

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**EXPRESSION D'UNE PROTÉINE D'ATTACHEMENT DU *CANID  
HERPESVIRUS 1*, LA GLYCOPROTÉINE D, ET LA PURIFICATION DES  
PROTÉINES CELLULAIRES INTERAGISSANTES**

Par  
Samar Micky

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Terence Ndongi Bukong  
INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Benoit Barbeau  
Université du Québec à Montréal

Directrice de recherche

Angela Pearson  
INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

*À chaque jour suffit sa peine*

Matthieu, 6:34

## REMERCIEMENTS

---

Je remercie très chaleureusement ma directrice de recherche, la Pr<sup>e</sup> Angela Pearson, pour son accompagnement, son support et ses commentaires constructifs. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir fait confiance. Aussi, un merci spécial pour votre patience et vos précieux conseils.

Je remercie les membres du laboratoire : Mohamed Eisa, Maha Ben Hamouda, Gauthier Alfonsi et Wiem Sleimi. Merci pour les conseils et tous ces moments passés ensemble. Merci particulier à Gauthier pour les dépannages informatiques.

Je remercie le technicien du service de microscopie électronique du Centre, Arnaldo Nakamura, pour son aide et son assistance.

Je remercie ma mère, mon frère et mes grands-parents pour leurs encouragements et leurs soutiens inconditionnels.

Enfin, je remercie ma grande famille pour les mots d'encouragements et pour les tapes sur l'épaule, sans oublier l'éternelle question « Quand est-ce que tu finis l'école ? »

Je termine en rendant hommage à mon père. Je sais combien tu aurais été fier en ce moment. Les mots ne seront pas assez justes pour exprimer le sentiment de reconnaissance qui m'anime. Merci !



## RÉSUMÉ

---

*Canid Herpesvirus 1* (CHV-1) est un *Varicellovirus* avec un tropisme pour les cellules épithéliales canines. Les facteurs cellulaires et viraux qui régulent l'entrée du virus ne sont pas entièrement connus. Nous avons précédemment démontré que le CHV-1 pénètre dans les cellules épithéliales non polarisées Madin-Darby canine kidney (MDCK) par un mécanisme similaire à la macropinocytose. Le virus induit la formation de protrusions membranaires lamellipodales qui se replient pour endocytoser le virus. Cependant, à ce jour le récepteur d'entrée du virus n'est pas identifié. À cet égard, notre objectif a été de purifier les protéines cellulaires qui se lient à la glycoprotéine virale D (gD), dans le but d'identifier le récepteur. Pour cela, nous avons généré un vecteur plasmidique exprimant l'ectodomaine de la gD, fusionné au domaine Fc de l'immunoglobuline humaine IgG-1. Le vecteur comprenait le signal de sécrétion de l'IL-2. Ce vecteur plasmidique a été transfecté dans des cellules HEK293T, et la glycoprotéine virale recombinante a été isolée du surnageant à l'aide des billes d'agarose de protéine A. Les protéines cellulaires ligands de la gD ont été coprécipitées, à partir d'un lysat de cellules MDCK. Les protéines purifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les protéines cellulaires identifiées ont des caractéristiques consistantes avec des récepteurs putatifs. Par ailleurs, nous avons étendu notre étude pour étudier l'entrée du CHV-1 dans les cellules MDCK polarisées. En utilisant la microscopie électronique à balayage, nous avons constaté que l'infection par CHV-1 ne modifie pas les extensions lamellipodales de la membrane sur la surface apicale des cellules MDCK polarisées. De plus, nous avons constaté que le CHV-1 infecte les cellules polarisées MDCK à la fois apicalement et basolatéralement ; cependant, l'infection du côté basolatéral a entraîné des titres viraux 759 fois plus élevés que lorsque les cellules étaient infectées du côté apical. Ces résultats suggèrent qu'il existe une distribution asymétrique des récepteurs cellulaires sur les cellules polarisées qui favorise l'entrée préférentielle du virus à partir de la surface basolatérale. La découverte du ou des récepteurs d'entrée du CHV-1 contribuera à une meilleure compréhension de la première étape de l'infection de cet agent pathogène vétérinaire. Cette connaissance pourrait être utilisée dans la conception de nouveaux thérapeutiques contre le CHV-1.

