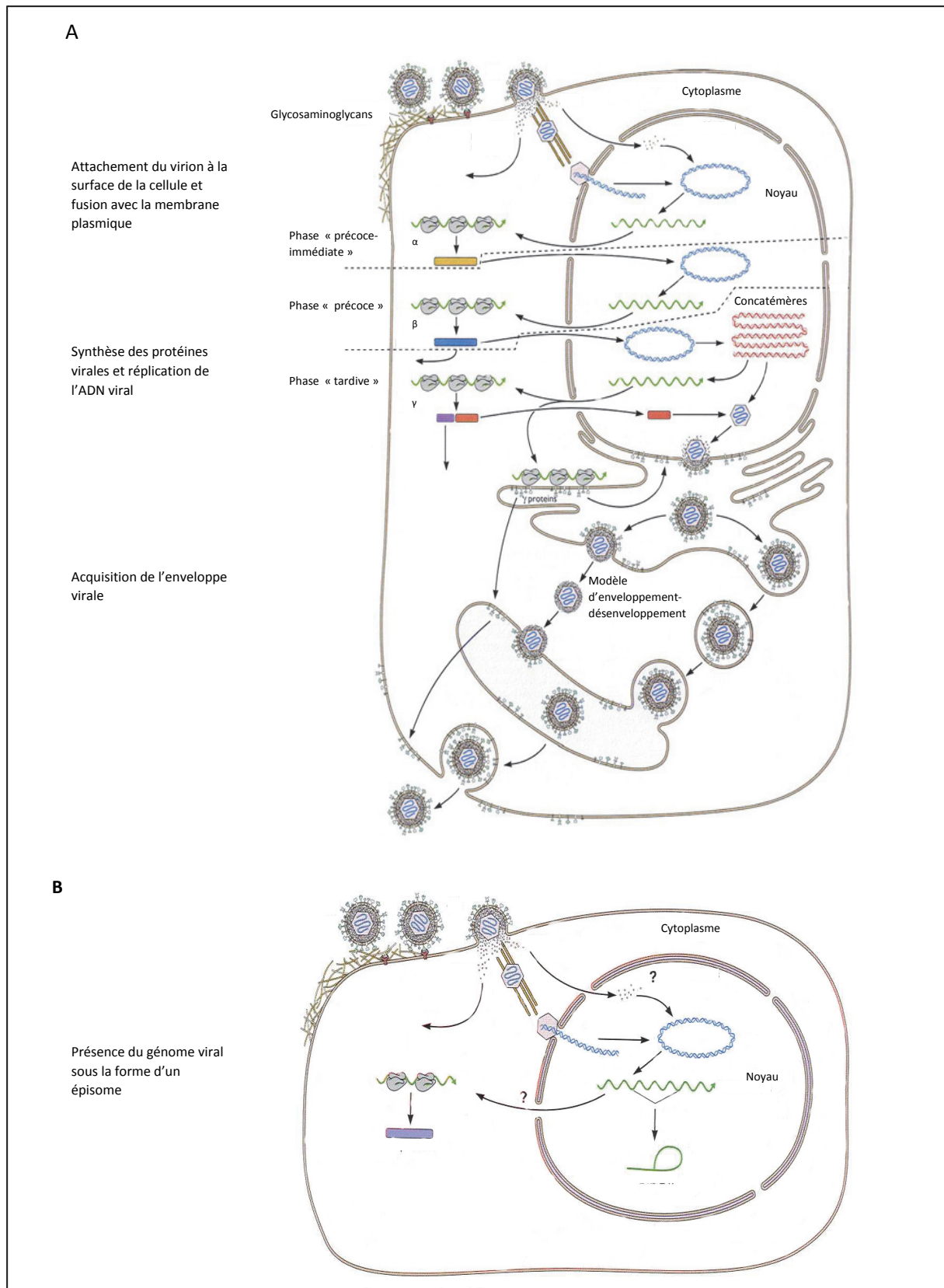
**Tableau 1 : Nomenclature et classification des *Gammaherpesvirinae*.** Les espèces types dans chaque genre viral sont indiquées par un astérisque. Adapté de la parution 2016 de la taxonomie virale par l'ICTV (<http://ictvonline.org>).

### 1.2.1. Cycle lytique

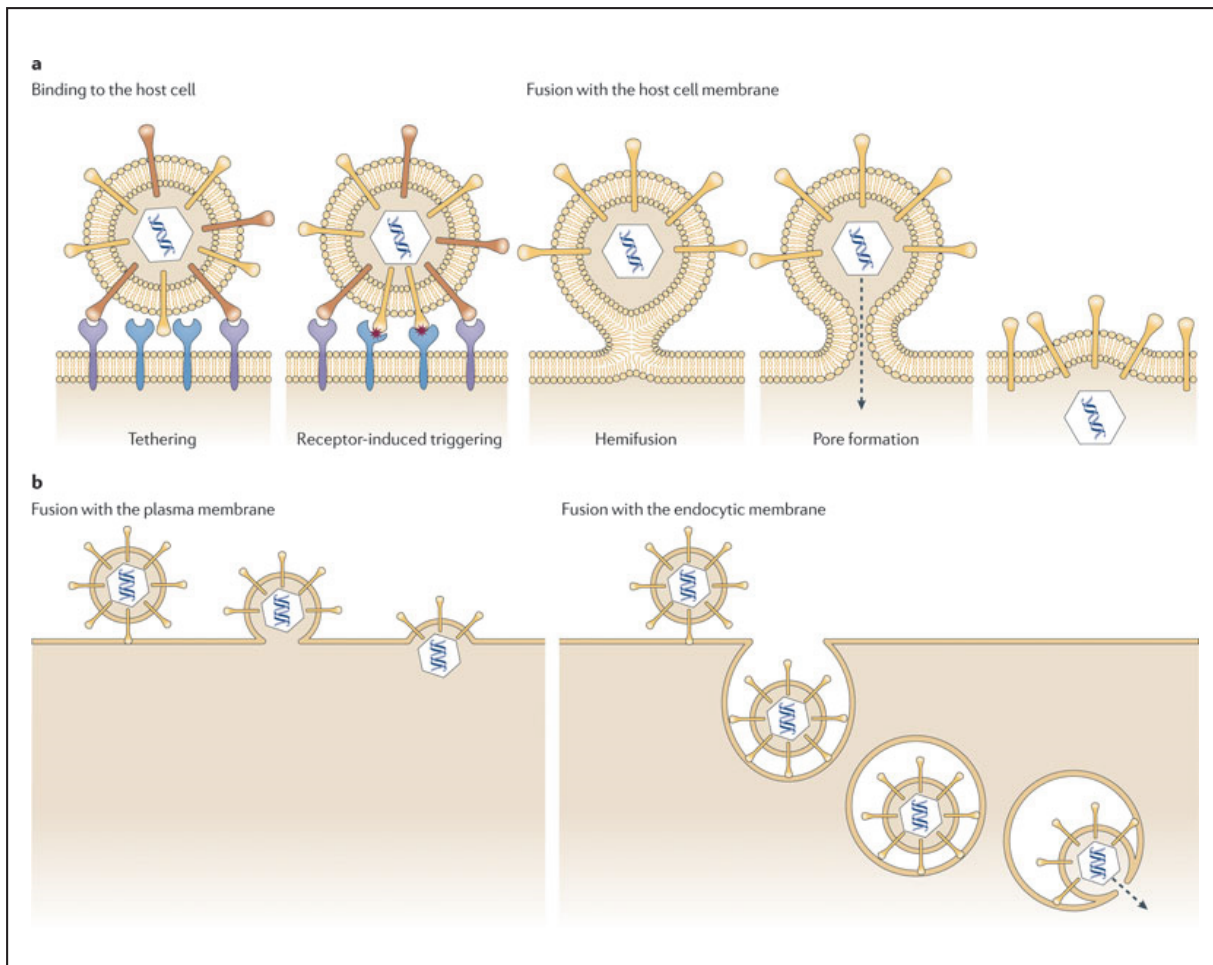
Même si la pathogénie varie d'un herpèsvirus à l'autre, le cycle de multiplication reste semblable (**Figure 2**). La première étape, qui consiste en la liaison du virion à la membrane cellulaire, fait intervenir différentes glycoprotéines virales. Cette étape ne sera que brièvement décrite ici car elle sera abordée plus en profondeur dans un chapitre ultérieur. La spécificité des protéines virales pour des ligands cellulaires détermine le tropisme du virus, et donc, sa voie d'entrée dans l'organisme et sa propagation. Les herpèsvirus sont caractérisés par leur capacité à interagir avec différents récepteurs, ce qui favorise l'infection de différents types cellulaires. Les interactions initiales impliquent le plus souvent des glycosaminoglycans et sont de faible affinité (Shukla and Spear, 2001). Celles-ci sont suivies par des interactions plus spécifiques, impliquant des récepteurs cellulaires variables selon l'espèce.

Suite à l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire, la membrane cellulaire et l'enveloppe virale fusionnent, et la capsid et les protéines du tégument sont libérées au sein du cytoplasme (**Figure 3A**). Selon les espèces virales, et parfois même selon le type cellulaire, la fusion des membranes peut avoir lieu directement en surface des cellules, ou nécessiter une endocytose, qui induit la fusion des membranes de manière dépendante ou non d'une chute du pH (Heldwein and Krummenacher, 2008; Nicola, 2016) (**Figure 3B**). La fusion est induite par une protéine dite de fusion. Cette protéine s'insère au sein de la membrane cible et subit un changement de conformation important. Cette transition structurelle induit l'exposition d'un peptide ou d'une boucle hydrophobe, qui interagit avec les membranes et les déstabilise. Cette étape permet le rapprochement des membranes et leur fusion (Connolly et al., 2011). Parmi les herpèsvirus, la machinerie de fusion est très conservée et est formée par un complexe protéique composé des glycoprotéines H (gH), gL et gB. gB partage des caractéristiques morphologiques importantes avec les autres protéines de fusion connues, et est donc probablement la protéine clé pour la fusion membranaire chez les herpèsvirus. gH et gL, quant à elles, ne possèdent pas de caractéristiques communes avec les autres protéines de fusion connues (Backovic et al., 2010; Chowdary et al., 2010; Matsuura et al., 2010). Ces données structurales semblent donc indiquer que le complexe gH/gL n'a pas un rôle direct en tant que protéine de fusion, mais agit plutôt en régulant la fusion via ses interactions avec gB. Ces interactions sont cependant nécessaires pour permettre la fusion puisque celle-ci n'est pas observée en l'absence de gH/gL (Connolly et al., 2011).

La fusion des membranes passe par différentes étapes intermédiaires, largement similaires pour tous les virus pour lesquels le processus a été caractérisé (**Figure 3A**). Les interactions entre la cellule et le virus et/ou la chute de pH induisent le changement de conformation de la protéine de fusion, ce qui déstabilise la membrane. Cette étape permet de rapprocher les feuillettes membranaires jusqu'à ce qu'une connexion locale soit établie entre les deux feuillettes externes (*stalk*). L'expansion radiale de cette connexion initiale permet la création locale d'une bicouche lipidique formée par les deux feuillettes



**Figure 2 : Représentation schématique du cycle viral lytique (A) et latent (B) des herpèsvirus. Adapté de Flint et al, 2000.**



**Figure 3 : Entrée du virus dans la cellule. A.** Etapes de la fusion membranaire. Le virus se lie aux récepteurs par l'intermédiaire de ses glycoprotéines. Les premières interactions permettent l'attachement du virus (glycoprotéine virale brune et récepteur cellulaire mauve), et favorisent d'autres interactions plus spécifiques (glycoprotéines jaunes et récepteurs cellulaires bleus) qui déclenchent la fusion membranaire. Le processus de fusion passe par un stade d'hémifusion avant de former un pore, permettant la libération de la capsid au sein du cytoplasme. **B.** Voies d'entrée du virus. Les herpesvirus peuvent entrer dans la cellule directement par fusion avec la membrane plasmique, ou par fusion avec la membrane de l'endosome après endocytose (Connolly et al., 2011).



internes des membranes. Cette étape est appelée hémifusion. Finalement, un pore se forme et s'élargit progressivement pour libérer la capsid virale au sein du cytoplasme cellulaire (Connolly et al., 2011).

Une fois la capsid libérée dans le cytoplasme, elle est dirigée jusqu'au nucléopore par le cytosquelette. La capsid est transportée de façon active le long des microtubules et des filaments d'actine (Radtke et al., 2010; Sodeik et al., 1997). Ce transport est facilité par le complexe protéique moteur « dynéine/dynactine » (Döhner and Sodeik, 2005; Döhner et al., 2002). Une fois à proximité du noyau, la capsid s'y arrime en interagissant avec des protéines du complexe du pore nucléaire. Ces interactions induisent l'ouverture de la capsid et la libération de son contenu dans le noyau par le pore nucléaire (Cohen et al., 2011; Kobilier et al., 2012). L'ADN viral est ensuite rapidement circularisé, avant même le début de la production de protéines virales (Lieberman, 2013). La transcription des gènes débute alors, sous forme de trois vagues successives, régulant les différentes phases de réplication du virus. Les produits des gènes « précoces immédiats » (*immediate early* (IE) ou  $\alpha$ ) sont les premières protéines virales néo-formées et participent principalement à la régulation de la transcription des deux autres classes de gènes. La seconde vague consiste en l'expression des gènes « précoces » (*early* (E) ou  $\beta$ ). Leurs produits sont des protéines impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, telle que l'ADN polymérase virale. La réplication de l'ADN marque la fin de la phase précoce et le début de la phase tardive (gènes « *late* » (L) ou  $\gamma$ ). Au sein des gènes  $\gamma$ , on distingue les gènes  $\gamma 1$  ou tardifs partiels, dont l'expression est augmentée par la synthèse d'ADN, et les gènes  $\gamma 2$ , ou tardifs stricts, dont l'expression est complètement dépendante de la synthèse d'ADN viral. Les produits d'expression des gènes tardifs consistent principalement en des protéines de structure, permettant l'assemblage de virions néo-formés. Certaines de ces protéines, produites dans le cytoplasme, sont donc dirigées vers le noyau où elles sont assemblées pour former les capsides virales (Heming et al., 2017).

La réplication de l'ADN, qui débute au niveau d'une ou plusieurs origines de réplication, se déroule selon le mode des « cercles roulants ». Ceci génère des concatémères, qui sont des structures complexes composées de multiples unités génomiques, liées bout à bout par des liens covalents. Durant les étapes de clivage et d'encapsidation de l'ADN, les concatémères sont clivés en unités génomiques simples qui sont intégrées dans les capsides néo-formées. Ces dernières sont ensuite transportées en périphérie nucléaire (Heming et al., 2017).

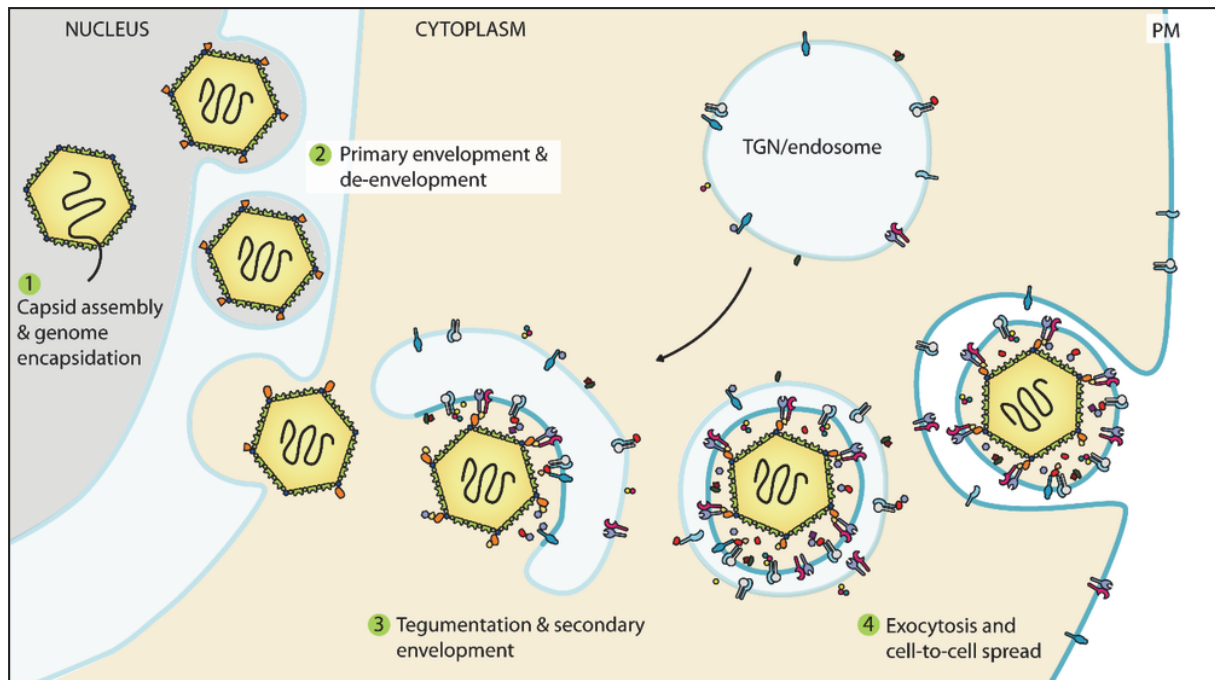
Alors que l'encapsidation du génome a lieu dans le noyau, le reste de la maturation du virion, c'est-à-dire l'acquisition du tégument et de l'enveloppe, prend place dans le cytosol. Pour rejoindre le cytoplasme, la capsid doit d'abord traverser la membrane nucléaire. Les transports classiques entre le noyau et le cytoplasme ont lieu au travers des pores nucléaires (Zuleger et al., 2012). Cependant, le diamètre de la nucléocapsid est d'environ 125 nm (McGeoch et al., 2006), alors que la taille maximale des molécules pouvant transiter dans les pores nucléaires est de 39 nm (Panté and Kann, 2002). De plus,

les liens entre la chromatine et la membrane nucléaire rendent celle-ci difficile d'accès (Hetzer, 2010). Autrement dit, la membrane nucléaire représente un obstacle majeur à la sortie de la nucléocapside du noyau. Pour expliquer la sortie de la nucléocapside, différents modèles ont été avancés (Mettenleiter et al., 2009, 2013). Le premier modèle proposé (Johnson and Spear, 1982) décrit que les nucléocapsides acquièrent une première enveloppe au niveau de la membrane interne du noyau, puis une seconde au niveau de la membrane externe du noyau. Les particules sont ensuite acheminées jusqu'à la membrane cellulaire et sont libérées par exocytose. Cependant, ce modèle impliquerait que le virion acquiert la totalité de ses composants membranaires au niveau de la membrane nucléaire, ce qui n'est pas le cas (Bigalke and Heldwein, 2016). Un second modèle (Wild et al., 2005) propose une dilatation des pores nucléaires pour permettre la sortie des nucléocapsides. Elles acquièrent ensuite leur enveloppe en pénétrant dans les vésicules golgiennes par bourgeonnement, puis sont finalement libérées à la surface cellulaire par exocytose. Cependant, l'intégrité du noyau jusqu'à une phase tardive du cycle viral rend cette hypothèse peu probable (Mettenleiter et al., 2013). Finalement, le modèle retenu actuellement est celui de l'enveloppement-désenveloppement (**Figure 4**) (Skepper et al., 2001). Dans ce modèle, le virion acquiert une première enveloppe en bourgeonnant au niveau de la membrane nucléaire interne, et se retrouve dans l'espace périnucléaire. Cette enveloppe initiale fusionne alors avec la membrane nucléaire externe, libérant la nucléocapside nue dans le cytoplasme. La particule acquiert alors son tégument, puis bourgeonne dans les vésicules golgiennes, dont les membranes contiennent les glycoprotéines virales. Finalement, le virus est libéré par exocytose (Bigalke and Heldwein, 2016; Owen et al., 2015).

### 1.2.2. Cycle latent

La latence est définie comme un état au cours duquel le virus persiste dans la cellule en l'absence d'un cycle productif (**Figure 3B**). Pendant la latence, le génome viral est maintenu sous la forme d'un épisode circulaire, extrachromosomique dans la majorité des cas, et présent en plusieurs copies dans le noyau cellulaire. La latence est caractérisée par l'inhibition de l'expression des gènes associés au cycle lytique. Les modalités diffèrent selon le type d'herpèsvirus. Par exemple, la latence chez la plupart des alphaherpèsvirus est caractérisée par l'accumulation dans le noyau d'ARN non codants dérivés de la région LAT du génome viral. Ces ARN exercent une large variété de fonctions, permettant en autres d'inhiber l'apoptose, ou encore génèrent des micro-ARN (miARN) qui participent à la régulation de l'expression de gènes viraux et cellulaires (Bloom, 2016).

En ce qui concerne les gammaherpèsvirus, la latence est associée à l'expression d'un panel spécifique de gènes, qui permettent au virus de maintenir l'infection et d'échapper à la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte. Ainsi, le KSHV exprime un nombre restreint de protéines telles que LANA, qui est la protéine de maintenance du génome des *rhadinovirus*, la vFLIP, la vCyclin, les Kaposines A, B et C, ainsi que des miARNs (Dittmer et al., 1998; McClure and Sullivan, 2008; Staskus et al., 1997).



**Figure 4: Modèle d'enveloppement-désenveloppement.** Suite à l'assemblage de la nucléocapside dans le noyau, celle-ci interagit avec la membrane nucléaire interne et bourgeonne dans l'espace périnucléaire. Cette première enveloppe est perdue par fusion avec la membrane nucléaire externe, libérant ainsi la capside nue dans le cytoplasme. Après l'acquisition du tégument, les capsides bourgeonnent dans des vésicules dérivées d'endosomes ou du réseau trans-golgien, dans lesquelles sont ancrées les protéines virales membranaires. Cette seconde étape d'enveloppement procure donc à la particule virale son enveloppe finale. La particule est ensuite libérée par exocytose hors de la cellule. TGN : réseau trans-golgien (Owen et al., 2015).

La protéine LANA (*Latency-associated nuclear antigen*) est suffisante, en l'absence d'autres protéines virales, à la maintenance dans le noyau de l'épisome viral du KSHV (Grundhoff and Ganem, 2003; Skalsky et al., 2007), et du MuHV-4, un *Rhadinovirus* qui infecte les rongeurs (Correia et al., 2013; Habison et al., 2012). En effet, cette protéine est responsable du maintien de l'épisome viral au sein de la cellule en créant un lien entre l'épisome viral et la chromatine (Weidner-Glunde et al., 2017). Son extrémité N-terminale lie des protéines nucléaires, tandis que son extrémité C-terminale interagit avec différentes séquences aux extrémités du génome viral (Lu et al., 2012; Wong and Wilson, 2005). De cette manière, LANA induit la réplication de l'ADN viral par la machinerie cellulaire lorsque la réplication de l'ADN cellulaire commence en vue de la mitose (Barbera et al., 2004; Grundhoff and Ganem, 2003; Hu et al., 2002; Lim et al., 2004). De plus, la liaison des épisomes viraux aux chromosomes évite la perte dans le cytoplasme de l'ADN viral au moment de la division cellulaire (Ballestas and Kaye, 2001; Ballestas et al., 1999; Barbera et al., 2006). De cette manière, LANA permet la distribution aléatoire des épisomes viraux au sein des deux cellules filles. De plus, il a été démontré que LANA inhibe l'apoptose et stimule la prolifération cellulaire, permettant ainsi le maintien des cellules infectées au sein de l'organisme. Elle inhibe également l'expression des gènes du cycle lytique et maintient le virus à l'état latent (Uppal et al., 2014).

Suite à des stimuli externes, une réactivation virale suivie d'un cycle répliatif lytique peut survenir. Les conditions qui favorisent cette réactivation sont méconnues. Par exemple, des changements dans la physiologie cellulaire peuvent induire une infection productive. En ce qui concerne l'EBV, les stimuli qui induisent des dégâts au niveau de l'ADN ou la production de radicaux libres de l'oxygène induisent la réactivation (Kenney and Mertz, 2014). De même, des études ont démontré que l'activation de TLR (*Toll Like Receptor*) peut mener à la réactivation du MuHV-4 (Ptaschinski et al., 2010) ou du KSHV (Gregory et al., 2009), ce qui implique une réactivation potentielle du virus lors d'une coïnfection avec un autre pathogène. Dans ce contexte, une étude a démontré qu'une coïnfection avec un helminthe pouvait induire la réactivation du MuHV-4 *in vivo*, suite à la production d'IL-4 (interleukine-4) (Reese et al., 2014). Mais la source majeure de réactivation à partir des cellules B est probablement l'engagement des BCR et la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes, comme cela a été démontré pour l'EBV (Davies et al., 2010; Laichalk and Thorley-Lawson, 2005) et le MuHV-4 (Liang et al., 2009). La réactivation du virus passe par différents mécanismes menant à l'expression des gènes lytiques, réprimés lors de la phase de latence. Par exemple, sous l'action de stimuli cellulaires, deux gènes précoces immédiats de l'EBV sont exprimés et activés. L'expression de ces deux gènes mène à l'activation subséquente en cascade des gènes précoces, et finalement des gènes tardifs, menant à la production de nouvelles particules virales (Kenney and Mertz, 2014).

La latence est donc un état dynamique, au cours duquel peuvent survenir de courts événements de réactivation. Ces brèves périodes, accompagnées de production de particules infectieuses, peuvent

être associées à de faibles signes cliniques ou être complètement asymptomatiques. Ces événements sont importants pour la transmission du virus, mais également pour maintenir un réservoir de cellules infectées au sein de l'hôte. Les réactivations sont transitoires car rapidement contrôlées par le système immunitaire qui induit le retour à l'état latent du virus (Reese, 2016). L'infection chronique résulte donc en un état d'équilibre, qui balance entre le contrôle du virus par le système immunitaire et des épisodes de production virale.

## **2. Les *Gammaherpesvirinae***

Les gammaherpèsvirus infectent une large variété de mammifères. Leur site de latence privilégié étant le lymphocyte B, ils sont impliqués dans le développement de maladies lymphoprolifératives. La primo-infection est souvent asymptomatique, ou associée à de faibles signes cliniques. En effet, la phase lytique est courte et la latence s'établit rapidement. Dans cette famille, on retrouve deux virus qui infectent l'homme : l'EBV ou HHV-4 et le KSHV ou HHV-8. Seront également décrits dans ce chapitre les différents virus utilisés comme modèle en laboratoire pour l'étude des gammaherpèsvirus.

### **2.1. Les virus humains**

#### **2.1.1. Le virus d'Epstein Barr**

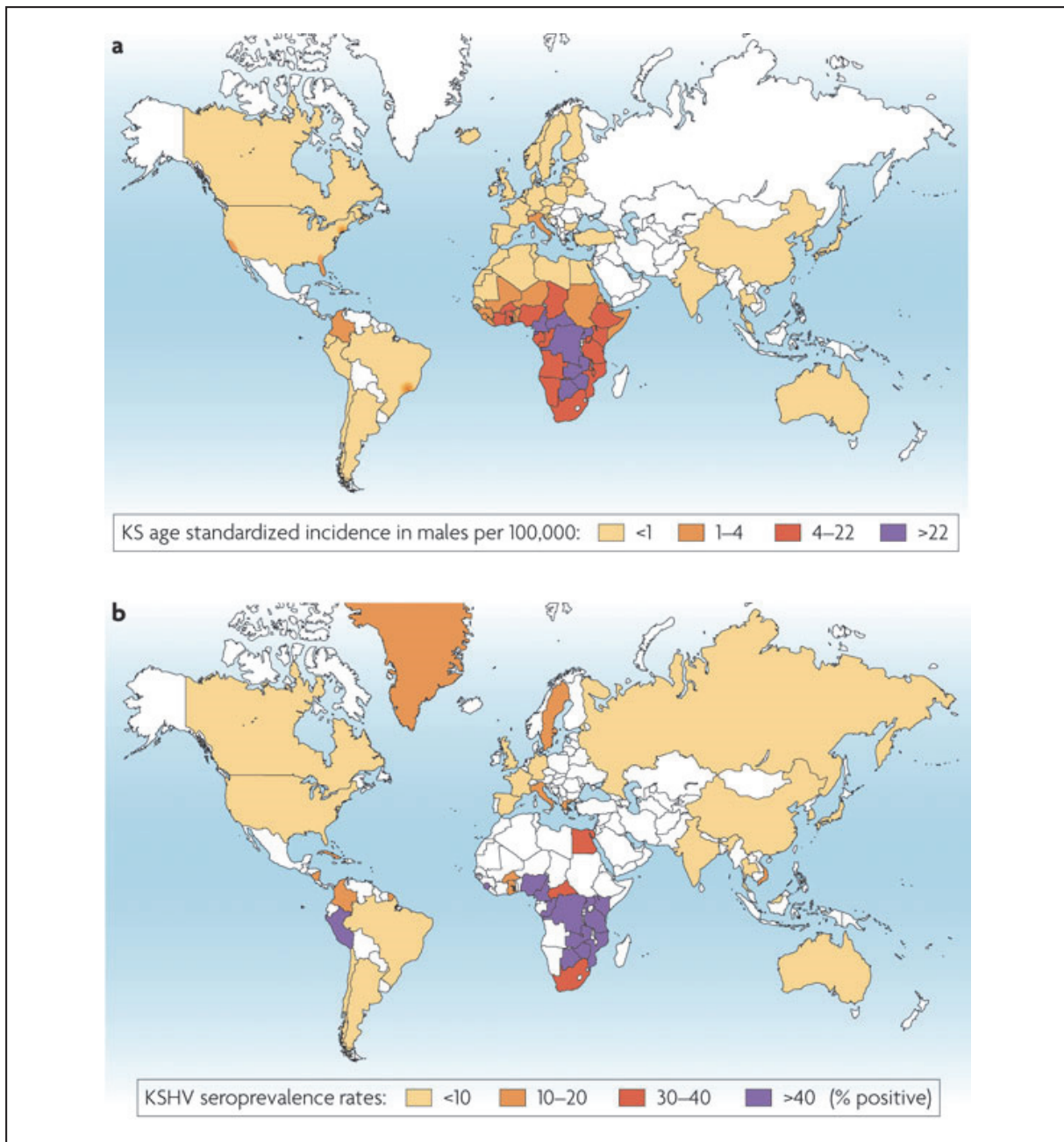
Parmi les *Lymphocryptovirus*, l'EBV est le seul virus connu infectant l'homme. L'EBV a été le premier gammaherpèsvirus décrit. Il a été isolé pour la première fois en 1964, depuis des cellules provenant d'un lymphome de Burkitt (Epstein et al., 1964). Plus tard, il a été démontré que l'EBV était impliqué dans l'étiologie de la mononucléose infectieuse (IM) (Henle et al., 1968). L'infection par l'EBV est largement répandue dans le monde entier. Il est estimé qu'environ 95% de la population mondiale est infectée par ce virus (Cesarman, 2014). La plupart des individus sont infectés durant l'enfance, de façon asymptomatique. Si la primo-infection a lieu plus tardivement, l'EBV induit dans environ 30% des cas une mononucléose infectieuse, suite à la prolifération lymphocytaire qui résulte de l'infection (Callan et al., 1996). La phase aiguë de cette pathologie se caractérise par une lymphadénopathie cervicale, de la fièvre et une pharyngite. Cette phase est suivie d'une fatigue générale qui peut durer plusieurs mois (Kim and Kopelman, 2005). Une fois la primo-infection endiguée, le maintien d'une réponse immune spécifique est essentiel au contrôle du virus. En effet, en cas d'immunosuppression, l'EBV est associée à de nombreux cancers, qui représentent environ 2 % des cancers chez l'homme (Zur Hausen and de Villiers, 2015; Parkin, 2006). Il s'agit principalement de désordres lymphoprolifératifs tels que le lymphome de Burkitt ou le lymphome d'Hodgkin, mais des cancers d'origine épithéliale peuvent également survenir, tels que le carcinome naso-pharyngé. Ainsi, il est intéressant de constater que les désordres associés à l'EBV reflètent son tropisme cellulaire pour les lymphocytes B et les cellules épithéliales (Rezk and Weiss, 2007).

En ce qui concerne sa pathogénie, l'EBV tire profit de la biologie normale des lymphocytes B pour réaliser son cycle. Il se transmet principalement par la salive (Hadinoto et al., 2009). Le site primaire de réplication reste actuellement controversé, mais l'hypothèse la plus communément admise est une réplication initiale au niveau de l'épithélium tonsillaire (Hutt-Fletcher, 2017). Quel que soit la manière dont il pénètre dans l'organisme, le virus atteint les lymphocytes B naïfs dans le tissu lymphoïde. L'EBV met alors en place différents programmes transcriptomiques de latence. Ceux-ci sont contrôlés par des promoteurs viraux spécifiques, qui sont activés par des modifications de la biologie cellulaire, telle que l'entrée en mitose. Le programme de latence induit sera différent selon le stade d'évolution des lymphocytes B. Finalement, la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes induit la réactivation virale. Ces épisodes de réactivation transitoire permettent l'excrétion de particules virales et la transmission (Thorley-Lawson and Allday, 2008).

### **2.1.2. Le virus associé au sarcome de Kaposi**

Parmi les *Rhadinovirus*, le KSHV est le seul virus connu infectant l'homme. Il a été isolé pour la première fois en 1994, chez un patient sidéen souffrant d'un Sarcome de Kaposi (KS) (Chang et al., 1994). Ainsi, le virus peut être isolé dans 95% des cas de KS, qu'il soit associé ou non au SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), ce qui démontre le lien de causalité entre le virus et la pathologie (Wen and Damania, 2010). Le KSHV est également responsable de maladies lymphoprolifératives telles que la maladie multicentrique de Castelman (Soulier et al., 1995) ou encore le lymphome primitif des séreuses (Cesarman et al., 1996). Comme pour l'EBV, ces pathologies sont principalement liées à un statut d'immunosuppression. L'incidence d'infection varie fortement selon les régions (**Figure 5**) : sa séroprévalence est basse en Asie ou aux USA, et varie entre 2 et 5% dans ces régions. Par contre, le virus est endémique en Afrique Subsaharienne, où le taux de séroconversion peut atteindre jusqu'à 50% dans certaines régions (Mesri et al., 2010).

Le KS représente de façon globale environ 1% des cancers imputables à une infection chez l'homme. Cependant, sa prévalence est très variable, et dans certains pays africains, il s'agit du cancer le plus fréquemment observé (Parkin, 2006). De plus, l'épidémie de SIDA a provoqué une explosion du nombre de KS. De manière générale, l'incidence du KS est corrélée à la séroprévalence du KSHV (**Figure 5**). Il s'agit d'un cancer d'origine endothéliale, qui se présente sous 4 formes (Giffin and Damania, 2014). Celles-ci se distinguent selon leur agressivité, leur tropisme cellulaire, mais également selon les taux de morbidité et de mortalité associés. La première, décrite en 1872 par Moritz Kaposi, s'observe principalement chez les personnes âgées en région méditerranéenne. Elle est caractérisée par des lésions bénignes au niveau des membres, qui dégénèrent rarement en une forme plus agressive. La seconde, la forme endémique africaine, apparaît dans les pays d'Afrique centrale et de l'est. Elle touche principalement les enfants et est associée à une mortalité élevée (Stein et al., 1994). La troisième est la forme épidémique du KS, et est principalement liée au SIDA (Beral et al., 1990). Cette forme est la plus



**Figure 5 : Prévalences géographiques comparées du KS et du KSHV. A.** Incidences standardisées du KS chez les individus mâles dans les différentes régions du monde. Les données proviennent de l'agence internationale pour la recherche sur le cancer. **B.** Taux de séroprévalence du KSHV dans les différentes régions du monde. La séroprévalence du KSHV en Europe du nord, en Asie et aux Etats-Unis est inférieure à 10%. Dans de nombreuses régions d'Afrique sub-saharienne, elle dépasse 50%. La région méditerranéenne présente des taux intermédiaires de 10 à 30% (Mesri et al., 2010).

agressive et représente le cancer le plus fréquent chez les patients sidéens (Parkin, 2006). Finalement, la dernière forme est d'origine iatrogène, et est liée à un traitement immunosuppresseur utilisé en cas de transplantation d'organes (Andreoni et al., 2001).

La pathogénie du KSHV est moins bien connue que celle de l'EBV, et son mode de transmission n'est pas parfaitement défini. Ainsi, dans les populations où la pression d'infection est faible, la transmission se ferait principalement par voie sexuelle. Ce risque de transmission est accru dans certaines populations spécifiques, telles que la communauté homosexuelle ou les personnes immunodéprimées. Au contraire, dans les régions où la pression d'infection est plus élevée, ce mode de transmission semble limité, et la transmission par voie non-sexuelle serait prépondérante (de Sanjose et al., 2009). *In vitro*, le KSHV présente un large tropisme. Pourtant, malgré sa capacité à infecter les cellules B *in vivo*, l'infection de ces cellules *in vitro* est difficile (Bechtel et al., 2003), et nécessite une activation préalable à l'aide d'IL-4 et de CD40L (Rappocciolo et al., 2008). Par contre, les lymphocytes B d'origine tonsillaire sont directement infectables sans ce traitement, ce qui semble démontrer un stade d'activation plus avancé de ces lymphocytes. De plus, bien que le virus soit associé à des lymphomes *in vivo*, sa capacité à immortaliser des lignées cellulaires B *in vitro* n'a pas pu être démontrée, contrairement à l'EBV. Par ailleurs, le KSHV ne possède pas d'homologues des gènes LMP-1 et 2, responsables de cette transformation chez l'EBV (Barton et al., 2011). Cependant, cette capacité a été observée chez un autre *Rhadinovirus*, le HVS (Trimble and Desrosiers, 1991), prouvant qu'il ne s'agit pas d'une caractéristique limitée aux *Lymphocryptovirus*.

## 2.2. Les modèles animaux non murins

Etant donné la gravité et la fréquence des maladies associées aux gammaherpèsvirus humains, ceux-ci sont la cible de nombreuses études. Deux limitations majeures réduisent l'efficacité de ces recherches. Premièrement, leur spectre d'hôte étroit implique l'absence de modèle animal robuste. A ce niveau, différents progrès ont permis d'étudier les virus dans des modèles de souris chimérisées et humanisées, capables de soutenir l'infection (McHugh et al., 2017; Wang et al., 2014). Cependant, l'intérêt de ces modèles reste limité pour étudier la pathogénie naturelle du virus. Deuxièmement, la difficulté à cultiver ces virus *in vitro* limite également leur étude. C'est pourquoi dans de nombreux cas, des virus apparentés infectant les animaux de laboratoire sont utilisés pour l'étude des gammaherpèsvirus (Barton et al., 2011). Les différents gammaherpèsvirus exploités comme modèles sont décrits dans ce chapitre. Le MuHV-4 fera l'objet d'un chapitre ultérieur plus complet puisqu'il s'agit du modèle choisi pour ce travail



### 2.2.1. Le rhesus monkey rhadinovirus (RRV) et l'herpèsvirus saimiri (HVS)

Le RRV est un *Rhadinovirus* qui infecte les primates non-humains. Il est très proche phylogénétiquement du KSHV, ce qui en fait un modèle intéressant. De plus, sa capacité de réplication lytique rapide facilite les études *in vitro* et les manipulations génétiques nécessaires pour la production de mutants. Enfin, les expérimentations *in vivo* sont possibles puisqu'il infecte les macaques rhesus (O'Connor and Kedes, 2007). Le HVS, un *Rhadinovirus* qui infecte le singe écureuil, peut également être utilisé. Comme le RRV, il est intéressant grâce à sa croissance et sa manipulation aisées *in vitro* (Jung et al., 1999). En outre, le HVS infecte les macaques rhesus et provoquent chez ces derniers des pathologies lymphoprolifératives. Le macaque rhesus est le primate non humain le mieux caractérisé au niveau génétique et immunologique, ce qui permet donc une utilisation plus aisée de ce virus *in vivo*. Dès lors, le HVS pourrait être exploité d'une part pour étudier la pathogénie et l'induction des cancers par les *Rhadinovirus*. D'autre part, ce modèle de cancer pourrait permettre l'évaluation de thérapies ou de vaccins anti-tumoraux (Rosenwirth et al., 2011). Cependant, le coût élevé des macaques rhesus, les problèmes éthiques liés à leur utilisation ainsi que les difficultés de manutention de ces espèces limitent l'exploitation de ces modèles.

### 2.2.2. Le rhesus monkey lymphocryptovirus (RLV)

Parmi les *Lymphocryptovirus*, il existe également un virus infectant les macaques rhesus, le RLV. Au départ, cette souche a été isolée à partir d'un lymphome chez un macaque immunodéprimé. Son séquençage indique une forte homologie avec l'EBV, en particulier en ce qui concerne les gènes codant pour les protéines lytiques, où 49 à 98 % des séquences en acides aminés sont homologues. Les limites de l'utilisation de ce modèle sont les mêmes que celles citées dans le RRV et le HVS, et sont principalement liées à l'utilisation de primates en laboratoire. Cependant, contrairement aux *Rhadinovirus*, il n'existe parmi les *Lymphocryptovirus* aucun modèle murin. L'intérêt de l'utilisation de ce virus pour l'étude des *Lymphocryptovirus* est donc plus important (Wang, 2013).

### 2.2.3. L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4)

Le BoHV-4 est un *Rhadinovirus* isolé à partir d'échantillons provenant de bovins sains ou présentant un panel varié de pathologies : endométrite, avortement, troubles digestifs et respiratoires, ou encore lésions cutanées au niveau des mamelles (Donofrio et al., 2005). Contrairement aux autres gammaherpèsvirus, son spectre d'hôte est plus vaste, et il est capable d'infecter différentes espèces telles que le lapin ou le cochon d'Inde. De plus, sa croissance *in vitro* dans une large variété de cellules est aisée. Ce virus représente donc une belle opportunité pour l'étude des gammaherpèsvirus en laboratoire (Ackermann, 2006). Finalement, le séquençage complet du génome (Zimmermann et al., 2001) et

l'existence d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) intégrant le BoHV-4 (Gillet et al., 2005), ont également augmenté son intérêt en tant que modèle.

### 3. L'Herpèsvirus Murin-4

Le MuHV-4 est un *Rhadinovirus* couramment utilisé en recherche. Il infecte les souris de laboratoire et sa croissance *in vitro* est aisée. Il offre un modèle intéressant pour l'étude des gammaherpèsvirus pour différentes raisons. Premièrement, de nombreux gènes impliqués dans la latence sont conservés parmi les *Rhadinovirus* (par exemple, la protéine LANA ou la vCyclin), tandis que l'essentiel des gènes associés à la réplication virale sont conservés de manière générale chez l'ensemble des herpèsvirus. Deuxièmement, le MuHV-4 code également pour certains gènes uniques, mais dont certaines fonctions sont conservées au sein des gammaherpèsvirus. Troisièmement, le lymphotropisme du MuHV-4 ainsi que sa capacité à induire des maladies lymphoprolifératives, tout comme ses homologues humains, suggère que les stratégies utilisées pour persister dans l'organisme sont probablement semblables (Barton et al., 2011). Quatrièmement, un plasmide BAC intégrant le MuHV-4 a été développé (Adler et al., 2000), facilitant la production de mutants pour étudier l'implication de gènes spécifiques dans la pathogénie. Enfin, l'utilisation de la souris de laboratoire pour les infections *in vivo* facilite les recherches, étant donné les connaissances concernant son génome, ainsi que les multiples modèles de souris mutantes existants.

#### 3.1. Spectre d'hôtes

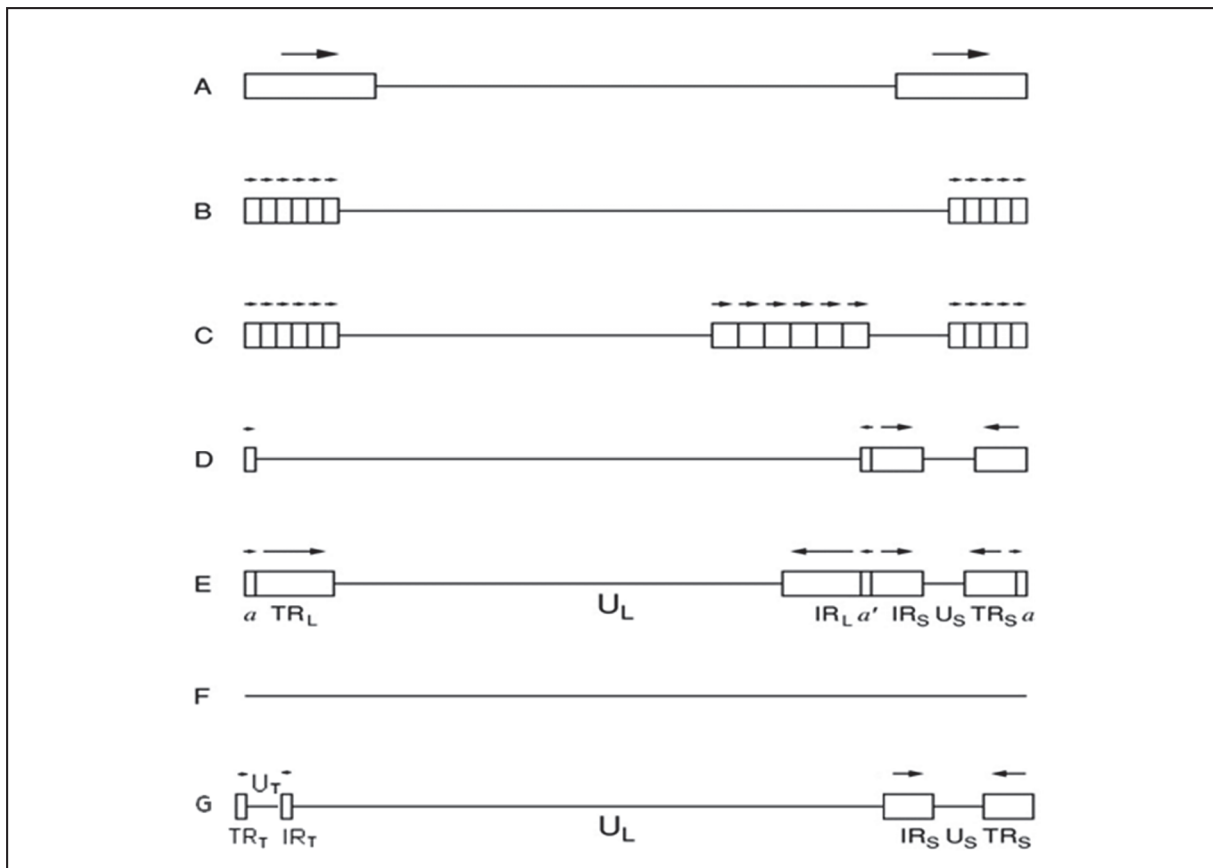
Le MuHV-4 est un pathogène naturel de différents rongeurs. Il a été isolé pour la première fois en 1980 chez le campagnol roux (*Myodes glareolus*) en Slovaquie (souches 60, 68 et 72), et chez le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*) (souches 76 et 78) (Blaskovic et al., 1980). Par la suite, des virus très proches du MuHV-4 ont également été isolés chez d'autres rongeurs sauvages tels que le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*), le campagnol agreste (*Microtus agrestis*) (Hughes et al., 2010b), ou encore la musaraigne musette (*Crocidura russula*) (Chastel et al., 1994). Actuellement, il n'existe pas de consensus concernant l'hôte naturel du MuHV-4, bien que certaines études se soient penchées sur la question. Deux études ont démontré que la séroprévalence du MuHV-4 était élevée chez le campagnol sylvestre, semblant de ce fait privilégier ce dernier comme hôte naturel (Blasdell et al., 2003; Telfer et al., 2007). Cependant, en 2009, Hugues *et al* ont isolé un virus proche du MuHV-4, le WMHV (*Wood Mouse Herpesvirus*) chez le campagnol sylvestre (Hughes et al., 2010a). Étant donné la proximité entre le MuHV-4 et le WMHV, on ne peut pas exclure que les populations mentionnées dans les deux études ci-dessus étaient en fait infectées par le WMHV et non par le MuHV-4. Bien qu'il n'ait pas été isolé chez la souris domestique (*Mus musculus*), le MuHV-4 infecte la souris de laboratoire, et celle-ci est utilisée communément pour l'infection par le MuHV-4 en recherche. Malgré la distance phylogénétique entre le campagnol et la souris, une étude a démontré que les sites de réplication et de latence étaient

comparables au sein de ces deux espèces, confirmant ainsi la valeur de ce modèle murin pour l'étude de la pathogénie des gammaherpèsvirus (Francois et al., 2010).

### 3.2. Génome viral

Le MuHV-4 a été séquencé entièrement en 1997, et son génome a été aligné et comparé à celui des autres gammaherpèsvirus (Virgin et al., 1997). Le génome du MuHV-4 mesure environ 120 kb. Sa partie centrale unique (118,237 bp) est entourée de part et d'autre d'un nombre variable de régions terminales répétées (*terminal repeat* - TR) de 1,2 kb (Efstathiou et al., 1990) (**Figure 6**). 80 ORFs (*open reading frame*) ont été identifiés lors de l'analyse du génome, dont 63 sont des homologues des gènes du HVS, l'espèce type du genre *Rhadinovirus*. Ces 63 ORF sont également présents chez le KSHV, et pour la plupart, chez l'EBV. Ces gènes conservés sont répartis dans le génome sous forme de blocs, séparés par des gènes uniques, spécifiques au MuHV-4. Les analogies au niveau de l'organisation et des séquences des génomes du MuHV-4 et du KSHV indiquent leur proximité évolutive supérieure par rapport à l'EBV (Virgin et al., 1997), confirmant l'appartenance du MuHV-4 au genre *Rhadinovirus*. Par ailleurs, les gènes associés à la latence semblent bien conservés parmi les *Rhadinovirus*, mais pas de manière plus générale chez les autres gammaherpèsvirus. Cette observation suggère que, si les gènes de réplication lytique sont bien conservés, les stratégies utilisées pour persister dans l'organisme ont évolué de manière variable parmi les gammaherpèsvirus (Virgin et al., 1997). Les 63 ORFs communs au HVS et au MuHV-4 ont été nommés selon le numéro du gène homologue identifié pour le HVS. Par exemple, l'homologue du gène 4 du HVS est nommé ORF4 chez le MuHV-4. Les gènes uniques du MuHV-4 sont nommés par la lettre M et numérotés selon leur emplacement dans le génome, de M1 à M14 (Virgin et al., 1997).

Le génome des gammaherpèsvirus code pour des homologues de gènes cellulaires. Par exemple, le KSHV en exprime 12, qui semblent être impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, de l'immunité et de la production de cytokines (Simas and Efstathiou, 1998). En ce qui concerne le MuHV-4, 4 ont été identifiés (Virgin et al., 1997). Le premier, l'ORF 4, est un homologue des protéines cellulaires impliquées dans la régulation du complément, permettant au virus de contrôler et limiter la lyse cellulaire liée à l'activation du complément (Kapadia et al., 2002). Le second gène est commun au KSHV, au MuHV-4 et au HVS. Il s'agit de l'ORF72, qui code pour un homologue de la D-cycline cellulaire. L'EBV, quant à lui, ne code pas pour cet homologue, mais peut réguler directement l'expression de la D-cycline cellulaire. Ce mécanisme semble donc conservé parmi les gammaherpèsvirus. La protéine encodée par l'ORF72 du MuHV-4 interagit avec la kinase cycline-dépendante *cdk2*, et favorise ainsi la prolifération cellulaire (van Dyk et al., 1999). Troisièmement, le gène M11 du MuHV-4 présente une homologie faible avec les membres de la famille des Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*) cellulaires, qui participent à la régulation de l'apoptose et de l'autophagie. L'EBV et le KSHV codent également pour des homologues de Bcl-2. *In vivo*, la v-Bcl-2 du MuHV-4 favorise



**Figure 6 : Les différentes classes de structure génomique des herpesvirus.** Les herpesvirus peuvent être divisés en 7 classes selon l'organisation de leur génome. **A.** Dans cette catégorie, les génomes consistent en une séquence unique flanquée d'une séquence répétée directe. Ce type de structure se retrouve essentiellement chez les betaherpesvirus. **B.** Répétitions en tandem: les génomes présentent des séquences répétées directes, contenant elles-mêmes un nombre variable de répétitions d'une même séquence (0,8 à 2,3 kbp). Cet arrangement caractérise la plupart des gammaherpesvirus du genre *Rhadinovirus*, dont le MuHV-4 et le KSHV. **C.** Structure dérivée de la classe B, dont la principale différence avec celle-ci est la présence d'un set interne de répétitions directes, indépendantes des répétitions des sets terminaux. L'EBV présente ce type de structure. **D.** Les génomes de cette classe contiennent deux régions uniques ( $U_L$  et  $U_S$ ), chacune présentant des répétitions terminales et internes directes ou inversées ( $TR_L/IR_L$  et  $TR_S/IR_S$ ). Cet arrangement se retrouve chez les alphaherpesvirus du genre *Varicellovirus*. **E.** La structure est semblable à la classe D, avec des  $TR_L/IR_L$  plus longues et qui peuvent s'inverser, donnant lieu à quatre isomères d'ADN viral en proportions équimolaires. De plus, les extrémités génomiques sont redondantes: elles contiennent une séquence identique de quelques centaines de bp, en répétitions directes aux extrémités ( $\alpha$ ) mais aussi en répétition inversée à la jonction  $IR_L - IR_S$  ( $\alpha'$ ). Ce type de structure est caractéristique des alphaherpesvirus du genre *Simplexvirus* mais se retrouve également chez certains betaherpesvirus tels que le HCMV (*Human cytomegalovirus*). **F.** Structure génomique sans aucune répétition. Cette classe fait figure d'exception chez les herpesvirus. Le *Tupaiid herpesvirus 1* présenterait ce type de génome. **G.** Nouvelle organisation génomique décrite récemment chez l'alphaherpesvirus *Testudinid herpesvirus 3* (TeHV-3) (Gandar et al., 2015). Le génome contient 3 régions uniques:  $U_L$ ,  $U_S$  et  $U_T$ .  $U_S$  et  $U_T$  présentent des répétitions terminales et internes ( $TR_T/IR_T$  et  $TR_S/IR_S$ ). **A-F**, les régions uniques et répétées sont représentées par les lignes et les rectangles, respectivement. L'orientation des répétitions est indiquée par les flèches. La nomenclature des régions uniques et répétées est illustrée pour les classes **E** et **G**.  $l$ , long ;  $s$ , short ;  $t$ , third. Adapté de (Gandar et al., 2015; Pellet and Roizman, 2007).

l'établissement de la latence (Gangappa et al., 2002; de Lima et al., 2005). Finalement, le quatrième gène est l'ORF74, qui code pour un homologue du récepteur de l'IL-8 (interleukine 8). Chez le MuHV-4, ce gène semble impliqué dans la réactivation virale (Lee et al., 2003; Moorman et al., 2003).

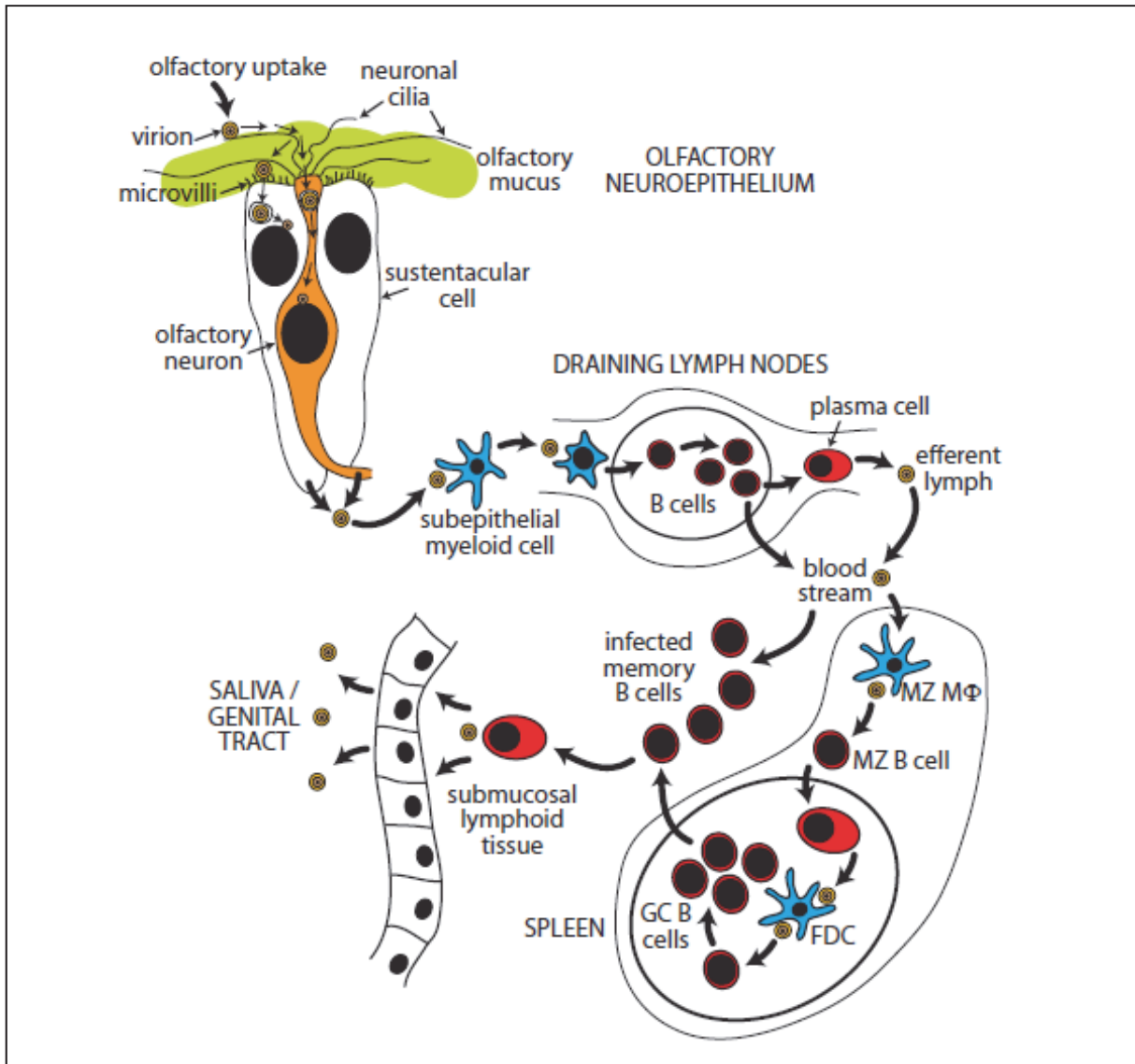
Actuellement, 20 microARN (miARN) ont été identifiés chez le MuHV-4, au niveau de l'extrémité 5' du génome (Pfeffer et al., 2005; Reese et al., 2010; Zhu et al., 2010). Les miARN sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides. Ils se lient par complémentarité à des séquences situées au niveau des extrémités 3' non traduites de leur cible afin d'en inhiber la traduction ou pour induire leur dégradation (Bartel, 2009). Chez le MuHV-4, ces miARN sont initialement intégrés à des séquences tRNA-like puis processés individuellement par l'enzyme tRNAaseZ (Bogerd et al., 2010; Diebel et al., 2010, 2014). De nombreux miARN ont été identifiés chez les différents gammaherpèsvirus et sont associés à différentes fonctions: 44 chez l'EBV (Zhu et al., 2009), et 12 chez le KSHV (Samols et al., 2005). Ils semblent participer à la régulation du cycle cellulaire, stimulant la croissance, et inhibant l'apoptose. Ils favoriseraient ainsi le développement de tumeurs. Ils participeraient également à la régulation de la réplication virale (Kang et al., 2017), et de la réponse immune innée (Zhu et al., 2013).

Bien que le séquençage complet de différents gammaherpèsvirus soit disponible, la fonction de nombreux gènes reste encore à élucider. Pourtant, connaître la fonction individuelle de ces gènes est important, d'une part pour comprendre leur rôle dans la pathogénie du virus, et d'autre part, pour pouvoir éventuellement les utiliser comme cible thérapeutique, par exemple dans le cadre du développement de vaccins. Pour déterminer les fonctions de chaque gène, des virus mutants déficients pour l'expression de un ou plusieurs gènes sont utilisés afin de déterminer le phénotype viral obtenu en leur absence, *in vitro* ou *in vivo*. Classiquement, ces virus mutants ont été générés par recombinaison homologue en cellule eucaryote. Cependant, cette méthode est longue et difficile, et l'analyse des mutants générés est très tardive, ne permettant de vérifier les mutations produites que longtemps après le début du processus (Adler et al., 2003). D'autres méthodes ont donc été développées afin de faciliter la construction de souches mutantes. Une de ces méthodes est basée sur l'insertion du génome viral au sein d'un chromosome BAC, utilisé en cellules procaryotes. L'utilisation de bactéries permet d'appliquer des méthodes de recombinaison mieux contrôlées, basées sur des étapes successives de sélection positive et négative. Une fois la mutation générée dans les cellules procaryotes, les particules virales sont reconstituées par transfection des génomes viraux modifiés dans des cellules eucaryotes (Messerle et al., 1997). Depuis la première description de ce processus avec le cytomégalovirus humain (HCMV) (Messerle et al., 1997), de nombreux autres herpèsvirus ont également été clonés de cette manière. Ainsi, tous les herpèsvirus humains ont été clonés à l'exception du HHV7 (Warden et al., 2011). De plus, d'autres herpèsvirus, tels que le BoHV-4 (Gillet et al., 2005) ou le MuHV-4 (Adler et al., 2000), ont également été intégrés à un BAC.

Bien que particulièrement utile pour la production de mutants, la présence du BAC au sein du génome peut poser problème puisqu'elle peut dans certains cas influencer l'infection. Par exemple, le MuHV-4 comprenant la cassette BAC ne montre pas de déficit *in vitro*, mais est atténué *in vivo* (Adler et al., 2001). Ce phénomène est probablement lié à la réponse immunitaire développée à l'encontre de l'eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) contenue au sein de la cassette BAC (El-Gogo et al., 2008). De ce fait, pour les études *in vivo*, un passage en fibroblastes exprimant la cre-recombinase est nécessaire, pour exciser la cassette BAC du MuHV-4 par l'action de la cre-recombinase sur les sites loxP situés de part et d'autres de la séquence BAC. Dès lors, la seule trace dans le génome viral de l'intégration de la cassette BAC est un unique site loxP (Adler et al., 2001).

### 3.3. Pathogénie

La voie naturelle d'infection par le MuHV-4 n'est pas connue, mais la plus probable est l'infection respiratoire. En laboratoire, une infection intra-nasale sous anesthésie induit une infection pulmonaire (Lawler et al., 2015), tandis que sans anesthésie, l'infection se limite au nez (Milho et al., 2009). La voie naturelle d'infection est donc probablement nasale plutôt que pulmonaire. Après inoculation intra-nasale, le virus infecte la muqueuse, où la réplication lytique démarre au niveau du neuroépithélium (Milho et al., 2012) (**Figure 7**). En effet, le virus cible les cils neuronaux, en surface du mucus. Ceci lui permet l'accès au neurone olfactif sous le mucus, probablement via un transport rétrograde le long du cil. Une fois au niveau de l'épithélium, le virus infecte les cellules sustentaculaires, qui deviennent rapidement la source principale d'infection (Milho et al., 2012). Au niveau pulmonaire, le virus exploite les glycosaminoglycans (GAGs) présents en surface des cellules épithéliales des alvéoles afin d'être présenté aux macrophages alvéolaires. En effet, la liaison aux GAGs est une étape nécessaire pour l'infection de la cellule, et l'absence de GAGs en surface des macrophages rend leur infection difficile *in vitro*. Par contre, *in vivo*, la présence de GAGs en surface des cellules épithéliales permet la liaison du virus, mais au lieu de pénétrer dans ces cellules, cette liaison permet au virus d'infecter dans un premier temps les macrophages alvéolaires. Dans un second temps, l'infection est transférée aux cellules épithéliales alvéolaires (Lawler et al., 2015). La réplication virale au niveau des poumons induit une pneumonie interstitielle accompagnée d'infiltrations périvasculaires et péribronchiolaires de leucocytes. L'infection primaire est contrôlée en 10 à 14 jours (Sunil-Chandra et al., 1992). De manière concomitante à l'infection primaire au niveau des poumons et du nez, le virus colonise les nœuds lymphatiques drainants et la rate et atteint son site de latence privilégié, le lymphocyte B. Pour cela, le MuHV-4 exploite les cellules myéloïdes CD11c<sup>+</sup> présentes au niveau des muqueuses (Gaspar et al., 2011). En effet, le MuHV-4 provoque la migration des cellules myéloïdes CD11c<sup>+</sup> infectées jusqu'au nœud lymphatique drainant, et le passage du virus dans ces cellules induit les changements de conformation des glycoprotéines gH/gL et gB nécessaires à l'infection des cellules B. Ces changements de conformation ont normalement lieu après l'endocytose et permettent la fusion



**Figure 7 : Schéma du trafic du MuHV-4 dans l'organisme de la souris.** Après infection intra-nasale, les virions se lient aux cils neuronaux, permettant au virus de traverser la couche de mucus pour atteindre les neurones et les cellules sustentaculaires au niveau de la muqueuse. Après libération au niveau basolatéral, le virus infecte les cellules myéloïdes. L'infection des cellules CD11c+ permet au virus d'atteindre les cellules B au niveau des nœuds lymphatiques. Ces cellules infectées prolifèrent dans les centres germinatifs. De là, certaines se différencient en plasmocyte et libèrent des virions dans les vaisseaux lymphatiques. Les virions libérés atteignent la rate où ils sont captés par les macrophages de la zone marginale (MZ MF), qui transmettent l'infection aux cellules B de la même zone (MZ B cell). Ces dernières migrent dans la pulpe blanche, se différencient en plasmocyte et libèrent de nouveaux virions. Ceux-ci sont interceptés par les cellules dendritiques folliculaires, qui transfèrent l'infection aux cellules B des centres germinatifs (GC B cell). Ces cellules, tout comme la majorité des cellules B infectées au niveau des nœuds lymphatiques, rejoignent les cellules B mémoires circulantes. La différenciation en plasmocyte au niveau des sous-muqueuses est associée à la réactivation du virus et permet l'excrétion virale au niveau du tractus génital, du moins chez les femelles (Gillet et al., 2015).

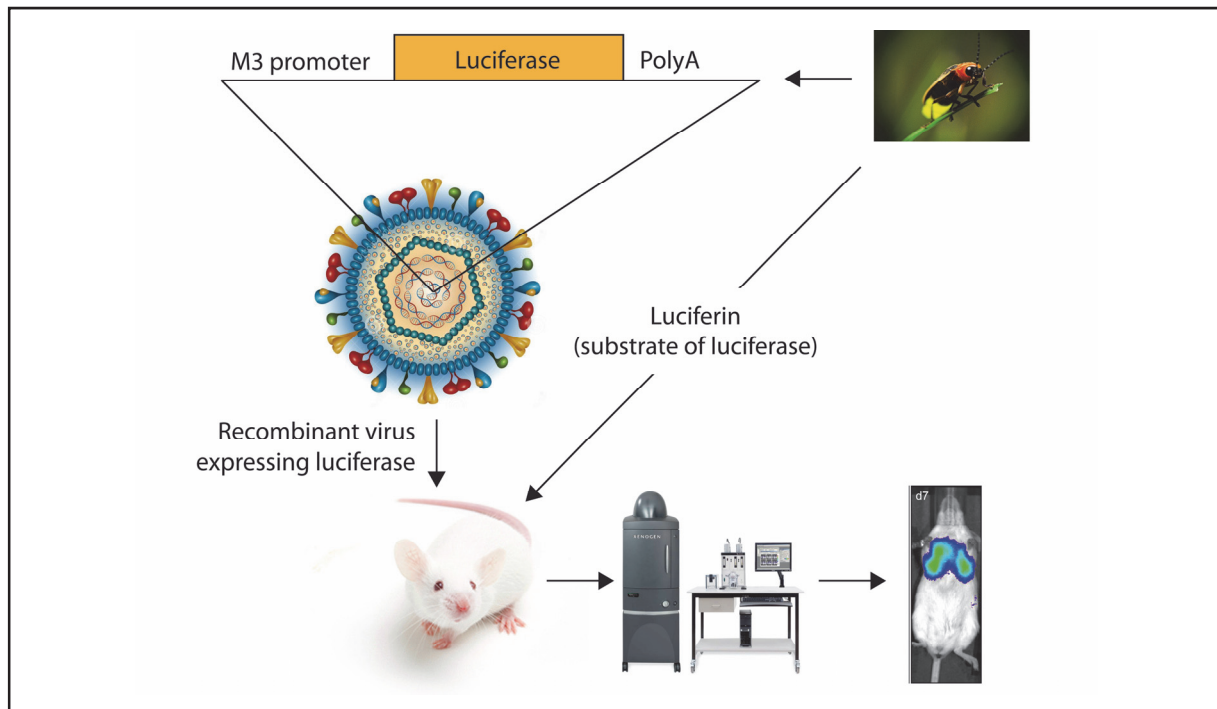
avec la membrane cellulaire. Le passage par les cellules myéloïdes CD11c+ favorise donc le transfert de l'infection aux cellules B, sans nécessiter d'endocytose (Frederico et al, 2012). Pour coloniser la rate, le virus exploite à nouveau les cellules myéloïdes pour atteindre les lymphocytes B : le virus infecte dans un premier temps les macrophages de la zone marginale pour ensuite atteindre les cellules B de cette même zone. Le virus se propage aux follicules, où il est transféré des cellules dendritiques aux cellules B (Frederico et al., 2014). Ces dernières prolifèrent dans les centres germinatifs et rejoignent la circulation. La plupart sont éliminées par le système immunitaire, mais quelques-unes se différencient en cellules mémoires, et forment le réservoir de latence. Les cellules B permettent ainsi le transport du virus dans l'organisme (Stevenson and Efstathiou, 2005). La latence peut également s'établir dans les macrophages et les cellules dendritiques de la rate (Flano et al., 2000; Stewart et al., 1998; Sunil-Chandra et al., 1992). La réplication lytique au niveau de la rate se termine vers 14-15 jours (Sunil-Chandra et al., 1992). Étonnamment, le niveau de latence n'y est pas dépendant de la dose d'inoculation (Milho et al., 2009). La différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes induit la réactivation du virus, le plus souvent au niveau des sous-muqueuses (Liang et al., 2009). Une réplication au niveau de l'épithélium mucosal précède probablement la réexcrétion de particules virales au niveau des muqueuses.

### 3.4. Transmission

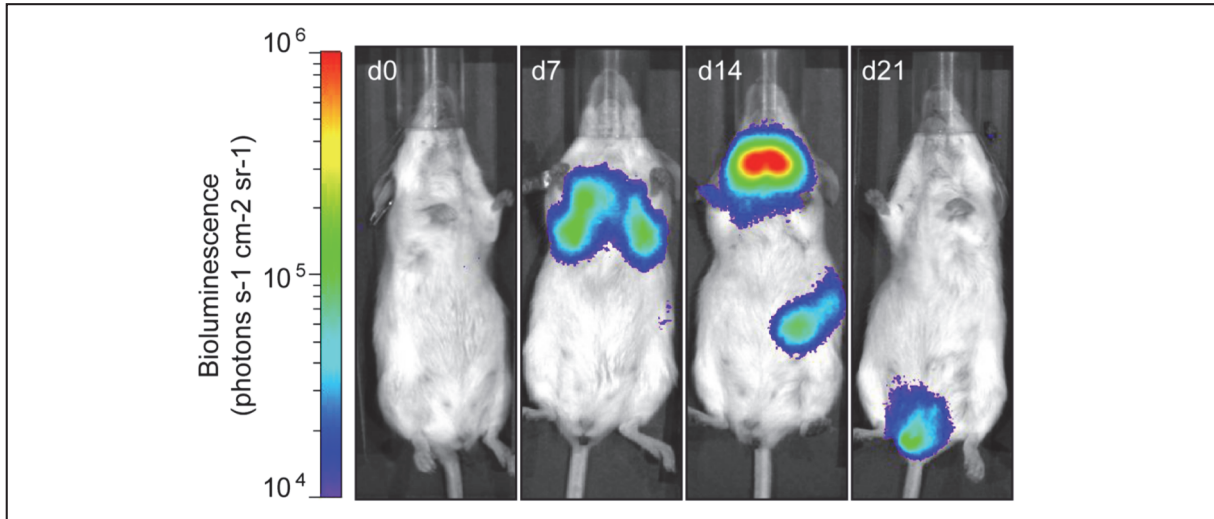
Jusqu'à récemment, la transmission des gammaherpèsvirus n'avait jamais été observée en laboratoire et la localisation de la réexcrétion virale était inconnue pour le MuHV-4. Mais le développement d'un système d'imagerie *in vivo* (IVIS – *in vivo imaging system*) a permis des avancées dans ce domaine (**Figure 8**) (Milho et al., 2009). Brièvement, la luciférase a été insérée au sein du génome du MuHV-4, sous le contrôle d'une copie du promoteur du gène M3. Ce gène est un gène « *early* » et est donc associé à la phase lytique du cycle. Dès lors, la réplication virale s'accompagne de l'expression de la luciférase. Lorsque le substrat de la luciférase, la luciférine, est injecté aux souris par voie intra-péritonéale, la réaction engendrée induit la production de photons par oxydation de la luciférine. Ces photons sont détectables par une caméra extrêmement sensible, permettant d'observer, au sein de l'organisme de la souris, la localisation et l'évolution de l'infection lytique au fil des jours (**Figure 9**) (Milho et al., 2009). Cette méthode présente divers avantages. D'abord, la luciférine est administrée facilement, sans danger pour les animaux. Ensuite, elle montre une excellente distribution dans l'organisme. Finalement, cette méthode permet de suivre le cours de l'infection sur un même individu au fil du temps. Cela limite drastiquement le nombre d'individus nécessaires pour les études, et réduit les biais induits par l'utilisation de groupes différents lors des expériences cinétiques (Hutchens and Luker, 2007).

Grâce à cette nouvelle technique, on a pu observer que, après l'infection intranasale, une réexcrétion virale avait lieu au niveau du tractus génital femelle (Francois et al., 2013). En effet, un





**Figure 8: Système d'imagerie *in vivo*.** Un virus recombinant exprime la luciférase de la luciole (*photinus pyralis*) sous le contrôle d'un promoteur associé au cycle lytique. Après avoir été infectées, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de luciférine, le substrat de la luciférase. La luciférine est alors oxydée et cette réaction induit l'émission de photons. Ceux-ci sont détectés par une caméra ultra sensible (Charge-coupled device (CCD)). Une photographie et une mesure des photons émis sont superposées, et une échelle colorimétrique est utilisée pour représenter les intensités d'émission lumineuse.



**Figure 9 : Suivi du cycle pathogénique du MuHV-4 par la technologie IVIS après une inoculation par voie intranasale chez la souris.** Des souris femelles ont été infectées sous anesthésie générale légère avec un MuHV-4 recombinant exprimant la luciférase. Après avoir reçu de la luciférine, les souris ont été analysées par la technologie IVIS pour détecter l'émission de bioluminescence permettant de suivre la progression de l'infection virale au cours du temps. Les images présentées sont issues d'une souris représentative, de gauche à droite, des J0, J7, J14 et J21 après inoculation virale. L'échelle présente la légende couleur de l'intensité du signal de bioluminescence. A J7, le MuHV-4 est détecté au niveau pulmonaire; à J14, il est observé dans les tissus lymphoïdes de latence, soit essentiellement les nœuds lymphatiques cervicaux superficiels et la rate ; entre le 17 et le 21<sup>ème</sup> jour, un signal transitoire est détecté au niveau des voies génitales (Francois et al., 2013).

signal luminescent transitoire mais récurrent a pu être observé au niveau génital grâce à l'IVIS (**Figure 9**). Ce signal apparaît principalement entre le 17 et le 21<sup>ème</sup> jour après l'infection. Des analyses *ex vivo* ont démontré que le signal provenait de l'infection de cellules des couches supérieures de l'épithélium vaginal, à la limite entre le vagin et l'exocol. Après contact avec des males naïfs, un signal génital a été observé chez 30% d'entre eux, s'accompagnant d'une séroconversion et d'une infection latente. L'infection semble avoir lieu en dessous plutôt que sur l'épithélium du pénis, un trauma de l'épithélium pourrait donc être nécessaire pour permettre la transmission (Francois et al., 2013). Cette étude est intéressante puisqu'il s'agit de la première observation d'une transmission horizontale expérimentale d'un gammaherpèsvirus en laboratoire. Ce modèle offre donc de nombreuses opportunités d'études.

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser ce modèle de transmission pour nos recherches. En effet, afin de déterminer comment contrer l'infection par les herpèsvirus, une meilleure compréhension du cycle et de la pathogénie virale est primordiale. En particulier, la transmission des gammaherpèsvirus reste méconnue. L'opportunité d'étudier une transmission naturelle en laboratoire est donc intéressante pour deux raisons principales.

Premièrement, ce modèle permet d'étudier les mécanismes de transmission des gammaherpèsvirus. Durant leur propagation dans l'organisme, les gammaherpèsvirus se propagent par contact direct entre les cellules (May et al., 2005a). Par contre, au moment de la transmission, ils sont libérés en surface des muqueuses et exposés au milieu extra-cellulaire. Les glycoprotéines étant les principales sources d'interaction avec les récepteurs cellulaires durant la phase extra-cellulaire du cycle, celles-ci devraient jouer un rôle important pendant la transmission. Il existe de nombreuses études concernant les glycoprotéines virales et leurs fonctions. Cependant, la plupart ont été réalisées *in vitro*, et si certaines étudient les fonctions des glycoprotéines *in vivo*, la relevance de ces données dans un contexte de transmission est indéterminée en l'absence de modèle adéquat en laboratoire. Pourtant, des études sur l'importance des glycoprotéines dans un contexte de transmission seraient essentielles pour mieux comprendre cette partie du cycle viral. D'une part, les protéines impliquées dans l'entrée cellulaire déterminent le tropisme du virus, et donc la voie et la manière dont la transmission va avoir lieu. D'autre part, la transmission est un moment critique où le virus est exposé à des anticorps spécifiques, et les mécanismes permettant l'évasion de la réponse humorale sont susceptibles de favoriser la transmission du virus. La 4<sup>ème</sup> section de cette introduction reprend les connaissances actuelles concernant les glycoprotéines impliquées dans l'entrée cellulaire et l'évasion de la réponse humorale par le MuHV-4, mais également par le KSHV, l'EBV et le BoHV-4.

Deuxièmement, une fois l'infection transmise, il est difficile de prévenir l'établissement de la latence ou de l'éliminer. Une approche alternative pourrait consister à inhiber la transmission. Ce modèle permet donc de tester l'efficacité de différents moyens pour prévenir la transmission. Actuellement, la vaccination est un moyen de lutte primordial contre les infections virales. Cependant, obtenir une

immunité stérilisante prévenant la transmission des herpèsvirus est difficile. Dans la première partie de la section 5 de cette introduction sont reprises les différentes raisons pour lesquelles obtenir une vaccination efficace contre les herpèsvirus est compliqué. En l'absence de vaccination efficace, le recours aux molécules anti-virales peut être nécessaire. Dans la seconde partie de la section 5 sont répertoriées les différentes molécules connues à ce jour pour leur efficacité anti-herpétique, ainsi que les conditions d'utilisation des molécules anti-virales dans le cadre des infections par les gammaherpèsvirus.

#### 4. Glycoprotéines virales impliquées dans l'entrée et l'évasion de la réponse humorale

##### 4.1. Les glycoprotéines du MuHV-4 et leurs homologues chez les gammaherpèsvirus humains

Le MuHV-4 exprime au moins 10 glycoprotéines associées à l'enveloppe (Vidick et al., 2013). Parmi celles-ci, 5 sont conservées chez l'ensemble des *herpesviridae*, et sont nommés en référence aux noms originellement utilisés pour l'herpèsvirus simplex, le prototype des alphaherpèsvirus : gB, gH, gL, gN et gM (Chandran and Hutt-Fletcher, 2007). Les autres glycoprotéines peuvent présenter des homologues chez les autres gammaherpèsvirus, ou être limitées aux *Rhadinovirus*.

**gB** est la protéine d'enveloppe la plus conservée parmi les herpèsvirus, et participe à l'entrée dans la cellule. gB se présente sous la forme d'un trimère, présent au niveau des membranes virales. Un site d'ancrage transmembranaire est observé au niveau de son extrémité C-terminale tandis que son ectodomaine présente de nombreux sites de glycosylation (Gillet and Stevenson, 2007; Pertel, 2002).

**gH et gL**, quant à elles, sont associées et forment un complexe. gH est une glycoprotéine présentant un site d'ancrage transmembranaire unique et un large ectodomaine, tandis que gL est constituée d'une courte séquence peptidique, sans ancrage transmembranaire. Son association avec gH est donc nécessaire pour sa présence en surface du virion (Dubin and Jiang, 1995).

**gM et gN** sont les deux autres glycoprotéines conservées au sein des herpèsvirus. gM est une glycoprotéine de type III, contenant 8 domaines transmembranaires, et forme un lien disulphide avec la glycoprotéine gN. Ces protéines sont principalement impliquées dans l'assemblage du MuHV-4 et sa libération (May et al., 2005b, 2008).

**gp150** est encodée par le gène M7 et est fortement conservée parmi les gammaherpèsvirus : ses homologues chez l'EBV, le KSHV et le BoHV-4 sont respectivement gp350/220, gpK8.1 et gp180, encodées par BLLF1 (Nemerow et al., 1987), K8.1 (Raab et al., 1998) et Bo10 (Machiels et al., 2011a). Ces protéines partagent la caractéristique d'être fortement glycosylées et participent à la liaison à la cellule. Leur rôle est décrit plus en détail dans les paragraphes suivants.

**Gp70** est encodé par l'ORF4 et possède un homologue chez le KSHV. Ces protéines participent à la régulation du complément (Kapadia et al., 2002; Spiller et al., 2003) et à la liaison aux GAGs en surface des cellules (Gillet et al., 2007a) aussi bien chez le MuHV-4 que chez le KSHV.

Les protéines encodées par les **ORF27** et **58** forment un complexe participant au passage de l'infection de cellule en cellule. Ces deux glycoprotéines présentent également des homologues à la fois chez le KSHV, et chez l'EBV (BDLF2 et BMRF2). Chez le MuHV-4, l'ORF27 favorise le passage de cellule en cellule, tandis que l'ORF58 est nécessaire pour que l'ORF27 atteigne la surface cellulaire et soit intégré aux virions (Gill et al., 2008; May et al., 2005a, 2005c). Les homologues de ces protéines chez l'EBV, BDLF2 et BMRF2, semblent être impliqués dans un mécanisme similaire : ces deux protéines forment un complexe, où BMRF2 favorise le transport du complexe jusqu'à la surface cellulaire. Ce complexe participe alors à la propagation de cellule en cellule (Gore and Hutt-Fletcher, 2009; Xiao et al., 2009).

Finalement, l'**ORF28** code pour une petite glycoprotéine associée à l'enveloppe virale, fortement glycosylée. Sa fonction chez le MuHV-4 n'est pas déterminée, mais elle n'est pas essentielle pour l'infection *in vitro* ou *in vivo*. Il existe un homologue de l'ORF28 chez le KSHV et chez l'EBV (BDLF3). Cependant, ce dernier, bien qu'homologue positionnel de l'ORF28, ne présente qu'une faible homologie avec celui-ci (May et al., 2005d). BDLF3 est impliqué dans l'évasion de la réponse immunitaire adaptative cellulaire (Quinn et al., 2015).

Ci-dessous sont reprises les fonctions des glycoprotéines du MuHV-4, mais aussi des autres gammaherpèsvirus, dans la liaison à la cellule et l'évasion de la réponse humorale.

#### **4.2. Glycoprotéines des gammaherpèsvirus impliquées dans l'attachement à la cellule**

Le processus d'entrée des herpèsvirus est complexe. Tandis que la plupart des virus enveloppés n'utilisent qu'une seule protéine pour cette étape du cycle, les protéines impliquées chez les herpèsvirus sont nombreuses. De plus, chacune de ces protéines remplit plusieurs fonctions. Ainsi, elles peuvent lier plusieurs récepteurs ou interagir avec d'autres glycoprotéines (Connolly et al., 2011). gB, gH et gL sont essentielles pour l'entrée dans la cellule, tandis que d'autres protéines, comme gp350/220 chez l'EBV, ne sont pas essentielles, mais favorisent l'entrée, ou sont impliquées dans l'orientation du tropisme viral.

En fonction des récepteurs cellulaires ciblés, le tropisme viral peut être modifié. Dans ce contexte, des systèmes complexes d'alternance de tropisme ont été identifiés et permettent le passage d'un type cellulaire à un autre pendant leur cycle biologique. Ces alternances de tropisme peuvent influencer la transmission. En effet, en fonction du type cellulaire dont sont issus les virions au moment de la transmission, le tropisme est modifié, et les cellules initialement ciblées peuvent être différentes.

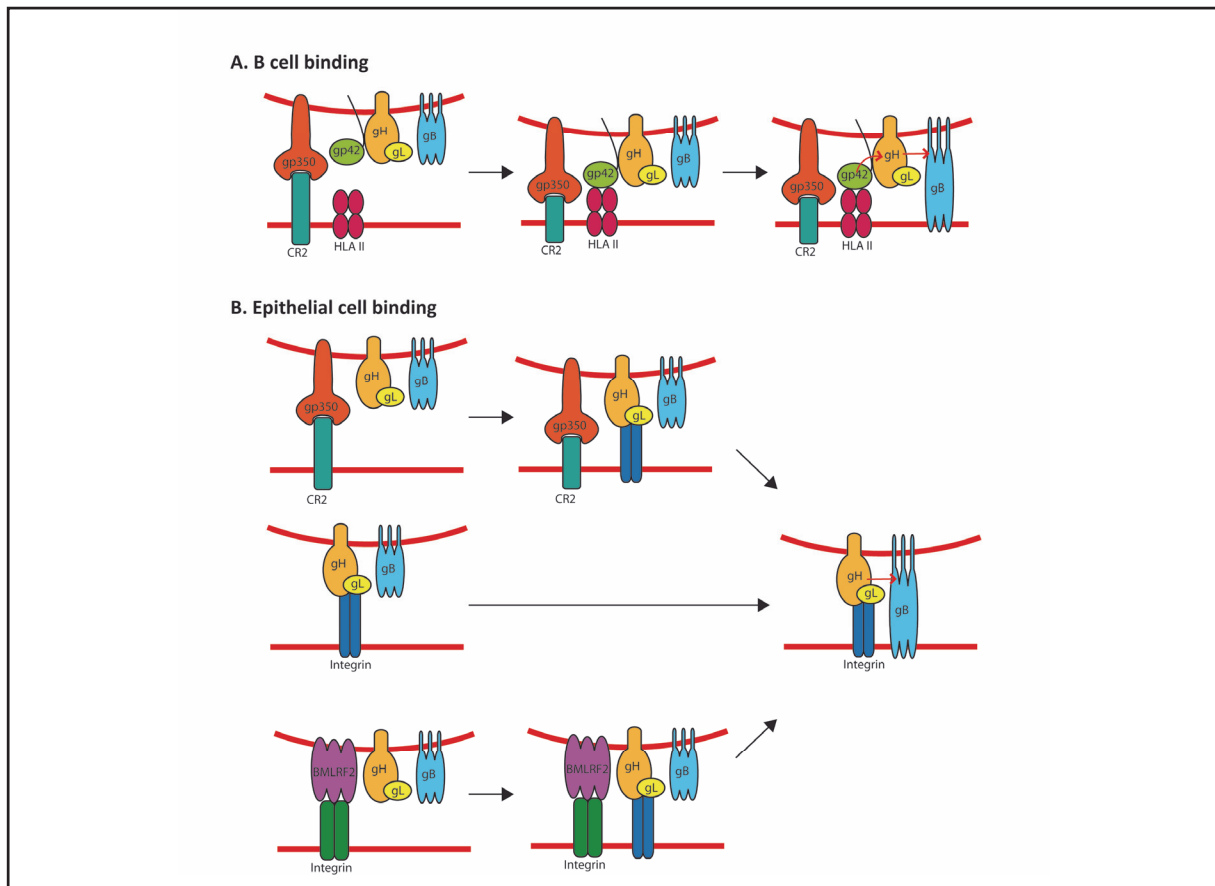
Dans cette section seront décrits dans un premier temps les interactions entre les glycoprotéines virales et les récepteurs cellulaires exploitées pour la liaison aux cellules. Ensuite seront abordés les mécanismes de tropisme alternés décrits chez les gammaherpèsvirus.

#### 4.2.1. Liaison aux récepteurs cellulaires

En ce qui concerne l'**EBV**, l'entrée et les glycoprotéines impliquées dans la liaison varient en fonction du type cellulaire ciblé. Pour lier les cellules B (**Figure 10A**), le virus fait intervenir la glycoprotéine gp350/220, la protéine majeure d'enveloppe, qui interagit avec le récepteur du complément de type 2 (CR2 ou CD21) via une interaction de forte affinité (Fingerroth et al., 1984; Nemerow et al., 1987). Récemment, il a été démontré que gp350/220 pouvait également interagir avec le récepteur cellulaire CR1/CD35 (Ogembo et al., 2013). Dans ce contexte, gp350/220 agit donc comme un catalyseur de l'infection. Sans cette glycoprotéine, l'infection peut toujours survenir, mais est moins efficace. Gp350/220 se présente sous deux formes, suite à un épissage alternatif du gène BLLF1 qui génère deux protéines de 350 et de 220 acides aminés, toutes deux présentant une séquence d'ancrage transmembranaire et un site de liaison au CR2. La signification de la coexistence de deux formes épissées de la même protéine, toutes deux capables de lier le CR2, n'est pas connue. Cependant, la liaison initiale à gp350 amène le virus à environ 50 nm de la surface cellulaire (Nemerow and Cooper, 1984). L'hypothèse pourrait donc être qu'un transfert de la liaison de gp350 vers gp220 rapprocherait le virus de la cellule et favoriserait les interactions subséquentes nécessaires à l'infection (Hutt-Fletcher, 2015).

La liaison aux cellules de type épithélial est plus complexe (**Figure 10B**). Premièrement, les cellules épithéliales qui expriment le CR2 peuvent lier gp350/220. En effet, certaines cellules épithéliales expriment de bas niveaux de CR2 en culture, et stimuler cette expression permet d'initier l'infection via la liaison de gp350/220 (Borza et al., 2004). *In vivo*, le seul site dans la cavité buccale où les cellules épithéliales expriment le CR2 serait les amygdales (Jiang et al., 2008). Deuxièmement, en l'absence d'expression du CR2, la liaison implique d'autres glycoprotéines. D'une part, gH/gL participent à la liaison des cellules épithéliales en liant les intégrines  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  et  $\alpha\beta 8$  (Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2011; Chesnokova et al., 2009) via leur motif KGD (Matsuura et al., 2010). Le complexe gH/gL est donc suffisant pour lier et initier l'infection des cellules épithéliales (McShane and Longnecker, 2004). Cependant, lorsque le complexe gH/gL est impliqué dans la liaison, l'efficacité de l'infection est réduite (Borza et al., 2004). D'autre part, la glycoprotéine BMRF2 possède un motif RGD situé sur son ectodomaine, qui permet la liaison aux intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$ , exprimées en surface des cellules épithéliales orales (Tugizov et al., 2003; Xiao et al., 2008).

Le **KSHV** présente un tropisme cellulaire plus large, probablement grâce à sa capacité à interagir avec les héparans sulfates (HS), très largement répandus en surface cellulaire (Akula et al.,



**Figure 10 : Liaison et fusion de l'EBV avec la cellule. A.** En surface des cellules B, la glycoprotéine gp350 permet la liaison du virus au CR2. Ensuite, l'interaction entre gp42 et la molécule HLA II entraîne un changement de conformation de gp42. Les interactions ultérieures avec gH/gL et/ou gB permettent l'insertion des boucles de fusion de gB au sein de la membrane cellulaire, et la fusion. **B.** En surface des cellules épithéliales, la liaison initiale peut impliquer différents récepteurs. Sur certaines cellules épithéliales, la présence du récepteur CR2 peut permettre la liaison de gp350. En l'absence de CR2, les intégrines cellulaires sont exploitées et lient gH/gL directement ou la glycoprotéine BMLRF2. Dans tous les cas, le changement de conformation de gH/gL suite à son interaction avec les intégrines entraîne la fusion par le changement de conformation de gB.

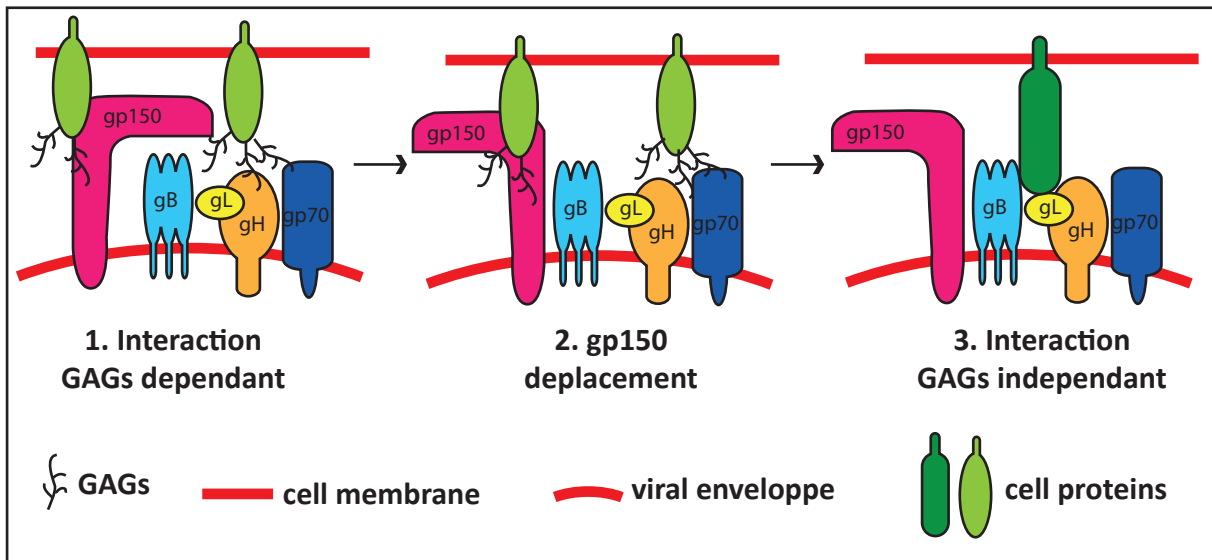
2001). Ces interactions avec les HS représentent probablement la liaison initiale à la cellule, permettant de concentrer les virus en surface de celle-ci, et favorisant le changement de conformation de glycoprotéines afin de permettre à des interactions plus spécifiques d'intervenir, dépendantes du type cellulaire infecté (Veettil et al., 2014). Différentes glycoprotéines semblent impliquées dans la liaison aux HS : gB et gpK8.1A sont les deux principales protéines engagées, mais l'ORF4 et gH semblent également capables d'interagir avec les HS (Akula et al., 2002; Birkmann et al., 2001; Hahn et al., 2009; Wang et al., 2003). Ces liaisons initiales sont essentielles pour l'infection. En effet, si les HS sont clivés, ou saturés avec des formes solubles de gB et gpK8.1A, alors l'infection est inhibée (Birkmann et al., 2001; Wang et al., 2001, 2003).