Mots-clés : *Canid herpesvirus 1* ; Ligand gD ; Cellules MDCK polarisées ; lamellipodes ; Interaction virus-cellule hôte



## ABSTRACT

---

*Canid Herpesvirus 1* (CHV-1) is a *Varicellovirus* with tropism for canine epithelial cells. The cellular and viral factors regulating virus entry are not fully known. We previously demonstrated that CHV-1 enters non-polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by a macropinocytosis-like mechanism. The virus induces the formation of extensive lamellipodial membrane protrusions that fold back to endocytose the virus. However, to this day, the entry receptor of the virus is not identified. To address this question, we wished to purify the cellular ligand of the viral glycoprotein D (gD), to identify the receptor(s) responsible for CHV-1 entry into MDCK cells. We generated a plasmid vector expressing the ectodomain of gD fused to the Fc domain of human immunoglobulin IgG-1. The vector included the secretion signal for IL-2. This plasmid vector was transfected into HEK293T cells, and recombinant viral glycoprotein was isolated from the supernatant using protein A agarose. We affinity purified the gD ligands from MDCK cell lysates. The purified proteins were identified by mass spectrometry. Several of the proteins specifically retained by the gD-Fc affinity matrix belonged to families of membrane proteins that could be putative receptors. Moreover, we extended our study to investigate the entry of CHV-1 into polarized MDCK cells. Using scanning electron microscopy, we found that CHV-1 infection does not alter the lamellipodial membrane extensions on the apical surface of polarized MDCK cells. Moreover, we found that CHV-1 infects MDCK polarized cells both apically and basolaterally; however, infection of the basolateral side resulted in viral titers that were 759-fold higher than when the cells were infected from the apical side. These results suggest that there is an asymmetric distribution of cellular receptors on polarized cells that promotes the preferential entry of the virus from the basolateral surface. Discovering the CHV-1 entry receptor(s) will contribute to a better understanding of the first step of infection of this veterinary pathogen, knowledge that could be used in the design of new therapeutics against CHV-1.

Keywords : *Canid herpesvirus 1*; gD ligand; Polarized MDCK cells; lamellipodia; virus-host cell interaction



# TABLE DES MATIÈRES

---

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	IX
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XV
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CANID HERPESVIRUS 1 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Classification.....	1
1.1.2 Structure du virion.....	2
1.1.3 Pathologie chez le chiot nouveau-né.....	4
1.1.4 Pathologie chez le chien adulte .....	5
1.1.5 Traitement.....	6
1.1.6 Mécanisme de pathogenèse du CHV-1.....	6
1.1.7 Cycle de réplication lytique des herpesvirus .....	8
<b>1.2 MECANISME D'ENTREE DES VARICELLOVIRUS .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Primo-infection dans les cellules épithéliales polarisées .....	10
1.2.2 Varicella-zoster virus .....	12
1.2.3 Bovine herpesvirus .....	13
1.2.4 Equine herpesvirus .....	15
1.2.5 Canid herpesvirus.....	17
<b>1.3 ROLES DES GLYCOPROTEINES VIRALES DANS L'ENTREE .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Glycoprotéine C (gC).....	21
1.3.2 Glycoprotéine D (gD).....	21
1.3.3 Glycoprotéine H/gL (gH/gL).....	24
1.3.4 Glycoprotéine B .....	26
<b>2 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>31</b>
<b>3 MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 CELLULES ET VIRUS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 CLONAGE DE GD-FC .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 TRANSFECTION DES CELLULES MAMMIFERES HEK293T .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 PURIFICATION DE GD-FC ET FC .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN .....</b>	<b>34</b>

3.6	QUANTIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES gD-Fc ET Fc .....	35
3.7	SDS-PAGE EN CONDITIONS NON-REDUCTRICES .....	35
3.8	DEGLYCOSYLATION DE LA gD-Fc .....	35
3.9	PREPARATION DU LYSAT CELLULAIRE MDCK .....	36
3.10	PULL-DOWN ASSAY DE LA gD-Fc .....	36
3.11	POLARISATION DES CELLULES MDCK .....	37
3.12	ANALYSE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	37
3.13	PRODUCTION VIRALE DU CHV-1 DANS LES CELLULES MDCK POLARISEES .....	37
3.14	PLAQUE ASSAY .....	38
3.15	ANALYSE STATISTIQUE .....	38
4	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>39</b>
4.1	<b>PURIFICATION DES PROTÉINES CELLULAIRES LIGANDS DE LA gD</b> .....	<b>39</b>
4.1.1	<i>Expression de la glycoprotéine recombinante gD-Fc</i> .....	39
4.1.2	<i>Caractérisation de la protéine recombinante gD-Fc</i> .....	43
4.1.3	<i>Immunoprécipitation des protéines cellulaires interagissant avec la gD-Fc</i> .....	45
4.1.4	<i>Profil des protéines interagissant avec l'ectodomaine de la gD du CHV-1</i> .....	46
4.2	<b>CARACTÉRISATION DE L'INFECTION DU CHV-1 DANS LES CELLULES</b>	
	<b>ÉPITHÉLIALES MDCK POLARISÉES</b> .....	<b>48</b>
4.2.1	<i>Impact du CHV-1 sur les protubérances membranaires des cellules MDCK polarisées</i> ..	48
4.2.2	<i>Efficacité de l'infection apicale et basolatérale du CHV-1</i> .....	50
5	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>53</b>
5.1	<b>L'ECTODOMAINE DE LA gD DU CHV-1 INTERAGIT AVEC DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DES</b>	
	<b>MOLECULES D'ADHESION ET DES RECEPTEURS TYROSINE KINASE</b> .....	<b>53</b>
5.2	<b>CHV-1 INFECTE PREFERENTIELLEMENT LA SURFACE BASOLATERALE DES CELLULES MDCK</b>	
	<b>POLARISEES</b> .....	<b>55</b>
6	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>58</b>
7	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>61</b>

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1.1 : RELATIONS PHYLOGENIQUES ET TAXONOMIQUES DE LA FAMILLE <i>HERPESVIRIDAE</i> .....	2
FIGURE 1.2: STRUCTURE DU CHV-1. ....	3
FIGURE 1.3 : ILLUSTRATION SIMPLIFIEE DE LA STRUCTURE GENOMIQUE DU CHV-1.....	3
FIGURE 1.4 : MODELE DE PATHOGENESE DU CHV-1 .....	7
FIGURE 1.5 : REPLICATION LYTIQUE DES ALPHAHERPESVIRUS. ....	9
FIGURE 1.6 CARACTERISTIQUE DES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES .....	<b>ERREUR! SIGNET NON DÉFINI.</b>
FIGURE 1.7: MECANISME D'ATTACHEMENT ET DE FUSION DU HSV-1 .....	20
FIGURE 1.8 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA GD LIEE A HVEA. ....	23
FIGURE 1.9: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE L'HETERODIMERE GH/GL .....	26
FIGURE 1.10: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA GB.....	27
FIGURE 1.11 STRUCTURE DU CYTODOMAINE DE LA GB.....	28
FIGURE 4.1 : SCHEMA DE LA PROTEINE GD-Fc DU CHV-1. ....	40
FIGURE 4.2 : EXPRESSION DE L'ECTODOMAINE DE LA GD DU CHV-1 FUSIONNE AVEC LA PROTEINE FC.....	41
FIGURE 4.3 : QUANTIFICATION DE LA PROTEINE GD-Fc PRODUITE AVEC UN GRADIENT COMPARATIF DE LA PROTEINE BSA .....	42
FIGURE 4.4 OLIGOMÉRISEMENT DE LA GD-Fc .....	44
FIGURE 4.5 : ANALYSE DE LA GLYCOSYLATION DE LA GD-Fc TRAITÉE AVEC LA PNGASE.....	45
FIGURE 4.6: PROTÉINES DU LYSAT CELLULAIRE MDCK CAPTURÉES PAR LES PROTÉINES RECOMBINANTES GD-Fc ET FC.....	46
FIGURE 4.7: PROFIL DES PROTÉINES INTERAGISSANT AVEC L'ECTODOMAINE DE LA GD DU CHV-1 .....	47
FIGURE 4.8 : L'ULTRASTRUCTURE DE LA SURFACE APICALE DES CELLULES MDCK POLARISEES N'EST PAS MODIFIÉE PAR LE CHV-1 .....	49
FIGURE 4.9: LA STRUCTURE DES EXTENSIONS LAMELLIPODALES DE LA SURFACE APICALE DES CELLULES MDCK POLARISEES N'EST PAS ALTERÉE PAR LE CHV-1 .....	50
FIGURE 4.10 : L'INFECTION PAR LE CHV-1 EST PLUS EFFICACE SUR LA SURFACE BASOLATERALE .....	51
FIGURE 6.1 MODELE D'INFECTION DU CHV-1 DANS LES CELLULES MDCK POLARISEES.....	59



## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 3.1 AMORCES UTILISEES POUR SEQUENCER LES VECTEURS RECOMBINANTS PFUSE-GD-Fc2 .....33



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

BHV-1	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
BME	$\beta$ -mercaptoéthanol
BSA	<i>Bovin serum albumin</i>
CIRD	<i>Canine infectious respiratory disease</i>
CMH-1	<i>Major histocompatibility class I</i>
CRBD	<i>Complex of respiratory bovine disease</i>
CHO-K1	<i>Chinese Hamster ovarian K1</i>
CHV-1	<i>Canid Herpesvirus 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EHV-1	<i>Equine herpesvirus 1</i>
EHV-4	<i>Equine herpesvirus 4</i>
EGTA	<i>Ethyleneglycoltetraacetic Acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
gB	<i>Glycoprotein B</i>
gC	<i>Glycoprotein C</i>
gD	<i>Glycoprotein D</i>
gE	<i>Glycoprotein E</i>
gH/gL	<i>Glycoprotein H et L (heterodimère)</i>
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i>
HEPES	Hydroxyéthylpipérazineéthane sulfonique
HS	<i>Heparan sulfate</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>

HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
IDE	<i>Insulin-degrading enzyme</i>
IRL	<i>Internal repeat long</i>
IRS	<i>Internal repeat short</i>
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LLPS	<i>Liquid-liquid phase separation</i>
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MDBK	<i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MET	Microscopie électronique à transmission
MPR	<i>Membrane proximal region</i>
MPRCi	<i>Cation-independent Mannose 6-phosphate receptor</i>
NHE	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger</i>
NMMHC-IIA	<i>Non-muscle myosin heavy chain IIA</i>
NMMHC-IIB	<i>Non-muscle myosin heavy chain IIB</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PET	Polyéthylène téréphtalate
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PILR $\alpha$	<i>Paired immunoglobulin like type 2 receptor alpha</i>
P/S	Pénicilline et streptomycine
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
Pvr	<i>Poliovirus receptor</i>
PRV	<i>Pseudorabies virus</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20</i>
TRL	<i>Terminal repeat long</i>
TRS	<i>Terminal repeat short</i>
VZV	<i>Varicella-zoster virus</i>
UL	<i>Unique long</i>
US	<i>Unique short</i>



# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 *Canid herpesvirus 1*

### 1.1.1 Classification

Mis en évidence pour la première fois en 1965 par Carmichael *et al.*, le *Canid herpesvirus 1* (CHV-1) est un virus vétérinaire qui infecte principalement l'espèce canine, notamment les chiens. CHV-1 est un virus membre de l'ordre des *Herpesvirales*, de la famille des *Herpesviridae*, de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, et du genre *Varicellovirus* (Strandberg & Carmichael, 1965). Les *Herpesviridae* sont des virus larges à ADN doubles brins. La famille des *Herpesviridae* est divisée en trois sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae* (Davison *et al.*, 2009).

Tout d'abord, les *Alphaherpesvirinae* se distinguent des autres sous-familles à cause de leur cycle de réplication court. Les *Alphaherpesvirinae* sont divisés en 5 genres, dont : *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus* et *Varicellovirus* (Davison *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 2022; McGeoch *et al.*, 2006) (**Figure 1.1**). La plupart sont des virus neurotropiques qui établissent la latence dans les neurones, à l'exception de quelques virus, notamment du genre *Mardivirus* (Morgan *et al.*, 2001). Les *Iltovirus* et les *Mardivirus* infectent les oiseaux, alors que les *Scutavirus* infectent les reptiles. Seules les *Simplexvirus* et *Varicellovirus* infectent les mammifères (Davison *et al.*, 2009). Finalement, le genre *Varicellovirus* comprend entre autres : *Varicella-zoster virus* (VZV), agent causal de la varicelle ; Pseudorabies virus/SuHV-1, agent causal de la maladie d'Aujeszky chez les porcs ; *Bovine herpesvirus 1* (BHV-1), agent causal de la rhinotrachéite chez les bœufs ; *Equine herpesvirus 1* (EHV-1), agent causal de la mortalité néonatale des chevaux ; *Equine herpesvirus 4* (EHV-4) qui cause la rhinopneumonie chez les chevaux ; *Feline herpesvirus 1* (FHV-1), agent causal de la rhinotrachéite chez les félins ; et le *Canid herpesvirus* (CHV-1) qui cause des avortements spontanés des chiennes gestantes (Appel *et al.*, 1969; Kolb *et al.*, 2017; Lewin *et al.*, 2020) (**Figure 1.1**).