Au-delà de la liaison aux HS, gB participe également à la liaison à des récepteurs spécifiques, telles que des intégrines, ou le récepteur DC-SIGN ("*Dendritic cell specific intracellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) grabbing non-integrin*"). Le KSHV a été le premier virus pour lequel la liaison à des intégrines a été démontrée (Akula et al., 2002). Par la suite, l'importance de ces interactions pour l'infection, ainsi que l'implication de gB dans ce phénomène ont été mis en évidence (Garrigues et al., 2008; Kerur et al., 2010; Veettil et al., 2008). En effet, gB peut lier les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$  (Akula et al., 2002; Veettil et al., 2008), et son motif RGD semble impliqué dans ces interactions (Garrigues et al., 2008; Wang et al., 2003). Plus récemment, l'implication de l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$  dans la liaison à gB a été discutée (Walker et al., 2014). De plus, différentes études ont établi que ces interactions ne se limitaient pas à une simple liaison, mais enclenchaient de conséquents changements de conformation des récepteurs cellulaires, et facilitaient les étapes subséquentes de l'infection en induisant différentes voies de signalisation intracellulaires (Chakraborty et al., 2011; Veettil et al., 2008). La liaison de gB au récepteur DC-SIGN favorise l'infection des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules B activées. L'emploi d'anticorps anti-DC-SIGN et de lectines DC-SIGN solubles inhibent l'infection, confirmant l'importance de cette molécule (Rappocciolo et al., 2006, 2008).

Les interactions initiales du **MuHV-4** avec la cellule sont, comme pour le KSHV, HS-dépendantes, et sont nécessaires pour initier l'infection (Gillet et al., 2009a). Les principales glycoprotéines qui lient les HS sont gp70 (Gillet et al., 2007a), et gH (Gillet et al., 2008a). Quant à gL, sa fonction est probablement principalement régulatrice : gL semble contrôler les changements de conformation de gH et gB qui ont lieu après l'endocytose, et participe à la liaison non pas en liant directement les HS, mais en permettant la liaison de gH aux HS (Gill et al., 2006). gL n'est donc pas essentiel, puisque gp70 peut lier les HS, et que gH et gB sont suffisants pour induire la fusion membranaire (Gillet et al., 2009a). Les liaisons subséquentes à ces interactions initiales HS-dépendantes ne sont pas déterminées mais impliquent probablement gH/gL ou gB.

Etant donné la large distribution des HS en surface des cellules, ceux-ci ne devraient pas limiter le tropisme viral. Cependant, *in vivo*, on observe que l'expression de HS en surface des cellules





**Figure 11: Liaison du MuHV-4 à la cellule.** Dans un premier temps, le MuHV-4 établirait des liaisons GAGs dépendantes. Les glycoprotéines impliquées dans ces liaisons sont probablement gH/gL et gp70. Le contact initial stable entre la cellule et le virus permettrait alors à gp150 d'être déplacé suite à ses interactions de faible affinité avec les GAGs. Le déplacement de gp150 exposerait des épitopes d'autres glycoprotéines, probablement situés sur gH/gL et/ou gB, qui seraient alors disponibles pour engager des liaisons avec des récepteurs cellulaires spécifiques, indéterminés à ce jour.

épithéliales se fait principalement au niveau basolaréral des cellules (Hayashi et al., 1987), et sont donc inaccessibles à un virus entrant au moment de la transmission. Dès lors, l'expression de HS au pôle apical des cellules épithéliales pourrait être l'un des éléments déterminant du tropisme. Par exemple, il a été montré que l'épithélium olfactif, contrairement aux épithélia nasal respiratoire ou naso-pharyngé, exprimait des HS au niveau de leur pôle apical (Milho et al., 2012), ce qui pourrait expliquer pourquoi le virus cible en premier lieu cet épithélium après infection intra-nasale.

La glycoprotéine gp150, l'homologue de gp350/220 de l'EBV, est également capable de lier les HS, quoi qu'avec une affinité faible (Gillet et al., 2007a). Elle inhibe l'infection des cellules HS-négatives (Gillet et al., 2007a), et augmente de ce fait la dépendance du virus aux HS pour l'infection (de Lima et al., 2004). D'ailleurs, la délétion de gp150 réduit cette dépendance aux HS et permet d'augmenter la proportion de cellules HS-négatives infectées (de Lima et al., 2004). L'hypothèse pour expliquer ce phénomène est que l'interaction faible entre gp150 et les HS permettrait le déplacement de gp150, exposant ainsi les autres glycoprotéines impliquées dans la liaison. De même, l'absence de gp150 mène à un déficit de libération des particules infectieuses à partir des cellules infectées, les particules virales s'accumulant en surface de la cellule au lieu d'être libérées (de Lima et al., 2004), ce qui semble confirmer que gp150 participerait à la régulation de la liaison à la cellule.

Pour résumer, la liaison du MuHV-4 à la cellule se ferait donc en trois temps : les interactions initiales entre gH/gL et/ou gp70 et les HS permettraient de stabiliser la liaison de faible affinité entre gp150 et les HS, induisant ainsi le déplacement de ce dernier. Ceci exposerait des épitopes d'autres glycoprotéines impliquées dans des liaisons à des récepteurs cellulaires spécifiques, non déterminés à ce jour (**Figure 11**).

#### 4.2.2. Mécanismes de modification de tropisme

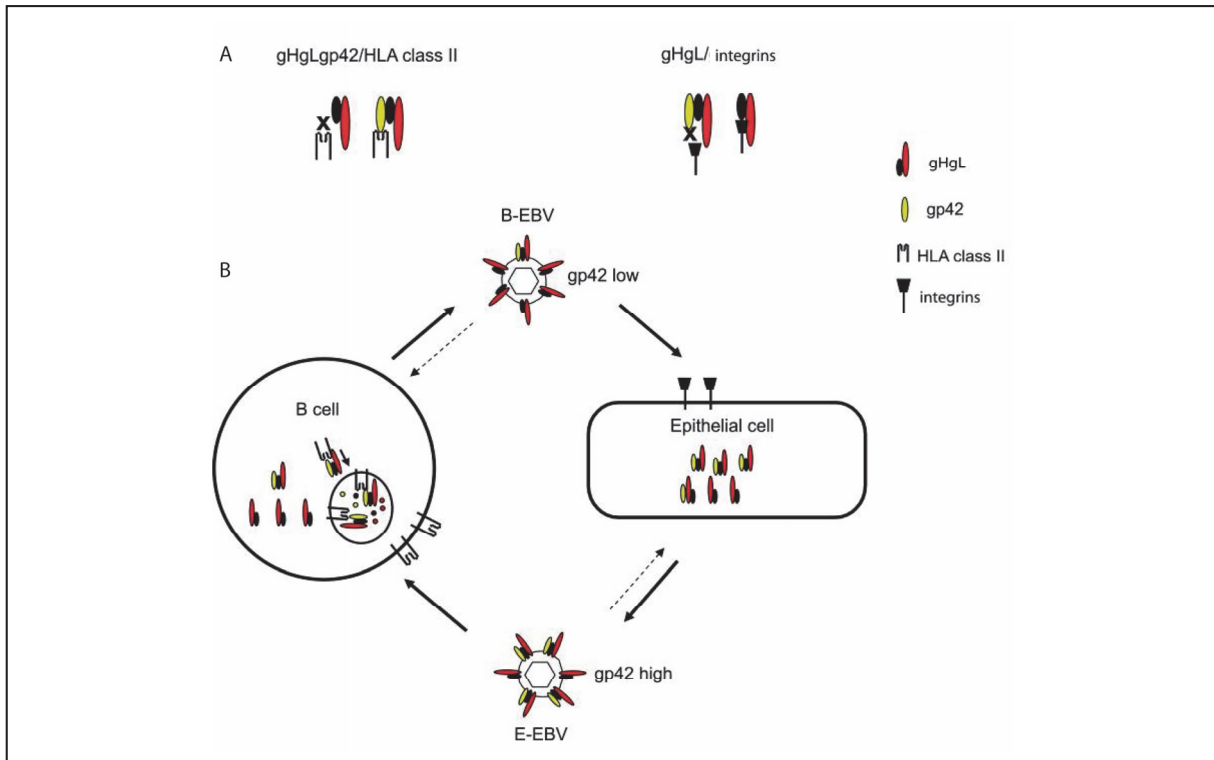
En participant à la liaison cellulaire, les glycoprotéines influencent le tropisme viral. Chez les gammaherpèsvirus, des variations de l'expression des glycoprotéines à la surface des particules virales permettent des modifications de tropisme et un cycle biologique complexe, passant d'un type cellulaire à un autre.

En ce qui concerne l'EBV, la principale protéine impliquée dans le tropisme cellulaire est la glycoprotéine gp42. Celle-ci lie les molécules HLA II (*human leucocyte antigene II*) en surface des cellules B, ce qui induit l'activation de gH/gL et la fusion membranaire (Connolly et al., 2011). Par contre, l'absence de son récepteur en surface des cellules épithéliales inhibe l'activation de gH/gL et l'entrée du virus dans la cellule (Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Chen et al., 2012). En effet, les sites de liaison de gH/gL aux intégrines cellulaires et à gp42 se chevauchent au niveau d'un domaine KGD. La liaison de gH/gL à gp42 inhibe donc l'attachement aux intégrines cellulaires, leur site de liaison étant

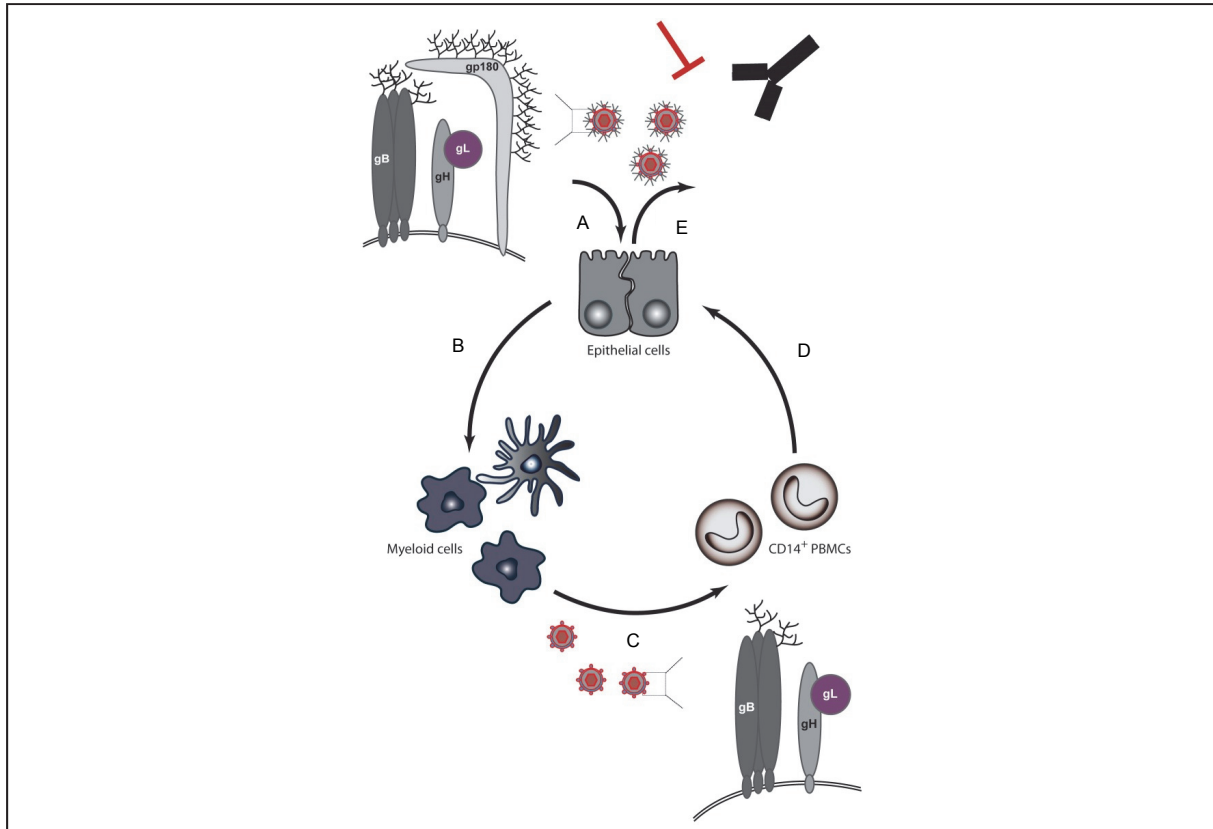
camouflé par gp42 (Chen et al., 2012). Le complexe gH/gL en surface des virions se présente sous deux formes : des hétérodimères gH/gL, et des complexes tripartites gH/gL/gp42. La proportion relative des deux formes influence le tropisme cellulaire : une proportion élevée de gp42 favorise l'infection des cellules B tandis qu'une réduction de son expression permet l'infection des cellules épithéliales. Lorsque les virions sont produits dans des cellules B, la présence de molécules HLA II réduit la proportion de gp42 en surface du virion en séquestrant les complexes gH/gL/gp42 et en induisant leur dégradation durant la maturation du virus. De ce fait, l'infection des cellules épithéliales est favorisée par les virions produits dans les cellules B. Au contraire, les virions issus de cellules épithéliales exposent à leur surface une large quantité de protéines gp42 puisque leur présence n'est pas régulée par les molécules HLA II. Par ce procédé, on observe donc une alternance de tropisme de l'EBV entre les cellules épithéliales et les cellules B (**Figure 12**) (Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Hutt-Fletcher, 2015; Wang et al., 1998).

Chez le **KSHV**, il n'existe pas d'alternance de tropisme aussi bien décrit. Pourtant, un mécanisme similaire doit exister chez les *Rhadinovirus*, pour expliquer le paradigme selon lequel les virions persistent dans les cellules B *in vivo*, alors qu'*in vitro*, ces cellules sont peu infectables. D'ailleurs, des mécanismes d'alternance de tropisme sont rapportés chez d'autres *Rhadinovirus*. Chez le **BoHV-4**, le gène Bo10, l'homologue des gènes codant pour gp350 chez l'EBV et gp150 chez le MuHV-4, est exprimé sous deux formes, suite à un épissage alternatif. Ces deux formes protéiques induisent deux phénotypes viraux distincts, qui présentent non seulement un tropisme différent en modifiant la dépendance du virus aux GAGs, mais également une sensibilité variable à la neutralisation (Machiels et al., 2013). Les cellules épithéliales produisent des virions où Bo10 est exprimé sous sa forme complète, et gp180, le produit de Bo10, est exprimé en surface des virions. Ce phénotype viral est moins sensible à la neutralisation, mais n'est pas infectieux pour les leucocytes circulants. Par contre, l'amplification au sein des cellules myéloïdes induit l'expression de Bo10 sous une forme tronquée, rendant le virus plus susceptible à la neutralisation, mais infectieux pour les leucocytes circulants. Ces observations concordent avec le cycle du virus *in vivo* : les virions produits dans les cellules épithéliales et destinés à être libérés au niveau des muqueuses en vue de la transmission, sont plus susceptibles d'être exposés aux anticorps, et sont donc protégés contre la neutralisation. Par contre, les virions issus des cellules myéloïdes ne nécessitent pas cette même protection contre les anticorps, mais sont préparés pour l'infection des leucocytes (**Figure 13**) (Machiels et al., 2013).

Un phénomène similaire a été observé chez le **MuHV-4**. En effet, le virus doit transiter par les cellules épithéliales et les cellules myéloïdes avant d'être infectieux pour les cellules B. En co-culture avec des cellules épithéliales, l'infection des cellules myéloïdes est possible. De même, la co-culture avec des cellules myéloïdes permet l'infection des cellules B. Cette facilitation de l'infection des cellules B est liée à la présence en surface des virions issus des cellules myéloïdes, de formes de gB et gH qui ne sont normalement disponibles qu'après les changements de conformation qui suivent l'endocytose.



**Figure 12 : la glycoprotéine gp42 de l'EBV influence le tropisme viral.** **A.** L'infection des cellules B requiert une interaction entre gp42 et le HLA II pour induire la fusion. Par contre, c'est l'interaction de gH/gL avec les intégrines cellulaires qui est nécessaire pour permettre l'infection des cellules épithéliales, et la présence de gp42 inhibe cette interaction. En surface des virions, le complexe gH/gL se présente sous deux formes : des hétérodimères gH/gL et des complexes tripartites gH/gL/gp42. C'est donc la proportion relative de ces deux complexes qui va influencer le tropisme viral. Une majorité de complexes tripartites favorise l'infection des cellules B, tandis que l'absence de gp42 permet l'infection des cellules épithéliales. **B.** Dans les cellules B, les complexes gH/gL/gp42 interagissent avec les molécules HLA II dans le réticulum endoplasmique et sont dirigés vers les endosomes pour être dégradés. Ceci résulte en une réduction de la proportion de complexes comprenant gp42 en surface cellulaire. En l'absence de molécules HLA II dans les cellules épithéliales, ce phénomène n'a pas lieu et les virions produits sont riches en protéine gp42. Les virions issus de cellules épithéliales infectent donc préférentiellement les cellules B, et inversement. Adapté de (Hutt-Fletcher, 2007).



**Figure 13 : Modèle de modification de tropisme chez le BoHV-4 suite à l'épissage alternatif de Bo10. A.** L'expression de Bo10 sous sa forme épissée (gp180) favorise l'infection des cellules GAG+. **B.** L'infection des cellules myéloïdes suit l'amplification initiale au niveau des cellules épithéliales. **C.** L'expression de Bo10 sous sa forme non épissée (tronquée) au niveau des cellules myéloïdes favorise l'infection des leucocytes circulants, tels que les cellules CD14+ dans le cas du BoHV-4. **D.** L'infection est transmise aux cellules épithéliales, qui libèrent des virions exprimant gp180 à leur surface. Ces derniers sont donc moins sensibles aux anticorps potentiellement présents au niveau du site d'excrétion, gp180 participant à la protection du virion contre la neutralisation (**E**) (Machiels et al., 2013).

Ce camouflage des épitopes vulnérables en surface des virions permet de les protéger, mais inhibe l'infection des cellules B. L'amplification au sein des cellules myéloïdes permet donc l'accès direct à ces épitopes en surface du virion, ce qui facilite l'infection des cellules B (Frederico et al., 2012). Comme pour le BoHV-4, le transit par les cellules myéloïdes sensibilise donc probablement le virus à la neutralisation, sans conséquence importante puisque le virus se dissémine dans l'organisme par contact direct entre les cellules (May et al., 2005c) et n'est pas exposé aux anticorps. Concernant gp150, l'homologue de gp180, aucun épissage alternatif, ni de modification de son expression par passage dans les cellules myéloïdes, n'ont été observés à ce jour. Or, gp150 inhibe l'infection des cellules GAGs-négatives. La relative indépendance de l'infection des cellules B par rapport à gp150 *in vivo* confirme que l'infection des cellules B se fait probablement par contact, et non pas par les virions libres (Gillet et al., 2015). *In vivo*, la dépendance de l'infection par rapport aux HS est donc principalement liée à l'entrée dans l'organisme, c'est-à-dire au niveau de l'infection des cellules épithéliales (Gillet et al., 2009a). On peut donc observer au sein des *Rhadinovirus*, des mécanismes différents qui permettent l'infection des cellules B après avoir transité par les cellules myéloïdes.

### 4.3. Evasion de la réponse humorale

En cas d'infection par un gammaherpèsvirus, le système immunitaire est capable de limiter les signes cliniques associés, mais pas d'éradiquer le virus. En effet, celui-ci a développé de nombreux mécanismes pour échapper à la réponse immune de son hôte et ainsi persister au sein de l'organisme. Ces mécanismes agissent à tous les niveaux de la réponse immune, et les interactions entre le virus et le système immunitaire sont multiples et complexes. En ce qui concerne les glycoprotéines, elles jouent un rôle important dans l'évasion de la réponse humorale. En effet, puisque les glycoprotéines en surface des virions sont directement exposées aux anticorps, différents systèmes permettent d'en limiter la neutralisation. Ces mécanismes ont probablement une importance toute particulière au moment de la transmission du virus, le virus étant exposé à la réponse humorale à ce moment du cycle.

#### 4.3.1. Multiplicité des épitopes de liaison

Les gammaherpèsvirus expriment différentes glycoprotéines non-essentiels impliquées dans l'entrée. En diversifiant ses protéines de liaison, le virus pourrait rester infectieux malgré la neutralisation de l'une d'entre elles. Par exemple, le **MuHV-4** et le **KSHV** présentent différentes protéines capables de lier les GAGs en surface des cellules, alors que la plupart des virus n'en possèdent qu'une seule. En effet, gp70 et gH/gL du MuHV-4 sont capables de lier les GAGs. De cette manière, si l'une de ces protéines est neutralisée, les autres sont toujours disponibles pour lier la cellule (Gillet et al., 2009a). gL ne participe pas directement à la liaison des GAGs mais favorise la liaison de gH (Gill et al., 2006). Lorsque gL est délété, le virus devient plus sensible à la neutralisation. En effet, en l'absence de gL, le virus dépend entièrement de gp70 pour sa liaison aux GAGs cellulaires, et devient

donc plus facilement neutralisable (Gillet et al., 2009b). Cette étude démontre donc l'importance de la diversification des épitopes de liaison à la cellule pour la protection du virus contre la neutralisation.

#### 4.3.2. Camouflage des épitopes de liaison en surface du virion

Les herpesvirus exploitent également un autre mécanisme qui protège leurs épitopes de liaison. En effet, certaines glycoprotéines, ou certains épitopes, peuvent ne pas être nécessaires à la liaison, mais camouflent d'autres épitopes essentiels et limitent leur neutralisation. Par exemple, en ce qui concerne l'**EBV**, les anticorps dirigés contre gp350/220 bloquent l'infection des cellules B en neutralisant l'interaction de gp350/220 avec son récepteur CR2. Pourtant, ces anticorps favorisent l'infection des cellules épithéliales (Turk et al., 2006). Cet effet ne semble pas médié par l'exploitation des récepteurs Fc des cellules, mais plutôt par le fait que les anticorps anti-gp350/220 agrègent ces glycoprotéines en surface de virion. L'hypothèse est donc que, si gp350/220 n'est pas essentiel à la liaison, sa présence peut limiter l'accès aux autres glycoprotéines nécessaires pour lier la cellule. Dans ce cas, les anticorps anti-gp350/220, en groupant les molécules gp350/220 en surface du virion, facilitent l'accès aux autres glycoprotéines et favorisent l'infection des cellules épithéliales. De cette manière, gp350/220 permet probablement de protéger des épitopes vulnérables du virus contre la neutralisation, et exploite la présence d'anticorps spécifiques pour modifier son tropisme, puisque ces anticorps, normalement neutralisants pour l'infection des cellules B, favorisent finalement l'infection des cellules épithéliales (Hutt-Fletcher, 2007). Cette fonction de gp350/220 n'est pas sans rappeler celle de gp150, son homologue chez le **MuHV-4**. En effet, comme décrit ci-dessus, la dépendance de l'infection aux HS du MuHV-4 est principalement liée à la présence de gp150. L'hypothèse pour expliquer cela serait que les interactions initiales entre gp150 et les HS permettraient de déplacer gp150, qui exposerait alors les épitopes des autres glycoprotéines impliquées dans la liaison (de Lima et al., 2004). Même si les intervenants cellulaires sont différents, le principe pourrait être similaire et permettrait de couvrir en surface du virion des épitopes vulnérables car essentiels à la liaison.

Les herpesvirus peuvent également profiter de la glycosylation de leurs protéines pour limiter la neutralisation. En effet, les glycans peuvent camoufler et bloquer l'accès aux épitopes importants des glycoprotéines. Par exemple, gB du **MuHV-4** pourrait participer à la protection des épitopes en surface des virions. En effet, sa partie N-terminale (gB-NT) est fortement glycosylée et semble former un bouclier de glycans qui protège des épitopes vulnérables à la neutralisation (Gillet and Stevenson, 2007). L'importance de la glycosylation dépend du type cellulaire d'où proviennent les virions : par exemple, au moment de la transmission, les gammaherpesvirus dérivent probablement de cellules épithéliales (Jiang et al., 2006), ce qui entraîne une forte glycosylation des virions produits et protège le virus contre la neutralisation (Gillet and Stevenson, 2007). Un mécanisme similaire est décrit pour le **BoHV-4**, impliquant la glycoprotéine gp180 : celle-ci forme un bouclier de glycans qui protège les autres glycoprotéines de la neutralisation (Machiels et al., 2011b). Comme les homologues de gp180,

gp350/220 de l'EBV et gp150 du MuHV-4, sont également fortement glycosylés, il est possible que ce mécanisme soit conservé parmi les gammaherpèsvirus.

#### 4.3.3. Infection des cellules en exploitant les récepteurs cellulaires Fc

Les virions peuvent également tirer parti de la reconnaissance de certains de leurs épitopes de surface par les anticorps pour rester infectieux. Par exemple, le **MuHV-4** est capable d'infecter les cellules en utilisant leurs récepteurs Fc (FcR) (Rosa et al., 2007). De cette manière, le virus qui ne peut plus lier les cellules en utilisant ses épitopes de liaison à cause de leur neutralisation, reste capable de lier les récepteurs Fc des cellules en exploitant le fragment Fc des anticorps fixés sur ses glycoprotéines (Rosa et al., 2007). L'infection des cellules FcR+ semble dépendre principalement des IgG anti-gp150, même si les anticorps dirigés contre gH/gL et gB semblent également favoriser l'infection des cellules FcR+, dans une moindre mesure. De ce fait, ces anticorps, majoritairement dirigés contre gp150, ne sont pas neutralisants et augmentent même l'infection des cellules FcR+ (Gillet et al., 2007b).

#### 4.3.4. Faible immunogénicité des cibles majeures de neutralisation.

Un autre mécanisme permettant de limiter la neutralisation est la réduction de l'immunogénicité relative des protéines virales importantes, afin de réduire la quantité d'anticorps produits contre ces protéines. Ce mécanisme protège les cibles majeures de neutralisation du **MuHV-4**, gH/gL et gB (Gillet et al., 2006). En effet, seule une faible proportion des anticorps produits naturellement sont dirigés contre ces protéines (Gillet et al., 2007b). Cependant, une vaccination post-exposition dirigée contre gH/gL permet d'améliorer la neutralisation du virus *in vivo* et *in vitro* (Gillet et al., 2007c). gH/gL sont également des cibles potentielles de neutralisation pour le KSHV (Naranatt et al., 2002) et pour l'EBV (Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2011). Ces observations démontrent donc le potentiel neutralisant d'anticorps dirigés contre gH/gL. Par contre, induire une réponse neutralisante à l'encontre de gB est plus compliqué car les épitopes de fusion de gB sont difficilement neutralisables en conditions naturelles (Gillet et al., 2006, 2008b; Glauser et al., 2011; May and Stevenson, 2010).

Une raison principale de cette faible immunogénicité relative des glycoprotéines gB et gH/gL du MuHV-4 est liée à l'existence d'une protéine largement immunodominante. En effet, la majorité des anticorps produits naturellement contre les épitopes de surface du MuHV-4 sont dirigés contre la glycoprotéine gp150. Ces anticorps ne sont pas neutralisants, l'immunodominance n'est donc pas corrélée avec le potentiel neutralisant des anticorps. Dès lors, gp150 agit comme un leurre immunologique qui protège le virus contre la neutralisation en déviant la réponse immune vers la production d'anticorps non-neutralisants (Gillet et al., 2007b). L'immunodominance de gp150 est liée à une courte région linéaire, reconnue par les anticorps sous sa forme native, mais aussi sous sa forme dénaturée. Ceci explique sa haute immunogénicité, puisque les débris de cellules infectées stimulent en



continu la production d'anticorps (Gillet et al., 2007b), tandis que les épitopes de gH/gL sont perdus lors de la dénaturation (Gill et al., 2006). Ce domaine est fortement conservé parmi les homologues de gp150. De plus, gp350/220 et gpK8.1 sont également fortement immunogéniques (Chandran et al., 1998; Thorley-Lawson and Poodry, 1982). L'immunodominance de protéines non essentielles pourrait donc être un mécanisme d'évasion de la neutralisation conservé parmi les gammaherpèsvirus.

#### **4.3.5. Changement de conformation post-endocytose**

Les herpèsvirus peuvent infecter les cellules soit après endocytose, soit en induisant la fusion membranaire directement en surface des cellules (Connolly et al., 2011). Le MuHV-4 infecte les cellules par endocytose (Gill et al., 2006), et gH/gL, gB et gp150 subissent un changement de conformation après l'endocytose, juste avant la fusion membranaire (Gillet et al., 2008b; Glauser et al., 2012). De cette manière, les épitopes de fusion du MuHV-4 sont camouflés jusqu'à ce que le virus atteigne les endosomes tardifs et sont donc protégés du milieu extracellulaire. Comme les épitopes de fusion ne sont pas exposés en surface de la cellule, les anticorps, pour neutraliser la fusion, doivent inhiber le changement de conformation des glycoprotéines impliquées. Ceci est particulièrement difficile à atteindre étant donné que la chute de pH dans les endosomes tardifs est favorable à ces changements de conformation et au détachement des anticorps liés (Stevenson et al., 2009).

La glycoprotéine gL semble avoir une fonction de régulation dans les changements de conformation de gH et gB (Gill et al., 2006). En effet, la délétion de gL induit la présence constitutive en surface du virion de gH sous sa forme post-endocytose, gH devenant ainsi une cible aisée de neutralisation (Gillet et al., 2008c). De plus, en l'absence de gL, le changement de conformation de gB et la libération de la capsid dans le cytoplasme sont prématurés. Donc, même si gL n'est pas essentiel pour l'infection, les virions déficients pour gL sont plus susceptibles à la neutralisation et montrent un déficit d'infection *in vitro* et *in vivo*. gL a un impact minime sur la dissémination au sein de l'organisme puisque le virus se propage de cellules en cellules, mais la délétion de gL réduit l'infection par les virions libres et augmente la sensibilité à la neutralisation (Gillet et al., 2008c). gL a donc un rôle important dans l'évasion des anticorps en aidant à camoufler les épitopes de fusion en surface des virions (Gillet et al., 2009b).

## **5. Moyens de lutte**

Lutter contre les infections à herpèsvirus est un challenge important de la médecine actuelle. Dans cette section seront abordés deux moyens de lutte disponibles actuellement pour lutter contre les virus. La première partie décrira les raisons principales pour lesquelles les essais de développement de vaccins à l'encontre des gammaherpèsvirus restent non satisfaisants dans la plupart des cas. En l'absence de vaccination efficace permettant de prévenir, si pas la transmission, au moins l'apparition des signes

cliniques associés, un moyen de lutte régulièrement exploité actuellement contre les herpèsvirus est l'utilisation de molécules anti-virales. La seconde partie de cette section abordera donc les différentes molécules connues actuellement pour leur efficacité anti-herpétique, ainsi que le contexte d'utilisation de ces molécules contre les gammaherpèsvirus.

### **5.1. Problèmes majeurs pour le développement de vaccins efficaces contre les gammaherpèsvirus**

La vaccination reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les pathogènes viraux. Cependant, la vaccination contre les gammaherpèsvirus est un challenge compliqué pour différentes raisons. Premièrement, les gammaherpèsvirus sont des virus persistants, qui ont donc développé divers moyens leur permettant de coexister avec la réponse immune et d'être excrétés au niveau des muqueuses en présence d'une immunité spécifique. Entre autre, de nombreux mécanismes décrits permettent aux gammaherpèsvirus de moduler et/ou de résister aux réponses immunes adaptatives cellulaire et humorale. En conséquence, il est difficile de développer des vaccins efficaces, étant donné leur capacité à résister à la réponse immune adaptative.

Deuxièmement, dans le cadre d'une infection à gammaherpèsvirus, les maladies sont principalement associées à la latence. Or, les vaccins efficaces contre des herpèsvirus permettent de limiter la pathologie associée à l'infection lytique mais échouent souvent à réduire l'établissement de l'infection latente. Ceci s'explique par le fait que durant la latence, le nombre d'antigènes exprimés est faible, et que leur détection est limitée par les nombreux mécanismes permettant de réduire la présentation antigénique (Stevenson et al., 2009). Ainsi, si le vaccin idéal permettrait d'obtenir une immunité stérilisante et préviendrait l'infection et l'installation à l'état latent du virus, dans les faits, un tel niveau de protection est difficile à obtenir. Par exemple, en médecine humaine, un vaccin vivant atténué développé contre le virus de la varicelle permet de protéger contre le développement de la maladie, mais échoue à prévenir l'infection (Gershon, 2013). En ce qui concerne les gammaherpèsvirus, l'essai clinique le plus avancé en termes de vaccination anti-EBV est un vaccin sous-unitaire basé sur la glycoprotéine gp350, en phase de test II (Moutschen et al., 2007; Sokal et al., 2007a). Ce vaccin, qui induit la production d'anticorps neutralisants *in vivo*, semble réduire l'incidence de la mononucléose infectieuse (*infectious mononucleosis* - IM) associée à l'infection, mais échoue à réduire l'infection elle-même (Moutschen et al., 2007; Sokal et al., 2007b). Un objectif réaliste de la vaccination contre les gammaherpèsvirus serait donc de prévenir la maladie associée à l'infection, plutôt que de prévenir l'infection. En effet, en influençant le cours de l'infection par la stimulation du système immunitaire, on peut espérer limiter les signes cliniques associés.

Troisièmement, la production d'anticorps neutralisants *in vivo* pose problème. En effet, certains anticorps permettent de neutraliser complètement l'infection *in vitro*, mais n'induisent qu'une

neutralisation partielle *in vivo* (Stevenson et al., 2009). Cette différence est probablement liée au fait que la neutralisation *in vivo* est largement dépendante de la voie d'infection du virus et du type cellulaire ciblé. Par exemple, des anticorps dirigés contre gp350 de l'EBV permettent de neutraliser *in vitro* l'infection des cellules B (Thorley-Lawson and Geilinger, 1980). Par contre, une vaccination basée sur cette même glycoprotéine *in vivo* ne permet pas de réduire le taux de séroconversion (Sokal et al., 2007b), indiquant ainsi que l'infection des cellules B n'est pas essentielle à l'entrée du virus au sein de l'organisme. Dès lors, une compréhension approfondie du cycle viral et du tropisme cellulaire est primordiale pour développer une réponse vaccinale adéquate. Actuellement, les connaissances concernant l'entrée des gammaherpèsvirus au sein de l'organisme sont trop limitées. Ceci complique le développement de vaccins, puisque ces vaccins sont basés sur des suppositions non prouvées concernant le cycle et l'entrée du virus au sein de l'organisme.

Finalement, la plupart des vaccins efficaces contre des herpèsvirus sont des vaccins vivants atténués (Baigent et al., 2006; Bouma, 2005; Takahashi et al., 2001). Cependant, pour des raisons de sécurité, ces techniques ne devraient pas être utilisées dans le cadre des infections à gammaherpèsvirus. En effet, ceux-ci sont considérés comme des carcinogènes de grade I, et plusieurs de leurs gènes sont capable d'induire la transformation cancéreuse de cellules. Dès lors, le recours à des vaccins vivants atténués comporte des risques conséquents (Morgan and Khanna, 2007). Afin de contourner ce problème, différentes études concernant le MuHV-4 ont développé des souches virales incapables de s'établir à l'état latent, notamment via la délétion de la protéine LANA (Boname et al., 2004; Fowler and Efsthathiou, 2004; Jia et al., 2010; Rickabaugh et al., 2004). L'utilisation de ces souches virales comme vaccin ont permis de conférer une protection plus ou moins importante contre un challenge subséquent avec une souche sauvage de MuHV-4. Dès lors, ces études ouvrent de nouvelles perspectives concernant l'utilisation de vaccins vivants pour lutter contre les gammaherpèsvirus.

## 5.2. Les anti-viraux

Une alternative à l'induction d'une immunité anti-virale efficace consiste en l'utilisation de drogues anti-virales. L'utilisation de molécules anti-virales peut être justifiée dans trois contextes. Le premier, le plus classique, est de traiter les signes cliniques associés à l'infection. Il s'agit du contexte le plus simple, où la balance risque/bénéfice est la plus facile à évaluer puisque les bénéfices du traitement sont directement visibles. Le second contexte vise à prévenir l'infection. Dans ce cas, on administre la molécule en prévention à un patient qui risque de contracter l'infection, pour réduire la probabilité de contamination. Finalement, dans le troisième cas, le patient est infecté, mais ne présente pas de symptômes associés. Dans certaines situations, il est intéressant d'administrer un traitement pour prévenir l'apparition de ces signes cliniques, ou pour prévenir la réexcrétion du virus afin de limiter les risques de transmission. Dans tous les cas, le choix de traiter ou non doit toujours dépendre de la balance risques/bénéfices, en tenant compte des éventuels effets néfastes de la molécule, ainsi que des bénéfices

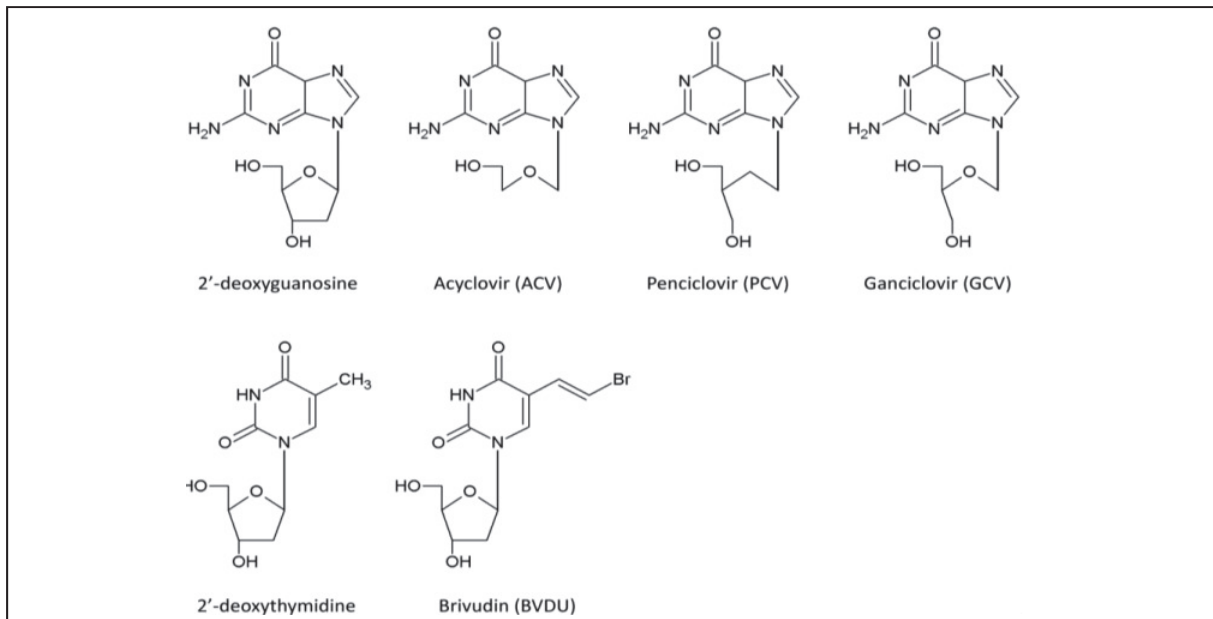
potentiels pour le patient. Actuellement, les traitements anti-herpétiques utilisés permettent de réduire l'apparition de signes cliniques et/ou la réexcrétion virale, mais ne permet pas d'éliminer le virus à l'état latent.

Depuis le développement de l'acyclovir, la première molécule possédant une activité anti-herpétique, de nombreuses recherches ont été menées afin d'améliorer la spécificité, la sécurité et l'efficacité des composants anti-viraux. Dans cette section seront décrites les principales molécules utilisées actuellement contre les herpesvirus en médecine humaine, ainsi que les avancées récentes dans le développement de nouvelles molécules.

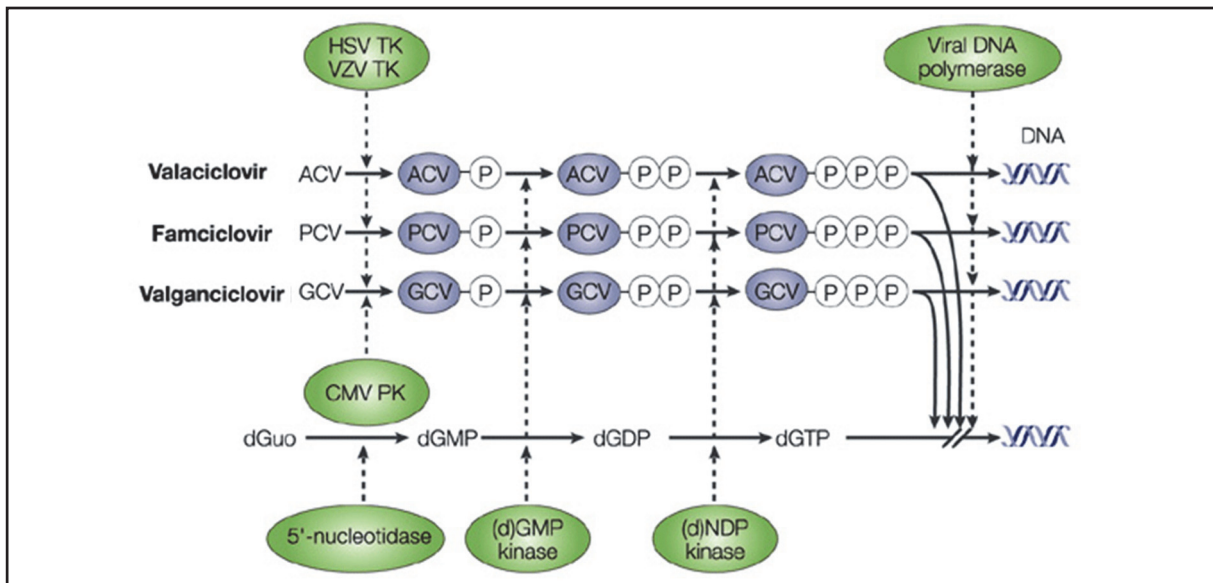
### 5.2.1. Les analogues de nucléoside

Les analogues de nucléoside utilisés actuellement en médecine humaine sont l'acyclovir, (ACV), le penciclovir (PCV), le ganciclovir (GCV) et la brivudine (BVDU) (**Figure 14**). Ces molécules agissent comme des inhibiteurs compétitifs des nucléosides naturels, ou sont incorporés directement au sein de la chaîne d'ADN en formation et en terminent l'élongation (Coen et al., 2014). L'activation des analogues de nucléoside requiert trois étapes de phosphorylation (**Figure 15**). La première phosphorylation est catalysée par un enzyme viral, la thymidine kinase (TK) (Jamieson et al., 1974). Dans certains cas, décrits plus loin, c'est la protéine kinase virale (PK) qui est responsable de cette première phosphorylation. Dans tous les cas, les deux phosphorylations suivantes sont exécutées par des kinases cellulaires (Miller and Miller, 1982). L'implication d'un enzyme viral dans le processus d'activation permet de limiter l'activité de la molécule aux cellules infectées, ce qui confère à ces composants une sécurité d'utilisation unique. Cependant, c'est également une limite majeure d'utilisation de leur utilisation, puisque l'implication d'une protéine virale dans le processus d'activation favorise le développement de résistances. En effet, des mutations de la TK et de la PK peuvent engendrer des résistances des souches virales envers les analogues de nucléoside. Dans de rares cas, la mutation responsable de la résistance est située au niveau de l'ADN polymérase virale (Sellar and Peggs, 2012). Ces résistances apparaissent principalement en cas de traitement de longue durée, typiquement utilisé chez les personnes immuno-déprimées.

Parmi ces analogues de nucléoside, l'ACV est l'archétype des agents anti-viraux. Son principe d'action repose sur son incorporation au sein de la chaîne d'ADN en élongation. Il ne peut ensuite plus en être excisé. En l'absence du groupement 3'-hydroxyl nécessaire à l'élongation de la chaîne, celle-ci est suspendue. L'ADN polymérase est ainsi séquestrée sur la chaîne d'ADN non terminée et n'est plus disponible pour d'autres élongations. De plus, l'ACV étant un meilleur substrat pour l'ADN polymérase virale que pour son homologue cellulaire, son incorporation au sein des chaînes d'ADN cellulaire est limitée (Reardon and Spector, 1989). Cette molécule est couramment utilisée en médecine humaine pour les infections à HSV-1, -2 (*Herpes Simplex Virus*) et VZV (*Varicella Zoster Virus*), et est remarquable



**Figure 14 : Structure des analogues de nucléoside utilisés actuellement en médecine humaine contre les herpèsvirus (Coen et al., 2014).**



**Figure 15 : Mécanisme d'activation et d'action des analogues de nucléoside.** Dans cette illustration sont reprises les étapes d'activation de trois analogues de nucléoside, l'acyclovir, le penciclovir et le ganciclovir, ainsi que de leurs précurseurs oraux, respectivement le valaciclovir, le famciclovir et le valganciclovir. Ces analogues de nucléoside sont phosphorylés par la thymidine kinase (TK) du HSV et du VZV pour être activés, tandis qu'en ce qui concerne le CMV, c'est la protéine kinase (PK) qui est nécessaire pour cette première étape de phosphorylation pour le ganciclovir. Les deux phosphorylations suivantes sont catalysées par des kinases cellulaires. Les molécules, une fois activées, inhibent l'élongation des chaînes d'ADN (De Clercq, 2004).

par sa sécurité d'utilisation. Par contre, son efficacité contre les gammaherpèsvirus est plus limitée : l'ACV est efficace contre l'EBV *in vitro*, mais ne montre qu'une faible activité contre le KSHV (Bounaadja et al., 2013; Friedrichs et al., 2004). En effet, la TK du KSHV n'a que peu d'affinité pour les dérivés puriques (ACV ou GCV), et reconnaît préférentiellement les dérivés pyrimidiques (BVDU). Chez ce virus, c'est la PK qui est responsable de la mono-phosphorylation des dérivés puriques, telles que le GCV, et dans une moindre mesure, l'ACV (Gustafson et al., 2000).

Une seconde molécule utilisée actuellement pour lutter contre les herpèsvirus est le PCV. Contrairement à l'ACV, il ne bloque pas l'élongation de la chaîne d'ADN après son incorporation, mais en retarde l'élongation. En effet, son groupement 3'-hydroxyl permet une élongation limitée de la chaîne d'ADN après son incorporation (Reardon and Spector, 1989). Le PCV possède le même spectre d'activité que l'ACV : actif contre le HSV-1, -2 et l'EBV, il n'inhibe que peu le KSHV (Bacon and Boyd, 1995; Bacon et al., 1996; Neyts and De Clercq, 1997).

Le GCV est la principale molécule utilisée contre le HCMV chez les patients transplantés. *In vitro*, il est également efficace contre le HSV, le VZV, l'EBV et le KSHV (Bounaadja et al., 2013; De Clercq, 1993; Friedrichs et al., 2004). En ce qui concerne le KSHV et le HCMV, la première étape de phosphorylation nécessaire à l'activation n'est pas catalysée par la TK, mais par la PK. Comme le PCV, son groupement 3'-hydroxyl permet une élongation limitée après son incorporation au sein de la chaîne d'ADN. Par rapport aux autres analogues de nucléoside, le GCV montre une plus grande affinité pour l'ADN polymérase cellulaire, et son incorporation potentielle au sein de l'ADN cellulaire est responsable de sa toxicité supérieure par rapport aux autres molécules de cette famille. En effet, le GCV peut engendrer des myélosuppressions, entraînant majoritairement des neutropénies, ou dans de plus rares cas, des thrombocytopénies et des anémies (Markham and Faulds, 1994).

Finalement, la BVDU est active principalement contre le HSV-1 et le VZV. Bien qu'active *in vitro* contre le KSHV (Bounaadja et al., 2013; Friedrichs et al., 2004), son efficacité *in vivo* contre les *Rhadinovirus* semble plus limitée : aucun effet protecteur n'a pu être observé contre le MuHV-4 chez des souris immuno-compétentes (Coen et al., 2013a) ou immuno-déficientes (Neyts and De Clercq, 1998). De plus, la BVDU n'est que très faiblement active contre l'EBV (Bounaadja et al., 2013; Friedrichs et al., 2004).

### 5.2.2. Les analogues de nucléotide (*acyclic nucleoside phosphonate* – ANP)

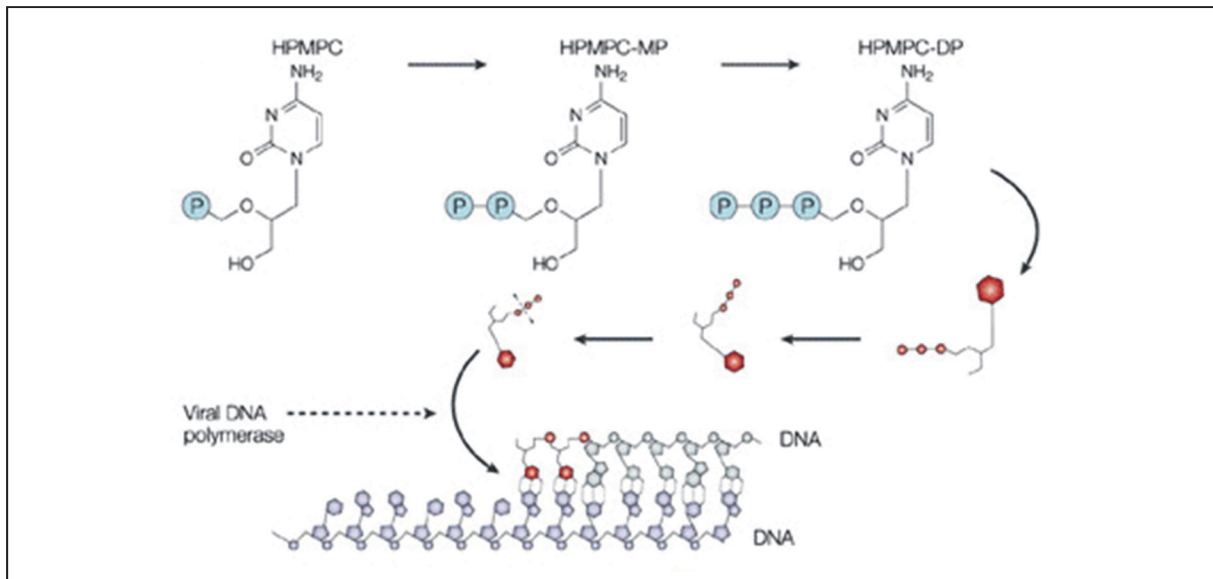
Cette famille regroupe trois molécules importantes: le cidofovir (CDV), le ténofovir et l'adéfovir. Contrairement aux analogues de nucléoside, les ANP ne requièrent pas d'étape de phosphorylation catalysée par les kinases virales, grâce à leur groupement phosphonate. Les seules étapes d'activation nécessaires sont donc les deux phosphorylations catalysées par les enzymes

cellulaires (**Figure 16**). Ces ANP diphosphorylés sont des substrats de l'ADN polymérase et sont incorporés à la chaîne d'ADN, bloquant ainsi son élongation (De Clercq and Holy, 2005). Dans le cas de l'adéfovir et du ténofovir, l'incorporation d'une molécule unique au sein de l'ADN suffit à stopper son élongation (De Clercq and Holy, 2005), tandis que pour le CDV, deux incorporations successives, en tandem, sont requises pour terminer efficacement l'élongation de la chaîne d'ADN, comme cela a été démontré pour le CMV (Xiong et al., 1997). Dans ce cas, l'activité de la molécule ne se limite donc plus aux cellules infectées, puisque la molécule active est présente dans l'ensemble des cellules. La spécificité d'action anti-virale est dans ce cas liée à l'affinité supérieure des ANP diphosphorylés pour l'ADN polymérase virale par rapport à son homologue cellulaire (Kramata et al., 1996). De plus, comme aucun enzyme viral n'est requis pour leur activation, cette famille de molécules exerce une activité contre un large panel de virus à ADN : l'ensemble des virus à ADN et rétrovirus sont susceptibles au cidofovir, au ténofovir et/ou à l'adéfovir (De Clercq and Holy, 2005).

Le **CDV** possède un très large spectre d'activité : il est actif contre divers virus à ADN (polyoma-, papilloma-, adéno- et poxvirus), ainsi que contre les huit herpèsvirus humains (De Clercq, 2003). Malgré ce spectre d'activité impressionnant, le CDV n'est actuellement utilisé que de façon très spécifique dans la clinique des herpèsvirus. En effet, sa toxicité importante rend son utilisation limitée aux cas où des résistances sont démontrées à l'encontre des analogues de nucléoside. Le cas typique d'utilisation du CDV est la rétinite à HCMV, chez les patients sidéens (De Clercq, 2005). Le CDV a une faible bio-disponibilité orale, et est donc administré par voie intra-veineuse. Contrairement aux analogues de nucléoside, il permet une réponse anti-virale prolongée. En effet, même si sa concentration sérique diminue rapidement, le temps de demi-vie de ses métabolites intra-cellulaires est élevé (Ho et al., 1992). Ces métabolites servent donc de stock intra-cellulaire, et permettent de limiter la fréquence du traitement à une administration hebdomadaire dans un premier temps, puis bimensuelle (De Clercq, 2011). Un autre avantage du cidofovir est l'absence à ce jour d'émergence de souches résistantes en clinique. *In vitro*, des souches de CMV et de HSV avec une susceptibilité réduite au CDV ont été isolées, et présentent des mutations au niveau de l'ADN polymérase virale. Cependant, ces souches ont une réplication ou une pathogénicité réduites par rapport aux souches sauvages (Andrei et al., 2000; Cihlar et al., 1998). Si elles émergeaient en clinique, elles ne seraient donc probablement pas problématiques, et pourraient même être bénéfiques en stimulant la réponse immunitaire.

Sa faible biodisponibilité orale, ainsi que sa toxicité, principalement rénale, lui sont conférées par son groupement phosphonate (Miller and Miller, 1982). En effet, ce dernier empêche la traversée de la barrière intestinale, et provoque l'accumulation de la molécule dans les tubules proximaux des reins par leur absorption via les transporteurs d'anions organiques (*organic anion transporter* - OAT) (Ho et al., 2000). Afin d'en limiter la toxicité, l'injection de CDV est associée à une importante hydratation





**Figure 16: Mécanisme d'action du CDV, aussi appelé HPMPC (Hydroxy 2-Phosphonomethoxy Propyl Cytosine).** L'activation du CDV n'est pas dépendante de l'activité d'enzymes viraux, mais dépend d'une double phosphorylation catalysée par des enzymes cellulaires. Deux incorporations successives, en tandem, au sein de la chaîne d'ADN sont nécessaires pour stopper l'élongation (De Clercq, 2004).

intra-veineuse, et à l'administration concomitante de probénécide. Ce dernier est un inhibiteur des OAT, et permet de réduire l'accumulation du CDV dans les tubules rénaux (Lacy et al., 1998).

Pour améliorer la biodisponibilité orale du CDV, des précurseurs ont été développés, dans lesquels le groupement phosphonate est transformé en un groupement ester phosphonique (Tichý et al., 2011). En particulier, le précurseur CMX001 (brincidofovir - BCV) semble prometteur (Rice et al., 2011). Sa haute tolérance a été démontrée dans différentes études cliniques (Painter et al., 2012; Tippin et al., 2016). En particulier, aucun trouble rénal n'a été décrit (Painter et al., 2012), grâce à l'absence d'interaction entre le BCV et les transporteurs OAT (Tippin et al., 2016). Le BCV présente *in vitro* une activité contre une large variété de virus à ADN, tels que les ortho-, les polyo-, les herpès-, les papilloma- et les adénovirus (Lanier et al., 2010). De plus, *in vivo*, le BCV a été testé dans divers modèles animaux, et son efficacité a par exemple été démontrée contre le CMV chez la souris (Bidanset et al., 2004; Kern et al., 2004). Le BCV est d'ailleurs actuellement en test clinique pour la prévention des pathologies liées au HCMV en cas de transplantation de cellules hématopoïétiques. En effet, sa haute tolérance en fait un candidat intéressant pour une utilisation préventive. En ce qui concerne les gammaherpèsvirus, l'EBV et le KSHV sont aussi sensibles au BCV qu'au CDV *in vitro* (Coen et al., 2013b). Le BCV semble donc un candidat prometteur pour le traitement des herpèsvirus.

Un autre ANP, l'**adéfovir**, présente également un spectre d'activité très large : il est actif contre les rétro- et les hepadnavirus, ainsi que contre les huit herpèsvirus humains (De Clercq and Holy, 2005). En clinique, cette molécule est principalement utilisée pour traiter les hépatites B chroniques, mais n'est actuellement pas utilisée contre les herpèsvirus.

Finalement, le **ténofovir** est actif contre les rétrovirus et les hepadnavirus, mais n'a qu'une activité limitée contre les herpèsvirus. Cette molécule représente actuellement la pierre d'angle dans le traitement du VIH (De Clercq and Holy, 2005). Sa forme active (diphosphorylée) est caractérisée par une très faible affinité pour les polymérases cellulaires. Sa faible interférence avec la production d'ADN cellulaire explique probablement sa faible toxicité, rendant cette molécule intéressante dans le traitement de pathologies chroniques telles que le SIDA (Birkus et al., 2002).

### 5.2.3. Les analogues de pyrophosphate

Le **foscarnet** est une molécule qui n'est pas un analogue de nucléoside ou de nucléotide, mais qui agit en inhibant directement l'ADN polymérase virale : en bloquant le site de liaison pyrophosphate de l'enzyme, il prévient le clivage des groupements pyrophosphates à partir des désoxyribonucléotides ajoutés à la chaîne d'ADN. C'est donc un inhibiteur de l'ADN polymérase qui n'est pas incorporé au sein de la chaîne d'ADN. Il est environ 100 fois plus actif contre l'ADN polymérase virale que contre l'enzyme cellulaire (Crumpacker, 1992). Sa biodisponibilité orale étant faible, il est administré par voie

intra-veineuse. Son spectre d'activité inclut l'ensemble des herpèsvirus humains. Puisque son activation ne nécessite pas l'implication de la TK ou de la PK, il est également actif contre les souches virales pour lesquelles des mutations au sein de ces enzymes confèrent une résistance aux analogues de nucléosides. Il est également actif contre le VIH. Au vu de sa néphrotoxicité importante, le foscarnet est principalement utilisé en seconde intention, pour traiter les infections à HSV, VZV ou HCMV pour lesquelles les traitements avec l'ACV ou le GCV ont été inefficaces. L'activité *in vitro* du foscarnet contre les gammaherpèsvirus est relativement faible (Long et al., 2003). Cependant, certaines études ont démontré son efficacité dans le cadre du traitement du KS (Glesby et al., 1996; Mocroft et al., 1996). De même, un cas clinique rapporte l'efficacité du foscarnet contre l'EBV après transplantation de poumons (Afshar et al., 2011). Cette molécule pourrait donc potentiellement être efficace *in vivo* contre les gammaherpèsvirus, mais son utilisation est limitée par sa toxicité.

#### 5.2.4. Nouvelles molécules

Le monde scientifique est encore aujourd'hui à la recherche de la molécule anti-virale parfaite. Pour cela, de nombreuses molécules sont développées, notamment des dérivés ou précurseurs des drogues citées précédemment afin d'en améliorer l'efficacité, de réduire le développement de résistances, d'en limiter la toxicité, ou d'en augmenter la biodisponibilité orale afin de faciliter le traitement (Jordheim et al., 2013). Parmi les molécules existantes, de nombreuses molécules dérivées de la famille des analogues de nucléosides et de nucléotides sont en cours de développement.

Au-delà des précurseurs et dérivés des molécules déjà connues, le monde scientifique s'attache également à découvrir de nouveaux composants, ciblant des étapes différentes de la réplication virale. En effet, la cible principale des molécules anti-herpétiques actuelles est limitée à l'ADN polymérase virale. De nombreuses recherches se penchent donc sur des principes actifs ayant une cible d'action différente. Par exemple, une cible potentielle étudiée à ce jour est l'hélicase primase virale (Weller and Kuchta, 2013). Ce complexe est composé de trois protéines virales, exhibant des activités d'hélicase, de primase et de NTPase, essentielles à la réplication. Ces protéines déroulent l'ADN afin de le rendre accessible pour la polymérase, et génèrent des amorces pour la synthèse de l'ADN. Actuellement, des inhibiteurs de cette hélicase primase sont en cours de développement. Même si leur mécanisme d'action n'est pas complètement établi, il semblerait que ces inhibiteurs stabilisent la liaison entre l'ADN et l'hélicase primase, empêchant cette dernière d'accompagner l'ADN polymérase le long de la chaîne d'ADN en formation (Crute et al., 2002). Certaines de ces molécules montrent une grande efficacité en particulier contre les alphaherpèsvirus. Par exemple, le pritelivir présente une activité *in vitro* contre le HSV 200 fois supérieure à celle de l'ACV (Kleymann et al., 2002). De plus, des études cliniques ont démontré le potentiel de la molécule ASP2151 dans le traitement de l'herpès génital (Tyring et al., 2012). Cependant, l'efficacité de ces molécules à l'encontre des gammaherpèsvirus n'a jusqu'à présent

pas été testée. L'avenir de ce type de molécules pour le traitement des herpèsvirus est actuellement encore incertain.

### 5.2.5. Utilisation des anti-viraux dans le cadre des infections à gammaherpèsvirus

Les avancées concernant les connaissances sur les anti-viraux est moindre pour les gammaherpèsvirus que pour les autres herpèsvirus humains tels que le CMV, ou le HSV. En effet, contrairement aux autres herpèsvirus, l'intérêt d'un traitement anti-viral lors de la primo-infection est limité, celle-ci étant le plus souvent asymptomatique. De plus, si l'EBV peut induire une mononucléose infectieuse lors de la primo-infection, la maladie est auto-limitante, ce qui réduit l'intérêt d'un traitement. En outre, la fenêtre d'opportunité pour administrer un traitement qui serait efficace est courte, et n'est donc que rarement accessible. Développer des tests cliniques et des recherches coûteuses pour ces cas représente donc un intérêt limité. En ce qui concerne les pathologies cancéreuses associées à la latence, elles représentent un besoin médical majeur non résolu actuellement. Cependant, parmi l'ensemble des traitements disponibles pour les maladies cancéreuses, l'intérêt des molécules anti-virales n'est pas déterminé. En effet, lors des pathologies cancéreuses associées aux gammaherpèsvirus, ceux-ci sont sous une forme latente, et ne sont parfois même pas détectables. L'intérêt de traitements anti-viraux dans ces cas est donc discutable, ce qui explique le nombre limité de recherches à ce sujet.

Par exemple, concernant le management du KS, il n'existe pas de traitement standard préétabli, et le traitement choisi dépend de différents paramètres, telles que la localisation de la tumeur, ou le statut d'immunocompétence du patient. La place principale des molécules anti-virales dans ce traitement se situe au niveau du contrôle du VIH lorsque celui-ci est associé au KS (Uldrick and Whitby, 2011; Vanni et al., 2006). Le traitement HAART (*Highly Active Retroviral Therapy*) utilisé pour le management du VIH permet non seulement de contrôler la virémie du VIH et de limiter l'immunodéficience associée, mais certaines études indiquent que ce traitement pourrait également participer à la résolution des KS (Casper and Wald, 2007). Cependant, il n'est pas déterminé si ce traitement a un effet direct sur le KSHV et s'il est capable d'inhiber la réplication virale (Sgadari et al., 2003). Les molécules anti-virales peuvent également être utilisées pour cibler directement le KSHV. Par exemple, une étude a montré que le GCV permettait de réduire la charge virale du KSHV dans le plasma, et que, en prévention, il permettait de réduire l'incidence des KS après transplantation d'organes (Coen et al., 2014). De même, le foscarnet permettrait lui aussi de réduire l'incidence du KS suite à un traitement préventif (Glesby et al., 1996). L'utilisation de molécules anti-virales afin de cibler les gammaherpèsvirus pourrait donc être intéressante, mais probablement plus efficace en prévention qu'en traitement. Ceci est probablement expliqué par la faible infection lytique associée au KS (Gantt and Casper, 2011). Par contre, les autres pathologies associées au KSHV, tel que la maladie multicentrique de Castleman ou encore le lymphome primitif des séreuses, présentent une plus grande proportion de réplication lytique. L'utilisation de

molécules anti-virales dans ce cas pourrait donc être potentiellement plus efficace (Gantt and Casper, 2011).

Pour conclure, l'intérêt des molécules anti-virales dans le cadre des infections à gammaherpèsvirus est peu défini, ce qui explique le nombre limité d'études à ce sujet. Cependant, les informations actuelles semblent indiquer que, dans le cadre des pathologies cancéreuses associées aux gammaherpèsvirus, la meilleure solution résiderait dans une approche préventive plutôt que thérapeutique. En effet, le peu de réplication virale associée aux pathologies cancéreuses limiterait l'efficacité de ces molécules. Par contre, en prévention, le traitement pourrait dans certains cas réduire le développement de cancers (Glesby et al., 1996), probablement en diminuant la charge virale (Schwartz, 2004). De ce fait, il serait intéressant dans le futur de tester en priorité l'efficacité des molécules anti-virales dans le cadre de la prévention des pathologies. De même, l'utilisation préventive des molécules anti-virales afin d'empêcher l'infection d'individus sains pourrait également être une piste intéressante. En effet, empêcher l'établissement de l'infection serait le moyen le plus efficace de lutter contre les gammaherpèsvirus. Actuellement, les recherches se concentrent sur le développement de molécules plus efficaces, mais aussi plus sûres. Des molécules avec un profil de sécurité élevé pourraient être particulièrement intéressantes pour les traitements préventifs.

---

# Objectifs

---

## Objectifs

La diversité de la littérature disponible au sujet des gammaherpèsvirus démontre leur importance dans la médecine actuelle. En effet, l'épidémie du VIH qui tarde à être contrôlée, ou encore le nombre croissant de greffes d'organe et donc de traitements immunosuppresseurs associés, sont des exemples de facteurs de risque pour le développement des pathologies liées aux gammaherpèsvirus. Dès lors, le management de ces maladies est un véritable challenge que la médecine peine encore à relever.

La revue de la littérature démontre le manque de connaissance concernant les voies de transmission utilisées par les gammaherpèsvirus. Notamment, les types cellulaires impliqués dans la réexcrétion virale et dans l'infection initiale ainsi que les glycoprotéines virales engagées au moment de la transmission restent méconnus. De plus, l'implication et l'importance de la réponse immune mucoale ainsi que les mécanismes utilisés par les virus pour y échapper sont peu décrits. Récemment, une transmission par voie sexuelle d'un gammaherpèsvirus murin, le MuHV-4, a été observée en conditions expérimentales chez la souris de laboratoire. Ce modèle est une opportunité unique d'étudier plus en détail la transmission des gammaherpèsvirus, et permet non seulement de déterminer comment le virus est capable de se réactiver et de se transmettre en présence d'une immunité spécifique, mais également de développer des techniques permettant de bloquer efficacement la transmission.

L'objectif de ce travail est d'exploiter le modèle de transmission par voie sexuelle du MuHV-4 développé précédemment. Dans une première étude, nous nous concentrerons sur les fonctions associées aux glycoprotéines virales pendant la transmission, et en particulier sur la glycoprotéine gp150 du MuHV-4. En effet, différentes études *in vitro* ont démontré que gp150 pourrait participer à la protection du virus contre la neutralisation, et à la libération des particules infectieuses à partir des cellules infectées, deux fonctions particulièrement importantes durant la transmission. Dès lors, l'objectif de cette première étude est de déterminer le rôle de la glycoprotéine virale gp150 dans un contexte de transmission naturelle.

Mieux connaître la manière dont le virus se transmet est important afin de développer des moyens de lutte efficaces. Actuellement, ces moyens de lutte contre les herpèsvirus sont bien souvent limités aux molécules anti-virales, en l'absence de vaccins efficaces. Dès lors, l'objectif de la seconde étude présentée est de tester l'efficacité d'une molécule anti-virale, sélectionnée pour son efficacité anti-herpétique, dans un contexte de transmission naturelle. Pour cela, des souris seront traitées en pré- ou post-exposition afin de réduire l'excrétion virale ou de prévenir l'infection.

---

# Section expérimentale

---



# ———— Section expérimentale

## Etude 1 :

“The major envelope glycoprotein of Murid Herpesvirus-4  
promotes sexual transmission”

---

## ***Préambule***

Récemment, l'observation d'une transmission par voie sexuelle du MuHV-4 en laboratoire (Francois et al., 2013) a ouvert de nouvelles possibilités d'études concernant les mécanismes qui interviennent dans la transmission des gammaherpèsvirus. Durant la majeure partie du cycle *in vivo*, les herpèsvirus se propagent et se disséminent dans l'organisme par contact direct entre les cellules, et ne sont donc pas exposés au milieu extra-cellulaire. Cependant, au moment de la transmission, les virus sont libérés en surface des muqueuses. Dès lors, les protéines virales impliquées dans la phase extra-cellulaire du cycle sont potentiellement importantes au moment de la transmission.

Différentes études *in vitro* ont mis en avant le rôle potentiel de la glycoprotéine gp150 du MuHV-4 pendant la phase extra-cellulaire du cycle viral. Ainsi, gp150 serait impliquée dans la protection du virus contre la neutralisation (Gillet et al., 2007b) et faciliterait la libération des virions en surface des cellules (de Lima et al., 2004). L'objectif de ce travail est donc de déterminer la relevance biologique dans un contexte de transmission naturelle de ces observations faites *in vitro*. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un système d'imagerie *in vivo*, permettant de localiser et quantifier la réplication lytique associée à l'infection virale dans l'organisme de la souris. Nous avons dès lors comparé les capacités d'infection et de transmission, après inoculation intra-nasale de deux souches virales, déficientes ou non pour l'expression de gp150.

Cette étude a été publiée en juillet 2017 dans la revue « *Journal of Virology* » et a été identifiée comme article d'intérêt significatif par les éditeurs. Les résultats obtenus sont présentés dans cette section.

---

# Section expérimentale

## Etude 1 :

“The major envelope glycoprotein of Murid Herpesvirus-4  
promotes sexual transmission”

---

*Journal of Virology* 91(13):e00235-17

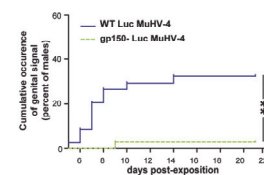
C. Zeippen, J. Javaux, X. Xiao, M. Ledecq, J. Mast, F. Farnir, A. Vanderplassen, P.  
Stevenson, L. Gillet



## Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors

### The Major Envelope Glycoprotein of Murid Herpesvirus 4 Promotes Sexual Transmission


Gammaherpesviruses are important human and animal pathogens. Infection control has been difficult because the key process of transmission is not well understood. Murid herpesvirus 4 (MuHV-4), a gammaherpesvirus of rodents, transmits sexually in mice. Zeippen et al. (e00235-17) discovered that the major envelope glycoprotein, gp150, of MuHV-4 does not modulate viral entry or dissemination but rather promotes sexual transmission by facilitating virus release from infected vaginal epithelial cells. These data establish an important function of gp150, which also will be useful in investigating its homologs in human pathogens.



Absence of gp150 restricts sexual transmission of MuHV-4 from females to males.



## The Major Envelope Glycoprotein of Murid Herpesvirus 4 Promotes Sexual Transmission

Caroline Zeippen,<sup>a</sup> Justine Javaux,<sup>a</sup> Xue Xiao,<sup>a</sup> Marina Ledecq,<sup>b</sup> Jan Mast,<sup>b</sup> Frédéric Farnir,<sup>c</sup> Alain Vanderplasschen,<sup>a</sup>  Philip Stevenson,<sup>d</sup> Laurent Gillet<sup>a</sup>

Immunology Vaccinology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine-Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège, Liège, Belgium<sup>a</sup>; Electron Microscopy Unit, Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA-CERVA), Uccle, Belgium<sup>b</sup>; Biostatistics and Bioinformatics Applied to Veterinary Science, Department of Animal Productions, Faculty of Veterinary Medicine FARAH, University of Liège, Liège, Belgium<sup>c</sup>; School of Chemistry and Molecular Biosciences, University of Queensland and Royal Children's Research Hospital, Brisbane, Queensland, Australia<sup>d</sup>

**ABSTRACT** Gammaherpesviruses are important human and animal pathogens. Infection control has proven difficult because the key process of transmission is ill understood. Murid herpesvirus 4 (MuHV-4), a gammaherpesvirus of mice, is transmitted sexually. We show that this depends on the major virion envelope glycoprotein gp150. gp150 is redundant for host entry, and *in vitro*, it regulates rather than promotes cell binding. We show that gp150-deficient MuHV-4 reaches and replicates normally in the female genital tract after nasal infection but is poorly released from vaginal epithelial cells and fails to pass from the female to the male genital tract during sexual contact. Thus, we show that the regulation of virion binding is a key component of spontaneous gammaherpesvirus transmission.

**IMPORTANCE** Gammaherpesviruses are responsible for many important diseases in both animals and humans. Some important aspects of their life cycle are still poorly understood. Key among these is viral transmission. Here we show that the major envelope glycoprotein of murid herpesvirus 4 functions not in entry or dissemination but in virion release to allow sexual transmission to new hosts.

**KEYWORDS** gammaherpesvirus, glycoprotein, release, transmission

Transmission is the main motor of viral evolution, and the large disease burden imposed by human gammaherpesviruses reflects very high infection prevalences due to efficient transmission from carriers to new hosts (1). Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infect up to 90% (2) and 30% (3) of humans worldwide, respectively. Endemic infections are maintained chiefly by carriers shedding virus in their saliva. However, in populations with a low prevalence of infection, sexual transmission becomes important due to increased contact (4). This was seen clearly for KSHV transmission associated with HIV infection (5) and may also apply to EBV (6).

While interrupting transmission is the *sine qua non* of infection control, analyzing EBV and KSHV transmission has proven difficult. Natural EBV infection is asymptomatic for at least a month (6), and experimental transmission is made difficult by many EBV and KSHV functions being host specific. However, gammaherpesviruses colonize most mammals, so related animal viruses, such as murid gammaherpesvirus 4 (MuHV-4), provide another way to understand infection *in vivo* (7). Luciferase (Luc) imaging of MuHV-4 infection (8) revealed genital infection following intranasal (i.n.) inoculation of female mice, which then spread to naive males by sexual contact (9). This has provided

Received 10 February 2017 Accepted 10 April 2017

Accepted manuscript posted online 19 April 2017

Citation Zeippen C, Javaux J, Xiao X, Ledecq M, Mast J, Farnir F, Vanderplasschen A, Stevenson P, Gillet L. 2017. The major envelope glycoprotein of murid herpesvirus 4 promotes sexual transmission. *J Virol* 91:e00235-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00235-17>.

Editor Richard M. Longnecker, Northwestern University

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Laurent Gillet, L.Gillet@ulg.ac.be.

a basis for understanding the molecular determinants of gammaherpesvirus transmission.

Virion glycoproteins are likely the main actors in transmission. The MuHV-4 envelope displays at least 10 membrane-bound proteins (10, 11). gH, gB, gM, and gN are essential for infectivity, while gL, gp70, gp150, open reading frame 58 (ORF58), ORF27, and ORF28 are redundant. ORF28 has no known function (12). ORF27 and ORF58 form a complex involved in direct cell-to-cell viral spread (13). gM/gN is probably required for virion assembly (14). gp70, gH/gL, and gB all contribute to cell binding and/or entry (15, 16). A surprising finding was that gp150, the MuHV-4 equivalent of gp350/220 in EBV (17), K8.1A in KSHV (18), and gp180 in bovine gammaherpesvirus 4 (BoHV-4) (19), is redundant for both cell binding *in vitro* and virion entry into naive hosts (20). Moreover, gp150-deficient virions show enhanced binding to cells that express little heparan (20).

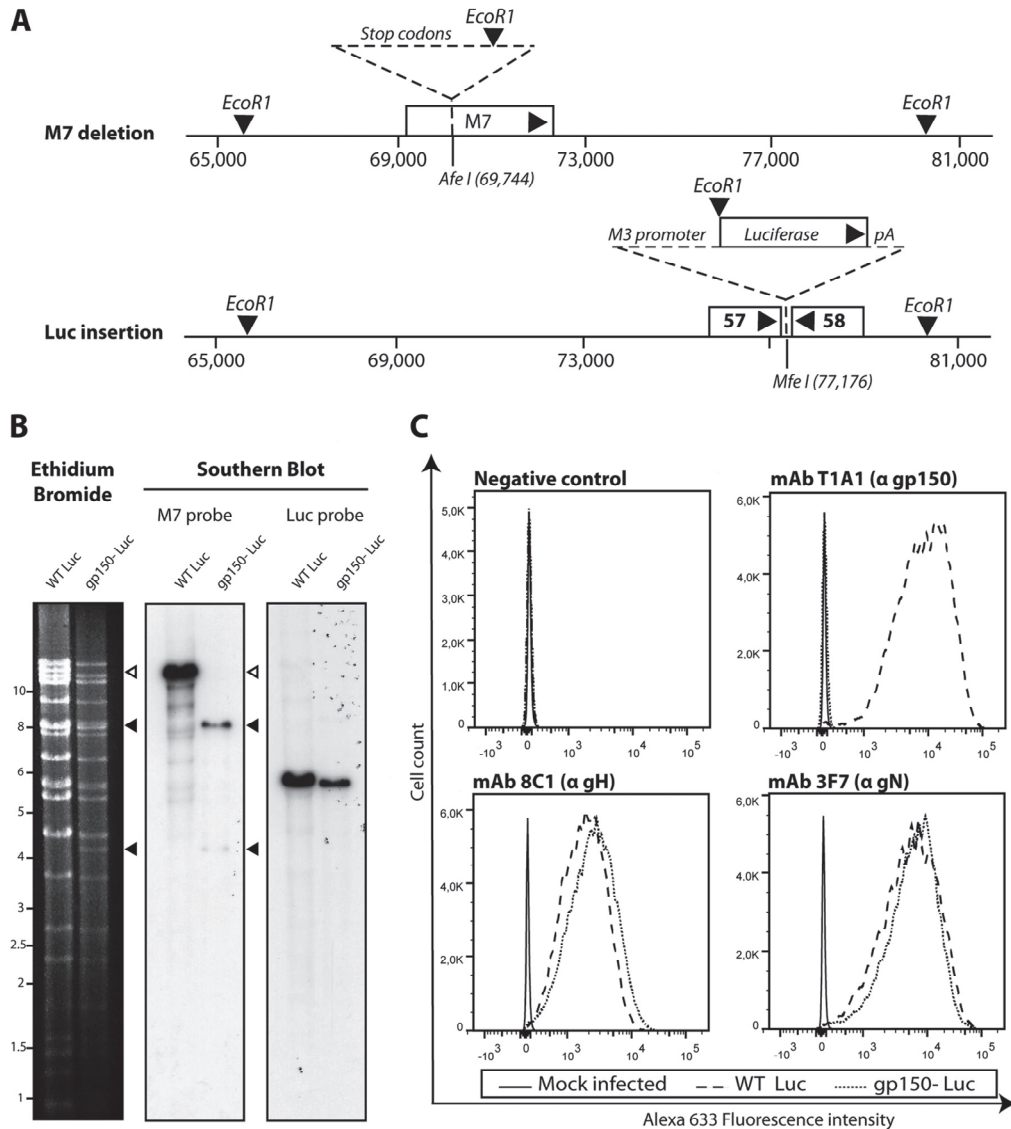
Heparan binding is a key event in infection by cell-free MuHV-4 (21), a characteristic shared by many herpesviruses. MuHV-4 binds to heparan via gH/gL and by gp70 (15, 16). While heparan is abundant on most transformed stromal cells, the apical surfaces of most differentiated epithelia display much less heparan. However, the lungs and olfactory epithelium, which are efficiently targeted by MuHV-4, display heparan. Specifically, nonsulfated heparan, which is bound by gH/gL, is present on the apical cilia of olfactory neurons (22) and on type 1 alveolar epithelial cells (23). The genital tract is not known to express apical heparan, and here host entry may depend on sexual contact causing epithelial trauma, which exposes the abundant heparan of basolateral epithelial surfaces (24).

MuHV-4 also binds to nonheparan ligands, for example, via gB (25), but this binding appears not to be available until heparan is engaged. Thus, the dependence of virions on heparan reflects both positive and negative regulation. Negative regulation is mediated by gp150, suggesting that heparan displaces it from covering an important non-heparan binding site (26). The main *in vitro* defect of gp150-deficient (gp150<sup>-</sup>) MuHV-4 is poor release from infected cells, which tend to lose heparan and are probably coated by the abundantly shed heparan binding domains of gp70 (15, 20). gp150 itself binds heparan only weakly, but heparan and gp150 are presumably brought into close contact by the strong interactions of gH/gL and gp70. BoHV-4 gp180 also binds to heparan and regulates heparan-independent virion-cell binding (19). KSHV K8.1 binds to heparan, and there have been suggestions of a regulatory role (27, 28). EBV gp350 does not bind to heparan (this is a function of EBV gp150 [29]). However, gp350 regulates binding to epithelial cells (30), suggesting that it promotes virion release from epithelial cells. Thus, the regulation of cell binding by the major envelope glycoprotein is a common gammaherpesviruses theme.

Despite the importance of gp150 for MuHV-4 release from infected cells, gp150-deficient mutants show no defect in host colonization after nasal inoculation (20, 31). This reflects that host colonization is driven primarily by lymphoproliferation and cell-cell virus transfer (32). The main function of cell-free virions is viral genome transfer to new hosts. Standard pathogenesis models ignore this crucial component of the viral life cycle. Here we show that gp150-deficient MuHV-4 has no defect in genital tract colonization but transmits poorly to new hosts. This reflected poor virion release from the female vaginal epithelium.

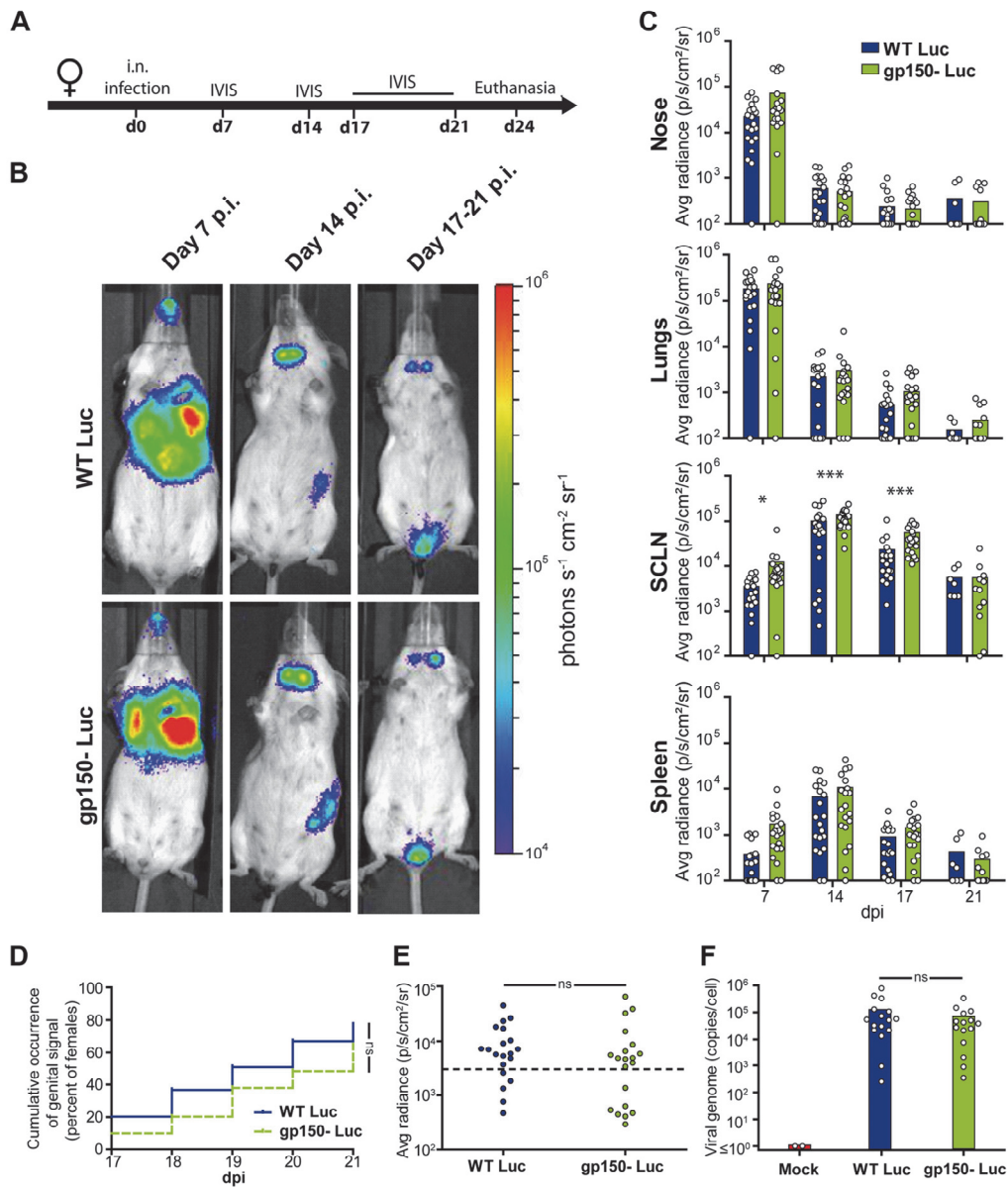
## RESULTS

**Generation of luciferase-positive gp150<sup>-</sup> MuHV-4.** Viral luciferase expression is a key tool for monitoring infection *in vivo* (8). Thus, to track infection by gp150<sup>-</sup> MuHV-4, we generated a luciferase-positive (Luc<sup>+</sup>) version of the previously studied M7-STOP mutant (20) (Fig. 1A). The predicted genomic structure was confirmed by restriction enzyme digestion and Southern blotting of viral DNA (Fig. 1B). Genome sequencing confirmed a lack of mutations elsewhere (data not shown). Analysis of infected cells confirmed a lack of gp150 expression by gp150<sup>-</sup> Luc MuHV-4 (Fig. 1C), while the expressions of other glycoproteins were similar.



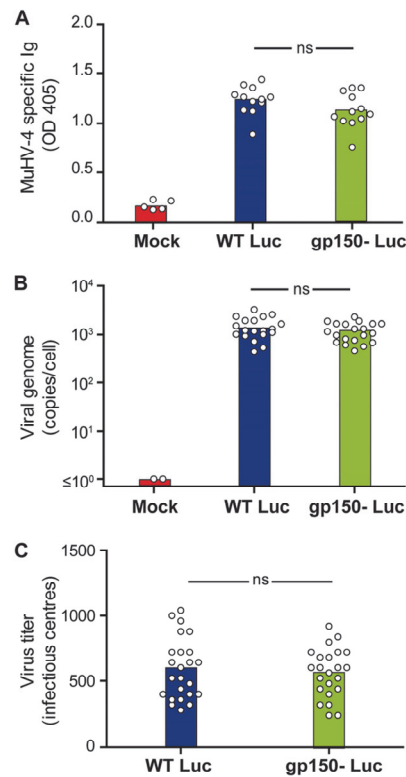
**FIG 1** Generation of gp150<sup>-</sup> MuHV-4 expressing luciferase. (A) Two tested MuHV-4 mutations were combined. To disrupt gp150, stop codons and an *EcoRI* restriction site were inserted into an *AfeI* site at genomic position 69473 (20). To express luciferase, an M3 promoter-driven cassette was inserted into the *MfeI* site at genomic position 77176 (8). (B) Viral DNA was digested with *EcoRI*, resolved by agarose gel electrophoresis, and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled probes, corresponding to nucleotides 69467 to 70918 (M7 open reading frame) of MuHV-4 and to the firefly luciferase coding sequence (pGL4.10; Promega). The open arrow shows the WT M7 fragment (13,724 bp). Black arrows show the restriction fragments containing M7-STOP. (C) Mutants were analyzed for infected-cell glycoprotein expression by flow cytometry. We used monoclonal antibodies recognizing gp150 (T1A1), gH (8C1), and gN (3F7) (14, 15, 47).

**gp150<sup>-</sup> MuHV-4 shows no infection defect after intranasal inoculation.** Female BALB/c mice ( $n = 20$ ) were given wild-type (WT) or gp150<sup>-</sup> Luc MuHV-4 i.n., and infection was tracked by using an *in vivo* imaging system (IVIS) (Fig. 2A). A luminescent signal was observed in the nose and thoracic region at day 7 postinfection (p.i.) and in the neck and left abdominal region at day 14 p.i. (Fig. 2B and C). These signals correspond to lytic infection in the nose, lungs, superficial cervical lymph nodes (SCLN), and spleen (8). gp150<sup>-</sup> MuHV-4 showed greater SCLN signals ( $P < 0.01$ ), but otherwise, there was no difference between infection groups.



**FIG 2** Bioluminescence imaging of gp150<sup>-</sup> MuHV-4. (A) Female mice were infected intranasally with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> Luc MuHV-4 (10<sup>4</sup> PFU under general anesthesia) and imaged at the times indicated. (B) Representative images are shown for each group at days 7, 14, and 17 to 21 p.i. (C) Signal intensities were compared for each organ (*n* = 20 mice per group), measuring equivalent regions of interest and subtracting the right abdominal signal as a negative background. The limit of detection of the assay is 10<sup>2</sup> photons/s/cm<sup>2</sup>/sr. Results were analyzed by a linear model, using day postinfection, strain, and interaction between day and strain as factors (*P* > 0.05 for all comparisons, except for the SCLN, where gp150<sup>-</sup> signals were significantly higher at days 7, 14, and 17 [\**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.001]). (D and E) To assay genital tract colonization, mice were imaged every day from days 17 to 21 p.i. Positive signals were taken as those >2 standard deviations above the mean for 10 uninfected mice (threshold represented by the dashed line). The occurrence of a genital signal (D) (*n* = 40 mice per group) and the maximal genital signal (E) (*n* = 20 mice per group) showed no significant difference between groups (*P* > 0.05 by chi-square and Mann-Whitney tests, respectively). (F) The smallest pieces of genital tissue expressing luciferase were isolated. Genome copy numbers were then measured by qPCR and did not show a significant difference between groups (*n* = 20 mice per group; *P* > 0.05 by a Mann-Whitney test). The histograms show mean values. The results are representative of data from three independent experiments. ns, not significant.



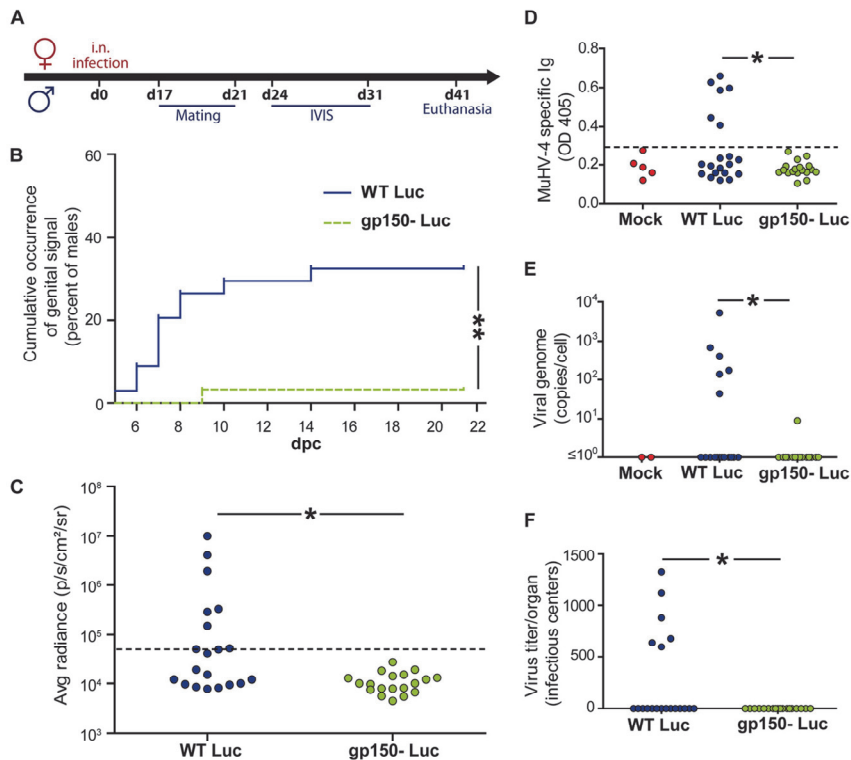


**FIG 3** Seroconversion and latency establishment after intranasal inoculation of gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> MuHV-4. Female mice were infected intranasally with WT or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (10<sup>4</sup> PFU under general anesthesia). At 1 month p.i., sera and spleen were collected. (A) ELISA of sera shows no difference in MuHV-4-specific antibodies between groups ( $P > 0.05$  by one-way analysis of variance and a Bonferroni *post hoc* test). OD 405, optical density at 405 nm. (B and C) Viral genome copy numbers in spleen measured by qPCR show no significant difference between groups ( $P > 0.05$  by one-way analysis of variance and a Bonferroni *post hoc* test) (B), nor did infectious center assays of spleens show a difference between groups ( $P > 0.05$  by the Student test) (C). Mean values are represented by histograms.

Between days 17 and 21 p.i., the mice were imaged daily to observe the transient genital signal (9). By this time, primary lytic infection had resolved, and the luciferase signals from lymphoid organs were greatly reduced compared with those at day 14. Genital luciferase signals were detectable in 77% of mice given gp150-positive (gp150<sup>+</sup>) MuHV-4 and in 64% of those given gp150<sup>-</sup> MuHV-4 ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2D). The maximum intensity of the genital signal showed no difference between groups ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2E), nor did the viral DNA loads of luciferase-positive vaginal mucosa samples (Fig. 2F). Thus, gp150<sup>-</sup> MuHV-4 showed no defect in genital colonization after i.n. inoculation.

At 1 month p.i., sera were assayed for MuHV-4-specific IgG by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 3A). No difference between gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> infections was observed ( $P > 0.05$ ). At the same time, quantitative PCR (qPCR) of spleen DNA showed no difference in viral genome loads between gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (Fig. 3B and C). Thus, gp150<sup>-</sup> MuHV-4 showed no defect in the extent of infection or the capacity to establish latency in the spleen.