Ensuite, les *Betaherpesvirinae* sont typiquement connus pour avoir un tropisme d'hôte restreint. Ils ont un cycle de réplication long. Les cellules infectées montrent une taille élargie, dit cytomégalia. Les *Betaherpesvirinae* sont divisés en 4 genres : Cytomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus et Roseolovirus (HHV-6A (human herpesvirus 6A), HHV6B (human herpesvirus 6B), HHV-7 (human herpesvirus 7)) (Davison *et al.*, 2009; Gatherer *et al.*, 2021).

Finalement, les *Gammaherpesvirinae* infectent les cellules lymphoblastoïdes, notamment les cellules T et B. Cette sous-famille est divisée en 4 genres : Lymphocryptovirus (virus prototypique : *Epstein Barr virus* (EBV), Macavirus, Percavirus et Rhadinovirus (virus prototypique : *Kaposi Sarcoma virus* (KSHV)) (Davison *et al.*, 2009; Gatherer *et al.*, 2021).

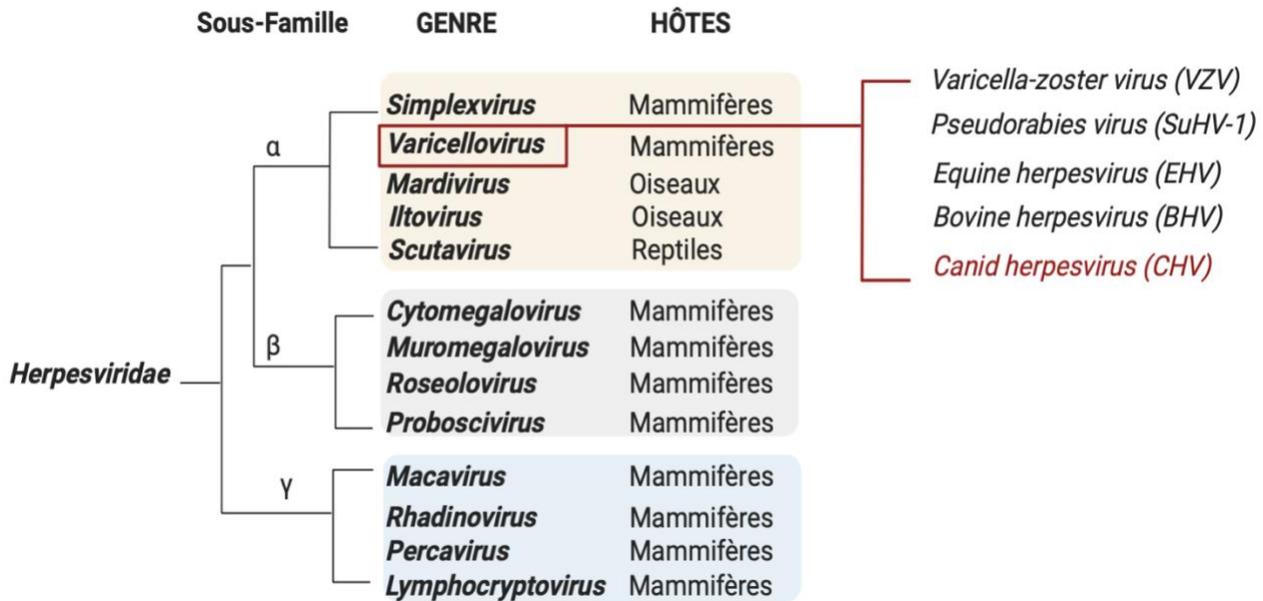


Figure 1.1 : Relations phylogéniques et taxonomiques de la famille *Herpesviridae*

Le schéma montre les embranchements dans la famille des *Herpesviridae* et non la distance évolutive. Figure inspirée de Pellett *et al.* (2011)

### 1.1.2 Structure du virion

CHV-1 est un virus enveloppé à ADN double brin linéaire. Le virion est formé d'un noyau, d'une capsid, d'une couche protéique non-structurée (tégument) et d'une enveloppe. Le diamètre du virion mature peut atteindre jusqu'à 280 nm. Le diamètre varie en fonction de l'épaisseur de la couche du tégument, le plan de coupe et l'état de l'enveloppe (Gatherer *et al.*, 2021; Strandberg & Carmichael, 1965) (**Figure 1.2**).