**gp150 promotes sexual transmission from female to male after intranasal infection.** To assay transmission, intranasally infected female BALB/c mice were mated with BALB/c males at the time of the appearance of a genital signal (between days 17 and 21 p.i.), mixing 3 naive males with 3 excreting females (Fig. 4A). In total, in 2 independent experiments, 34 males were mated with gp150<sup>+</sup> MuHV-4-infected fe-

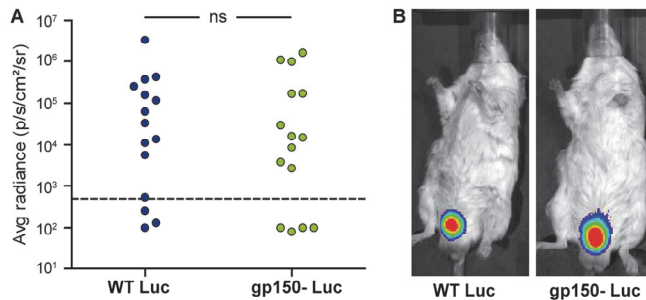


**FIG 4** gp150 promotes MuHV-4 sexual transmission. Female BALB/c mice were infected intranasally with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 ( $10^4$  PFU under general anesthesia) and imaged at the indicated times. When a genital signal appeared, female mice were mated with naive BALB/c males, which were then monitored in turn by an IVIS. (A) Experimental scheme. (B and C) Occurrence of positive genital signals (B) and maximal genital signals (C) in males, imaged between 3 and 21 days after contact with females. Signal intensities were measured in equivalent regions of interest, subtracting the right abdominal region as the background. Males with a genital signal  $>2$  standard deviations above the mean for 10 controls (the dotted line in panel C) were considered positive ( $n = 6$  in panel C;  $P < 0.05$  by a Fisher test). Panel B shows pooled data for 2 experiments ( $P < 0.01$  by a Fisher test). Panel C shows 1 experiment (20 mice per group). (D to F) Male infections were confirmed at 1 month by an ELISA of serum for MuHV-4-specific Ig (D), qPCR of splenic viral genome loads (E), and an infectious center assay of spleens (F). dpc, days postcontact. Panels D to F all show significant differences by a Fisher test ( $P < 0.05$ ).

males, and 30 males were mated with gp150<sup>-</sup> MuHV-4-infected females. Males were imaged every 3 to 4 days over 3 weeks. A total of 32% of males ( $n = 11$ ) in the gp150<sup>+</sup> group and 3% of males ( $n = 1$ ) in the gp150<sup>-</sup> group showed a genital signal (Fig. 4B). Figure 4C shows the maximal male genital signals measured at between days 7 and 17 postcontact in 1 experiment.

At 1 month postcontact, serum and spleen were collected from males to confirm the results of *in vivo* imaging. MuHV-4-specific antibodies were detected in all the males that had positive IVIS signals (Fig. 4D shows data from 1 experiment). The same animals were also positive for splenic viral DNA by quantitative PCR and for reactivatable splenic virus by an infectious center assay (Fig. 4E and F). Thus, gp150<sup>-</sup> MuHV-4 showed significantly less female-to-male transmission than did gp150<sup>+</sup> MuHV-4.

**gp150 does not promote infection of the penile mucosa.** We considered that gp150 disruption might reduce transmission by reducing virus entry into the male penile mucosa. To test this hypothesis, 30 males were anesthetized with isoflurane, and gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 ( $10^5$  PFU in 15  $\mu$ l phosphate-buffered saline [PBS]) was put into contact with scraped penile mucosa for 20 min. IVIS imaging over the next 8 days showed 11/15 infected males in each group (Fig. 5). Thus, gp150 was not required to infect the penile mucosa.



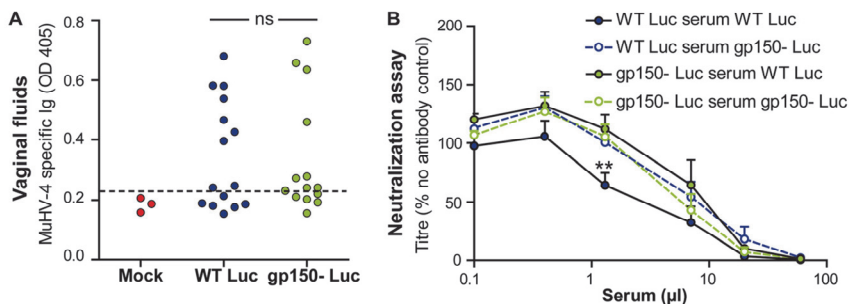
**FIG 5** MuHV-4 infection of male genital mucosa. Male BALB/c mice ( $n = 15$  per group) were infected under general anesthesia by scraping virions ( $10^5$  PFU) onto the penile mucosa. Animals were imaged for eight consecutive days. (A) Maximal genital signal observed for each male by *in vivo* imaging at between days 1 and 8 p.i. ( $P > 0.05$  by a Fisher test). (B) Images showing a representative positive mouse from each group.

#### gp150 does not promote transmission by protecting against neutralization.

gp150 is an immunodominant glycoprotein and, as anti-gp150 antibodies are nonneutralizing, helps by its immunogenicity to protect virions against neutralization (33). gp150-specific antibodies additionally promote MuHV-4 entry into IgG Fc receptor-positive cells, and its gp180 homolog in BoHV-4 acts as a protective glycan shield (34). Thus, although MuHV-4-specific antibody responses are relatively weak at 1 month postinfection (35), gp150 could potentially promote transmission by reducing the impact of antibodies. To test this hypothesis, we first looked for MuHV-4-specific antibodies in vaginal secretions (Fig. 6A). These antibodies were present at low titers in a minority of infected mice, with no significant difference between the 2 groups ( $P > 0.05$ ). We also tested the susceptibility of gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> virions to neutralization by sera of mice infected by the same virus for 1 month (Fig. 6B). No significant difference was observed ( $P > 0.05$ ), except at one dilution of serum where gp150<sup>+</sup> virions were significantly more neutralized by the homologous serum ( $P < 0.01$ ). Thus, gp150 seemed not to promote transmission by directly protecting vulnerable epitopes against antibody neutralization.

#### gp150 promotes the release of infectious MuHV-4 virions from vaginal mucosa.

gp150 promotes virion release from infected cells *in vitro* (20). Thus, we considered that gp150<sup>-</sup> Luc virions might be poorly released into vaginal secretions and thus be less



**FIG 6** Importance of gp150 for protection against neutralizing antibodies. (A) Female BALB/c mice were infected intranasally with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 ( $10^4$  PFU under general anesthesia), and vaginal fluids collected at day 24 p.i. were tested by an ELISA for MuHV-4-specific antibodies. No difference was observed between groups ( $P > 0.05$  by a Fisher test). (B) gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> virions (200 PFU) were incubated (1 h at 37°C) with dilutions of sera from BALB/c mice infected with the same viruses 1 month previously. After incubation, the virus-serum mixtures were plaque assayed on BHK-21 cells. Titers are expressed relative to values for virus without an antibody. The data show averages of data from triplicate measurements  $\pm$  standard errors of the means and were analyzed by two-way analysis of variance and Bonferroni *post hoc* tests. No significant difference was observed ( $P > 0.05$ ), except at one dilution of serum, where gp150<sup>+</sup> virions were significantly more neutralized by gp150<sup>+</sup> MuHV-4-elicited antibody (\*\*,  $P < 0.01$ ).

available for penile infection. To test this hypothesis, female BALB/c mice were infected intranasally, and when genital luciferase signals were observed, vaginal washouts were collected for a plaque assay. To distinguish cell-free from cell-associated virions, the vaginal washouts were centrifuged at  $100 \times g$  (10 min) to collect cell-associated virions and then at  $20,000 \times g$  (90 min) to collect cell-free virions. The infection groups showed no significant difference in cell-associated infectivity ( $P > 0.05$ ), but a lack of gp150 significantly reduced cell-free infectivity ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7A). We also compared gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> virus growth in primary vaginal epithelial cells. While levels of gp150<sup>+</sup> virions were split equally between the supernatants and cells at 24 h p.i. and then progressively increased in the supernatants, gp150<sup>-</sup> virions were strongly cell associated (Fig. 7B).

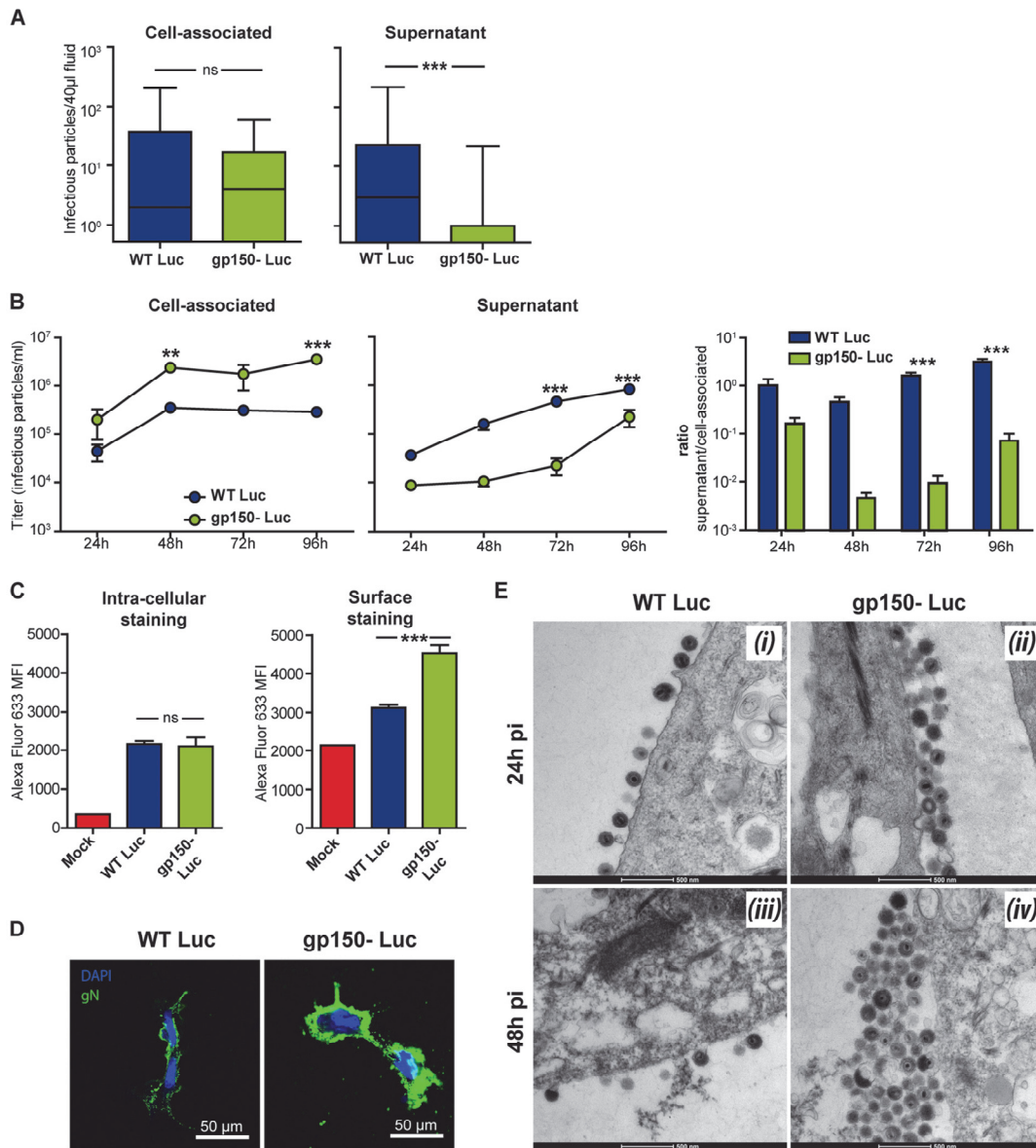
Data from staining of infected cells for gN (Fig. 7C) supported the idea of virion retention: staining of fixed-permeabilized cells showed no significant difference between gp150<sup>+</sup> and gp150<sup>-</sup> MuHV-4 ( $P > 0.05$ ), indicating similar infections, but staining of nonpermeabilized cells showed significantly more cell surface gN after gp150<sup>-</sup> MuHV-4 infection ( $P < 0.001$ ) (Fig. 7C and D). Besides increased virus retention at the cell surface, increased gN detection could also be consecutive to increased gN cell surface expression in cells infected with gp150-deficient virus or to increased epitope access in the absence of gp150. To distinguish between these hypotheses by direct visualization, we performed transmission electronic microscopy (TEM) of infected vaginal cells. The cells were exposed to gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (1 PFU/cell) and then analyzed by TEM 24 h and 48 h later. gp150<sup>+</sup> virions never formed more than a single layer at the infected cell surface. In contrast, gp150-deficient virions formed multiple layers (Fig. 7E). Such aggregates were not observed in viral stocks, showing that virions do not spontaneously aggregate with each other (data not shown). Thus, gp150<sup>-</sup> virions were poorly released from vaginal epithelial cells.

## DISCUSSION

Viral transmission is a crucial determinant of disease burden. For example, spikes in diseases caused by Ebola and avian influenza viruses are associated with increased infection rates rather than more virulent infections (36, 37). Conversely, while both live and killed poliovirus vaccines prevent disease, eradication has depended on live vaccines because it more effectively inhibits transmission (38). For herpesviruses, which are highly prevalent and only sometimes cause disease, transmission is a key intervention target. However, even established live-attenuated vaccines that prevent disease are probably insufficient by themselves to prevent transmission (39). Therefore, it is important to understand this process better.

Herpesvirus transmission has proven difficult to replicate in experimental settings and is ignored by most standard pathogenesis assays of host colonization/disease after deliberate inoculation. Murine cytomegalovirus is transmitted via the upper respiratory tract (40). MuHV-4 also enters new hosts via the upper respiratory tract (22). However, it has not been shown to be transmitted spontaneously by this route. This may reflect that most experimental settings favor low-frequency/high-penetrance contacts, rather than the high-frequency/low-penetrance contacts of natural, endemic virus exchange. Nonetheless, sexual contact may be a significant mode of transmission for many herpesviruses in populations with a low prevalence of infection (4), as observed for KSHV (5) and potentially EBV (6). gp150 provides the first example of a viral glycoprotein important for transmission but not for entry or dissemination, because it is important for virion release.

Escape from infected cells poses a general problem for nonmotile pathogens. One solution is to produce large numbers of infectious particles and cause widespread epithelial destruction. The *modus operandi* of herpesviruses, which are transmitted chronically, at a low level, and for the most part without symptoms, seems instead to center on entry and exit at different sites, for example, entry at the olfactory epithelium, where there is apical heparan, and exit from the oropharynx, where heparan is basolateral (22). Sexual transmission seems to go against this paradigm, as entry and



**FIG 7** Defective gp150 virion release from vaginal epithelial cells. (A) Female BALB/c mice were infected intranasally with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (10<sup>4</sup> PFU under general anesthesia) and serially imaged by an IVIS. When a genital signal appeared, vaginal fluids were collected by lavage. Cell-associated and cell-free virions were separated by successive centrifugations. Each virion type was quantified by a plaque assay. Results were analyzed by a Mann-Whitney test (ns, not significant [ $P > 0.05$ ]; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). (B) Primary vaginal epithelial cells were infected with gp150<sup>-</sup> or gp150<sup>+</sup> MuHV-4 (0.05 PFU/cell). Supernatants and cells were collected and plaque assayed on BHK-21 cells. Results were analyzed by two-way analysis of variance and Bonferroni *post hoc* tests (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). (C) Primary vaginal epithelial cells were infected with gp150<sup>-</sup> or gp150<sup>+</sup> MuHV-4 (1 PFU/cell for 18 h) and then stained for gN. Staining of fixed and permeabilized cells was used to assess total infection, while staining of intact cells was used to estimate virion numbers at the cell surface. (gM/gN homes strongly to the Golgi network and thus reaches the cell surface only by virtue of incorporation into virions [14].) Mean fluorescence intensities (MFI) were analyzed by one-way analysis of variance and Bonferroni *post hoc* tests (ns,  $P > 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). These results are representative of data from at least 3 experiments. (D) Primary vaginal cells were infected with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (2 PFU/cell). At 48 h p.i., cells were stained for gN, counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and observed by confocal microscopy. (E) Primary vaginal cells were infected with gp150<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 (1 PFU/cell) and then processed for TEM. The pictures are representative of results from at least 10 sections per sample: panels i and ii are from 24 h p.i., and panels iii and iv are from 48 h p.i.

exit then overlap. For MuHV-4, the lack of its key binding target, heparan, on the apical genital epithelium (41) suggests that tissue trauma is required for host entry. With sexual transmission, this is entirely plausible. Barring too much tissue trauma in the virus donor, genital epithelia should then efficiently shed heparan-dependent virions. Indeed, during sexual transmission, shedding probably precedes trauma. Accordingly, a loss of heparan dependence through gp150 disruption severely compromised MuHV-4 shedding and subsequent virus transmission. In the absence of gp150, the newly produced virions likely bind to components present at the cell surface. Thus, the unknown cell ligand for which gp150 regulates binding could be cleaved or have a secreted form that could cause virion aggregation and poor release. The nature of this cellular component will have to be investigated in the future. Thus, heparan dependence is not just a means of virion capture but a switch that enables both virion capture and release to be efficient. We envisage that BoHV-4 gp180, KSHV K8.1A, and EBV gp350 also promote transmission by virion release, at both genital and oral mucosal surfaces, in addition to any roles that they have in host entry.

Could virus shedding be targeted by vaccination? We believe that this is unlikely to be achieved by targeting gp150 or its homologs, as they are already highly immunogenic in virus carriers (33). gp150-specific antibodies fail to neutralize MuHV-4; their main effect is to increase infection of cells with low levels of heparan and high levels of IgG Fc receptors (38), while (monoclonal) antibodies to EBV gp350 promote epithelial infection (42). In contrast, shedding of infectious virus could potentially be reduced by boosting other, subdominant antibody specificities in virus carriers (43). This remains to be tested in the transmission model. The feasibility of this approach is also supported by the fact that gp150 likely does not act as a glycan shield (Fig. 6B), in contrast to its homolog in BoHV-4 (34).

Altogether, the present study identifies for the first time the importance of a specific gammaherpesvirus glycoprotein in transmission. gp150 did this by promoting virion release from infected vaginal epithelial cells. These results establish a new and important gp150 function that may well also apply to its homologs in human pathogens.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** BALB/c mice were housed at the University of Liège, Department of Infectious Diseases, FARA. The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Liège approved the protocol (permit number 1502).

Female mice were infected intranasally with  $10^4$  PFU of MuHV-4 diluted in 30  $\mu$ l of sterile PBS, under general anesthesia with isoflurane. For imaging, mice were injected intraperitoneally with luciferin (60 mg/kg of body weight) and imaged 10 min later with an IVIS Spectrum instrument (Caliper Life Sciences). For quantitative comparisons, we used Living Image software (Caliper Life Sciences) to obtain the average radiance (photons per second per square centimeter per steradian) over each region of interest. The background measured in the right abdominal region was removed from the measurements.

**Viruses.** All viruses were derived from a MuHV-4 bacterial artificial chromosome (BAC) (44). We used a mutant expressing firefly luciferase under the control of the M3 promoter (WT Luc<sup>+</sup>) (8). The M7 sequence was disrupted via the insertion of an oligonucleotide containing stop codons in all reading frames and an EcoRI restriction site at an AfeI site (genomic position 69743; GenBank accession number AF105037.1) (20). We further mutated this virus to obtain gp150<sup>-</sup> Luc<sup>+</sup> MuHV-4 by the insertion of the luciferase coding sequence (8). Briefly, a luciferase coding sequence under the control of an M3 promoter and followed by a polyadenylation [poly(A)] signal was inserted into the MfeI site (genomic position 77176) between poly(A) signals of ORF57 and ORF58.

For *in vivo* experiments, the loxP-flanked BAC/enhanced green fluorescent protein (eGFP) cassette was removed by virus growth in NIH 3T3-CRE cells until eGFP<sup>+</sup> cells were no longer visible (45). Virus stocks were grown in BHK-21 cells cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 100 U penicillin ml<sup>-1</sup>, 100 mg streptomycin ml<sup>-1</sup>, and 10% fetal calf serum. Infected cells were cleared of cell debris by low-speed centrifugation (1,000  $\times$  g for 30 min). Viruses were then concentrated by high-speed centrifugation (58,000  $\times$  g for 90 min) and titrated by a plaque assay on BHK-21 cells (33).

**Southern blotting.** Viral DNA was digested with the EcoRI restriction enzyme, electrophoresed on a 0.8% agarose gel, and transferred to a positively charged nylon membrane. The membrane was hybridized with [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled probes and exposed to X-ray film.

**Genome sequencing.** Viral genomic DNA was extracted from purified virions, and full-length genome sequencing was performed as described previously (46).

**Flow cytometry.** Cells were infected with WT Luc<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> Luc<sup>+</sup> MuHV-4 (1 PFU/cell) and incubated for 18 h. Cells were incubated with MuHV-4 glycoprotein-specific monoclonal antibodies

(MAbs) (4°C for 45 min). The MAbs used were MAb 3F7 (anti-gN) (14), MAb TIA1 (anti-gp150) (20), and MAb 8C1 (anti-gH) (47). Cells were then incubated with Alexa 633-conjugated goat anti-mouse polyclonal antibody (PAb) (Invitrogen) (4°C for 45 min). Cells were washed in PBS, and fluorescence was analyzed on a FACSAria cytometer (Becton Dickinson).

**Infectious center assay.** Reactivation of virus from the spleen was assayed by an infectious center assay (9). Briefly,  $5 \times 10^5$  BHK-21 cells grown in 6-well cluster dishes were cocultured for 5 days at 37°C with an *ex vivo* spleen cell suspension in RPMI medium containing 2 mM glutamine, 100 U penicillin ml<sup>-1</sup>, 100 mg streptomycin ml<sup>-1</sup>, 10% fetal calf serum, 0.6% carboxymethyl cellulose (CMC), and  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol. Cells were then fixed and stained for plaque counting.

**Quantification of anti-MuHV-4-specific antibodies by an ELISA.** Nunc MaxiSorp ELISA plates were coated for 18 h at 4°C with Triton X-100-disrupted MuHV-4 virions ( $10^6$  PFU/well), blocked in PBS–0.1% Tween 20–3% bovine serum albumin (BSA), and incubated with mouse sera (diluted 1/200 in PBS–0.1% Tween 20) or with mouse vaginal fluids (50  $\mu$ l/well). Bound antibodies were detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse Ig polyclonal antibody (Sigma). Washing was performed with PBS–0.1% Tween 20. *p*-Nitrophenylphosphate (Sigma) was used as the substrate for colorimetry, and the absorbance was read at 405 nm by using a Benchmark ELISA plate reader (Thermo).

**Detection of infectious particles in vaginal fluids.** Vaginal lavage fluids were obtained by gently flushing the mouse vagina with 200  $\mu$ l of sterile PBS. Lavage fluids were successively centrifuged (100  $\times$  *g* for 10 min and 20,000  $\times$  *g* for 1 h 30 min), and pellets from the two centrifugations were resuspended in 100  $\mu$ l of sterile PBS. Samples were titrated on BHK-21 cells by a plaque assay.

**Seroneutralization assay.** Sera were collected from mice infected with either WT Luc<sup>+</sup> or gp150<sup>-</sup> MuHV-4 at 1 month postinfection. Virions were incubated with different dilutions of sera for 1 h at 37°C. The virus-serum mixtures were then added to  $5 \times 10^5$  BHK-21 cells grown in 6-well cluster dishes, in complete DMEM with 0.6% CMC. Cells were cultured for 4 days before being fixed and stained for plaque counting.

**Viral genome quantification.** MuHV-4 genomic positions 40264 to 44385 were amplified (iCycler; Bio-Rad) (ORF25 forward primer 5'-ATGGTATAGCCGCTTTGTG-3' and reverse primer 5'-ACAAGTGGATGAAGGGTTGC-3'). The PCR products were quantified by hybridization with a TaqMan probe (genomic positions 43088 to 43117 [5'-6-carboxyfluorescein [FAM]-TTCATAAGTTTATGCTGATCCAGTGGTTG-black hole quencher 1 [BHQ1]-3']) and converted to genome copy numbers by comparison with a standard curve of a cloned plasmid template serially diluted in control spleen DNA and amplified in parallel. Cellular DNA was quantified in parallel by amplifying part of the interstitial retinoid binding protein (IRBP) gene (forward primer 5'-ATCCCTATGTCATCTCTACTYTG-3' and reverse primer 5'-CCRCTGCCCTCCATGTYTG-3'). The PCR products were quantified with Sybr green (Invitrogen), and the copy number was calculated by comparison with standard curves of the cloned mouse IRBP template amplified in parallel. Amplified products were distinguished from paired primers by melting-curve analysis, and the correct sizes of the amplified products were confirmed by electrophoresis and staining with ethidium bromide.

**Culture of vaginal epithelial cells.** Vaginal tissues were dissected and incubated overnight at 4°C with 0.2% dispase II. Epithelial sheets were then separated from stroma, and the epithelium was cut into small pieces and incubated for 30 min in PBS–0.01% EDTA–0.025% trypsin. Cells were filtered on a 100- $\mu$ m cell strainer and cultured on fibronectin-collagen precoated 24-well dishes ( $3 \times 10^5$  cells/well), as described previously (48). Cells were cultured 1/1 in Ham's F-12 medium–Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 100 U penicillin ml<sup>-1</sup>, 100 mg streptomycin ml<sup>-1</sup>, 10% fetal calf serum, 2.5  $\mu$ g amphotericin B ml<sup>-1</sup>, 0.01  $\mu$ g cholera toxin ml<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ g insulin ml<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ g transferrin ml<sup>-1</sup>, 0.4  $\mu$ g hydrocortisone ml<sup>-1</sup>, 10 ng murine epidermal growth factor ml<sup>-1</sup>, 50  $\mu$ M beta-mercaptoethanol, and 20  $\mu$ g adenine ml<sup>-1</sup>.

**Transmission electron microscopy.** Samples were prepared for TEM as previously described (19). Briefly, cells were washed with PBS and fixed directly in the dish with cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. The cells were then scraped off and prepared for electron microscopy. Epon blocks and sections were prepared as described previously (49). Sections were analyzed by using a Tecnai Spirit transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands), and electron micrographs were taken by using a bottom-mounted 4K-by-4K-resolution Eagle camera (FEI).

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant VIR-IMPRINT ARC from the University of Liège. C.Z. is a research fellow of the Fonds de la Recherche Scientifique-Fonds National Belge de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

We thank L. Willems for helpful discussions and the technician and administrative team of the laboratory for very helpful assistance.

## REFERENCES

- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. 2009. Redefining chronic viral infection. *Cell* 138:30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>.
- Henle G, Henle W, Clifford P, Diehl V, Kafuko GW, Kirya BG, Klein G, Morrow RH, Munube GM, Pike P, Tukei PM, Ziegler JL. 1969. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 43:1147–1157.

3. Verma SC, Robertson ES. 2003. Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett* 222: 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00261-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00261-1).
4. Davison AJ. 2011. Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann N Y Acad Sci* 1230:E37–E49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06358.x>.
5. Schulz TF. 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J Antimicrob Chemother* 45(Suppl T3):15–27. [https://doi.org/10.1093/jac/45.suppl\\_4.15](https://doi.org/10.1093/jac/45.suppl_4.15).
6. Dunmire SK, Grimm JM, Schmeling DO, Balfour HH, Jr, Hogquist KA. 2015. The incubation period of primary Epstein-Barr virus infection: viral dynamics and immunologic events. *PLoS Pathog* 11:e1005286. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005286>.
7. Barton E, Mandal P, Speck SH. 2011. Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse. *Annu Rev Immunol* 29: 351–397. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-072710-081639>.
8. Milho R, Smith CM, Marques S, Alenquer M, May JS, Gillet L, Gaspar M, Efstathiou S, Simas JP, Stevenson PG. 2009. In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* 90:21–32. <https://doi.org/10.1099/vir.0.006569-0>.
9. Francois S, Vidick S, Sarlet M, Desmecht D, Drion P, Stevenson PG, Vanderplasschen A, Gillet L. 2013. Illumination of murine gammaherpesvirus-68 cycle reveals a sexual transmission route from females to males in laboratory mice. *PLoS Pathog* 9:e1003292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003292>.
10. Vidick S, Leroy B, Palmeira L, Machiels B, Mast J, Francois S, Wattiez R, Vanderplasschen A, Gillet L. 2013. Proteomic characterization of murid herpesvirus 4 extracellular virions. *PLoS One* 8:e83842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083842>.
11. Bortz E, Whitelegge JP, Jia Q, Zhou ZH, Stewart JP, Wu TT, Sun R. 2003. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol* 77:13425–13432. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.24.13425-13432.2003>.
12. May JS, Coleman HM, Boname JM, Stevenson PG. 2005. Murine gammaherpesvirus-68 ORF28 encodes a non-essential virion glycoprotein. *J Gen Virol* 86:919–928. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80661-0>.
13. May JS, de Lima BD, Colaco S, Stevenson PG. 2005. Intercellular gammaherpesvirus dissemination involves co-ordinated intracellular membrane protein transport. *Traffic* 6:780–793. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00316.x>.
14. May JS, Colaco S, Stevenson PG. 2005. Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 79: 3459–3467. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3459-3467.2005>.
15. Gillet L, Adler H, Stevenson PG. 2007. Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS One* 2:e347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000347>.
16. Gillet L, Colaco S, Stevenson PG. 2008. The murid herpesvirus-4 gH/gL binds to glycosaminoglycans. *PLoS One* 3:e1669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001669>.
17. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR. 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61:1416–1420.
18. Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B, Neipel F. 1998. The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol* 72:6725–6731.
19. Machiels B, Lete C, de Fays K, Mast J, Dewals B, Stevenson PG, Vanderplasschen A, Gillet L. 2011. The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *J Virol* 85:1011–1024. <https://doi.org/10.1128/JVI.01092-10>.
20. de Lima BD, May JS, Stevenson PG. 2004. Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *J Virol* 78:5103–5112. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5103-5112.2004>.
21. Gillet L, May JS, Stevenson PG. 2009. In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* 90:602–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005785-0>.
22. Milho R, Frederico B, Efstathiou S, Stevenson PG. 2012. A heparan-dependent herpesvirus targets the olfactory neuroepithelium for host entry. *PLoS Pathog* 8:e1002986. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002986>.
23. Lawler C, Milho R, May JS, Stevenson PG. 2015. Rhadinovirus host entry by co-operative infection. *PLoS Pathog* 11:e1004761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004761>.
24. Hayashi K, Hayashi M, Jalkanen M, Firestone JH, Trelstad RL, Bernfield M. 1987. Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 35:1079–1088. <https://doi.org/10.1177/35.10.2957423>.
25. Glauser DL, Kratz AS, Gillet L, Stevenson PG. 2011. A mechanistic basis for potent, glycoprotein B-directed gammaherpesvirus neutralization. *J Gen Virol* 92:2020–2033. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032177-0>.
26. Glauser DL, Kratz AS, Stevenson PG. 2012. Herpesvirus glycoproteins undergo multiple antigenic changes before membrane fusion. *PLoS One* 7:e30152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030152>.
27. Subramanian R, Sehgal I, D'Auvergne O, Kousoulas KG. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoproteins B and K8.1 regulate virion egress and synthesis of vascular endothelial growth factor and viral interleukin-6 in BCBL-1 cells. *J Virol* 84:1704–1714. <https://doi.org/10.1128/JVI.01889-09>.
28. Birkmann A, Mahr K, Ensser A, Yaguboglu S, Titgemeyer F, Fleckenstein B, Neipel F. 2001. Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol* 75:11583–11593. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11583-11593.2001>.
29. Chesnokova LS, Valencia SM, Hutt-Fletcher LM. 2016. The BDLF3 gene product of Epstein-Barr virus, gp150, mediates non-productive binding to heparan sulfate on epithelial cells and only the binding domain of CD21 is required for infection. *Virology* 494:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.002>.
30. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ. 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7065–7070. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510512103>.
31. Ruiss R, Ohno S, Steer B, Zeidler R, Adler H. 2012. Murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein 150 does not contribute to latency amplification in vivo. *J Virol* 86:107–117. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-107>.
32. Gillet L, Frederico B, Stevenson PG. 2015. Host entry by gammaherpesviruses—lessons from animal viruses? *Curr Opin Virol* 15:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.007>.
33. Gillet L, May JS, Colaco S, Stevenson PG. 2007. The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS One* 2:e705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000705>.
34. Machiels B, Lete C, Guillaume A, Mast J, Stevenson PG, Vanderplasschen A, Gillet L. 2011. Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield. *PLoS Pathog* 7:e1002387. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002387>.
35. Stevenson PG, Doherty PC. 1998. Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *J Virol* 72:943–949.
36. Diehl WE, Lin AE, Grubaugh ND, Carvalho LM, Kim K, Kyaw PP, McCauley SM, Donnard E, Kucukural A, McDonel P, Schaffner SF, Garber M, Rambaut A, Andersen KG, Sabeti PC, Luban J. 2016. Ebola virus glycoprotein with increased infectivity dominated the 2013-2016 epidemic. *Cell* 167:1088.e6–1098.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.014>.
37. Shi Y, Wu Y, Zhang W, Qi J, Gao GF. 2014. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol* 12:822–831. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3362>.
38. Minor PD. 2000. Eradication of polio by vaccination. *Virology* 268: 231–232. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0208>.
39. Bouma A. 2005. Determination of the effectiveness of pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals* 33:241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.08.011>.
40. Farrell HE, Lawler C, Tan CS, MacDonald K, Bruce K, Mach M, Davis-Poynter N, Stevenson PG. 2016. Murine cytomegalovirus exploits olfaction to enter new hosts. *mBio* 7:e00251-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00251-16>.
41. Hayashi K, Hayashi M, Boutin E, Cunha GR, Bernfield M, Trelstad RL. 1988. Hormonal modification of epithelial differentiation and expression of cell surface heparan sulfate proteoglycan in the mouse vaginal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Lab Invest* 58:68–76.
42. Turk SM, Jiang R, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. 2006. Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *J Virol* 80:9628–9633. <https://doi.org/10.1128/JVI.00622-06>.
43. Gillet L, May JS, Stevenson PG. 2007. Post-exposure vaccination improves gammaherpesvirus neutralization. *PLoS One* 2:e899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000899>.
44. Adler H, Messerle M, Wagner M, Koszinowski UH. 2000. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infec-



- tious bacterial artificial chromosome. *J Virol* 74:6964–6974. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6964-6974.2000>.
45. Adler H, Messerle M, Koszinowski UH. 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gamma-herpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J Virol* 75:5692–5696. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5692-5696.2001>.
  46. Latif MB, Machiels B, Xiao X, Mast J, Vanderplasschen A, Gillet L. 2016. Deletion of murid herpesvirus 4 ORF63 affects the trafficking of incoming capsids toward the nucleus. *J Virol* 90:2455–2472. <https://doi.org/10.1128/JVI.02942-15>.
  47. Gill MB, Gillet L, Colaco S, May JS, de Lima BD, Stevenson PG. 2006. Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 87:1465–1475. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81760-0>.
  48. Hakkinen L, Koivisto L, Larjava H. 2001. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *Methods Cell Sci* 23:189–196. <https://doi.org/10.1023/A:1016385109922>.
  49. Mast J, Nanbru C, van den Berg T, Meulemans G. 2005. Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Vet Pathol* 42: 559–565. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-559>.

# Section expérimentale

## Etude 2 :

“Blockage of a gammaherpesvirus sexual transmission by the nucleotide analogue Cidofovir.”

---

## *Préambule*

La lutte contre les herpèsvirus reste un problème important en médecine. A ce jour, peu de vaccins sont disponibles pour réduire les pathologies associées aux herpèsvirus, et aucun ne permet d'en prévenir la transmission. L'utilisation de molécules anti-virales reste donc un outil thérapeutique essentiel dans de nombreux cas. Actuellement, les molécules anti-virales sont couramment utilisées pour réduire les signes cliniques associés aux herpèsvirus, comme l'acyclovir en cas d'infection par le HSV-1 et -2, ou encore le ganciclovir en cas de pathologie liée au HCMV chez les patients immunodéprimés. En revanche, les études concernant l'utilité des agents anti-viraux pour réduire la transmission des herpèsvirus sont moins nombreuses.

Dans cette étude, nous avons exploité le modèle de transmission sexuelle d'un gammaherpèsvirus murin, le MuHV-4, pour étudier l'impact d'un traitement en pré- ou post-exposition à l'aide d'une molécule anti-virale, pour réduire la réexcrétion virale, et pour prévenir l'infection d'individus sains. Nous avons pour cela utilisé un analogue de nucléotide, le cidofovir, dont l'activité contre les gammaherpèsvirus a été démontrée à différentes reprises par le passé (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998). Les résultats obtenus sont présentés dans la section suivante.

# ———— Section expérimentale

## Etude 2 :

“Blockage of a gammaherpesvirus sexual transmission by the nucleotide analogue Cidofovir.”

———— *En préparation*

C. Zeippen, J. Javaux, R. Snoek, J. Neyts, L. Gillet

## *Abstract*

**Objectives:** To investigate the efficiency of Cidofovir to block sexual transmission of a gammaherpesvirus in a mouse model.

**Methods:** A luciferase expressing strain of Murid Herpesvirus 4 was used to monitor genital excretion of the virus in infected female BALB/c mice and sexual transmission to naïve males. Briefly, female mice were infected intranasally and followed daily by *in vivo* imaging from day 17 to day 22 post-infection to identify MuHV-4 replication in the genital tract. To test sexual transmission, females displaying genital luciferase signal were mated with naïve males that were then tested for MuHV-4 infection by different complementary approaches (*in vivo* imaging, serology, viral genome quantification in spleen) at different times post-contact. The efficiency of Cidofovir to block genital excretion or sexual transmission has been tested by treating infected females (either once-daily or at a single time point), naïve males before exposure (either once-daily or at a single time point) or males 24h post-exposure.

**Results:** On the one hand, we showed that a daily treatment of infected females can reduce MuHV-4 genital shedding by 75%. On the other hand, a daily preventive treatment of naïve males was sufficient to block viral transmission. In contrast, a single administration of Cidofovir to infected females at day 14 post-infection or to naïve males 2 to 6 days before mating was not sufficient to significantly reduce transmission. Finally, a single administration of CDV to males 24h post-mating significantly reduced transmission.

**Conclusions:** Altogether, our results show that Cidofovir can significantly reduce gammaherpesvirus sexual transmission. Such treatments could therefore be recommended in some specific conditions where gammaherpesvirus infection could be deleterious.

## *Introduction*

Gammaherpesviruses are important pathogens which are ubiquitous in both human and animal populations. Thus, Epstein-Barr virus (EBV) and the Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV), infect respectively up to 90% (Henle et al., 1969) and 30% (Verma and Robertson, 2003) of humans world-wide and are associated with several human malignancies such as Burkitt's and Hodgkin's lymphomas, nasopharyngeal carcinoma, Kaposi's sarcoma and post-transplant lymphoproliferative disease (Thorley-Lawson and Gross, 2004; Verma and Robertson, 2003). Efficient control of these infections is therefore of major interest, particularly in immunocompromised people (Cesarman, 2011).

The very high infection prevalence of these infections is due to efficient transmission from carriers to new hosts (Virgin et al., 2009) and reflects the fact that these viruses have evolved to coexist with immune responses. Indeed, gammaherpesviruses establish persistent, productive infections, with virus carriers both making anti-viral immune responses that protect against disease and excreting infectious virions. While interrupting transmission is the *sine qua non* of infection control, strategies based on vaccination have therefore been mainly unsuccessful to reach this goal. For example, vaccination with the Epstein-Barr virus (EBV) gp350, to block virion binding to B cells, failed to reduce infection rates while protecting against infectious mononucleosis (Moutschen et al., 2007; Sokal et al., 2007b). Other approaches to block transmission are therefore needed.

Antiviral drugs are another way to fight viral infections (De Clercq and Li, 2016). No antiviral drugs are currently licensed for treatment of KSHV or EBV infections. However, several antiherpetic agents have been shown to block these infections *in vitro*, especially those targeting the viral DNA polymerase, such as acyclovir, ganciclovir, foscarnet, and cidofovir (CDV) (Friedrichs et al., 2004; Lin et al., 1991; Meerbach et al., 1998; Neyts and De Clercq, 1998). CDV, also called HPMPC (for (S)-1-[(3-hydroxy-2-(phosphomethoxy)propyl)]cytosine) is a nucleotide analogue that needs to be phosphorylated by cellular kinases to its diphosphate form to become biologically active, and block viral DNA polymerase (Coen et al., 2013b). CDV is highly active against gammaherpesvirus *in vitro* (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998) and when evaluated in an *in vivo* model, CDV proved to be very efficient in protecting mice from gammaherpesvirus-induced disease whereas acyclovir, ganciclovir, foscarnet had little or no effect (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998). While CDV and related molecules are promising compounds for future clinical development to fight gammaherpesvirus infection, their capacity to block transmission has never been investigated.

Analysing EBV and KSHV transmission has proved difficult as these viruses have no well-established *in vivo* infection models. Related animal viruses, such as Murid herpesvirus 4 (MuHV-4), provide another way to address such questions (Barton et al., 2011). Indeed, using luciferase imaging of

MuHV-4 infection (Milho et al., 2009), we recently observed genital MuHV-4 excretion following intranasal inoculation of female mice and transmission to naïve males by sexual contact (Francois et al., 2013). Interestingly, that way of transmission also occurs for the KSHV transmission associated with HIV infection (Schulz, 2000), and may apply also to EBV (Dunmire et al., 2015).

In this study, we want therefore to investigate how CDV could be used to block gammaherpesvirus transmission in conditions close to natural settings.

## ***Material and methods***

**Ethics statement and animals.** Experiments, maintenance and care of mice complied with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Liège, Belgium approved the protocol (Permit Number: 1502). All efforts were made to limit animal suffering. BALB/c mice were purchased from ENVIGO Laboratories and were housed in the University of Liège, Department of infectious diseases, FARAHA. Female mice were infected intranasally (i.n.) with  $10^4$  PFU of MuHV-4 diluted in 30  $\mu$ l of sterile PBS, under general anaesthesia with isoflurane.

**Antiviral compound.** Mice were injected with 25mg/kg/d of CDV subcutaneously (s.c.), as it was used in previous *in vivo* experiments to attest efficacy of CDV against MuHV-4 (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998). CDV was administered at different time points according to experimental design.

**Viral strain.** All viruses were derived from a MuHV-4 bacterial artificial chromosome (BAC) (Adler et al., 2000). We used a strain expressing luciferase under the control of the M3 promoter that has been described previously (WT Luc<sup>+</sup> strain) (Milho et al., 2009). For *in vivo* experiments, the loxP-flanked BAC/eGFP cassette was removed by subsequent growths of the virus in NIH-3T3-CRE cells until eGFP<sup>+</sup> cells were no longer visible (Adler et al., 2001). Virus stocks were grown in BHK-21 cells cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 2mM glutamine, 100 U penicillin mL<sup>-1</sup>, 100 mg streptomycin mL<sup>-1</sup> and 10 % fetal calf serum. Infected cells were cleared of cell debris by low-speed centrifugation (1,000 x g, 30 min). Viruses were then concentrated by high-speed centrifugation (100,000 x g, 90 min) and titrated by plaque-assay on BHK-21 cells as described elsewhere (Gillet et al., 2009a).

***In vivo* imaging.** For imaging, mice were anaesthetized, injected intraperitoneally with luciferin (60 mg/kg) and imaged 10 minutes later with an IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). For quantitative comparisons, Living Image software (Caliper Life Sciences) was used to obtain the average radiance (photons per second per cm<sup>2</sup> per steradian) over each region of interest. For the reliable comparison of data, an average background measured in the right abdominal region was removed from the measured intensities.

**Quantification of anti-MuHV-4 specific antibodies by ELISA.** Nunc Maxisorp ELISA plates (Nalgen Nunc) were coated for 18h at 4°C with Triton X-100-disrupted MuHV-4 virions ( $10^6$  PFU/well), blocked in PBS/0.1% Tween-20/3% BSA, and incubated with mouse sera (diluted 1/200 in PBS/0.1% Tween-20). Bound antibodies were detected with Alkaline Phosphatase conjugated goat anti-mouse Ig polyclonal antibody (Sigma). Washing was performed with PBS/0.1% Tween-20.



p-Nitrophenylphosphate (Sigma) was used as substrate for colorimetry and absorbance was read at 405 nm using a Benchmark ELISA plate reader (Thermo).

**Viral genome quantification.** MuHV-4 genomic co-ordinates 40,264-44,385 were amplified as described (Latif et al., 2015) (gene ORF25, forward primer 5'-ATGGTATAGCCGCCTTTGTG-3', reverse primer 5'-ACAAGTGGATGAAGGGTTGC-3'). The PCR products were quantified by hybridization with a TaqMan probe (genomic co-ordinates 43,088-43,117, 5' 6-FAM-TTCATAAGTTTTATGCTGATCCAGTGGTTG-BHQ1 3') and converted to genome copies by comparison with a standard curve of cloned plasmid template serially diluted in control spleen DNA and amplified in parallel (iCycler, Biorad). Cellular DNA was quantified by amplifying part of the interstitial retinoid binding protein (IRBP) gene (forward primer 5'-ATCCCTATGTCATCTCCTACYTG-3', reverse primer 5'-CCRCTGCCTTCCCATGTYTG-3'). The PCR products were quantified with Sybr green (Invitrogen), the copy number was calculated by comparison with a standard curve of cloned mouse IRBP template amplified in parallel. Amplified products were distinguished from paired primers by melting curve analysis and the correct sizes of the products confirmed by electrophoresis and staining with ethidium bromide.

## Results

### Daily CDV treatment of infected females leads to reduction of MuHV-4 genital excretion.

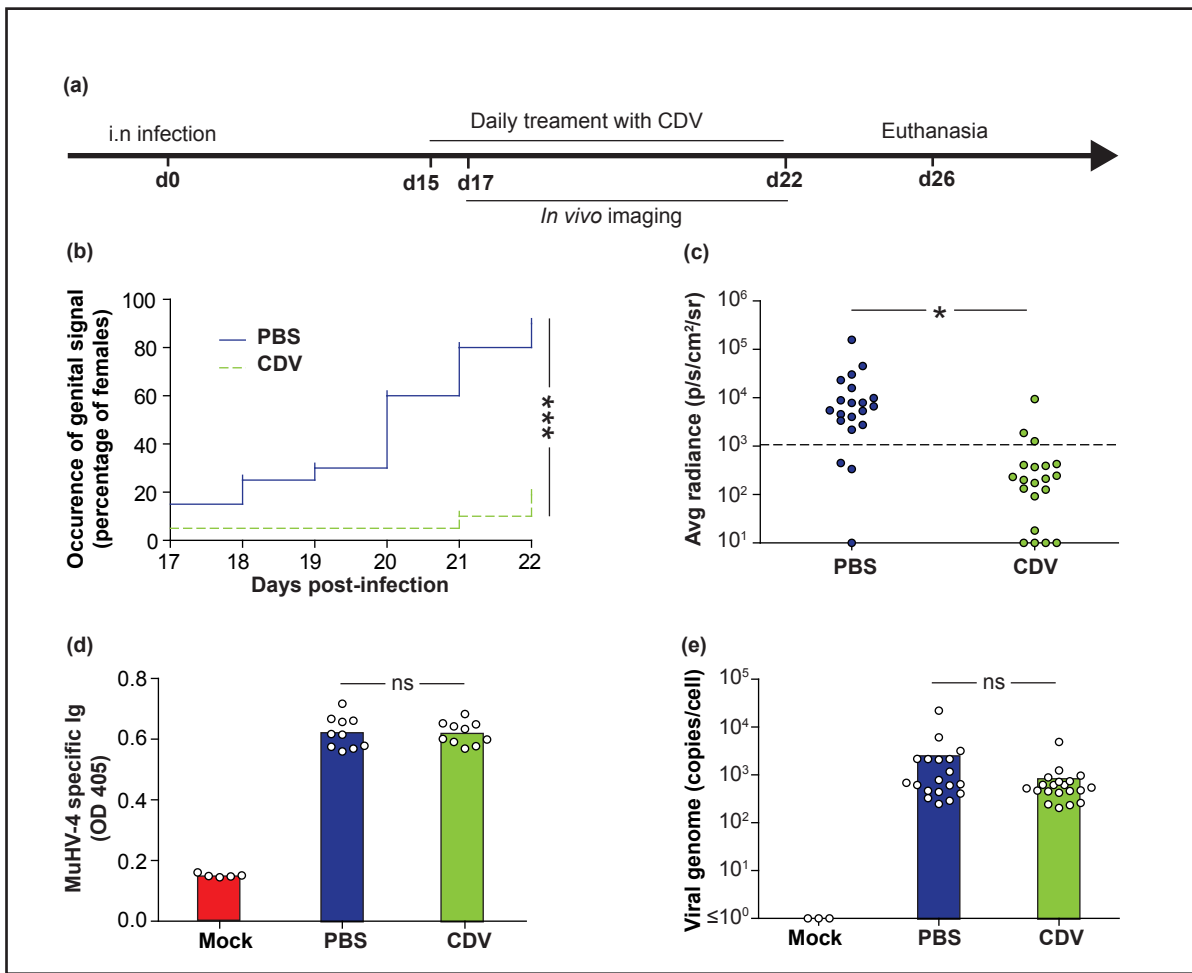
In order to test the effect of CDV treatment on MuHV-4 transmission, we firstly investigated if CDV was able to reduce MuHV-4 excretion from infected female mice. To this end, we infected 8 weeks old BALB/c female mice with a MuHV-4 strain expressing luciferase under the control of the M3 lytic promoter (Milho et al., 2009). Indeed, using this strain, we previously observed that, following intranasal infection, MuHV-4 is excreted in the genital tract of ~80% of infected female mice and that this excretion occurs in most of the cases between days 17 and 21 post-infection (p.i.) (Francois et al., 2013). Therefore, CDV was given on a daily basis from day 15 p.i. until day 22 p.i. (n=20) (**Figure 1a**) while control mice received PBS. Mice were then followed by daily *in vivo* imaging between days 17 and 22 p.i. in order to detect MuHV-4 genital excretion. While approximately 80% of untreated females showed MuHV-4 excretion during this period as expected, only 20% of females excreted the virus after treatment with CDV (**Figure 1b and 1c**). In contrast, CDV treatment did not significantly reduce seroconversion to MuHV-4 (**Figure 1d**) or the level of latent genomes in spleens (**Figure 1e**). Altogether, these results show that once-daily CDV administration reduces MuHV-4 genital excretion from MuHV-4 infected female mice without reducing latency establishment.