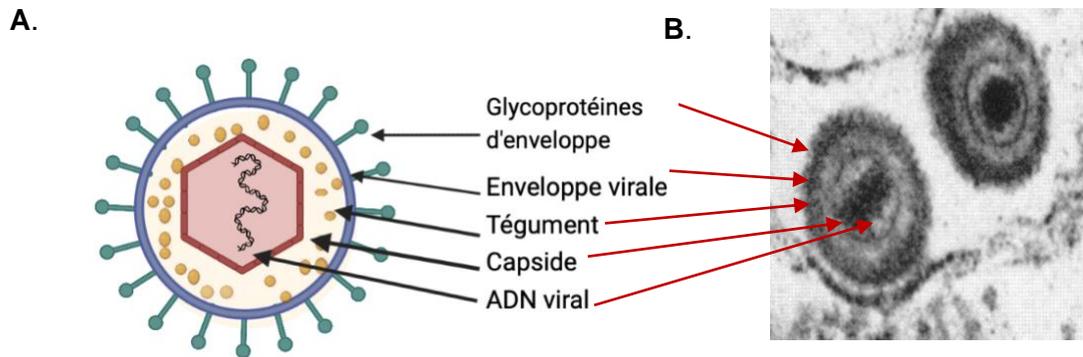


Figure 1.2: Structure du CHV-1.

(A) Le virus à ADN double brin linéaire (en noir) contient une enveloppe lipidique (en bleu) avec une capsidie icosaédrique (en rouge) et une couche tégumentaire (en jaune), formée de protéines virales et cellulaires. L'enveloppe virale contient plusieurs glycoprotéines virales (en vert) qui participent à l'entrée. (B) Micrographie électronique à transmission du virion CHV-1. Adapté de Strandberg et Carmichael (1965).

La structure génomique du CHV-1 est typique à celle des *Varicellovirus*. En d'autres mots, le génome du virus encode une séquence unique longue (UL) de 97 kbp (kilopaires de bases) et une séquence unique courte (US) 7.7kpb. Les deux séquences uniques sont encadrées de répétitions inversées terminales (TRL et TRS) et internes (IRL et IRS) (Papageorgiou *et al.*, 2016) (Figure 1.3).

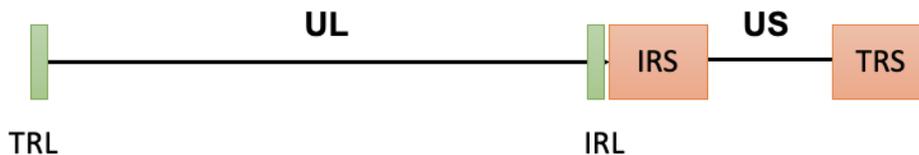


Figure 1.3 : Illustration simplifiée de la structure génomique du CHV-1.

Les séquences uniques sont représentées par des lignes pleines : la séquence unique longue (UL) et la séquence unique courte (US). Les séquences répétées sont représentées par des rectangles. Les séquences répétées encadrant les régions uniques sont désignées "terminal repeat long" (TRL), "internal repeat long" (IRL), "internal repeat short" (IRS) et "terminal repeat short" (TRS).

Le génome du CHV-1 est composé de 31,6 % de nucléotides GC (Guanine-Cytosine). Avec ce taux de GC, CHV-1 est considéré comme un des virus avec le plus faible % de GC,

parmi les alphaherpèsvirus séquencés. Le génome viral contient 76 cadres de lecture ouverts (ORF) qui sont prédits pour encoder des protéines fonctionnelles (Papageorgiou *et al.*, 2016).

Comme pour tous les herpèsvirus, la capsid du virion est un icosaèdre (T=16) formé de 162 capsomères. Il contient 16 capsomères organisés en 150 hexons, 11 pentons et 1 portail (Davison *et al.*, 2022).

La capsid est recouverte d'une couche non-structurée de protéine appelée tégment. Elle est distribuée asymétriquement. Le tégment contient plus de 20 protéines virales présentes en multiple copies (Bohannon *et al.*, 2013; Davison *et al.*, 2022). Pour les herpèsvirus, le tégment est une structure protéique qui participe à l'évasion du virus au système immunitaire et à la réplication du génome. Pour exemple, la protéine virale VP16 du virus herpès simplex 1 (HSV-1) promeut la transcription des gènes viraux en se liant au promoteur de gène immédiat-précoce en s'associant à deux facteurs cellulaires, HCF-1 et Oct-1, pour former un complexe de régulation transcriptionnelle (Fan *et al.*, 2020). De plus, VP16 recrute différents facteurs de transcription généraux pour favoriser l'expression des gènes viraux par l'ARN polymérase II (Fan *et al.*, 2020). Un autre exemple de l'action des protéines tégmentaires est la protéine UL11 du HSV-1. UL11 est une protéine qui a une conformation intrinsèquement désordonnée et dynamique qui subit une séparation de phase liquide-liquide (LLPS) *in vitro*. Le désordre intrinsèque suppose que UL11 a la capacité de se lier à de multiples partenaires. L'analyse séquentielle des protéines du tégment du HSV-1 a révélé qu'elles contiennent des régions intrinsèquement désordonnées de différentes longueurs (Metrick *et al.*, 2020). La présence de désordre intrinsèque, et potentiellement, la capacité à former des LLPS, peut donc être une caractéristique commune des protéines tégmentaires. Celle-ci leur permet de lier différents partenaires cellulaires, et ainsi remodeler l'environnement cellulaire en faveur du virus en inhibant la synthèse protéique, en inhibant les défenses cellulaires, et en stimulant l'expression des gènes viraux (Metrick *et al.*, 2020).

Finalement, le virion est recouvert d'une enveloppe virale qui est constituée des glycoprotéines virales. Celles-ci jouent un rôle principalement dans l'attachement du virion à la surface de la cellule de l'hôte, et aussi, dans l'interaction avec le récepteur cellulaire, qui subséquemment permet l'entrée du virus (Davison *et al.*, 2022).

### **1.1.3 Pathologie chez le chiot nouveau-né**

CHV-1 a un tropisme d'hôte restreint. Il infecte les chiens et les tissus canins (Nakamichi *et al.*, 2000). Les chiots nouveau-nés sont infectés par une infection transplacentaire. De plus, lors

de la naissance, les chiots nouveau-nés sont infectés par le canal de naissance ou par contact avec les sécrétions oronasales de leur mère. Chez les nouveau-nés infectés expérimentalement, on observe une infection généralisée fatale avec un taux de mortalité avoisinant 100 % (Decaro *et al.*, 2008). Certains auteurs ont rapporté que les chiots qui se sont rétablis d'infections naturelles présentaient une dysplasie cérébelleuse et rétinienne. Également, le virus cause une nécrose focale disséminée et une hémorragie chez les chiots (Carmichael *et al.*, 1965; Hashimoto *et al.*, 1982).

La sévérité de l'infection chez le nouveau-né est expliquée par certains auteurs par la température de réplication du virus. Le virus est inactivé lorsqu'il est exposé à des températures supérieures à 40°C, tandis que les chiots nouveau-nés ont des températures corporelles normales inférieures de 1 à 1.5°C à celle d'un chien adulte. Conséquemment, certains auteurs suggèrent que cette différence de température résultant d'un système de thermorégulation immature favoriserait une réplication virale systémique généralisée (Bottinelli *et al.*, 2016; Carmichael & Barnes, 1969).

#### **1.1.4 Pathologie chez le chien adulte**

Chez la chienne gestante infectée expérimentalement, l'infection cause l'avortement et la mortinaissance des chiots nouveau-nés. Le virus franchit la barrière transplacentaire pour infecter le fœtus (Hashimoto *et al.*, 1983; Hashimoto *et al.*, 1982). Cependant, chez la chienne, il n'y a pas de signe de maladie (Hashimoto *et al.*, 1983; Hashimoto *et al.*, 1982).