### A single CDV treatment of infected females does not reduce MuHV-4 genital excretion.

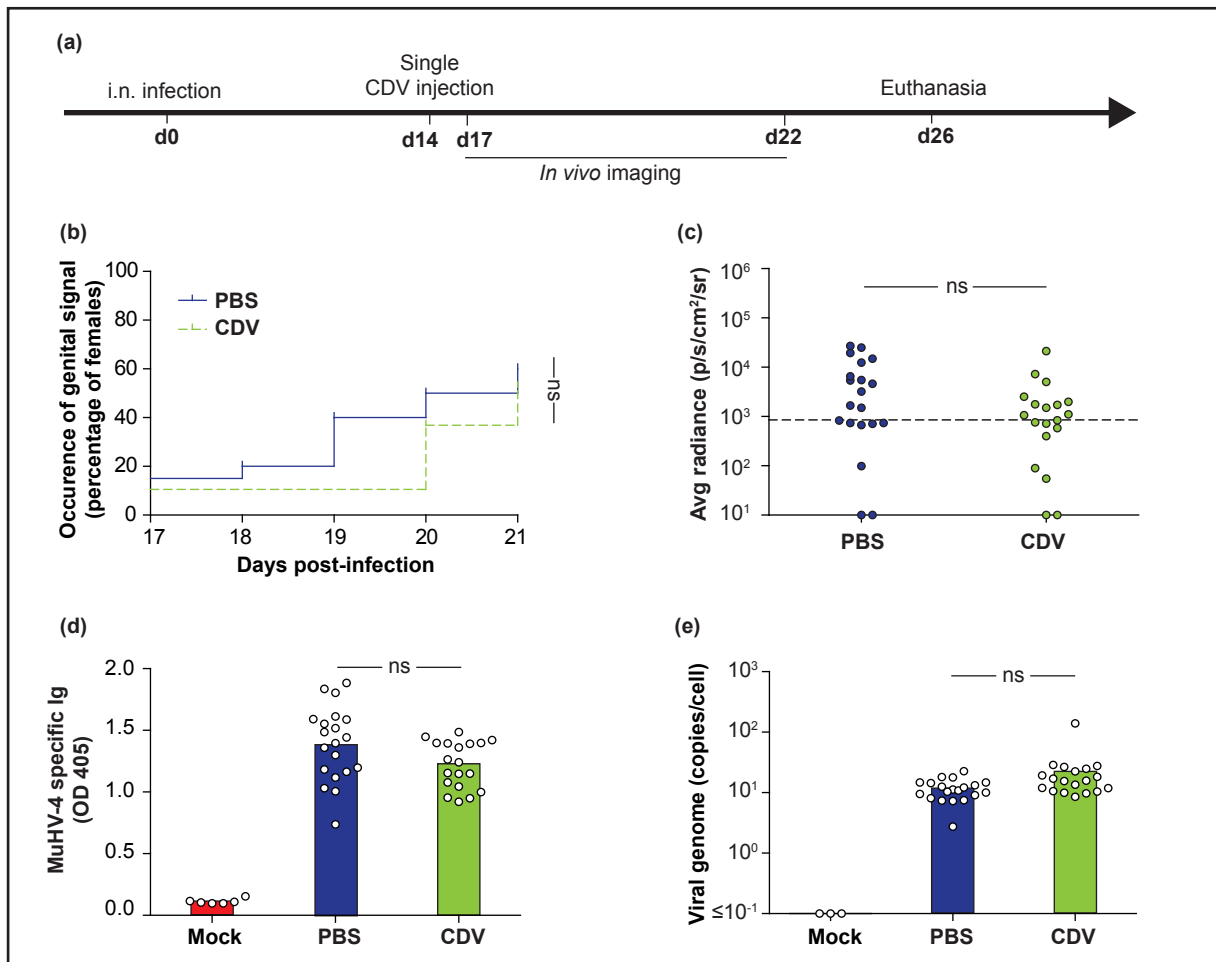
Daily CDV treatment is usually used in mice (Neyts and De Clercq, 1998), however, in humans a weekly administration is sufficient to maintain an efficient concentration, while reducing associated adverse effects. Therefore, in order to address the effect of a single CDV treatment, we repeated the same experiment by replacing the daily injections by a single injection of CDV performed at day 14 p.i. (**Figure 2a**). At 19 days p.i., only 2 females on 20 showed a genital excretion after treatment while 8 females on 20 had displayed a genital signal in the control group ( $p < 0.05$  by Chi<sup>2</sup> test, **Figure 2b**). However, at 21 days p.i., there was no difference between the two groups ( $p > 0.05$  by Chi<sup>2</sup> test) (**Figure 2b and 2c**), reflecting likely the reduction of CDV concentration into the organism. Again, CDV treatment did not reduce seroconversion to MuHV-4 (**Figure 2d**) or the level of latent genomes in spleens (**Figure 2e**). Altogether, these results show that a single CDV administration at day 14 p.i. is not sufficient to reduce MuHV-4 genital excretion from MuHV-4 infected female mice.

### Once-daily CDV treatment of naive males prevents MuHV-4 sexual transmission.

While antiviral treatments could be used to reduce excretion and transmission from infected subjects, they could also prevent infection of naive ones. We therefore investigated the potency of a daily CDV treatment to prevent MuHV-4 infection of naive males from sexual contact with excreting females. Briefly, we infected female BALB/c mice with the MuHV-4 WT Luc<sup>+</sup> strain and followed them by *in vivo* imaging in order to detect MuHV-4 genital excretion. When genital signal was observed,



**Figure 1: Effect of once-daily treatment with CDV on MuHV-4 genital excretion by female mice.** **A.** Experimental scheme. Female mice were infected i.n. with MuHV-4 (104 PFU). They were then injected daily with CDV (25mg/kg, s.c.) from day 15 to day 22 p.i. and were imaged by IVIS from day 17 to day 22 p.i.. **B.** Kaplan-Meier plot of time of occurrence of genital signal among MuHV-4 infected mice treated with PBS or CDV (n= 20 mice per group). **C.** Maximal intensity of genital luciferase signal among groups (n= 20 mice per group). Females were considered as positive if genital signal was superior to the mean value of 10 uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **D.** Serology performed by ELISA (n= 10 randomly subsampled mice from groups of 20 mice, except the mock-infected group which was made of 5 mice). **E.** Latency level was estimated by qPCR on spleen tissues (n= 20 mice per group except the mock-infected group which was made of 3 mice). Data are mean  $\pm$  SEM. For statistical analyses, the results were tested with Fisher test (b), Student t-test (c) or One-Way ANOVA and Bonferroni post-tests (d, e). \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ . i.n.: intranasal, s.c.: subcutaneous, ns: not significant



**Figure 2: Effect of a single treatment with CDV on MuHV-4 genital excretion by female mice. A.** Experimental scheme. Mice were infected i.n. with MuHV-4 (104 PFU). They were then injected with CDV (25mg/kg, s.c.) at day 14 p.i. and were imaged by IVIS from day 17 to day 22 p.i.. **B.** Kaplan-Meier plot of time of occurrence of genital signal among MuHV-4 infected mice treated with PBS or CDV (n= 20 mice per group). **C.** Maximal intensity of genital luciferase signal among groups (n= 20 mice per group). Females were considered as positive if genital signal was superior to the mean value of 10 uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **D.** Serology performed by ELISA (n= 20 mice per group, except the mock-infected group which was made of 5 mice). **E.** Latency level was estimated by qPCR on spleen tissues (n= 20 mice per group except the mock-infected group which was made of 3 mice). Data are mean  $\pm$  SEM. For statistical analyses, the results were tested with Fisher test (B), Student t-test (C) or One-Way ANOVA and Bonferroni post-tests (D, E). ns: not significant

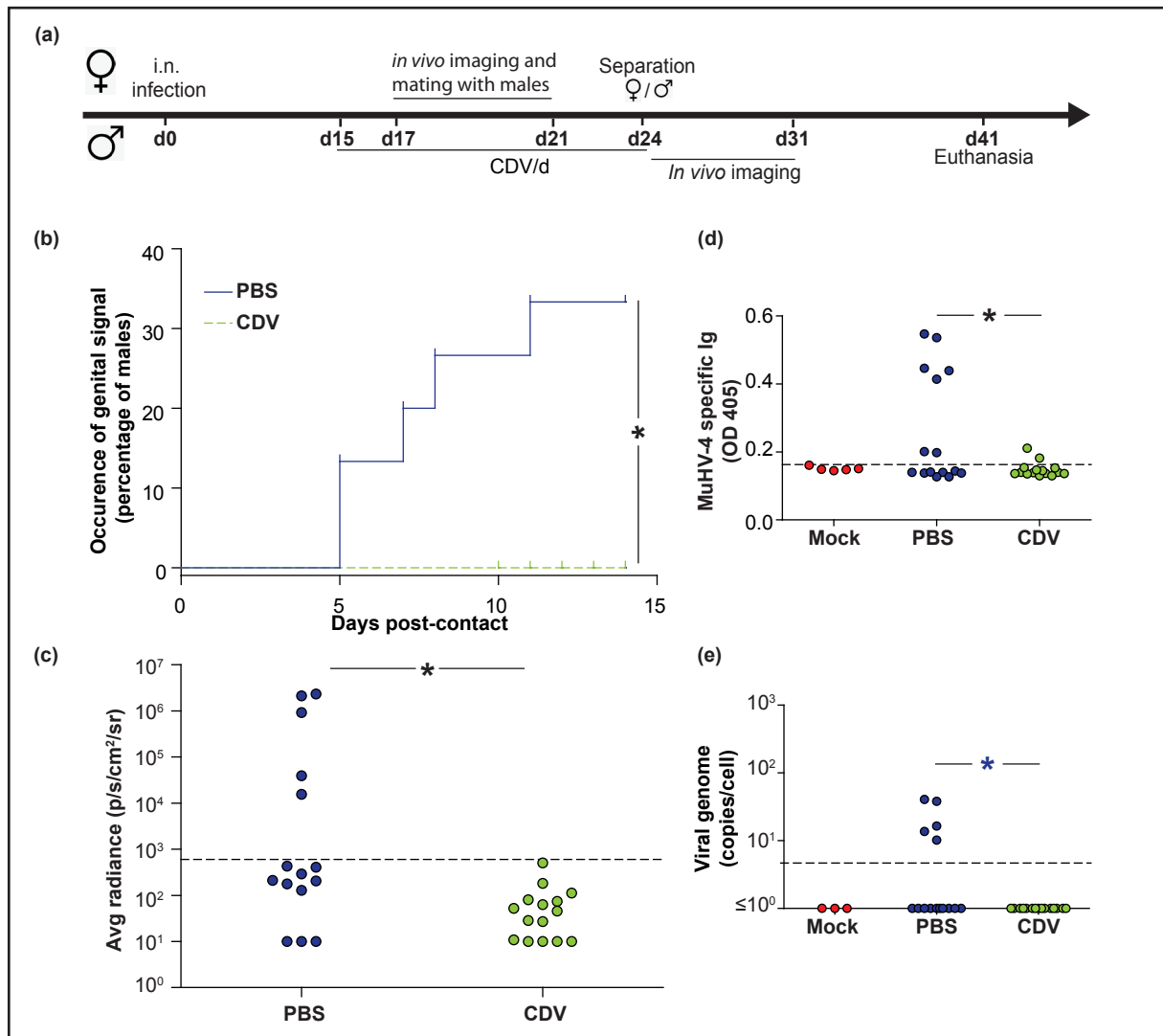
excreting females were mated with naive males, treated or not with CDV from days 15 to 24 (day 0 was defined as the time of females i.n. infection). At day 24, males were separated from females and were followed by *in vivo* imaging to determine transmission rate (**Figure 3a-b**). Strikingly, no male became infected after daily treatment with CDV (n=0/15) while a transmission rate of 35% was observed in the control group (**Figure 3c-d**). Males were euthanized at day 35 and none displayed seroconversion to MuHV-4 infection (**Figure 3d**) or latency establishment in spleen (**Figure 3e**). Altogether, these results show that once-daily CDV administration to naive males is sufficient to prevent their infection following sexual contact with MuHV-4 excreting females.

### **A single preventive CDV treatment of naive males is not sufficient to reduce MuHV-4 sexual infection.**

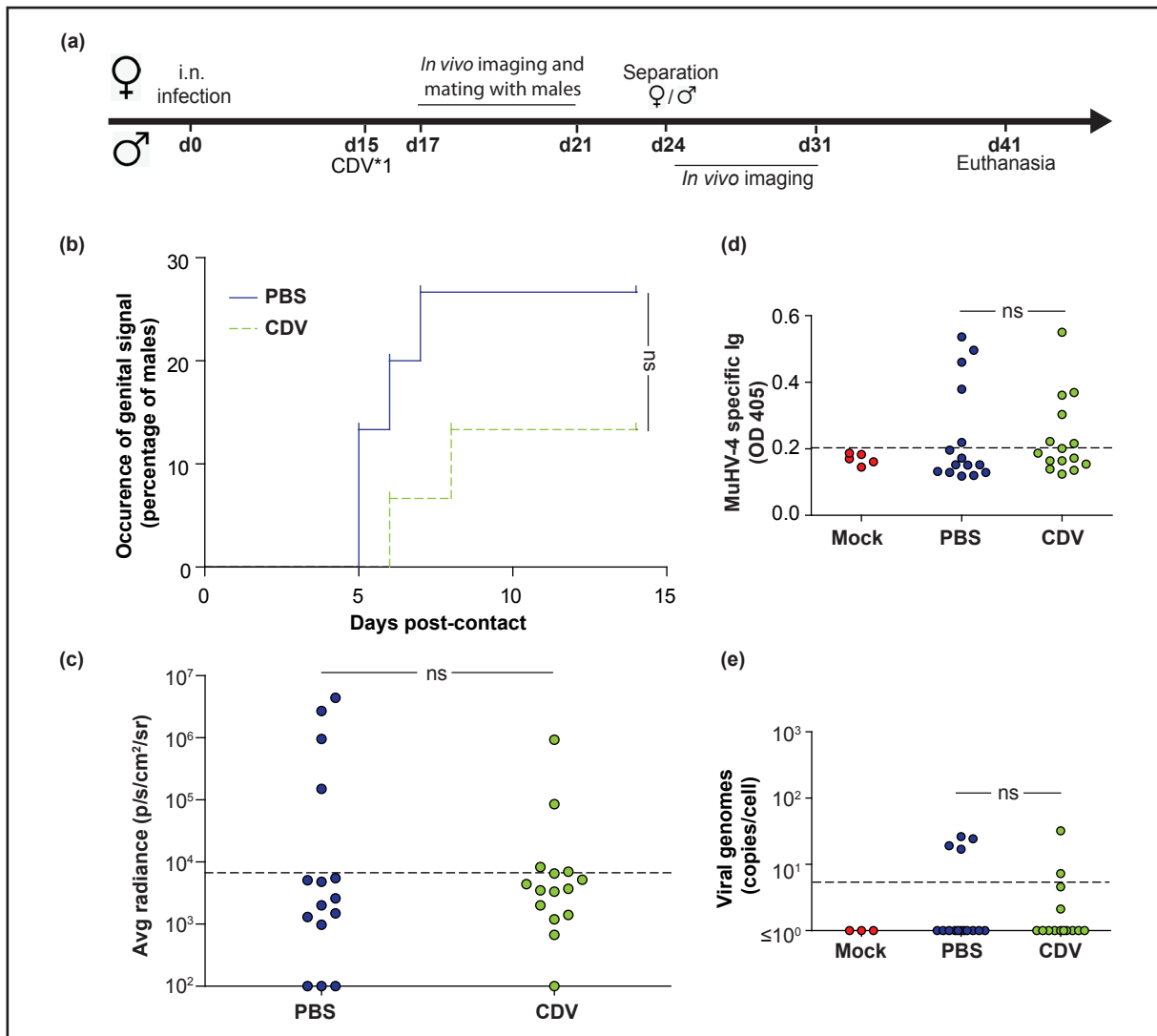
We then used a single preventive injection of CDV to naive males in order to test if it was sufficient to prevent infection. Briefly, we repeated the same experimental design as described above except that males received a single injection of CDV at day 15 (**Figure 4a**). *In vivo* imaging did not highlight any significant difference in infection rates between CDV and PBS treated groups (**Figure 4b-c**). Accordingly, similar rates of seroconversion (**Figure 4d**) or of latency establishment in spleen (**Figure 4e**) were observed in both groups. Altogether, these results show that a single CDV administration to naive males 2 to 6 days before sexual contact with females excreting the virus in the genital tract is not sufficient to prevent infection.

### **Influence of a single post-exposure CDV treatment of naïve males on their infection through the sexual route.**

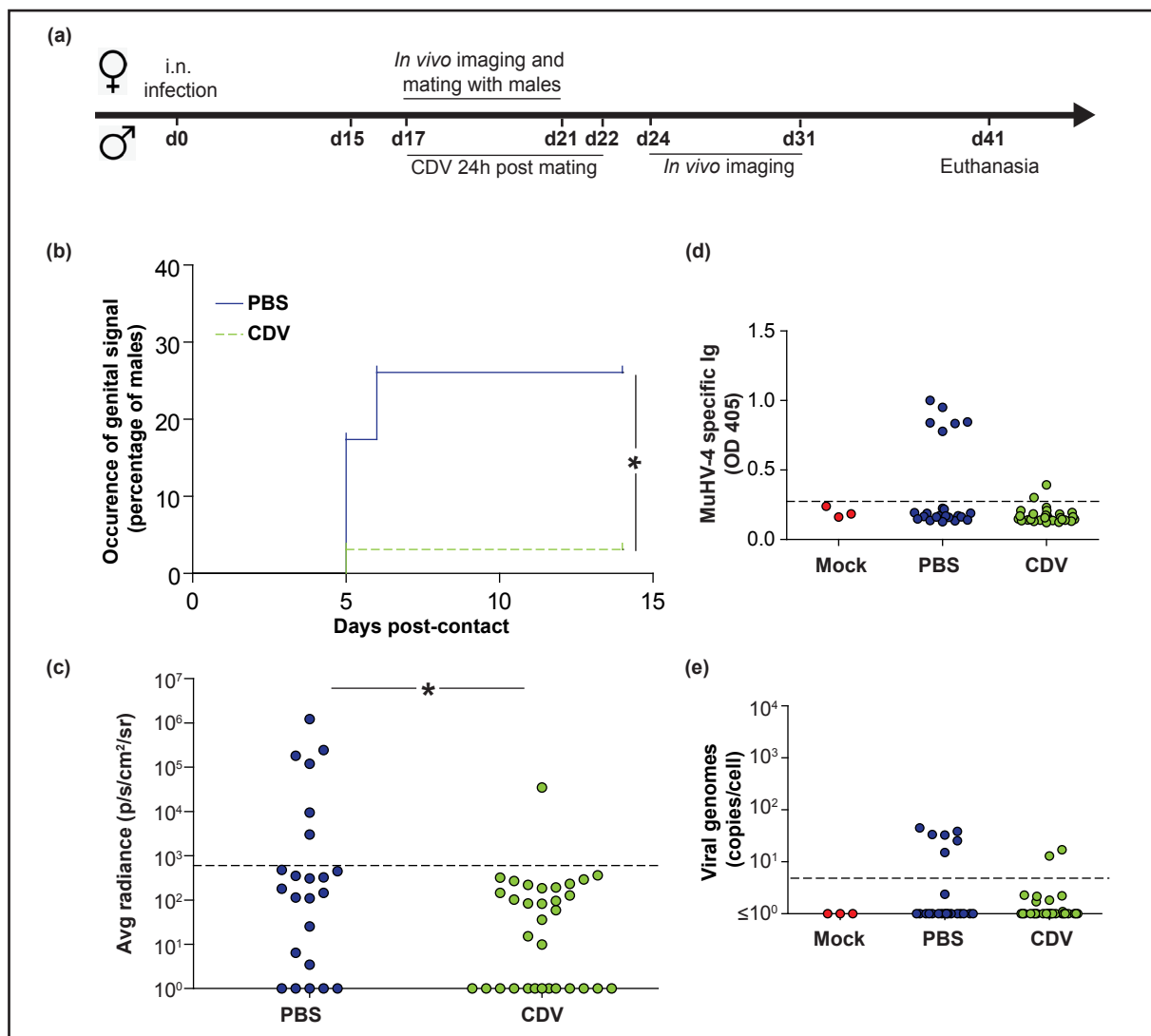
Finally, we tested if a single post-exposure treatment of exposed naive males could be sufficient to block systemic infection and latency establishment. Briefly, we repeated the same experimental scheme as the one described above, but instead of treating naive males before sexual contact with MuHV-4 excreting females, males received a single injection of CDV 24h after mating with infected females (**Figure 5a**). Interestingly, only 1 male on 32 (3%) displayed MuHV-4 genital infection whereas 26 percent (6 males on 23) became infected in the control group (**Figure 5b-c**). Accordingly, seroconversion to MuHV-4 (**Figure 5d**) and latency establishment (**Figure 5e**) tended also to be reduced in the CDV treated group in comparison with the PBS infected group. This however did not reached significance ( $p=0.056$  by Fisher's exact test) revealing that more mice should be included in the experiment. Anyway, altogether, these results suggest that a single post-exposure CDV administration to naive males could be sufficient to reduce their infection following sexual contact with MuHV-4 excreting females.



**Figure 3: Preventive daily treatment of males with CDV blocks MuHV-4 sexual transmission.** **A.** Experimental scheme. Female mice were infected i.n. with MuHV-4 (104 PFU) and were imaged from day 17 to day 21 p.i. When genital signal occurred, females were mated with naïve males, which received or not daily injection of CDV (25mg/kg, s.c.) from day 15 to day 24 according to experimental scheme. Males were followed by IVIS between days 24 and 31. **B.** Kaplan-Meier plot of time of occurrence of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 15 mice per group). **C.** Maximal intensity of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 15 mice per group). Males were considered as positive if genital signal was superior to the mean value of 10 uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **D.** Serology performed by ELISA on the sera of males (n= 15 mice per group, except the mock-infected group which was made of 5 mice). Males were considered as positive if MuHV-4 Ig were superior to the mean value of uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **E.** MuHV-4 latency level in males was estimated by qPCR on spleen tissues (n= 15 mice per group except the mock-infected group which was made of 3 mice). Males were considered as positive above 5 copies/cell (represented by the dotted line). Data are mean  $\pm$  SEM (B-E). For statistical analyses, the results were tested with Fisher test (B-E). \* p<0.05.



**Figure 4: Preventive single treatment of males with CDV fails to block MuHV-4 sexual transmission.** **A.** Experimental scheme. Female mice were infected i.n. with MuHV-4 (104 PFU) and were imaged from day 17 to day 21 p.i.. When genital signal occurred, females were mated with naive males which received or not a single injection of CDV (25mg/kg, s.c.) at day 15 of the experiment. Males were followed by IVIS between days 24 and 31. **B.** Kaplan-Meier plot of time of occurrence of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 15 mice per group). **C.** Maximal intensity of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 15 mice per group). Males were considered as positive if genital signal was superior to the mean value of 10 uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **D.** Serology performed by ELISA on the sera of males (n= 15 mice per group, except the mock-infected group which was made of 5 mice). Males were considered as positive if MuHV-4 Ig were superior to the mean value of uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **E.** MuHV-4 latency level in males was estimated by qPCR on spleen tissues (n= 15 mice per group except the mock-infected group which was made of 3 mice). Males were considered as positive above 5 copies/cell (represented by the dotted line). Data are mean  $\pm$  SEM (b-e). For statistical analyses, the results were tested with Fisher test (B-E). ns: not significant



**Figure 5: Post-exposure treatment of males with CDV can prevent establishment of MuHV-4 infection.** **A.** Experimental scheme. Female mice were infected i.n. with MuHV-4 (104 PFU) and were imaged from 17 to 21 days p.i.. When genital signal occurred, females were mated with naive males. Males were treated 24h post-mating with a single injection of CDV (25mg/kg, s.c.) or with PBS in the control group. Males were separated from females 48h post-mating, and were followed by in vivo imaging to detect virus replication. **B.** Kaplan-Meier plot of time of occurrence of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 23 mice in PBS group and 32 mice in CDV group). **C.** maximal intensity of genital luciferase signal among males treated with PBS or CDV (n= 23 mice in PBS group and 32 mice in CDV group). Males were considered as positive if genital signal was superior to the mean value of 10 uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **D.** Serology performed by ELISA on the sera of males (n= 23 mice in PBS group and 32 mice in CDV group, the mock-infected group was made of 3 mice). Males were considered as positive if MuHV-4 Ig were superior to the mean value of uninfected mice + 2 standard deviations (represented by the dotted line). **E.** MuHV-4 latency level in males was estimated by qPCR on spleen tissues (n= 23 mice in PBS group and 32 mice in CDV group, the mock-infected group was made of 3 mice). Males were considered as positive above 5 copies/cell (represented by the dotted line). Data are mean  $\pm$  SEM (B-E). For statistical analyses, the results were tested with Fisher test (B-E). \* p < 0.05, ns: not significant.



## *Discussion*

Gammaherpesviruses are highly prevalent animal and human viruses that are associated with numerous pathological conditions. In immunocompromised people, EBV and KSHV cause cancers such as Burkitt's lymphoma, Kaposi's Sarcoma or Castleman disease (Cesarman, 2014; Jha et al., 2016). Moreover, primary infection of young adults with EBV causes infectious mononucleosis (Taylor et al., 2015) which represents major health costs. EBV-induced infectious mononucleosis also increases the risk of developing multiple sclerosis to a similar degree as the strongest genetic risk factor (Geginat et al., 2017). Preventing gammaherpesvirus infection in some defined populations is therefore a major challenge for medicine.

Vaccines are one of the most successful approach developed by humans to prevent infectious diseases. However, despite the major burden of gammaherpesviruses, there is no available vaccine to prevent EBV or KSHV primary infection, reflecting likely the fact that these viruses have been selected during evolution to coexist with the immune response of their hosts. Over the last 50 years, several antivirals have been developed to treat different infectious conditions (De Clercq and Li, 2016). In the case of herpesviruses, viral DNA polymerase is a key target for the development of potent inhibitors. Thus, acyclic nucleoside phosphonates, such as CDV, are important broad-spectrum antiviral agents which emerged as the most potent anti-gammaherpesvirus drugs (Coen et al., 2013b). In this study, we tested the capacity of CDV to block transmission of a gammaherpesvirus in a mouse model of sexual transmission (Francois et al., 2013).

Briefly, we showed that once-daily treatment of either the infected or the naive partner is sufficient to significantly reduce the risk of transmission (**Figures 1 and 3**). In particular, treatment of the uninfected partner totally blocked transmission (**Figure 3**). Interestingly, this treatment not only reduced initial viral replication in the male genital tract to undetectable levels by the IVIS system but also protected those mice from seroconversion to MuHV-4 and from latency establishment in spleen (**Figure 3**). In contrast, CDV treatment of excreting females did not affect the levels of virus latency in spleen but was sufficient to reduce virus excretion (**Figure 1**). A similar approach had already been shown successful in the case of sexual transmission of Herpes Simplex virus 2 (HSV-2) in human (Corey et al., 2004; Crumacker, 2004) where once-daily valacyclovir treatment reduced the risk of HSV-2 transmission between heterosexual, monogamous couples discordant for HSV-2 infection. Such an approach could also apply to animals in specific conditions. For example, some gammaherpesviruses, such as those associated with malignant catarrhal fever, cause recurrent problems in zoo where persistently infected and susceptible animals are housed in close contact (Cooley et al., 2008; Frontoso et al., 2016). As those viruses are frequently transmitted upon parturition, treatment of persistently

infected animals around these periods could likely reduce virus excretion and help to protect neighbouring susceptible species.

One of the major pitfalls of CDV resides in their toxicity on the long term. We therefore tested the capacity of a single CDV injection (either to the infected or to the naive partner) before sexual contact to block MuHV-4 transmission (**Figures 2 and 4**). None of these two approaches allowed reducing significantly transmission at the end of the experimental protocol. However, it has to be noted that a single CDV injection was sufficient to block excretion of MuHV-4 from infected females for 5 days (between days 14 and 19 p.i.), reflecting probably that the frequency of CDV administration could be reduced to some extent (i.e. one administration every 4-5 days). Similarly, sexual transmission in males that received CDV only started at day 6 post-contact with infected females (**Figure 4**). These results suggest therefore that preventive CDV treatment has the potential to efficiently block gammaherpesvirus transmission but that the establishment of such protocol will be difficult as timing between treatment and sexual contact is unknown in most of the cases.

While preventive pre-exposure administration of antivirals is difficult to implement to block transmission, post-exposure treatment could display obvious advantages. Interestingly, we showed here that a single CDV administration to males 24h post-sexual contact with MuHV-4 excreting females could be sufficient to significantly reduce virus transmission (**Figure 5**). However, while primary infection of the male genital area was significantly reduced, as measured by IVIS, reductions of the rates of seroconversion and of viral genome copy numbers in the spleens were less clear (**Figures 5b-d**). This will require further experiments. If those results are confirmed, the feasibility of such an approach on the field could depend on the major mode of transmission of gammaherpesviruses in those conditions. Endemic EBV and KSHV infections are maintained chiefly by carriers shedding virus into their saliva. In that context, single post-exposure administration is likely not feasible. In contrast, in populations with low infection prevalence, sexual transmission becomes important due to its increased contact (Davison, 2011). This was seen clearly for the KSHV transmission associated with HIV infection (Schulz, 2000), and may apply also to EBV (Dunmire et al., 2015). In such a context, post-exposure treatment could probably be an option.

Altogether, we have shown that CDV could be used to efficiently block transmission of a gammaherpesvirus in conditions close to what happens in real life. Especially, it appeared that post-exposure treatment could be a very interesting approach in some epidemiological conditions regarding its efficacy and its ease of implementation.

## *Aknowledgments*

This work was supported by the VIR-IMPRINT ARC grant of the University of Liège. C.Z. 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 interpretation, or the decision to submit the work for publication. The authors thank A. Vanderplassen and L. Willems for helpful discussions and the technician and administrative team of the lab for very helpful assistance.

## References

- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M., and Koszinowski, U.H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* 74, 6964–6974.
- Adler, H., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (2001). Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J Virol* 75, 5692–5696.
- Barton, E., Mandal, P., and Speck, S.H. (2011). Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 351–397.
- Cesarman, E. (2011). Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* 305, 163–174.
- Cesarman, E. (2014). Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 349–372.
- De Clercq, E., and Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747.
- Coen, N., Duraffour, S., Naesens, L., Krecmerova, M., Van den Oord, J., Snoeck, R., and Andrei, G. (2013). Evaluation of Novel Acyclic Nucleoside Phosphonates against Human and Animal Gammaherpesviruses Revealed an Altered Metabolism of Cyclic Prodrugs upon Epstein-Barr Virus Reactivation in P3HR-1 Cells. *J. Virol.* 87, 12422–12432.
- Cooley, A.J., Taus, N.S., and Li, H. (2008). Development of a management program for a mixed species wildlife park following an occurrence of malignant catarrhal fever. *J. Zoo Wildl. Med.* 39, 380–385.
- Corey, L., Wald, A., Patel, R., Sacks, S.L., Tyring, S.K., Warren, T., Douglas, J.M., Paavonen, J., Morrow, R.A., Beutner, K.R., et al. (2004). Once-Daily Valacyclovir to Reduce the Risk of Transmission of Genital Herpes. *N. Engl. J. Med.* 350, 11–20.
- Crumpacker, C.S. (2004). Use of antiviral drugs to prevent herpesvirus transmission. *N. Engl. J. Med.* 350, 67–68.
- Davison, A.J. (2011). Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1230, E37–E49.
- Dunmire, S.K., Grimm, J.M., Schmeling, D.O., Balfour, H.H., and Hogquist, K.A. (2015). The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog.* 11, e1005286.
- Francois, S., Vidick, S., Sarlet, M., Desmecht, D., Drion, P., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2013). Illumination of murine gammaherpesvirus-68 cycle reveals a sexual transmission route from females to males in laboratory mice. *PLoS Pathog* 9, e1003292.
- Friedrichs, C., Neyts, J., Gaspar, G., De Clercq, E., and Wutzler, P. (2004). Evaluation of antiviral activity against human herpesvirus 8 (HHV-8) and Epstein-Barr virus (EBV) by a quantitative real-time PCR assay. *Antiviral Res.* 62, 121–123.

Frontoso, R., Autorino, G.L., Friedrich, K.G., Li, H., Eleni, C., Cocumelli, C., Di Cerbo, P., Manna, G., and Scicluna, M.T. (2016). An Acute Multispecies Episode of Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever in Captive Wild Animals in an Italian Zoo. *Transbound. Emerg. Dis.* *63*, 621–627.

Geginat, J., Paroni, M., Pagani, M., Galimberti, D., De Francesco, R., Scarpini, E., and Abrignani, S. (2017). The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol.* *38*, 498–512.

Gillet, L., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2009). In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* *90*, 602–613.

Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., et al. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* *43*, 1147–1157.

Jha, H.C., Banerjee, S., and Robertson, E.S. (2016). The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis. *Pathog. (Basel, Switzerland)* *5*, 18.

Latif, M.B., Machiels, B., Xiao, X., Mast, J., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2015). Deletion of Murid Herpesvirus 4 ORF63 Affects the Trafficking of Incoming Capsids toward the Nucleus. *J. Virol.* *90*, 2455–2472.

Lin, J.C., De Clercq, E., and Pagano, J.S. (1991). Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs, including (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* *35*, 2440–2443.

Meerbach, A., Holy, A., Wutzler, P., De Clercq, E., and Neyts, J. (1998). Inhibitory Effects of Novel Nucleoside and Nucleotide Analogues on Epstein--Barr Virus Replication. *Antivir. Chem. Chemother.* *9*, 275–282.

Milho, R., Smith, C.M., Marques, S., Alenquer, M., May, J.S., Gillet, L., Gaspar, M., Efstathiou, S., Simas, J.P., and Stevenson, P.G. (2009). In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* *90*, 21–32.

Moutschen, M., Léonard, P., Sokal, E.M., Smets, F., Haumont, M., Mazzu, P., Bollen, A., Denamur, F., Peeters, P., Dubin, G., et al. (2007). Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein–Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* *25*, 4697–4705.

Neyts, J., and De Clercq, E. (1998). In vitro and in vivo inhibition of murine gamma herpesvirus 68 replication by selected antiviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 170–172.

Schulz, T.F. (2000). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J. Antimicrob. Chemother.* *45 Suppl T3*, 15–27.

Sokal, E.M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Leonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F., and Denis, M. (2007). Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* *196*, 1749–1753.

Taylor, G.S., Long, H.M., Brooks, J.M., Rickinson, A.B., and Hislop, A.D. (2015). The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 787–821.

Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.

Verma, S.C., and Robertson, E.S. (2003). Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 155–163.

Virgin, H.W., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell* 138, 30–50.

---

# Discussion - Perspectives

---

Les herpesvirus sont l'archétype des virus persistants, capables de se maintenir à l'état latent dans l'organisme en présence d'une réponse immune spécifique. Au fil de l'évolution, divers mécanismes se sont développés, permettant au virus d'échapper au système immunitaire. Le virus peut donc être réactivé et excrété au niveau de sites spécifiques, et être transmis même plusieurs années après l'infection initiale. Mieux comprendre l'ensemble du cycle viral est d'une importance primordiale afin de mettre au point des moyens de lutte efficace. En particulier, les mécanismes précis impliqués lors de la transmission des gammaherpèsvirus, tels que les types cellulaires impliqués ou les protéines virales et cellulaires nécessaires, restent méconnus.

En laboratoire, l'étude du cycle pathogénique des gammaherpèsvirus passe souvent par l'utilisation d'un modèle. En effet, les gammaherpèsvirus humains étant caractérisés par leur spectre d'hôte étroit, les études *in vivo* sont limitées. Le modèle le plus fréquemment employé pour l'étude des gammaherpèsvirus est le MuHV-4. Jusqu'à récemment, l'étude de son cycle pathogénique se limitait à l'utilisation d'une inoculation expérimentale, en l'absence d'informations pertinentes concernant l'infection naturelle des rongeurs par le MuHV-4. Récemment, une transmission par voie sexuelle, de la femelle vers le mâle, a été observée chez les souris de laboratoire (Francois et al., 2013). Cette observation permet dès lors d'étudier les paramètres d'une transmission naturelle. Ce modèle ouvre donc de nombreuses perspectives d'études concernant la transmission des gammaherpèsvirus, et a été exploité dans le cadre de ce travail lors de deux études.

Durant la transmission, les herpesvirus sont excrétés au niveau des muqueuses et sont exposés au milieu extracellulaire. Les glycoprotéines virales devraient jouer un rôle important durant cette partie du cycle puisqu'elles sont directement exposées en surface du virus et sont les principales sources d'interactions avec les cellules au moment de l'entrée. Parmi les glycoprotéines du MuHV-4, gp150 pourrait avoir une place prépondérante durant la partie extracellulaire du cycle. En effet, gp150 participerait à la protection du virus contre la neutralisation (Gillet et al., 2007b; Rosa et al., 2007) et au relargage du virus à partir des cellules infectées (de Lima et al., 2004). De même, les homologues de gp150 chez les autres gammaherpèsvirus semblent également impliqués dans la partie extracellulaire du cycle : certains influencent le tropisme viral (Machiels et al., 2013; Nemerow et al., 1987), ou participent à la protection du virus contre la neutralisation (Machiels et al., 2011b). Jusqu'à ce jour, aucun déficit d'infection *in vivo* n'a été observé avec une souche déficiente pour gp150 (gp150-), au niveau de la réplication lytique ou de l'établissement de la latence (de Lima et al., 2004; Ruiss et al., 2012). Dès lors, gp150 pourrait être important non pas durant la dissémination du virus dans l'organisme, mais pourrait favoriser la transmission virale. Nous avons donc testé l'importance de gp150 dans un contexte de transmission naturelle en comparant la capacité de transmission d'une souche gp150- et d'une souche sauvage (WT). Les résultats obtenus indiquent que le virus gp150- ne présente pas de déficit d'infection après inoculation intra-nasale (**étude 1, figure 2c**). De même, la colonisation du tractus génital ainsi que



la réplication associée sont similaires pour les deux souches (**étude 1, figure 2d-f**). Par contre, la souche gp150- montre un déficit drastique de transmission par rapport à la souche sauvage (**étude 1, figure 4**). Cette étude démontre donc le rôle essentiel de gp150 au moment de la transmission. Les résultats obtenus lors de cette étude sont discutés dans les paragraphes suivants.

Premièrement, l'absence de gp150 n'entraîne pas de déficit d'infection après inoculation intranasale, aussi bien au niveau de la réplication lytique initiale (**étude 1, figure 2c**) que de l'établissement de la latence dans la rate (**étude 1, figure 3**). Cette observation est en adéquation avec les études précédentes concernant gp150 (de Lima et al., 2004; Ruiss et al., 2012). La souche gp150- ne montre pas de déficit d'infection lytique, mais au contraire, l'intensité du signal lumineux observé au niveau des nœuds lymphatiques cervicaux superficiels (SCLN) pour la souche gp150- est globalement plus élevée que pour la souche WT. Au niveau des nœuds lymphatiques, les cellules cibles du virus n'expriment pas de glycosaminoglycans. Or, l'absence de gp150 favorise l'infection des cellules GAG- (de Lima et al., 2004). Dès lors, la raison pour laquelle la souche gp150- se réplique mieux au niveau des nœuds lymphatiques pourrait être que l'absence de gp150 réduit sa dépendance aux GAGS, facilitant ainsi l'infection des cellules myéloïdes et des cellules B. De plus, l'absence de déficit de colonisation du tractus génital par la souche gp150- pourrait indiquer que l'infection du tissu génital ne dépend pas de virions libres mais plutôt d'une dissémination par les cellules. L'hypothèse pour expliquer la colonisation du tractus génital à partir d'une infection intra-nasale serait l'exploitation du homing naturel des cellules B au niveau des muqueuses. En effet, il existe entre le système respiratoire et le système génital des similarités au niveau du homing des cellules B : les cellules activées au niveau du système respiratoire expriment le récepteur CCR10, ce qui permettrait le homing des cellules B dans les différents tissus exprimant son ligand CCL28, dont le tractus uro-génital. De ce fait, des cellules B activées au niveau du tractus respiratoire pourraient se retrouver dans le tractus génital au moment de leur différenciation en plasmocyte (Brandtzaeg and Johansen, 2005; Cha et al., 2011; Neutra and Kozlowski, 2006). De cette manière, une hypothèse qui permettrait d'expliquer qu'un virus inoculé par les voies respiratoires soit libéré au niveau du tractus génital serait une exploitation du homing naturel des cellules B pour être excrété au niveau d'une muqueuse différente par rapport à son site d'entrée. Cette hypothèse serait intéressante à tester dans le futur. En effet, le cheminement du virus depuis l'inoculation intra-nasale jusqu'à la rate est à présent bien décrit (Frederico et al., 2012, 2014; Gaspar et al., 2011; Milho et al., 2012). Cependant, la seconde partie du cycle, qui permet au virus d'être acheminé jusqu'à son site d'excrétion, est inconnu. Pour étudier cette partie du cycle, une méthode basée sur le marquage des virus par un système de recombinaisons Cre/Lox pourrait être utilisée afin de suivre l'infection *in vivo*. Cette méthode a précédemment permis d'étudier les types cellulaires impliqués dans l'entrée et la propagation jusqu'à la rate du MuHV-4 (Frederico et al., 2012, 2014; Gaspar et al., 2011). Brièvement, ce système est basé sur une modification de la survie virale ou de l'expression d'une protéine fluorescente suite à une recombinaison Cre/Lox. Différentes souris transgéniques expriment la

recombinase Cre dans un type cellulaire particulier, qui varie selon les souris utilisées. La recombinaison observée au niveau des virus récoltés permet dès lors de déterminer s'ils ont transité par ce type cellulaire particulier. La difficulté pour étudier l'excrétion viendrait du fait qu'un système de recombinases inductibles devrait être utilisé afin de pouvoir déterminer le type cellulaire par lequel a transité le virus non pas juste après l'inoculation, mais durant son acheminement jusqu'au tractus génital. Or, la plupart des souris transgéniques de ce type expriment la recombinaison Cre après traitement au tamoxifène. Dans le cadre de l'excrétion génitale, cette molécule présente le désavantage d'interférer avec le cycle sexuel de la souris et pourrait dès lors affecter la transmission virale puisque celle-ci dépend des œstrogènes (Francois et al., 2013). Néanmoins, cette approche mériterait d'être testée dans le futur.

Deuxièmement, alors que gp150 est accessoire pour l'entrée au niveau respiratoire et la propagation au sein de l'organisme, il est essentiel pour une transmission par voie sexuelle (**étude 1, figure 4**). Dans notre étude, différentes hypothèses, basées sur les fonctions de gp150 et de ses homologues décrites par le passé *in vitro*, ont été testées afin d'expliquer ce déficit de transmission.

La première hypothèse qui a été testée est que gp150 protégerait le virus contre la neutralisation. En effet, gp150 semble agir comme un leurre immunologique qui dévie la réponse humorale vers la production d'anticorps non neutralisants (Gillet et al., 2007b). De plus, la glycoprotéine gp180 du BoHV-4, l'homologue de gp150, protège les épitopes clés de gH/gL et gB en formant un bouclier de glycans (Machiels et al., 2011b). Ce mécanisme pourrait être conservé parmi les homologues de gp180, qui présentent tous une glycosylation importante (Li et al., 1999; Machiels et al., 2011a; Szakonyi et al., 2006; Wright et al., 2009). Dès lors, l'absence de gp150 pourrait non seulement entraîner une augmentation de la production d'anticorps neutralisants, mais également réduire la protection des épitopes clés des autres glycoprotéines. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de la neutralisation en l'absence de gp150 (**étude 1, figure 6**). Dans nos conditions expérimentales, il semblerait donc que gp150 ne participe pas à la protection du virus contre la neutralisation.

La seconde hypothèse qui a été envisagée pour expliquer le phénotype observé est que gp150 pourrait influencer le tropisme viral, en permettant la liaison à un récepteur cellulaire particulier. Cette hypothèse n'est pas la plus probable, puisque la souche gp150- n'a jamais montré de déficit d'infection *in vitro* par rapport à la souche sauvage. Au contraire, la souche gp150- infecte mieux les cellules GAGs- (de Lima et al., 2004). Le même phénomène est observé pour la souche gp180- du BoHV-4 (Machiels et al., 2011a). De plus, gpK8.1 du KSHV et gp350 de l'EBV ne sont pas essentiels pour l'infection (Luna et al., 2004). Le fait que gp150 oriente le tropisme cellulaire en liant un récepteur particulier ne peut cependant pas être exclu. En effet, chez l'EBV, gp350 oriente le tropisme viral en liant spécifiquement le CR2 et favorise l'infection des cellules B (Tanner et al., 1987). Afin de tester cette hypothèse, nous avons infecté directement des mâles par voie intra-préputiale, et nous n'avons pas observé de différence entre les deux groupes (**étude 1, figure 5**). Afin d'être efficace, l'infection

expérimentale au niveau du prépuce nécessite une abrasion préalable de la muqueuse, ce qui favorise probablement le contact entre le virus et la muqueuse en supprimant les sécrétions mucosales et en induisant de légères lésions. Cette situation pourrait être physiologique, puisque lors des contacts sexuels, des traumatismes au niveau de la muqueuse peuvent être observés chez les rongeurs. Nos conditions expérimentales n'ont donc pas permis de mettre en évidence de modification de tropisme en l'absence de gp150. Cependant, ce phénomène ne peut pas être complètement exclu actuellement. En effet, il est possible que les conditions expérimentales utilisées ici induisent des lésions non physiologiques en condition naturelle d'accouplement, qui pourraient réduire l'importance de gp150 durant la transmission en supprimant la barrière épithéliale.

Gp150 pourrait également influencer le tropisme cellulaire d'une autre manière. En effet, les anticorps dirigés contre gp150 favorisent l'infection des cellules possédant un récepteur Fc (cellule FcR+) (Gillet et al., 2007b). Ce phénomène pourrait donc être exploité par le virus pour infecter les cellules FcR+ dans la muqueuse génitale mâle. Afin de déterminer si cette hypothèse est plausible, deux éléments sont à envisager : 1/ la présence d'anticorps spécifiques IgG au niveau du site d'excrétion virale ; 2/ la présence au niveau de la muqueuse mâle de cellules exprimant des récepteurs Fc.

Le premier point est de déterminer si des anticorps spécifiques permettant la liaison aux récepteurs Fc sont présents au niveau du site d'excrétion virale. En effet, les récepteurs Fc lient les IgG. Les immunoglobulines retrouvées au niveau du tractus génital femelle sont des IgA et des IgG. Les IgA sont les principales immunoglobulines retrouvées habituellement au niveau des sécrétions. Cependant, au niveau des sécrétions cervico-vaginales, une prédominance des IgG est observée par rapport aux IgA (Nguyen et al., 2014; Reis Machado et al., 2014). Dans notre étude, nous avons détecté la présence d'anticorps anti-MuHV-4 dans les sécrétions cervico-vaginales (**étude 1, figure 6**), mais nous n'avons pas déterminé l'isotype de ces anticorps. Ceci pourrait facilement être vérifié dans le futur.

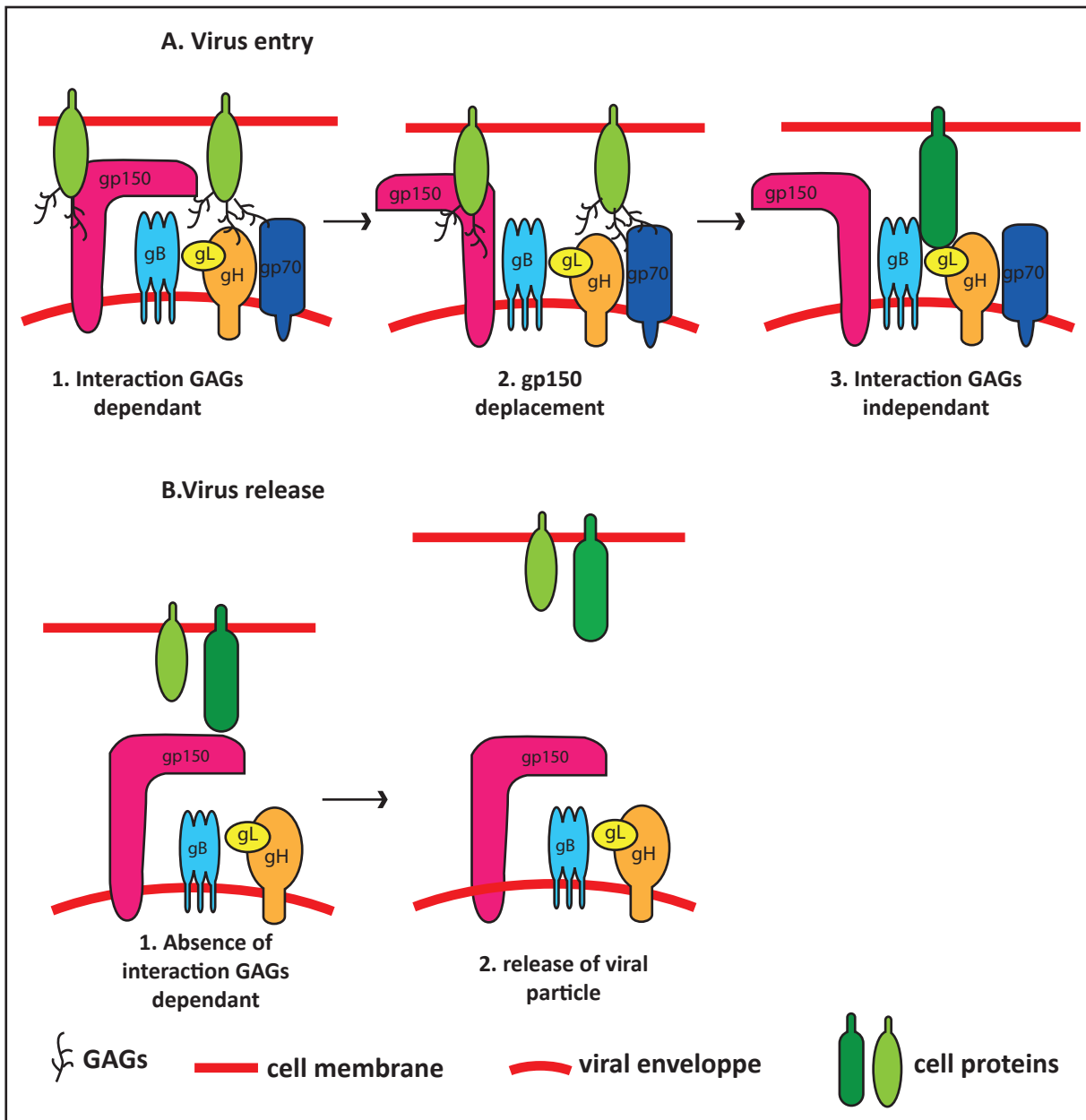
Le second point important concernant l'infection des cellules FcR+ est la présence au niveau de l'épithélium du pénis, de cellules exprimant des récepteurs Fc en surface de l'épithélium. Au niveau de la paroi interne du prépuce, la couche de kératine est moins épaisse, et les cellules de Langerhans présentes dans l'épithélium envoient des dendrites en surface (Ganor and Bomsel, 2011; Ganor et al., 2010). Dès lors, des récepteurs Fc peuvent être disponibles en surface de la muqueuse et favoriser l'infection. Cette voie d'infection pourrait correspondre aux observations effectuées par immunohistochimie précédemment (Francois et al., 2013). Dans cette étude, des antigènes viraux ont été détectés au niveau de la couche superficielle de l'épithélium du pénis, ainsi qu'au niveau de la partie superficielle du corps caverneux, en abord de l'épithélium. Pourtant, aucun antigène n'a été détecté dans les autres couches de l'épithélium. Dès lors, une infection des cellules dendritiques permettrait d'expliquer ce phénomène : l'infection par les dendrites permettrait au virus de traverser l'épithélium puis de se

propager au niveau du corps caverneux. Cette voie d'infection permettrait d'expliquer comment le virus traverse l'épithélium stratifié et kératinisé du pénis.

Un tel mécanisme a déjà été décrit par le passé pour d'autres virus. Par exemple, le VIH pourrait infecter les cellules au niveau du tractus génital femelle par leurs FcRn (Gupta et al., 2013). Une autre étude indique que le VIH utilise les dendrites des cellules de Langerhans en surface de la paroi interne du prépuce pour infecter la muqueuse (Ganor et al., 2010). Un phénomène similaire a également été décrit pour le virus de la Dengue, pour lequel la réaction croisée entre les anticorps induits par les différents sérotypes du virus peut favoriser une réinfection par un sérotype différent d'individus déjà immunisés. En effet, les anticorps induits par un premier sérotype ne neutralisent pas le second sérotype mais favorisent même l'infection des cellules dendritiques (Boonnak et al., 2008; Halstead et al., 2010; Rodenhuis-Zybert et al., 2010) (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Cette hypothèse n'a pas été adressée dans le cadre de notre étude, et pourrait dès lors être intéressante à investiguer dans le futur, en utilisant par exemple des mâles déficients pour les récepteurs Fc (FcγRII<sup>-/-</sup>, que l'on retrouve sur les cellules de Langerhans, ou FcRn<sup>-/-</sup>). De plus, au-delà de la transmission par voie sexuelle, ce phénomène pourrait également favoriser d'autres types de transmission, en exploitant les FcRn et FcR au niveau des autres muqueuses. En effet, l'excrétion génitale observée chez les femelles pourrait entraîner une transmission vers les nouveaux nés, ou encore une transmission par voie nasale par contact naso-génital lors des comportements reproducteurs. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu observer de transmission vers les nouveaux-nés, et nous n'observons que rarement d'infections intra-nasales chez les mâles. Toutefois, ceci pourrait être lié à nos conditions d'élevage, qui pourraient inhiber une partie des comportements reproducteurs naturels des souris. Ces voies de transmission ne peuvent donc pas être exclues.

Finalement, notre étude a pu démontrer que l'absence de gp150 entraîne une réduction de la libération des particules infectieuses à partir des cellules infectées, comme observé *in vitro* (de Lima et al., 2004). Nous avons en effet observé que les virions gp150<sup>-</sup>, au lieu d'être libérés après leur excrétion en surface des cellules épithéliales vaginales, restaient accrochés aux cellules en formant de multiples couches de virions (**étude 1, figure 7**). De ce fait, la quantité de particules infectieuses dans les sécrétions cervico-vaginales sont réduites par rapport à la souche sauvage, ce qui pourrait limiter la transmission en réduisant le contact entre les particules infectieuses et la muqueuse génitale mâle. L'hypothèse qui permettrait d'expliquer pourquoi gp150 favorise le relargage des particules infectieuses n'a pas été abordée dans ce travail. Cependant, de Lima *et al* ont proposé un modèle pour expliquer ce phénomène (**Figure 17**) (de Lima et al., 2004). Au moment de l'entrée dans la cellule, la présence de gp150 rend le virus dépendant à la présence des GAGs (de Lima et al., 2004) car il camouflerait des épitopes clés nécessaires à la liaison, probablement situés sur gH/gL et/ou sur gB. L'interaction de



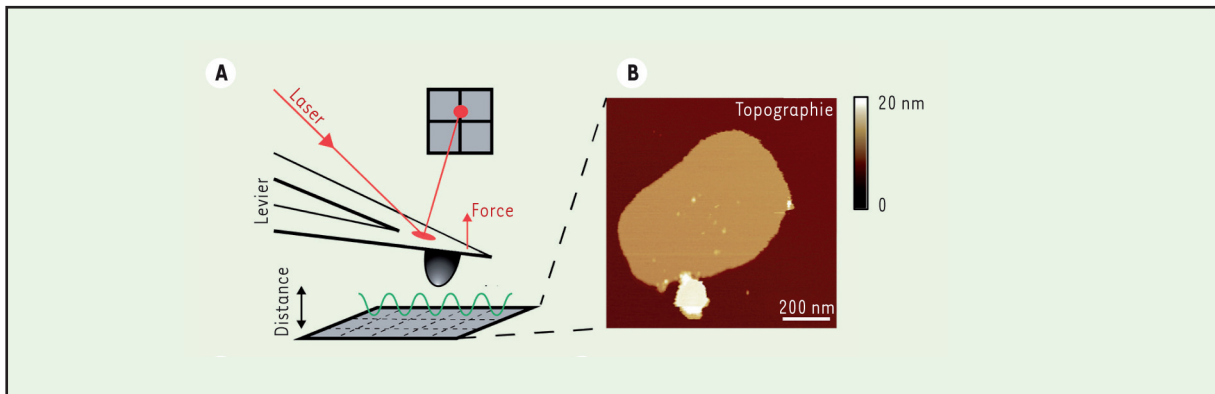
**Figure 17 : modèle expliquant les interactions entre gp150 et la cellule au moment de l'entrée et la sortie de la cellule. A.** Au moment de l'entrée, la présence de gp150 rend le virus dépendant à la présence des GAGs pour l'infection. En effet, l'interaction entre gp150 et les GAGs est nécessaire pour exposer les épitopes clés de liaisons de gH/gL et/ou gB, camouflés par gp150. **B.** Au moment de la sortie, en l'absence de GAGs, gp150 camoufle les épitopes de liaison et prévient le lien avec les récepteurs cellulaire, favorisant ainsi la libération des particules infectieuses.

faible affinité entre gp150 et les GAGs permettrait de déplacer gp150 et d'exposer les épitopes nécessaires à la liaison. Au moment de la sortie, gp150 conserverait sa conformation initiale en l'absence d'interaction avec des GAGs. Dès lors, gp150 préviendrait la liaison aux récepteurs cellulaires et favoriserait la libération des particules lors de leur sortie de la cellule. Gp150 agirait donc comme un régulateur de l'infection et non pas comme un acteur direct de liaison. De plus, gp150 participerait de cette manière à l'orientation du cycle viral. En effet, en surface des cellules épithéliales, les GAGs sont principalement exprimés au niveau basolatéral des cellules et non pas au niveau du pôle apical (Hayashi et al., 1987). Au moment de la sortie, si le virus est libéré au pôle apical des cellules, l'absence de GAGs à ce niveau faciliterait donc la libération des particules infectieuses. Au moment de l'entrée, l'infection dépend de la présence de GAGs. Dès lors, ceci pourrait expliquer le tropisme du virus pour l'épithélium olfactif après inoculation intra-nasale, puisque cet épithélium présente la particularité d'exprimer des GAGs au niveau de son pôle apical (Milho et al., 2012). En revanche, en ce qui concerne la transmission sexuelle, les légers traumatismes induits par l'accouplement pourraient permettre l'accès aux couches basolatérales des cellules épithéliales et ainsi permettre l'infection. En ce qui concerne les homologues de gp150, un rôle similaire a été proposé pour gp350. En effet, la présence de gp350 inhibe l'infection des cellules épithéliales, et des anticorps spécifiques anti-gp350 restaurent l'infection de ces cellules (Turk et al., 2006). Pour expliquer ce phénomène, une des hypothèses proposées est que les anticorps anti-gp350 permettent d'agréger en surface du virion les glycoprotéines gp350, facilitant ainsi l'accès à des glycoprotéines impliquées dans l'entrée, normalement camouflées par gp350 (Hutt-Fletcher, 2007). Dès lors, les deux homologues pourraient jouer un rôle similaire.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'accumulation des virions gp150- en surface des cellules serait l'implication de la protéine cellulaire tétherine. Cette protéine, dont l'expression est induite par l'interféron de type I, participe à la réponse anti-virale intrinsèque en inhibant la libération des virions enveloppés après leur bourgeonnement hors de la cellule. Elle présente à chacune de ses extrémités une zone d'ancrage transmembranaire. De cette manière, elle relie les enveloppes virales à la membrane plasmique, ou relie directement les particules virales entre elles, formant des réseaux de virions en surface des cellules (Van Damme et al., 2008; Jia et al., 2015; Neil et al., 2008; Sauter, 2014). Ceci permettrait d'expliquer l'observation par microscopie électronique de multiples couches de virions en surface des cellules vaginales en l'absence de gp150 (**étude 1, figure 7**). Différentes protéines de virus enveloppés permettent d'inhiber cet effet en réduisant l'expression de la tétherine en surface cellulaire. Cela a par exemple été démontré pour le VIH (Klimkait et al., 1990; Sakai et al., 1995), mais également pour différents herpèsvirus, dont le HSV-1 (Blondeau et al., 2013) et le KSHV (Bartee et al., 2006). Dès lors, il est possible que gp150 soit impliqué dans ce mécanisme d'évasion de la réponse anti-virale intrinsèque. Cette hypothèse mériterait d'être investiguée dans le futur.

Le mécanisme impliqué dans le déficit de relargage des particules infectieuses n'a jusqu'à présent pas été démontré. Cependant, nous collaborons actuellement avec le Dr David Alsteens et Martin Delguste de l'Université Catholique de Louvain sur une étude qui se concentre sur le rôle de gp150 dans les interactions avec les GAGs. Dans cette étude, une technologie récente a été exploitée afin de mesurer avec précision les forces d'interactions entre le virus et un support. Il s'agit de la microscopie à force atomique (**Figure 18**). Brièvement, ce système est basé sur l'utilisation d'une pointe, sur laquelle l'élément à analyser est fixé. Dans notre cas, une unique particule virale y est coatée. Cette pointe est située sur un levier, qui effectue des mouvements de balancier (approche/retrait) sur une surface. Les mouvements d'approche et de retrait sont mesurés par des lasers, ce qui permet de quantifier avec précision la force avec laquelle la surface attire et retient la pointe. Cette surface est coatée avec les éléments donc on veut mesurer les forces d'interactions avec la particule virale. Cela peut être une molécule particulière ou une surface cellulaire. Dans cette étude, les interactions entre des particules virales WT et gp150- et des surfaces héparinées ont été mesurées afin de modéliser et quantifier les forces d'interaction entre la particule virale et les GAGs. Dans un second temps, des cellules épithéliales CHO, sauvages (GAGs+) ou déficientes pour l'expression de GAGs (GAGs-) ont été utilisées.

Des résultats intéressants ont dès à présent été obtenus grâce à cette technique. Premièrement, en étudiant les forces d'interactions entre les souches WT ou gp150- et une surface héparinée, il a été déterminé que 2 glycoprotéines différentes semblent être impliquées dans les liaisons aux GAGs. De plus, gp150 ne semble pas interagir avec les GAGs de manière directe durant ces interactions courtes. L'absence de gp150 ne semble donc pas modifier le type d'interaction avec les GAGs, mais bien la force de ces interactions : la souche sauvage engage préférentiellement un nombre faible d'interactions tandis que la souche gp150- présente des interactions plus nombreuses. Dès lors, gp150 ne semble pas agir comme un acteur direct de la liaison aux GAGs, mais plutôt comme un régulateur en modifiant les forces d'interactions entre les GAGs et les glycoprotéines. Deuxièmement, en utilisant des cellules GAGs+ ou GAGs-, nous avons montré que le virus WT établit plus de liaisons avec les cellules GAG- qu'avec les cellules GAGs+. Cette observation est très surprenante car elle va à l'encontre des observations faites *in vitro* dans des tests d'infectiosité virale, où le virus WT s'attache et infecte les cellules GAGs- de manière très faible. Pour expliquer ce phénomène, l'hypothèse proposée est que la souche WT initierait dans un premier temps des interactions de faible affinité avec les GAGs, invisibles dans cette expérience car trop faibles et sous le seuil de détection. Ces interactions faibles permettraient aux virus de glisser en surface de la cellule jusqu'à l'engagement de liaisons spécifiques fortes qui permettraient l'entrée du virus dans la cellule. Par contre, en l'absence de GAGs, les interactions engagées initialement seraient directement de forte affinité. Cela préviendrait le glissement du virus le long de la membrane cellulaire, à la recherche de récepteurs spécifiques nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule. A partir de cette hypothèse, un modèle a été établi, dans lequel gp150 régule les forces d'interactions avec les GAGs. En prévenant des interactions initiales avec les GAGs de trop forte affinité, gp150 permettrait au virus de



**Figure 18 : Principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique.** **A.** Une pointe fine est placée à l'extrémité d'un levier souple. Sur la pointe est fixé l'élément à analyser, par exemple une particule virale. Le levier effectue des mouvements de balancier sur une surface dont on veut mesurer les forces d'interactions avec la pointe. La déflexion du laser est mesurée à l'aide d'un laser focalisé à son extrémité et réfléchi dans un photodétecteur. **B.** La mesure des forces d'interactions entre la pointe et la surface permettent d'établir une cartographie des forces de liaison (Alsteens, 2016).



sonder la surface cellulaire et de trouver les récepteurs permettant une liaison spécifiques, nécessaires à l'entrée dans la cellule. Cependant, ce modèle reste actuellement hypothétique et repose principalement sur des modèles mathématiques. Notre objectif est donc de confirmer cette hypothèse par différentes expériences. Par exemple, il serait intéressant de mesurer l'affinité des deux souches virales pour les GAGs en effectuant un ELISA sur plaque héparinée. De plus, un système d'imagerie (microscopie TIRF – *total internal reflection fluorescence*) permettant d'observer et de mesurer *in vivo* les mouvements des particules virales en surface des cellules avant leur entrée est actuellement utilisé. Des résultats préliminaires à ce sujet semblent confirmer que les virions gp150- sont moins mobiles en surface des cellules par rapport aux virions WT, mais nécessitent encore d'être vérifiés. Ce travail pourrait donc confirmer le rôle régulateur de gp150. Ainsi, il pourrait confirmer l'hypothèse qui explique comment gp150 favorise le relargage des particules infectieuses : en effet, si gp150 camoufle les épitopes de liaison des autres glycoprotéines, il est logique que la force des interactions observées soient différentes en présence ou en l'absence de gp150.

Cette hypothèse est intéressante, mais doit être considérée avec précautions. En effet, de nombreux points doivent encore être précisés et ne permettent pas pour l'instant d'expliquer complètement les phénotypes observés *in vitro*. D'abord, si les interactions fortes en l'absence de gp150 inhibent le glissement du virus en surface de la cellule, alors la souche gp150- devrait montrer un déficit d'infection des cellules GAGs+, ce qui n'est pas observé. De même, si c'est l'absence de glissement en surface des cellules qui inhibe l'infection des cellules GAGs- par le virus WT, alors ce même phénotype devrait être observé pour le virus gp150-, puisque dans ce cas, ni les GAGs, ni gp150 ne sont présents pour moduler les forces initiales d'interaction avec la cellule. Pourtant, *in vitro*, la souche gp150- infecte les cellules GAGs- avec une efficacité largement supérieure à la souche sauvage. Finalement, comment expliquer que les interactions fortes initiées entre le virus WT et les cellules GAGs- ne permettent ni l'attachement définitif, ni l'entrée dans la cellule ? Si ces liaisons fortes sont réellement spécifiques, il semble improbable qu'elles soient insuffisantes pour au moins permettre au virus de rester lié à la cellule. Or, *in vitro*, la souche WT ne s'attache que très faiblement aux cellules GAGs- dans les tests d'attachement en culture cellulaire. Il faudrait donc vérifier si ces liaisons sont bien spécifiques. Dès lors, différents points restent à élucider dans ce modèle. Ce système innovant est cependant prometteur, car il est une opportunité intéressante pour élucider les mécanismes d'interactions entre le virus et la cellule ainsi que les protéines impliquées, mais il nécessite d'être combiné avec des expériences biologiques permettant de confirmer les effets observés.

Dans la seconde étude de ce travail, nous avons utilisé un traitement anti-viral afin de prévenir la transmission du MuHV-4. En effet, à ce jour, la pertinence de l'utilisation des molécules anti-virales dans le cadre du traitement des pathologies associées aux gammaherpèsvirus reste peu claire. Certaines études semblent indiquer que leur utilisation pour prévenir les cancers associés aux gammaherpèsvirus

serait plus utile qu'en traitement (Glesby et al., 1996; Schwartz, 2004). De manière similaire, comme la latence est difficile à éliminer une fois installée, un traitement en vue de prévenir l'infection pourrait être plus efficace. Dans notre étude, nous avons donc utilisé un analogue de nucléotide, le CDV, pour réduire la réexcrétion virale ou pour prévenir l'infection d'individus naïfs. Les résultats obtenus sont discutés dans les paragraphes suivants.

Dans la première partie de cette étude, le traitement journalier de souris femelles infectées a permis de réduire drastiquement la réplication et l'excrétion virale au niveau génital (**étude 2, figure 1**). Cependant, en limitant le traitement à une injection unique, cet effet n'était plus observé (**étude 2, figure 2**). Dans un premier temps, une administration journalière a été choisie puisqu'il s'agit du traitement utilisé précédemment lors d'infections *in vivo* par le MuHV-4 (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998). Pourtant, en médecine humaine, la fréquence de traitement est limitée à une administration hebdomadaire pendant deux semaines, puis à une injection toutes les deux semaines. Dès lors, nous avons voulu déterminer si une réduction de la fréquence d'administration permettait de conserver cet effet anti-viral. En utilisant une seule administration de CDV, effectuée avant le début de l'excrétion génitale, une réduction significative de la réplication au niveau génital n'était plus observée. Il semble donc qu'en limitant le traitement à une injection unique, la concentration atteinte n'est pas suffisante pour inhiber la réplication virale durant toute la durée potentielle d'excrétion génitale, c'est-à-dire une semaine. La distribution et la biodisponibilité du CDV ont été étudiées par le passé : même après l'élimination des composants extracellulaires du CDV, son effet anti-viral persiste (Neyts et al., 1991), grâce à la longue demi-vie des métabolites intracellulaires (Aduma et al., 1995). Dès lors, en clinique, même lorsque la concentration plasmatique en CDV passe sous le seuil d'activité, les niveaux intracellulaires de ses métabolites restent suffisants pour inhiber la réplication virale (Snoeck et al., 1994). Cependant, la durée de demi-vie intracellulaire chez la souris, et donc la fréquence d'administration nécessaire pour rester au-dessus de ce seuil, ne sont pas déterminées avec précision. Précédemment, le traitement de souris immunodéprimées infectées par le MuHV-4 avec une dose identique à celle utilisée dans cette étude, durant 5 semaines consécutives, à raison de 5 jours de traitement par semaine, a permis d'inhiber la réapparition des signes cliniques jusqu'à 4 semaines après l'arrêt des injections, démontrant ainsi la longue durée d'activité du CDV (Neyts and De Clercq, 1998). La différence avec notre propre design expérimental est probablement que nous n'avons utilisé qu'une seule administration de CDV, ce qui ne permettrait pas un chargement suffisant des cellules en métabolites afin de conserver une longue durée d'activité. Cependant, même si la fréquence d'administration requise chez les souris n'est pas déterminée précisément, il n'est probablement pas nécessaire de l'étudier plus en détails, puisque cette fréquence est connue chez l'espèce cible, c'est-à-dire l'homme. L'élément à retenir de cette première partie est donc que l'activité du CDV permet de réduire significativement l'excrétion virale au niveau génital.

Dans la seconde partie de l'étude, des mâles naïfs ont reçu un traitement préventif afin de prévenir leur infection lors d'un contact sexuel avec des femelles excréant le virus au niveau génital. Ces mâles ont reçu soit un traitement journalier, administré à partir du 15<sup>ème</sup> jour et durant toute la période de contact potentiel avec le virus, soit une seule injection, administrée en pré-exposition. A nouveau, on observe qu'une seule injection de CDV est insuffisante pour induire un effet protecteur, comme discuté ci-dessus (**étude 2, figure 4**). Par contre, le traitement journalier permet de bloquer complètement la transmission (**étude 2, figure 3**). Dans ce cas, l'efficacité du CDV pour réduire la réplication virale est stérilisante et permet de prévenir l'installation de la latence. Or, même une faible dose infectieuse induit un état de latence similaire (Tibbetts et al., 2003). Dès lors, pour prévenir complètement l'établissement de la latence, l'efficacité du CDV doit être très élevée et permettre d'inhiber toute réplication virale au niveau du site d'entrée. Cette observation est intéressante, puisque dans les conditions actuelles, aucun autre système ne permet d'atteindre un tel niveau de protection contre les herpèsvirus.

Dans la troisième partie, un traitement unique, administré 24h après l'exposition au virus, réduit significativement la transmission (**étude 2, figure 5**). Cependant, même si la réduction de la réplication lytique observée au niveau génital est significative, l'influence sur l'établissement de la latence est moins claire et reste non significative. Dans le futur, cette expérience sera donc répétée afin d'augmenter les effectifs pour pouvoir mettre en évidence une différence significative si elle existe.

Au-delà des résultats obtenus, différents points semblent intéressants à discuter. Le premier point à aborder est le choix du CDV pour cette étude. Tout d'abord, il s'agit d'une molécule de choix en termes d'activité contre les herpèsvirus en général, et en particulier contre les gammaherpèsvirus. En effet, différentes études démontrent l'activité du CDV *in vitro* contre l'EBV (Coen et al., 2013b; Friedrichs et al., 2004), le KSHV (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998) et le MuHV-4 (Coen et al., 2013b; Neyts and De Clercq, 1998). Dans ces études, il est démontré que le CDV a une activité particulièrement élevée par rapport aux autres molécules aux propriétés anti-herpétiques connues telles que les analogues de nucléoside ou le foscarnet. Différentes études *in vivo* démontrent également l'activité du CDV contre le MuHV-4 chez des souris immunodéprimées (Neyts and De Clercq, 1998), où le CDV permet de réduire la mortalité associée à l'infection, et des souris immunocompétentes (Coen et al., 2013b), où le CDV permet de réduire la réplication lytique primaire. Le CDV est dès lors une molécule de choix dans la lutte contre les gammaherpèsvirus.

Ensuite, l'absence d'émergence en clinique de souches résistantes au CDV en fait un candidat intéressant. En effet, dans le cadre des traitements des pathologies associées aux gammaherpèsvirus, il est intéressant d'utiliser ce type de molécule, puisque ces maladies sont principalement associées à un statut d'immunosuppression et nécessitent des traitements de longues durées, favorables au développement de résistances. Jusqu'à ce jour, des souches résistantes au CDV ont pu être isolées *in*

*vitro*, mais leur atténuation rend improbable leur émergence en clinique (Andrei et al., 2000; Cihlar et al., 1998; Coen et al., 2014).

Les problèmes majeurs liés au choix du CDV sont sa faible biodisponibilité orale et sa néphrotoxicité. Actuellement, de nombreuses molécules sont en cours de développement, précurseurs ou dérivés du CDV, qui favorisent une administration par voie orale et/ou réduisent la toxicité rénale de la molécule, tout en conservant son activité anti-virale (De Clercq and Holy, 2005; Jordheim et al., 2013). Ces molécules ne sont actuellement pas approuvées pour le traitement de pathologies humaines. Cependant, l'avenir de cette classe de molécules est prometteur, notamment en termes de prévention, grâce au développement de molécules sûres, pouvant être utilisées sur de longues périodes, tout en limitant le risque de développement de résistances.

Une autre alternative qui permettrait de contourner les problèmes de biodisponibilité orale et de néphrotoxicité serait une utilisation topique de la molécule. En effet, ce type de traitement permettrait d'obtenir une concentration locale élevée, sans avoir recours à une administration par injection, et en limitant les effets secondaires liés au traitement. Dès lors, une administration intra-vaginale afin de réduire la réexcrétion du virus chez les souris femelles serait intéressante à envisager. Ce type de traitement a déjà été exploité dans de précédentes études dans le contexte d'infection par des alphaherpèsvirus. Par exemple, l'utilisation topique de ténofovir de manière intra-vaginale permet d'obtenir une concentration suffisante pour observer une activité élevée contre le HSV-2 et prévenir l'infection des femmes traitées alors qu'une administration systémique ne permet d'obtenir que des concentrations trop faible pour exhiber une activité anti-herpétique (Abdool Karim et al., 2015; Andrei et al., 2011). De même, une administration intra-vaginale de CDV pour traiter les infections liées au CpHV-1 (*caprine herpesvirus 1*) permet de réduire les signes cliniques associés à l'infection ainsi que la réexcrétion du virus (Tempesta et al., 2007a, 2007b, 2008). Dès lors, ce type de traitement à base de CDV pourrait être intéressant à envisager dans notre modèle.

Un second point important à aborder est la relevance des observations effectuées dans cette étude. En effet, les effets du CDV observés sont intéressants et concluants. Toutefois, sont-ils applicables en médecine humaine ? Est-il intéressant de traiter de manière préventive des patients pour prévenir l'infection par les gammaherpèsvirus ? Les gammaherpèsvirus sont associés à différentes pathologies chez l'homme, ce qui rend leur prévention importante. D'abord, l'EBV, bien que largement asymptomatique, peut être associé au développement de la mononucléose infectieuse lorsque la primo-infection est tardive. Or, dans les pays développés, l'hygiène croissante recule l'âge de la primo-infection et provoque une augmentation de la fréquence de la mononucléose infectieuse. Bien que bénigne dans la plupart des cas, cette pathologie peut être associée à de la fatigue chronique, pouvant persister jusqu'à 6 mois après la primo-infection, et dans de rares cas, elle peut être associée à des complications plus graves telles que des troubles neurologiques ou hépatiques (Cohen, 2015). Dès lors,

prévenir l'apparition de cette pathologie peut être intéressant. De plus, les gammaherpèsvirus sont associés au développement de pathologies cancéreuses en cas d'immunosuppression, notamment chez les patients sidéens. Il existe d'ailleurs un lien étroit entre les pathogénies des herpèsvirus et du VIH. En effet, il a été démontré que certains herpèsvirus humains étaient des facteurs de risque pour l'acquisition du VIH. Par exemple, ce lien est clairement démontré pour le HSV-2 : la réactivation virale au niveau génital induit un afflux de cellules T CD4+ dans le système génital, amenant ainsi de nombreuses cibles d'infection pour le VIH au niveau de sa porte d'entrée (Barnabas et al., 2011; Reynolds and Quinn, 2005). Ce lien n'est pas démontré pour les gammaherpèsvirus, mais un phénomène similaire existe probablement (Munawwar and Singh, 2016). Les herpèsvirus favorisent donc l'entrée du VIH et sa multiplication. En retour, l'immunosuppression liée au SIDA entraîne la réactivation des herpèsvirus et le développement de pathologies cancéreuses dans le cas des gammaherpèsvirus. Dans le cadre de la prévention du VIH et des pathologies associées, la prévention de la transmission des gammaherpèsvirus est donc essentielle. Finalement, différentes études semblent indiquer un lien entre l'EBV et le développement de la sclérose en plaque (SEP). En effet, les personnes séropositives pour l'EBV présentent un risque supérieur de développer la SEP, et ce risque est encore accru lorsque la primo-infection est associée à une mononucléose infectieuse (Burnard et al., 2017). Tous ces éléments confirment donc l'importance de prévenir l'infection par les gammaherpèsvirus. Toutefois, de récentes observations indiquent que l'infection par les gammaherpèsvirus durant l'enfance pourrait influencer la réponse immunitaire de manière durable. En effet, une étude menée dans notre laboratoire démontre que l'infection par le MuHV-4 permet de protéger contre le développement de l'asthme en marquant le système immunitaire de manière durable. Cette observation vient s'inscrire dans une théorie plus générale, l'hypothèse de l'hygiène, qui établit que les conditions d'hygiène grandissantes dans les pays développés et la réduction de l'exposition à différents agents pathogènes durant l'enfance induisent une plus grande susceptibilité du système immunitaire au développement de pathologies de type Th2. Dès lors, l'infection précoce par les gammaherpèsvirus pourrait, dans certaines conditions, être favorable.

Pour conclure, la prévention de la transmission des gammaherpèsvirus est intéressante dans de nombreux cas, mais doit probablement être ciblée dans certaines populations à risque. Notamment, les personnes immunodéprimées qui n'ont pas encore développé ces infections devraient être protégées en particulier. En effet, l'acquisition de ces pathogènes après l'installation d'une immunosuppression favorise particulièrement le développement des pathologies cancéreuses associées (Cohen, 2015). De plus, une acquisition tardive de l'EBV devrait être limitée. En effet, une séroconversion tardive limite les effets positifs potentiels sur le système immunitaire, et le développement de la mononucléose infectieuse associé à la primo-infection augmente le risque de développement de cancers (Cohen, 2015; Smith et al., 2011) et de SEP (Burnard et al., 2017).

Pour résumer, ce travail a permis de démontrer l'implication essentielle d'une glycoprotéine virale du MuHV-4 pendant la transmission par voie sexuelle et a permis d'élaborer un système efficace pour limiter la transmission, basé sur l'utilisation d'une molécule anti-virale. Ce travail a donc permis d'exploiter un modèle de transmission par voie sexuelle établi précédemment (Francois et al., 2013) et ouvre de nouvelles perspectives pour des études futures. En effet, si l'importance de gp150 au cours de la transmission est maintenant établie, ce modèle permet d'étudier l'impact d'autres glycoprotéines virales potentiellement impliquées lors de l'entrée dans la cellule, en utilisant différents virus mutants. De plus, si l'entrée du MuHV-4 dans l'organisme est maintenant bien décrite, ces observations restent basées sur un modèle d'inoculation expérimentale. Cette transmission naturelle représente dès lors une opportunité intéressante afin d'étudier les voies d'entrée et de dissémination dans l'organisme dans des conditions plus physiologiques, notamment en utilisant le système de marquage Cre/lox décrit plus haut. Finalement, ce modèle permettra dans le futur de tester l'efficacité de nouveaux moyens permettant de réduire la transmission, basés sur de nouvelles molécules anti-virales ou sur l'élaboration de vaccins. Ce travail a donc permis de démontrer l'opportunité unique représentée par l'élaboration d'un modèle de transmission d'un gammaherpèsvirus en laboratoire.

---

# Bibliographie

---

Abdool Karim, S.S., Abdool Karim, Q., Kharsany, A.B., Baxter, C., Grobler, A.C., Werner, L., Kashuba, A., Mansoor, L.E., Samsunder, N., Mindel, A., et al. (2015). Tenofovir Gel for the Prevention of Herpes Simplex Virus Type 2 Infection. *N. Engl. J. Med.* 373, 530–539.

Ackermann, M. (2006). Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. In *Veterinary Microbiology*, pp. 211–222.

Adler, H., Messerle, M., Wagner, M., and Koszinowski, U.H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* 74, 6964–6974.

Adler, H., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (2001). Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J Virol* 75, 5692–5696.

Adler, H., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.* 13, 111–121.

Aduma, P., Connelly, M.C., Srinivas, R. V, and Fridland, A. (1995). Metabolic diversity and antiviral activities of acyclic nucleoside phosphonates. *Mol. Pharmacol.* 47, 816–822.

Afshar, K., Rao, A.P., Patel, V., Forrester, K., and Ganesh, S. (2011). Use of Foscarnet Therapy for EBV Infection following Control of PTLD with Enhancement of Cellular Immunity in a Lung-Transplant Recipient. *J. Transplant.* 2011, 919651.

Akula, S.M., Wang, F.Z., Vieira, J., and Chandran, B. (2001). Human herpesvirus 8 interaction with target cells involves heparan sulfate. *Virology* 282, 245–255.

Akula, S.M., Pramod, N.P., Wang, F.Z., and Chandran, B. (2002). Integrin  $\alpha 3\beta 1$  (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell* 108, 407–419.

Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Esnouf, R., Fiten, P., and Opdenakker, G. (2000). Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. *J. Gen. Virol.* 81, 639–648.

Andrei, G., Lisco, A., Vanpouille, C., Introini, A., Balestra, E., van den Oord, J., Cihlar, T., Perno, C.F., Snoeck, R., Margolis, L., et al. (2011). Topical tenofovir, a microbicide effective against



HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication. *Cell Host Microbe* 10, 379–389.

Andreoni, M., Goletti, D., Pezzotti, P., Pozzetto, A., Monini, P., Sarmati, L., Farchi, F., Tisone, G., Piazza, A., Pisani, F., et al. (2001). Prevalence, incidence and correlates of HHV-8/KSHV infection and Kaposi's sarcoma in renal and liver transplant recipients. *J. Infect.* 43, 195–199.

Backovic, M., DuBois, R.M., Cockburn, J.J., Sharff, A.J., Vaney, M.-C., Granzow, H., Klupp, B.G., Bricogne, G., Mettenleiter, T.C., and Rey, F.A. (2010). Structure of a core fragment of glycoprotein H from pseudorabies virus in complex with antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22635–22640.

Bacon, T.H., and Boyd, M.R. (1995). Activity of penciclovir against Epstein-Barr virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1599–1602.

Bacon, T.H., Howard, B.A., Spender, L.C., and Boyd, M.R. (1996). Activity of penciclovir in antiviral assays against herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 37, 303–313.

Baigent, S.J., Petherbridge, L.J., Smith, L.P., Zhao, Y., Chesters, P.M., and Nair, V.K. (2006). Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *J. Gen. Virol.* 87, 769–776.

Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J. Virol.* 75, 3250–3258.

Ballestas, M.E., Chatis, P.A., and Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284, 641–644.

Barbera, A.J., Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2004). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 N terminus is essential for chromosome association, DNA replication, and episome persistence. *J. Virol.* 78, 294–301.

Barbera, A.J., Chodaparambil, J. V, Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J.C., Luger, K., and Kaye, K.M. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856–861.

Barnabas, R. V, Wasserheit, J.N., Huang, Y., Janes, H., Morrow, R., Fuchs, J., Mark, K.E., Casapia, M., Mehrotra, D. V, Buchbinder, S.P., et al. (2011). Impact of Herpes Simplex Virus Type 2 on HIV-1 Acquisition and Progression in an HIV Vaccine Trial (the Step Study). *JAIDS J. Acquir.*

Immune Defic. Syndr. 57, 238–244.

Bartee, E., McCormack, A., and Früh, K. (2006). Quantitative Membrane Proteomics Reveals New Cellular Targets of Viral Immune Modulators. *PLoS Pathog.* 2, e107.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.

Barton, E., Mandal, P., and Speck, S.H. (2011). Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 351–397.

Bechtel, J.T., Liang, Y., Hvidding, J., and Ganem, D. (2003). Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J. Virol.* 77, 6474–6481.

Beral, V., Peterman, T.A., Berkelman, R.L., and Jaffe, H.W. (1990). Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet (London, England)* 335, 123–128.

Bidanset, D.J., Beadle, J.R., Wan, W.B., Hostetler, K.Y., and Kern, E.R. (2004). Oral Activity of Ether Lipid Ester Prodrugs of Cidofovir against Experimental Human Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* 190, 499–503.

Bigalke, J.M., and Heldwein, E.E. (2016). Nuclear Exodus: Herpesviruses Lead the Way. *Annu. Rev. Virol.* 3, 387–409.

Birkmann, A., Mahr, K., Ensser, A., Yağuboğlu, S., Titgemeyer, F., Fleckenstein, B., and Neipel, F. (2001). Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J. Virol.* 75, 11583–11593.

Birkus, G., Hájek, M., Kramata, P., Votruba, I., Holý, A., and Otová, B. (2002). Tenofovir diphosphate is a poor substrate and a weak inhibitor of rat DNA polymerases alpha, delta, and epsilon\*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1610–1613.

Blasdell, K., McCracken, C., Morris, A., Nash, A.A., Begon, M., Bennett, M., and Stewart, J.P. (2003). The wood mouse is a natural host for Murid herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.* 84, 111–113.

Blaskovic, D., Stancekova, M., Svobodova, J., and Mistrikova, J. (1980). Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* 24, 468.

Blondeau, C., Pelchen-Matthews, A., Mlcochova, P., Marsh, M., Milne, R.S.B., and Towers, G.J. (2013). Tetherin Restricts Herpes Simplex Virus 1 and Is Antagonized by Glycoprotein M. *J. Virol.*

87, 13124–13133.

Bloom, D.C. (2016). Alphaherpesvirus Latency: A Dynamic State of Transcription and Reactivation. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press), pp. 53–80.

Bogerd, H.P., Karnowski, H.W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., and Cullen, B.R. (2010). A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Mol. Cell* 37, 135–142.

Boname, J.M., Coleman, H.M., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2004). Protection against wild-type murine gammaherpesvirus-68 latency by a latency-deficient mutant. *J. Gen. Virol.* 85, 131–135.

Boonnak, K., Slike, B.M., Burgess, T.H., Mason, R.M., Wu, S.J., Sun, P., Porter, K., Rudiman, I.F., Yuwono, D., Puthavathana, P., et al. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 82, 3939–3951.

Bortz, E., Whitelegge, J.P., Jia, Q., Zhou, Z.H., Stewart, J.P., Wu, T.-T., and Sun, R. (2003). Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J. Virol.* 77, 13425–13432.

Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat. Med.* 8, 594–599.

Borza, C.M., Morgan, A.J., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2004). Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J. Virol.* 78, 5007–5014.

Bouma, A. (2005). Determination of the effectiveness of Pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals* 33, 241–245.

Bounaadja, L., Piret, J., Goyette, N., and Boivin, G. (2013). Evaluation of Epstein-Barr Virus, Human Herpesvirus 6 (HHV-6), and HHV-8 Antiviral Drug Susceptibilities by Use of Real-Time-PCR-Based Assays. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1244–1246.

Brandtzaeg, P., and Johansen, F.E. (2005). Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206, 32–63.

Burnard, S., Lechner-Scott, J., and Scott, R.J. (2017). EBV and MS: Major cause, minor contribution or red-herring? *Mult. Scler. Relat. Disord.* 16, 24–30.

Callan, M.F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J.D., Moss, P.A., Gillespie, G.M., Bell, J.I.,

Rickinson, A.B., and McMichael, A.J. (1996). Large clonal expansions of CD8<sup>+</sup> T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat. Med.* 2, 906–911.

Casper, C., and Wald, A. (2007). The use of antiviral drugs in the prevention and treatment of Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease and primary effusion lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 312, 289–307.

Cesarman, E. (2011). Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* 305, 163–174.

Cesarman, E. (2014). Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 349–372.

Cesarman, E., Nador, R.G., Bai, F., Bohenzky, R.A., Russo, J.J., Moore, P.S., Chang, Y., and Knowles, D.M. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J. Virol.* 70, 8218–8223.

Cha, H.-R.R., Ko, H.-J.J., Kim, E.-D.D., Chang, S.-Y.Y., Seo, S.-U.U., Cuburu, N., Ryu, S., Kim, S., and Kweon, M.-N.N. (2011). Mucosa-associated epithelial chemokine/CCL28 expression in the uterus attracts CCR10<sup>+</sup> IgA plasma cells following mucosal vaccination via estrogen control. *J Immunol* 187, 3044–3052.

Chakraborty, S., ValiyaVeetil, M., Sadagopan, S., Paudel, N., and Chandran, B. (2011). c-Cbl-Mediated Selective Virus-Receptor Translocations into Lipid Rafts Regulate Productive Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection in Endothelial Cells. *J. Virol.* 85, 12410–12430.

Chandran, B., and Hutt-Fletcher, L. (2007). Gammaherpesviruses entry and early events during infection (Cambridge University Press).

Chandran, B., Bloomer, C., Chan, S.R., Zhu, L., Goldstein, E., and Horvat, R. (1998). Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology* 249, 140–149.

Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865–1869.

Chastel, C., Beaucournu, J.P., Chastel, O., Legrand, M.C., and Le Goff, F. (1994). A herpesvirus

from an European shrew (*Crocidura russula*). *Acta Virol.* 38, 309.

Chen, J., Rowe, C.L., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2012). The KGD Motif of Epstein-Barr Virus gH/gL Is Bifunctional, Orchestrating Infection of B Cells and Epithelial Cells. *MBio* 3, e00290-11-e00290-11.

Chesnokova, L.S., and Hutt-Fletcher, L.M. (2011). Fusion of Epstein-Barr virus with epithelial cells can be triggered by alphavbeta5 in addition to alphavbeta6 and alphavbeta8, and integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gHgL. *J Virol* 85, 13214–13223.

Chesnokova, L.S., Nishimura, S.L., and Hutt-Fletcher, L.M. (2009). Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins  $\alpha 6$  or  $\alpha 8$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20464–20469.

Chesnokova, L.S., Valencia, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2016). The BDLF3 gene product of Epstein-Barr virus, gp150, mediates non-productive binding to heparan sulfate on epithelial cells and only the binding domain of CD21 is required for infection. *Virology* 494, 23–28.

Chowdary, T.K., Cairns, T.M., Atanasiu, D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Heldwein, E.E. (2010). Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH–gL. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 882–888.

Cihlar, T., Fuller, M.D., Mulato, A.S., and Cherrington, J.M. (1998). A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology* 248, 382–393.

De Clercq, E. (1993). Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. *Adv. Virus Res.* 42, 1–55.

De Clercq, E. (2003). Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 1, 21–43.

De Clercq, E. (2005). Antiviral drug discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res.* 67, 56–75.

De Clercq, E. (2011). The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. *Biochem. Pharmacol.* 82, 99–109.

De Clercq, E., and Holy, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 928–940.

De Clercq, E., and Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747.

Coen, N., Singh, U., Vuyyuru, V., Van den Oord, J.J., Balzarini, J., Duraffour, S., Snoeck, R., Cheng, Y.C., Chu, C.K., and Andrei, G. (2013a). Activity and Mechanism of Action of HDVD, a Novel Pyrimidine Nucleoside Derivative with High Levels of Selectivity and Potency against Gammaherpesviruses. *J. Virol.* 87, 3839–3851.

Coen, N., Duraffour, S., Naesens, L., Krecmerova, M., Van den Oord, J., Snoeck, R., and Andrei, G. (2013b). Evaluation of Novel Acyclic Nucleoside Phosphonates against Human and Animal Gammaherpesviruses Revealed an Altered Metabolism of Cyclic Prodrugs upon Epstein-Barr Virus Reactivation in P3HR-1 Cells. *J. Virol.* 87, 12422–12432.

Coen, N., Duraffour, S., Snoeck, R., and Andrei, G. (2014). KSHV Targeted Therapy: An Update on Inhibitors of Viral Lytic Replication. *Viruses* 6, 4731–4759.

Cohen, J.I. (2015). Epstein-barr virus vaccines. *Clin. Transl. Immunol.* 4, e32.

Cohen, S., Au, S., and Panté, N. (2011). How viruses access the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 1634–1645.

Cohrs, R.J., and Gilden, D.H. (2001). Human herpesvirus latency. *Brain Pathol.* 11, 465–474.

Connolly, S.A., Jackson, J.O., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 369–381.

Cooley, A.J., Taus, N.S., and Li, H. (2008). Development of a management program for a mixed species wildlife park following an occurrence of malignant catarrhal fever. *J. Zoo Wildl. Med.* 39, 380–385.

Corey, L., Wald, A., Patel, R., Sacks, S.L., Tying, S.K., Warren, T., Douglas, J.M., Paavonen, J., Morrow, R.A., Beutner, K.R., et al. (2004). Once-Daily Valacyclovir to Reduce the Risk of Transmission of Genital Herpes. *N. Engl. J. Med.* 350, 11–20.

Correia, B., Cerqueira, S.A., Beauchemin, C., Pires de Miranda, M., Li, S., Ponnusamy, R., Rodrigues, L., Schneider, T.R., Carrondo, M.A., Kaye, K.M., et al. (2013). Crystal structure of the gamma-2 herpesvirus LANA DNA binding domain identifies charged surface residues which impact viral latency. *PLoS Pathog.* 9, e1003673.

Crumpacker, C.S. (1992). Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am. J.*

Med. 92, 3S–7S.

Crumpacker, C.S. (2004). Use of antiviral drugs to prevent herpesvirus transmission. *N. Engl. J. Med.* 350, 67–68.

Crute, J.J., Grygon, C.A., Hargrave, K.D., Simoneau, B., Faucher, A.-M., Bolger, G., Kibler, P., Liuzzi, M., and Cordingley, M.G. (2002). Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nat. Med.* 8, 386–391.

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host Microbe* 3, 245–252.

Davies, M.L., Xu, S., Lyons-Weiler, J., Rosendorff, A., Webber, S.A., Wasil, L.R., Metes, D., and Rowe, D.T. (2010). Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology* 400, 53–67.

Davison, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 143, 52.

Davison, A.J. (2011). Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1230, E37–E49.

Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., and Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177.

Diebel, K.W., Smith, A.L., and van Dyk, L.F. (2010). Mature and functional viral miRNAs transcribed from novel RNA polymerase III promoters. *RNA* 16, 170–185.

Diebel, K.W., Claypool, D.J., and van Dyk, L.F. (2014). A conserved RNA polymerase III promoter required for gammaherpesvirus TMER transcription and microRNA processing. *Gene* 544, 8–18.

Diehl, W.E., Lin, A.E., Grubaugh, N.D., Carvalho, L.M., Kim, K., Kyawe, P.P., McCauley, S.M., Donnard, E., Kucukural, A., McDonel, P., et al. (2016). Ebola Virus Glycoprotein with Increased Infectivity Dominated the 2013–2016 Epidemic. *Cell* 167, 1088–1098.e6.

Dittmer, D., Lagunoff, M., Renne, R., Staskus, K., Haase, A., and Ganem, D. (1998). A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 72, 8309–8315.

Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., and Sodeik, B. (2002). Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *Mol. Biol. Cell* 13, 2795–2809.

Döhner, K., and Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 67–108.

Donofrio, G., Cavirani, S., van Santen, V., and Flammini, C.F. (2005). Potential Secondary Pathogenic Role for Bovine Herpesvirus 4. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3421–3426.

Dubin, G., and Jiang, H. (1995). Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes. *J. Virol.* 69, 4564–4568.

Dunmire, S.K., Grimm, J.M., Schmeling, D.O., Balfour, H.H., and Hogquist, K.A. (2015). The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog.* 11, e1005286.

van Dyk, L.F., Hess, J.L., Katz, J.D., Jacoby, M., Speck, S.H., and Virgin HW, I. V (1999). The murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin gene is an oncogene that promotes cell cycle progression in primary lymphocytes. *J. Virol.* 73, 5110–5122.

Efstathiou, S., Ho, Y.M., and Minson, A.C. (1990). Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome. *J. Gen. Virol.* 71, 1355–1364.

El-Gogo, S., Flach, B., Staib, C., Sutter, G., and Adler, H. (2008). In vivo attenuation of recombinant murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68) is due to the expression and immunogenicity but not to the insertion of foreign sequences. *Virology* 380, 322–327.

Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). virus particles in cultures lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet* 28, 702–703.

Farrell, H.E., Lawler, C., Tan, C.S.E., MacDonald, K., Bruce, K., Mach, M., Davis-Poynter, N., and Stevenson, P.G. (2016). Murine Cytomegalovirus Exploits Olfaction To Enter New Hosts. *MBio* 7, e00251-16.

Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., and Fearon, D.T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4510–4514.



Flano, E., Husain, S.M., Sample, J.T., Woodland, D.L., and Blackman, M.A. (2000). Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J Immunol* *165*, 1074–1081.

Fowler, P., and Efstathiou, S. (2004). Vaccine potential of a murine gammaherpesvirus-68 mutant deficient for ORF73. *J. Gen. Virol.* *85*, 609–613.

Francois, S., Vidick, S., Sarlet, M., Michaux, J., Koteja, P., Desmecht, D., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2010). Comparative study of murid gammaherpesvirus 4 infection in mice and in a natural host, bank voles. *J Gen Virol* *91*, 2553–2563.

Francois, S., Vidick, S., Sarlet, M., Desmecht, D., Drion, P., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2013). Illumination of murine gammaherpesvirus-68 cycle reveals a sexual transmission route from females to males in laboratory mice. *PLoS Pathog* *9*, e1003292.

Frederico, B., Milho, R., May, J.S., Gillet, L., and Stevenson, P.G. (2012). Myeloid infection links epithelial and B cell tropisms of Murid Herpesvirus-4. *PLoS Pathog* *8*, e1002935.

Frederico, B., Chao, B., May, J.S., Belz, G.T., and Stevenson, P.G. (2014). A murid gamma-herpesviruses exploits normal splenic immune communication routes for systemic spread. *Cell Host Microbe* *15*, 457–470.

Friedrichs, C., Neyts, J., Gaspar, G., De Clercq, E., and Wutzler, P. (2004). Evaluation of antiviral activity against human herpesvirus 8 (HHV-8) and Epstein-Barr virus (EBV) by a quantitative real-time PCR assay. *Antiviral Res.* *62*, 121–123.

Frontoso, R., Autorino, G.L., Friedrich, K.G., Li, H., Eleni, C., Cocumelli, C., Di Cerbo, P., Manna, G., and Scicluna, M.T. (2016). An Acute Multispecies Episode of Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever in Captive Wild Animals in an Italian Zoo. *Transbound. Emerg. Dis.* *63*, 621–627.

Gangappa, S., van Dyk, L.F., Jewett, T.J., Speck, S.H., and Virgin, H.W. (2002). Identification of the in vivo role of a viral bcl-2. *J. Exp. Med.* *195*, 931–940.

Ganor, Y., and Bomsel, M. (2011). HIV-1 transmission in the male genital tract. *Am. J. Reprod. Immunol.* *65*, 284–291.

Ganor, Y., Zhou, Z., Tudor, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Gibault, L., Thiounn, N., Tomasini, J., Wolf, J.P., and Bomsel, M. (2010). Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. *Mucosal*

Immunol. 3, 506–522.

Gantt, S., and Casper, C. (2011). Human herpesvirus 8-associated neoplasms. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 295–301.

Garrigues, H.J., Rubinchikova, Y.E., DiPersio, C.M., and Rose, T.M. (2008). Integrin V 3 Binds to the RGD Motif of Glycoprotein B of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Functions as an RGD-Dependent Entry Receptor. *J. Virol.* 82, 1570–1580.

Gaspar, M., May, J.S., Sukla, S., Frederico, B., Gill, M.B., Smith, C.M., Belz, G.T., and Stevenson, P.G. (2011). Murid herpesvirus-4 exploits dendritic cells to infect B cells. *PLoS Pathog* 7, e1002346.

Geginat, J., Paroni, M., Pagani, M., Galimberti, D., De Francesco, R., Scarpini, E., and Abrignani, S. (2017). The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol.* 38, 498–512.

Gershon, A.A. (2013). Varicella zoster vaccines and their implications for development of HSV vaccines. *Virology* 435, 29–36.

Giffin, L., and Damania, B. (2014). KSHV. In *Advances in Virus Research*, pp. 111–159.

Gill, M.B., Gillet, L., Colaco, S., May, J.S., de Lima, B.D., and Stevenson, P.G. (2006). Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 87, 1465–1475.

Gill, M.B., Edgar, R., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2008). A Gamma-Herpesvirus Glycoprotein Complex Manipulates Actin to Promote Viral Spread. *PLoS One* 3, e1808.

Gillet, L., and Stevenson, P.G. (2007). Antibody evasion by the N terminus of murid herpesvirus-4 glycoprotein B. *Embo J* 26, 5131–5142.

Gillet, L., Daix, V., Donofrio, G., Wagner, M., Koszinowski, U.H., China, B., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N., and Vanderplassen, A. (2005). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J. Gen. Virol.* 86, 907–917.

Gillet, L., Gill, M.B., Colaco, S., Smith, C.M., and Stevenson, P.G. (2006). Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein B presents a difficult neutralization target to monoclonal antibodies derived from infected mice. *J Gen Virol* 87, 3515–3527.

Gillet, L., Adler, H., and Stevenson, P.G. (2007a). Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS One* 2, e347.

Gillet, L., May, J.S., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2007b). The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS One* 2, e705.

Gillet, L., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2007c). Post-exposure vaccination improves gammaherpesvirus neutralization. *PLoS One* 2, e899.

Gillet, L., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2008a). The murid herpesvirus-4 gH/gL binds to glycosaminoglycans. *PLoS One* 3, e1669.

Gillet, L., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2008b). Glycoprotein B switches conformation during murid herpesvirus 4 entry. *J Gen Virol* 89, 1352–1363.

Gillet, L., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2008c). The Murid Herpesvirus-4 gL regulates an entry-associated conformation change in gH. *PLoS One* 3, e2811.

Gillet, L., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2009a). In vivo importance of heparan sulfate-binding glycoproteins for murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* 90, 602–613.

Gillet, L., Alenquer, M., Glauser, D.L., Colaco, S., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2009b). Glycoprotein L sets the neutralization profile of murid herpesvirus 4. *J Gen Virol* 90, 1202–1214.

Gillet, L., Frederico, B., and Stevenson, P.G. (2015). Host entry by gamma-herpesviruses—lessons from animal viruses? *Curr. Opin. Virol.* 15, 34–40.

Glauser, D.L., Kratz, A.S., Gillet, L., and Stevenson, P.G. (2011). A mechanistic basis for potent, glycoprotein B-directed gammaherpesvirus neutralization. *J Gen Virol* 92, 2020–2033.

Glauser, D.L., Kratz, A.S., and Stevenson, P.G. (2012). Herpesvirus glycoproteins undergo multiple antigenic changes before membrane fusion. *PLoS One* 7, e30152.

Glesby, M.J., Hoover, D.R., Weng, S., Graham, N.M., Phair, J.P., Detels, R., Ho, M., and Saah, A.J. (1996). Use of antiherpes drugs and the risk of Kaposi's sarcoma: data from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Infect. Dis.* 173, 1477–1480.

Gore, M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2009). The BDLF2 protein of Epstein–Barr virus is a type II glycosylated envelope protein whose processing is dependent on coexpression with the BMRF2 protein. *Virology* 383, 162–167.

Gregory, S.M., West, J.A., Dillon, P.J., Hilscher, C., Dittmer, D.P., and Damania, B. (2009). Toll-like receptor signaling controls reactivation of KSHV from latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11725–11730.

Grundhoff, A., and Ganem, D. (2003). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus permits replication of terminal repeat-containing plasmids. *J. Virol.* *77*, 2779–2783.

Gupta, S., Gach, J.S., Becerra, J.C., Phan, T.B., Pudney, J., Moldoveanu, Z., Joseph, S.B., Landucci, G., Supnet, M.J., Ping, L.H., et al. (2013). The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog* *9*, e1003776.

Gustafson, E.A., Schinazi, R.F., and Fingerroth, J.D. (2000). Human herpesvirus 8 open reading frame 21 is a thymidine and thymidylate kinase of narrow substrate specificity that efficiently phosphorylates zidovudine but not ganciclovir. *J. Virol.* *74*, 684–692.

Habison, A.C., Beauchemin, C., Simas, J.P., Usherwood, E.J., and Kaye, K.M. (2012). Murine gammaherpesvirus 68 LANA acts on terminal repeat DNA to mediate episome persistence. *J. Virol.* *86*, 11863–11876.

Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C.C., and Thorley-Lawson, D.A. (2009). The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* *5*, e1000496.

Hahn, A., Birkmann, A., Wies, E., Dorer, D., Mahr, K., Stürzl, M., Titgemeyer, F., and Neipel, F. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gH/gL: glycoprotein export and interaction with cellular receptors. *J. Virol.* *83*, 396–407.

Hakkinen, L., Koivisto, L., Larjava, H., Häkkinen, L., Koivisto, L., and Larjava, H. (2001). An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *Methods Cell Sci.* *23*, 189–196.

Halstead, S.B., Mahalingam, S., Marovich, M.A., Ubol, S., and Mosser, D.M. (2010). Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 712–722.

Zur Hausen, H., and de Villiers, E.-M. (2015). Reprint of: cancer &quot;causation&quot; by infections--individual contributions and synergistic networks. *Semin. Oncol.* *42*, 207–222.

Hayashi, K., Hayashi, M., Jalkanen, M., Firestone, J.H., Trelstad, R.L., and Bernfield, M. (1987). Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* *35*, 1079–1088.

Hayashi, K., Hayashi, M., Boutin, E., Cunha, G.R., Bernfield, M., and Trelstad, R.L. (1988). Hormonal modification of epithelial differentiation and expression of cell surface heparan sulfate proteoglycan in the mouse vaginal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Lab. Invest.* *58*, 68–76.

Heldwein, E.E., and Krummenacher, C. (2008). Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 1653–1668.

Heming, J.D., Conway, J.F., and Homa, F.L. (2017). Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. pp. 119–142.

Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *59*, 94–101.

Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., et al. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* *43*, 1147–1157.

Hetzer, M.W. (2010). The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000539–a000539.

Ho, E.S., Lin, D.C., Mendel, D.B., and Cihlar, T. (2000). Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J. Am. Soc. Nephrol.* *11*, 383–393.

Ho, H.T., Woods, K.L., Bronson, J.J., De Boeck, H., Martin, J.C., and Hitchcock, M.J. (1992). Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol. Pharmacol.* *41*, 197–202.

Hu, J., Garber, A.C., and Renne, R. (2002). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J. Virol.* *76*, 11677–11687.

Hughes, D., Kipar, A., Milligan, S.G., Cunningham, C., Sanders, M., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Efstathiou, S., Bowden, R.J., Chastel, C., et al. (2010a). Characterization of a novel wood mouse

virus related to murid herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.* *91*, 867–879.

Hughes, D.J., Kipar, A., Sample, J.T., and Stewart, J.P. (2010b). Pathogenesis of a model gammaherpesvirus in a natural host. *J Virol* *84*, 3949–3961.

Hutchens, M., and Luker, G.D. (2007). Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol* *9*, 2315–2322.

Hutt-Fletcher, L.M. (2007). Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* *81*, 7825–7832.

Hutt-Fletcher, L.M. (2015). EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virol.* *10*, 1155–1162.

Hutt-Fletcher, L.M. (2017). The Long and Complicated Relationship between Epstein-Barr Virus and Epithelial Cells. *J. Virol.* *91*, e01677-16.

Jamieson, A.T., Gentry, G.A., and Subak-Sharpe, J.H. (1974). Induction of Both Thymidine and Deoxycytidine Kinase Activity by Herpes Viruses. *J. Gen. Virol.* *24*, 465–480.

Jha, H.C., Banerjee, S., and Robertson, E.S. (2016). The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis. *Pathog. (Basel, Switzerland)* *5*, 18.

Jia, Q., Freeman, M.L., Yager, E.J., McHardy, I., Tong, L., Martinez-Guzman, D., Rickabaugh, T., Hwang, S., Blackman, M.A., Sun, R., et al. (2010). Induction of protective immunity against murine gammaherpesvirus 68 infection in the absence of viral latency. *J. Virol.* *84*, 2453–2465.

Jia, X., Zhao, Q., and Xiong, Y. (2015). HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *31*, 106–114.

Jiang, R., Scott, R.S., and Hutt-Fletcher, L.M. (2006). Epstein-Barr virus shed in saliva is high in B-cell-tropic glycoprotein gp42. *J Virol* *80*, 7281–7283.

Jiang, R., Gu, X., Nathan, C.-A., and Hutt-Fletcher, L. (2008). Laser-capture microdissection of oropharyngeal epithelium indicates restriction of Epstein-Barr virus receptor/CD21 mRNA to tonsil epithelial cells. *J. Oral Pathol. Med.* *37*, 626–633.

Jochum, S., Ruiss, R., Moosmann, A., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012). RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E1396–E1404.

Johnson, D.C., and Spear, P.G. (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus

glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.* *43*, 1102–1112.

Jordheim, L.P., Durantel, D., Zoulim, F., and Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 447–464.

Jung, J.U., Choi, J.-K., Ensser, A., and Biesinger, B. (1999). Herpesvirus saimiri as a model for gammaherpesvirus oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *9*, 231–239.

Kang, S., Jeon, C., Im, K., Song, M.J., and Min, H. (2017). Regulation of the viral life cycle by murine gammaherpesvirus 68 microRNAs. *Arch. Virol.* *162*, 657–667.

Kapadia, S.B., Levine, B., Speck, S.H., and Virgin, H.W. (2002). Critical role of complement and viral evasion of complement in acute, persistent, and latent gamma-herpesvirus infection. *Immunity* *17*, 143–155.

Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2014). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* *26*, 60–68.

Kern, E.R., Collins, D.J., Wan, W.B., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., and Quenelle, D.C. (2004). Oral Treatment of Murine Cytomegalovirus Infections with Ether Lipid Esters of Cidofovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3516–3522.

Kerur, N., Veettil, M.V., Sharma-Walia, N., Sadagopan, S., Bottero, V., Paul, A.G., and Chandran, B. (2010). Characterization of entry and infection of monocytic THP-1 cells by Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV): Role of heparan sulfate, DC-SIGN, integrins and signaling. *Virology* *406*, 103–116.

Kim, K.M., and Kopelman, R.I. (2005). Medical mystery: abdominal pain--the answer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1421-2-2.

Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U.A.K., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., et al. (2002). New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat. Med.* *8*, 392–398.

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A., and Orenstein, J.M. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* *64*, 621–629.

Kobiler, O., Drayman, N., Butin-Israeli, V., and Oppenheim, A. (2012). Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus* 3, 526–539.

Kramata, P., Votruba, I., Otová, B., and Holý, A. (1996). Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *Mol. Pharmacol.* 49, 1005–1011.

Lacy, S.A., Hitchcock, M.J., Lee, W.A., Tellier, P., and Cundy, K.C. (1998). Effect of Oral Probenecid Coadministration on the Chronic Toxicity and Pharmacokinetics of Intravenous Cidofovir in Cynomolgus Monkeys. *Toxicol. Sci.* 44, 97–106.

Laichalk, L.L., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 79, 1296–1307.

Lanier, R., Trost, L., Tippin, T., Lampert, B., Robertson, A., Foster, S., Rose, M., Painter, W., O'Mahony, R., Almond, M., et al. (2010). Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses* 2, 2740–2762.

Latif, M.B., Machiels, B., Xiao, X., Mast, J., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2015). Deletion of Murid Herpesvirus 4 ORF63 Affects the Trafficking of Incoming Capsids toward the Nucleus. *J. Virol.* 90, 2455–2472.

Lawler, C., Milho, R., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2015). Rhadinovirus host entry by cooperative infection. *PLoS Pathog.* 11, e1004761.

Lee, B.J., Koszinowski, U.H., Sarawar, S.R., and Adler, H. (2003). A gammaherpesvirus G protein-coupled receptor homologue is required for increased viral replication in response to chemokines and efficient reactivation from latency. *J. Immunol.* 170, 243–251.

Li, M., MacKey, J., Czajak, S.C., Desrosiers, R.C., Lackner, A.A., and Jung, J.U. (1999). Identification and characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 virion glycoprotein. *J. Virol.* 73, 1341–1349.

Liang, X., Collins, C.M., Mendel, J.B., Iwakoshi, N.N., and Speck, S.H. (2009). Gammaherpesvirus-Driven Plasma Cell Differentiation Regulates Virus Reactivation from Latently Infected B Lymphocytes. *PLoS Pathog.* 5, e1000677.

Lieberman, P.M. (2013). Keeping it quiet: chromatin control of gammaherpesvirus latency. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 863–875.



Lim, C., Choi, C., and Choe, J. (2004). Mitotic chromosome-binding activity of latency-associated nuclear antigen 1 is required for DNA replication from terminal repeat sequence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 78, 7248–7256.

de Lima, B.D., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2004). Murine Gammaherpesvirus 68 Lacking gp150 Shows Defective Virion Release but Establishes Normal Latency In Vivo. *J. Virol.* 78, 5103–5112.

de Lima, B.D., May, J.S., Marques, S., Simas, J.P., and Stevenson, P.G. (2005). Murine gammaherpesvirus 68 bcl-2 homologue contributes to latency establishment in vivo. *J. Gen. Virol.* 86, 31–40.

Lin, J.C., De Clercq, E., and Pagano, J.S. (1991). Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs, including (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2440–2443.

Long, M.C., Bidanset, D.J., Williams, S.L., Kushner, N.L., and Kern, E.R. (2003). Determination of antiviral efficacy against lymphotropic herpesviruses utilizing flow cytometry. *Antiviral Res.* 58, 149–157.

Lu, F., Tsai, K., Chen, H.-S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R. V., Showe, L., Domsic, J., Marmorstein, R., and Lieberman, P.M. (2012). Identification of host-chromosome binding sites and candidate gene targets for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA. *J. Virol.* 86, 5752–5762.

Luna, R.E., Zhou, F., Baghian, A., Chouljenko, V., Forghani, B., Gao, S.J., and Kousoulas, K.G. (2004). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein K8.1 is dispensable for virus entry. *J. Virol.* 78, 6389–6398.

Machiels, B., Lete, C., de Fays, K., Mast, J., Dewals, B., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2011a). The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *J. Virol.* 85, 1011–1024.

Machiels, B., Lete, C., Guillaume, A., Mast, J., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2011b). Antibody evasion by a gammaherpesvirus O-glycan shield. *PLoS Pathog* 7, e1002387.

Machiels, B., Stevenson, P.G., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2013). A gammaherpesvirus uses alternative splicing to regulate its tropism and its sensitivity to neutralization. *PLoS Pathog* 9, e1003753.

Markham, A., and Faulds, D. (1994). Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 48, 455–484.

Mast, J., Nanbru, C., van den Berg, T., and Meulemans, G. (2005). Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Vet. Pathol.* 42, 559–565.

Matsuura, H., Kirschner, A.N., Longnecker, R., and Jardetzky, T.S. (2010). Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22641–22646.

May, J.S., and Stevenson, P.G. (2010). Vaccination with murid herpesvirus-4 glycoprotein B reduces viral lytic replication but does not induce detectable virion neutralization. *J Gen Virol* 91, 2542–2552.

May, J.S., de Lima, B.D., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2005a). Intercellular Gamma-Herpesvirus Dissemination Involves Co-Ordinated Intracellular Membrane Protein Transport. 6.

May, J.S., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2005b). Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 79, 3459–3467.

May, J.S., Walker, J., Colaco, S., and Stevenson, P.G. (2005c). The Murine Gammaherpesvirus 68 ORF27 Gene Product Contributes to Intercellular Viral Spread. *J. Virol.* 79, 5059–5068.

May, J.S., Coleman, H.M., Boname, J.M., and Stevenson, P.G. (2005d). Murine gammaherpesvirus-68 ORF28 encodes a non-essential virion glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 86, 919–928.

May, J.S., Smith, C.M., Gill, M.B., and Stevenson, P.G. (2008). An Essential Role for the Proximal but Not the Distal Cytoplasmic Tail of Glycoprotein M in Murid Herpesvirus 4 Infection. *PLoS One* 3, e2131.

McClure, L. V, and Sullivan, C.S. (2008). Kaposi's sarcoma herpes virus taps into a host microRNA regulatory network. *Cell Host Microbe* 3, 1–3.

McGeoch, D.J., Rixon, F.J., and Davison, A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117, 90–104.

McHugh, D., Caduff, N., Barros, M.H.M., Rämer, P.C., Raykova, A., Murer, A., Landtwin, V., Quast, I., Styles, C.T., Spohn, M., et al. (2017). Persistent KSHV Infection Increases EBV-Associated Tumor Formation In Vivo via Enhanced EBV Lytic Gene Expression. *Cell Host Microbe*

22, 61–73.e7.

McShane, M.P., and Longnecker, R. (2004). Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 17474–17479.

Meerbach, A., Holy, A., Wutzler, P., De Clercq, E., and Neyts, J. (1998). Inhibitory Effects of Novel Nucleoside and Nucleotide Analogues on Epstein--Barr Virus Replication. *Antivir. Chem. Chemother.* *9*, 275–282.

Mesri, E.A., Cesarman, E., and Boshoff, C. (2010). Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 707–719.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., and Koszinowski, U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14759–14763.

Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., and Granzow, H. (2009). Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res.* *143*, 222–234.

Mettenleiter, T.C., Müller, F., Granzow, H., and Klupp, B.G. (2013). The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cell. Microbiol.* *15*, 170–178.

Milho, R., Smith, C.M., Marques, S., Alenquer, M., May, J.S., Gillet, L., Gaspar, M., Efstathiou, S., Simas, J.P., and Stevenson, P.G. (2009). In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *J Gen Virol* *90*, 21–32.

Milho, R., Frederico, B., Efstathiou, S., and Stevenson, P.G. (2012). A heparan-dependent herpesvirus targets the olfactory neuroepithelium for host entry. *PLoS Pathog* *8*, e1002986.

Miller, W.H., and Miller, R.L. (1982). Phosphorylation of acyclovir diphosphate by cellular enzymes. *Biochem. Pharmacol.* *31*, 3879–3884.

Minor, P.D. (2000). Eradication of Polio by Vaccination. *Virology* *268*, 231–232.

Mocroft, A., Youle, M., Gazzard, B., Morcinek, J., Halai, R., and Phillips, A.N. (1996). Anti-herpesvirus treatment and risk of Kaposi's sarcoma in HIV infection. Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. *AIDS* *10*, 1101–1105.

Moorman, N.J., Virgin, H.W., and Speck, S.H. (2003). Disruption of the gene encoding the

gammaHV68 v-GPCR leads to decreased efficiency of reactivation from latency. *Virology* 307, 179–190.

Morgan, A.J., and Khanna, R. (2007). Epstein–barr virus vaccines.

Moutschen, M., Léonard, P., Sokal, E.M., Smets, F., Haumont, M., Mazzu, P., Bollen, A., Denamur, F., Peeters, P., Dubin, G., et al. (2007). Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein–Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* 25, 4697–4705.

Munawwar, A., and Singh, S. (2016). Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. *J. Lab. Physicians* 8, 5–18.

Naranatt, P.P., Akula, S.M., and Chandran, B. (2002). Characterization of gamma2-human herpesvirus-8 glycoproteins gH and gL. *Arch. Virol.* 147, 1349–1370.

Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.

Nemerow, G.R., and Cooper, N.R. (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 132, 186–198.

Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V., and Cooper, N.R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61, 1416–1420.

Neutra, M.R., and Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6, 148–158.

Neyts, J., and De Clercq, E. (1997). Antiviral drug susceptibility of human herpesvirus 8. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2754–2756.

Neyts, J., and De Clercq, E. (1998). In vitro and in vivo inhibition of murine gamma herpesvirus 68 replication by selected antiviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 170–172.

Neyts, J., Snoeck, R., Balzarini, J., and De Clercq, E. (1991). Particular characteristics of the anti-human cytomegalovirus activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) in vitro. *Antiviral Res.* 16, 41–52.

Nguyen, P. V, Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Roth, K., and Kaushic, C. (2014). Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cell. Mol. Immunol.* *11*, 410–427.

Nicola, A. V. (2016). Herpesvirus Entry into Host Cells Mediated by Endosomal Low pH. *Traffic* *17*, 965–975.

O'Connor, C.M., and Kedes, D.H. (2007). Rhesus monkey rhadinovirus: a model for the study of KSHV. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *312*, 43–69.

Ogembo, J., Kannan, L., Ghiran, I., Nicholson-Weller, A., Finberg, R.W., Tsokos, G., and Fingerroth, J. (2013). Human Complement Receptor Type 1/CD35 Is an Epstein-Barr Virus Receptor. *Cell Rep.* *3*, 371–385.

Owen, D., Crump, C., and Graham, S. (2015). Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* *7*, 5084–5114.

Painter, W., Robertson, A., Trost, L.C., Godkin, S., Lampert, B., and Painter, G. (2012). First Pharmacokinetic and Safety Study in Humans of the Novel Lipid Antiviral Conjugate CMX001, a Broad-Spectrum Oral Drug Active against Double-Stranded DNA Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2726–2734.

Panté, N., and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell* *13*, 425–434.

Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* *118*, 3030–3044.

Pertel, P.E. (2002). Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *J. Virol.* *76*, 4390–4400.

Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* *2*, 269–276.

Ptaschinski, C., Wilmore, J., Fiore, N., and Rochford, R. (2010). *In Vivo* Activation of Toll-Like Receptor-9 Induces an Age-Dependent Abortive Lytic Cycle Reactivation of Murine Gammaherpesvirus-68. *Viral Immunol.* *23*, 547–555.

Quinn, L.L., Williams, L.R., White, C., Forrest, C., Zuo, J., and Rowe, M. (2015). The Missing

Link in Epstein-Barr Virus Immune Evasion: the BDLF3 Gene Induces Ubiquitination and Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II. *J. Virol.* *90*, 356–367.

Raab, M.S., Albrecht, J.C., Birkmann, A., Yaguboglu, S., Lang, D., Fleckenstein, B., and Neipel, F. (1998). The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol* *72*, 6725–6731.

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

Rappocciolo, G., Jenkins, F.J., Hensler, H.R., Piazza, P., Jais, M., Borowski, L., Watkins, S.C., and Rinaldo, C.R. (2006). DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* *176*, 1741–1749.

Rappocciolo, G., Hensler, H.R., Jais, M., Reinhart, T.A., Pegu, A., Jenkins, F.J., and Rinaldo, C.R. (2008). Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *J. Virol.* *82*, 4793–4806.

Reardon, J.E., and Spector, T. (1989). Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J. Biol. Chem.* *264*, 7405–7411.

Reese, T.A. (2016). Coinfections: Another Variable in the Herpesvirus Latency-Reactivation Dynamic. *J. Virol.* *90*, 5534–5537.

Reese, T.A., Xia, J., Johnson, L.S., Zhou, X., Zhang, W., and Virgin, H.W. (2010). Identification of Novel MicroRNA-Like Molecules Generated from Herpesvirus and Host tRNA Transcripts. *J. Virol.* *84*, 10344–10353.

Reese, T.A., Wakeman, B.S., Choi, H.S., Hufford, M.M., Huang, S.C., Zhang, X., Buck, M.D., Jezewski, A., Kambal, A., Liu, C.Y., et al. (2014). Helminth infection reactivates latent  $\gamma$ -herpesvirus via cytokine competition at a viral promoter. *Science* *345*, 573–577.

Reis Machado, J., da Silva, M.V., Cavellani, C.L., dos Reis, M.A., Monteiro, M.L.G. dos R., Teixeira, V. de P.A., and Miranda Corrêa, R.R. (2014). Mucosal immunity in the female genital tract, HIV/AIDS. *Biomed Res. Int.* *2014*, 350195.

Reynolds, S.J., and Quinn, T.C. (2005). Developments in STD/HIV Interactions: The

Intertwining Epidemics of HIV and HSV-2. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 19, 415–425.

Rezk, S.A., and Weiss, L.M. (2007). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* 38, 1293–1304.

Rice, A.D., Adams, M.M., Wallace, G., Burrage, A.M., Lindsey, S.F., Smith, A.J., Swetnam, D., Manning, B.R., Gray, S.A., Lampert, B., et al. (2011). Efficacy of CMX001 as a Post Exposure Antiviral in New Zealand White Rabbits Infected with Rabbitpox Virus, a Model for Orthopoxvirus Infections of Humans. *Viruses* 3, 47–62.

Rickabaugh, T.M., Brown, H.J., Martinez-Guzman, D., Wu, T.-T., Tong, L., Yu, F., Cole, S., and Sun, R. (2004). Generation of a latency-deficient gammaherpesvirus that is protective against secondary infection. *J. Virol.* 78, 9215–9223.

Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J., and Smit, J.M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2773–2786.

Rosa, G.T., Gillet, L., Smith, C.M., de Lima, B.D., and Stevenson, P.G. (2007). IgG fc receptors provide an alternative infection route for murine gamma-herpesvirus-68. *PLoS One* 2, e560.

Rosenwirth, B., Kondova, I., Niphuis, H., Greenwood, E.J.D., Schmidt, F., Verschoor, E.J., Wittmann, S., Heeney, J.L., Bogers, W.M.J.M., Fickenscher, H., et al. (2011). Herpesvirus saimiri infection of rhesus macaques: A model for acute rhadinovirus-induced t-cell transformation and oncogenesis. *J. Med. Virol.* 83, 1938–1950.

Ruiss, R., Ohno, S., Steer, B., Zeidler, R., and Adler, H. (2012). Murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein 150 does not contribute to latency amplification in vivo. *Virol. J.* 9, 107.

Sakai, H., Tokunaga, K., Kawamura, M., and Adachi, A. (1995). Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J. Gen. Virol.* 76, 2717–2722.

Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L., and Renne, R. (2005). Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79, 9301–9305.

de Sanjose, S., Mbisa, G., Perez-Alvarez, S., Benavente, Y., Sukvirach, S., Hieu, N.T., Shin, H.-R., Anh, P.T.H., Thomas, J., Lazcano, E., et al. (2009). Geographic variation in the prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. *J. Infect. Dis.* 199, 1449–1456.

Sauter, D. (2014). Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Front.*

Microbiol. 5, 163.

Schulz, T.F. (2000). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J. Antimicrob. Chemother.* 45 *Suppl T3*, 15–27.

Schwartz, R.A. (2004). Kaposi's sarcoma: An update. *J. Surg. Oncol.* 87, 146–151.

Sellar, R.S., and Peggs, K.S. (2012). Management of multidrug-resistant viruses in the immunocompromised host. *Br. J. Haematol.* 156, 559–572.

Sgadari, C., Monini, P., Barillari, G., and Ensoli, B. (2003). Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet. Oncol.* 4, 537–547.

Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B., and Delecluse, H.J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7065–7070.

Shi, Y., Wu, Y., Zhang, W., Qi, J., and Gao, G.F. (2014). Enabling the “host jump”: structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 822–831.

Shukla, D., and Spear, P.G. (2001). Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J. Clin. Invest.* 108, 503–510.

Simas, J.P., and Efstathiou, S. (1998). Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6, 276–282.

Skalsky, R.L., Hu, J., and Renne, R. (2007). Analysis of viral cis elements conferring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus episome partitioning and maintenance. *J. Virol.* 81, 9825–9837.

Skepper, J.N., Whiteley, A., Browne, H., and Minson, A. (2001). Herpes Simplex Virus Nucleocapsids Mature to Progeny Virions by an Envelopment Deenvelopment Reenvelopment Pathway. *J. Virol.* 75, 5697–5702.

Smith, A., Howell, D., Patmore, R., Jack, A., and Roman, E. (2011). Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br. J. Cancer* 105, 1684–1692.

Snoeck, R., Andrei, G., Gérard, M., Silverman, A., Hedderman, A., Balzarini, J., Sadzot-Delvaux, C., Tricot, G., Clumeck, N., and De Clercq, E. (1994). Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-



hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin. Infect. Dis.* *18*, 570–578.

Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* *136*, 1007–1021.

Sokal, E., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Leonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F., and Denis, M. (2007a). Recombinant gp350 Vaccine for Infectious Mononucleosis: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety, Immunogenicity, and Efficacy of an Epstein-Barr Virus Vaccine in Healthy Young Adults. *J. Infect. Dis.* *196*, 1749–1753.

Sokal, E.M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Leonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F., and Denis, M. (2007b). Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* *196*, 1749–1753.

Soulier, J., Grollet, L., Oksenhendler, E., Cacoub, P., Cazals-Hatem, D., Babinet, P., d'Agay, M.F., Clauvel, J.P., Raphael, M., and Degos, L. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* *86*, 1276–1280.

Spiller, O.B., Robinson, M., O'Donnell, E., Milligan, S., Morgan, B.P., Davison, A.J., and Blackbourn, D.J. (2003). Complement regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein. *J. Virol.* *77*, 592–599.

Staskus, K.A., Zhong, W., Gebhard, K., Herndier, B., Wang, H., Renne, R., Beneke, J., Pudney, J., Anderson, D.J., Ganem, D., et al. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J. Virol.* *71*, 715–719.

Stein, M.E., Spencer, D., Ruff, P., Lakier, R., MacPhail, P., and Bezwoda, W.R. (1994). Endemic African Kaposi's sarcoma: clinical and therapeutic implications. 10-year experience in the Johannesburg Hospital (1980-1990). *Oncology* *51*, 63–69.

Stevenson, P.G., and Doherty, P.C. (1998). Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *J. Virol.* *72*, 943–949.

Stevenson, P.G., and Efsthathiou, S. (2005). Immune Mechanisms in Murine Gammaherpesvirus-68 Infection. *Viral Immunol.* *18*, 445–456.

Stevenson, P.G., Simas, J.P., and Efstathiou, S. (2009). Immune control of mammalian gamma-herpesviruses: lessons from murid herpesvirus-4. *J Gen Virol* 90, 2317–2330.

Stewart, J.P., Usherwood, E.J., Ross, A., Dyson, H., and Nash, T. (1998). Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *J. Exp. Med.* 187, 1941–1951.

Subramanian, R., Sehgal, I., D’Auvergne, O., and Kousoulas, K.G. (2010). Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Glycoproteins B and K8.1 Regulate Virion Egress and Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor and Viral Interleukin-6 in BCBL-1 Cells. *J. Virol.* 84, 1704–1714.

Sunil-Chandra, N.P., Efstathiou, S., Arno, J., and Nash, A.A. (1992). Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68. *J Gen Virol* 73 (*Pt* 9), 2347–2356.

Szakonyi, G., Klein, M.G., Hannan, J.P., Young, K.A., Ma, R.Z., Asokan, R., Holers, V.M., and Chen, X.S. (2006). Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 996–1001.

Takahashi, M., Kamiya, H., Asano, Y., Shiraki, K., Baba, K., Otsuka, T., Hirota, T., and Yamanishi, K. (2001). Immunization of the elderly to boost immunity against varicella-zoster virus (VZV) as assessed by VZV skin test reaction. *Arch. Virol. Suppl.* 161–172.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203–213.

Taylor, G.S., Long, H.M., Brooks, J.M., Rickinson, A.B., and Hislop, A.D. (2015). The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 787–821.

Telfer, S., Bennett, M., Carslake, D., Helyar, S., and Begon, M. (2007). The dynamics of murid gammaherpesvirus 4 within wild, sympatric populations of bank voles and wood mice. *J. Wildl. Dis.* 43, 32–39.

Tempesta, M., Camero, M., Bellacicco, A.L., Tarsitano, E., Crescenzo, G., Thiry, J., Martella, V., Decaro, N., Elia, G., Neyts, J., et al. (2007a). Potent inhibition of genital herpesvirus infection in goats by cidofovir. *Antivir. Ther.* 12, 977–979.

Tempesta, M., Camero, M., Bellacicco, A.L., Thiry, J., Crescenzo, G., Neyts, J., Thiry, E., and Buonavoglia, C. (2007b). Cidofovir is effective against caprine herpesvirus 1 infection in goats.

Antiviral Res. 74, 138–141.

Tempesta, M., Crescenzo, G., Camero, M., Bellacicco, A.L., Tarsitano, E., Decaro, N., Neyts, J., Martella, V., and Buonavoglia, C. (2008). Assessing the Efficacy of Cidofovir against Herpesvirus-Induced Genital Lesions in Goats Using Different Therapeutic Regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4064–4068.

Terhune, S.S., Schröer, J., and Shenk, T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* 78, 10390–10398.

Thorley-Lawson, D.A., and Allday, M.J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 913–924.

Thorley-Lawson, D.A., and Geilinger, K. (1980). Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5307–5311.

Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.

Thorley-Lawson, D.A., and Poodry, C.A. (1982). Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J Virol* 43, 730–736.

Tibbetts, S.A., Loh, J., Van Berkel, V., McClellan, J.S., Jacoby, M.A., Kapadia, S.B., Speck, S.H., and Virgin, H.W. (2003). Establishment and maintenance of gammaherpesvirus latency are independent of infective dose and route of infection. *J. Virol.* 77, 7696–7701.

Tichý, T., Andrei, G., Dračinský, M., Holý, A., Balzarini, J., Snoeck, R., and Krečmerová, M. (2011). New prodrugs of Adefovir and Cidofovir. *Bioorganic Med. Chem.* 19, 3527–3539.

Tippin, T.K., Morrison, M.E., Brundage, T.M., and Momméja-Marin, H. (2016). Brincidofovir Is Not a Substrate for the Human Organic Anion Transporter 1: A Mechanistic Explanation for the Lack of Nephrotoxicity Observed in Clinical Studies. *Ther. Drug Monit.* 38, 777–786.

Trimble, J.J., and Desrosiers, R.C. (1991). Transformation by herpesvirus saimiri. *Adv. Cancer Res.* 56, 335–355.

Tugizov, S.M., Berline, J.W., and Palefsky, J.M. (2003). Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat. Med.* 9, 307–314.

Turk, S.M., Jiang, R., Chesnokova, L.S., and Hutt-Fletcher, L.M. (2006). Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *J. Virol.* *80*, 9628–9633.

Tyring, S., Wald, A., Zadeikis, N., Dhadda, S., Takenouchi, K., and Rorig, R. (2012). ASP2151 for the Treatment of Genital Herpes: A Randomized, Double-Blind, Placebo- and Valacyclovir-Controlled, Dose-Finding Study. *J. Infect. Dis.* *205*, 1100–1110.

Uldrick, T.S., and Whitby, D. (2011). Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett.* *305*, 150–162.

Uppal, T., Banerjee, S., Sun, Z., Verma, S., and Robertson, E. (2014). KSHV LANA—The Master Regulator of KSHV Latency. *Viruses* *6*, 4961–4998.

Vanni, T., Sprinz, E., Machado, M.W., Santana, R. de C., Fonseca, B.A.L., and Schwartzmann, G. (2006). Systemic treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma: Current status and perspectives. *Cancer Treat. Rev.* *32*, 445–455.

Veettil, M. V., Sadagopan, S., Sharma-Walia, N., Wang, F.-Z., Raghu, H., Varga, L., and Chandran, B. (2008). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Forms a Multimolecular Complex of Integrins (V5, V3, and 31) and CD98-xCT during Infection of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, and CD98-xCT Is Essential for the Postentry Stage of Infection. *J. Virol.* *82*, 12126–12144.

Veettil, M.V., Bandyopadhyay, C., Dutta, D., and Chandran, B. (2014). Interaction of KSHV with Host Cell Surface Receptors and Cell Entry. *Viruses* *6*, 4024–4046.

Verma, S.C., and Robertson, E.S. (2003). Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol. Lett.* *222*, 155–163.

Vidick, S., Leroy, B., Palmeira, L., Machiels, B., Mast, J., Francois, S., Wattiez, R., Vanderplasschen, A., and Gillet, L. (2013). Proteomic characterization of murine herpesvirus 4 extracellular virions. *PLoS One* *8*, e83842.

Virgin, H.W., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell* *138*, 30–50.

Virgin, H.W., Latreille, P., Wamsley, P., Hallsworth, K., Weck, K.E., Dal Canto, A.J., and Speck, S.H. (1997). Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* *71*, 5894–5904.

- Walker, L.R., Hussein, H.A.M., and Akula, S.M. (2014). Disintegrin-like domain of glycoprotein B regulates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of cells. *J. Gen. Virol.* *95*, 1770–1782.
- Wang, F. (2013). Nonhuman primate models for Epstein-Barr virus infection. *Curr. Opin. Virol.* *3*, 233–237.
- Wang, F.Z., Akula, S.M., Pramod, N.P., Zeng, L., and Chandran, B. (2001). Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J. Virol.* *75*, 7517–7527.
- Wang, F.-Z., Akula, S.M., Sharma-Walia, N., Zeng, L., and Chandran, B. (2003). Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J. Virol.* *77*, 3131–3147.
- Wang, L.-X., Kang, G., Kumar, P., Lu, W., Li, Y., Zhou, Y., Li, Q., and Wood, C. (2014). Humanized-BLT mouse model of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 3146–3151.
- Wang, X., Kenyon, W.J., Li, Q., Müllberg, J., and Hutt-Fletcher, L.M. (1998). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J. Virol.* *72*, 5552–5558.
- Warden, C., Tang, Q., and Zhu, H. (2011). Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 124595.
- Weidner-Glunde, M., Mariggio, G., and Schulz, T.F. (2017). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen: Replicating and Shielding Viral DNA during Viral Persistence. *J. Virol.* *91*, e01083-16.
- Weller, S.K., and Kuchta, R.D. (2013). The DNA helicase/primase complex as a target for herpes viral infection. *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 1119–1132.
- Wen, K.W., and Damania, B. (2010). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): Molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett.* *289*, 140–150.
- Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E.M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M., and Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* *79*, 1071–1083.

Wong, L.-Y., and Wilson, A.C. (2005). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen Induces a Strong Bend on Binding to Terminal Repeat DNA. *J. Virol.* *79*, 13829–13836.

Wright, D.E., Colaco, S., Colaco, C., and Stevenson, P.G. (2009). Antibody limits in vivo murid herpesvirus-4 replication by IgG Fc receptor-dependent functions. *J Gen Virol* *90*, 2592–2603.

Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J., and Tugizov, S.M. (2008). The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology* *370*, 430–442.

Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J., and Tugizov, S.M. (2009). EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology* *388*, 335–343.

Xiong, X., Smith, J.L., and Chen, M.S. (1997). Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 594–599.

Zhu, J.Y., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grasser, F., and Meister, G. (2009). Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal Carcinomas. *J. Virol.* *83*, 3333–3341.

Zhu, J.Y., Strehle, M., Frohn, A., Kremmer, E., Hofig, K.P., Meister, G., and Adler, H. (2010). Identification and Analysis of Expression of Novel MicroRNAs of Murine Gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* *84*, 10266–10275.

Zhu, Y., Haecker, I., Yang, Y., Gao, S.-J., and Renne, R. (2013).  $\gamma$ -Herpesvirus-encoded miRNAs and their roles in viral biology and pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* *3*, 266–275.

Zimmermann, W., Broll, H., Ehlers, B., Buhk, H.J., Rosenthal, A., and Goltz, M. (2001). Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J. Virol.* *75*, 1186–1194.

Zuleger, N., Kerr, A.R.W., and Schirmer, E.C. (2012). Many mechanisms, one entrance: membrane protein translocation into the nucleus. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 2205–2216.