Les chiens adultes sont infectés par contact vénérien, oronasal et oculaire. Les signes d'une infection systémique sont rares chez les chiens adultes. Toutefois, les symptômes, tels que les vomissements, l'anorexie, un écoulement oculaire et une mort subite ont été signalés chez des coyotes âgés de 8 à 10 semaines infectés naturellement (Appel *et al.*, 1969; Gadsden *et al.*, 2012; Ledbetter *et al.*, 2013). Chez les chiens adultes de 3 semaines d'âge, l'infection peut être asymptomatique. Chez l'hôte immunosupprimé, l'infection conduit à des troubles respiratoires, génitaux et oculaires. L'infection par le virus est restreinte aux tissus nasopharyngés, aux organes génitaux, aux amygdales, aux ganglions lymphatiques rétropharyngiens, aux ganglions lymphatiques bronchiques, aux tissus conjonctifs et parfois aux poumons (Gadsden *et al.*, 2012).

Lors des expériences d'infection expérimentale des chiens, la voie d'inoculation s'est avérée importante, car elle détermine la dissémination et la localisation du virus dans les différents tissus de l'hôte (Hashimoto *et al.*, 1983; Hashimoto *et al.*, 1982). Chez les chiens infectés par voie nasale ou par voie intraveineuse, les particules virales sont détectées dans les sécrétions

nasales. Cependant, chez les chiens inoculés par voie vaginale, les particules virales sont détectées dans les sécrétions nasales et vaginales (Hashimoto *et al.*, 1983; Hashimoto *et al.*, 1982).

Par ailleurs, CHV-1 est une des causes virales du complexe de la maladie infectieuse respiratoire (CIRD : canine infectious respiratory disease) ou la toux kennel (kennel cough). Cela dit, CHV-1 n'est pas considéré comme l'agent étiologique du CIRD, car d'autres agents pathogènes, tels que le *canine adenovirus* et *canine influenza virus*, sont associés à ces troubles respiratoires (Appel *et al.*, 1969; Karpas *et al.*, 1968).

### 1.1.5 Traitement

Il n'existe pas de traitements qui permettent d'éradiquer le virus de l'animal infecté. Il n'existe pas non plus de vaccins qui confèrent une protection à long terme contre l'infection par le CHV-1.

Il existe un vaccin (Eurican Herpes®) à sous-unité de la glycoprotéine B du CHV-1 (Merial Lyon, France). Ce vaccin est approuvé en Europe seulement. Il est injecté aux chiennes gestantes pour augmenter le niveau d'anticorps neutralisant. L'immunité obtenue par le vaccin est de courte durée. Le vaccin ne confère pas de protection à long terme. Il doit être réadministré de manière sous-cutanée à la femelle à chaque gestation (Poulet *et al.*, 2001).

Un des traitements donnés aux chiots est une sérothérapie empirique. Il consiste à injecter aux chiots malades le sérum des mères positives ou des chiennes récemment vaccinées. Cela dit, il n'y a pas banque de sérum qui existe à ce jour (Bottinelli *et al.*, 2016).

### 1.1.6 Mécanisme de pathogenèse du CHV-1

Le mécanisme de pathogenèse du CHV-1 est similaire à celui des autres *Varicellovirus* (**Figure 1.4**). Typiquement, l'entrée initiale du virus se produit dans les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires, notamment dans l'épithélium oronasal (**Figure 1.4 A**). Le virus infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieure. Les nouvelles particules virales produites traversent la membrane basale et atteignent les amygdales et d'autres tissus lymphoïdes locaux par le biais des cellules infectées (Evermann *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). À ce stade, on observe une virémie médiée par les cellules hématopoïétiques infectées, potentiellement, par des lymphocytes T ou des monocytes. Les cellules infectées disséminent le virus dans différents organes, tels que les reins, les poumons, les tissus lymphoïdes, la peau, etc. (**Figure 1.4 B**) (Evermann *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). À la suite de ce stade systémique, les

nouveaux virions vont atteindre les cellules neuronales du nerf sensoriel, par transport axonal rétrograde (des axones vers le corps neuronal) ou par la voie hématogène grâce aux cellules infectées (**Figure 1.4 C**). Le virus établit sa latence dans les neurones des ganglions sensoriels (Evermann *et al.*, 2011). En latence, le génome du virus persiste sous forme épisomale sans produire des nouveaux virions. Suivant un stress ou une immunosuppression de l'hôte, le virus se réactive et se réplique. Les nouveaux virions migrent par la voie axonale antérograde (du corps neuronal vers l'axone) pour infecter les cellules épithéliales près des terminaisons des axones, provoquant des lésions récurrentes (**Figure 1.4 D**) (Evermann *et al.*, 2011).

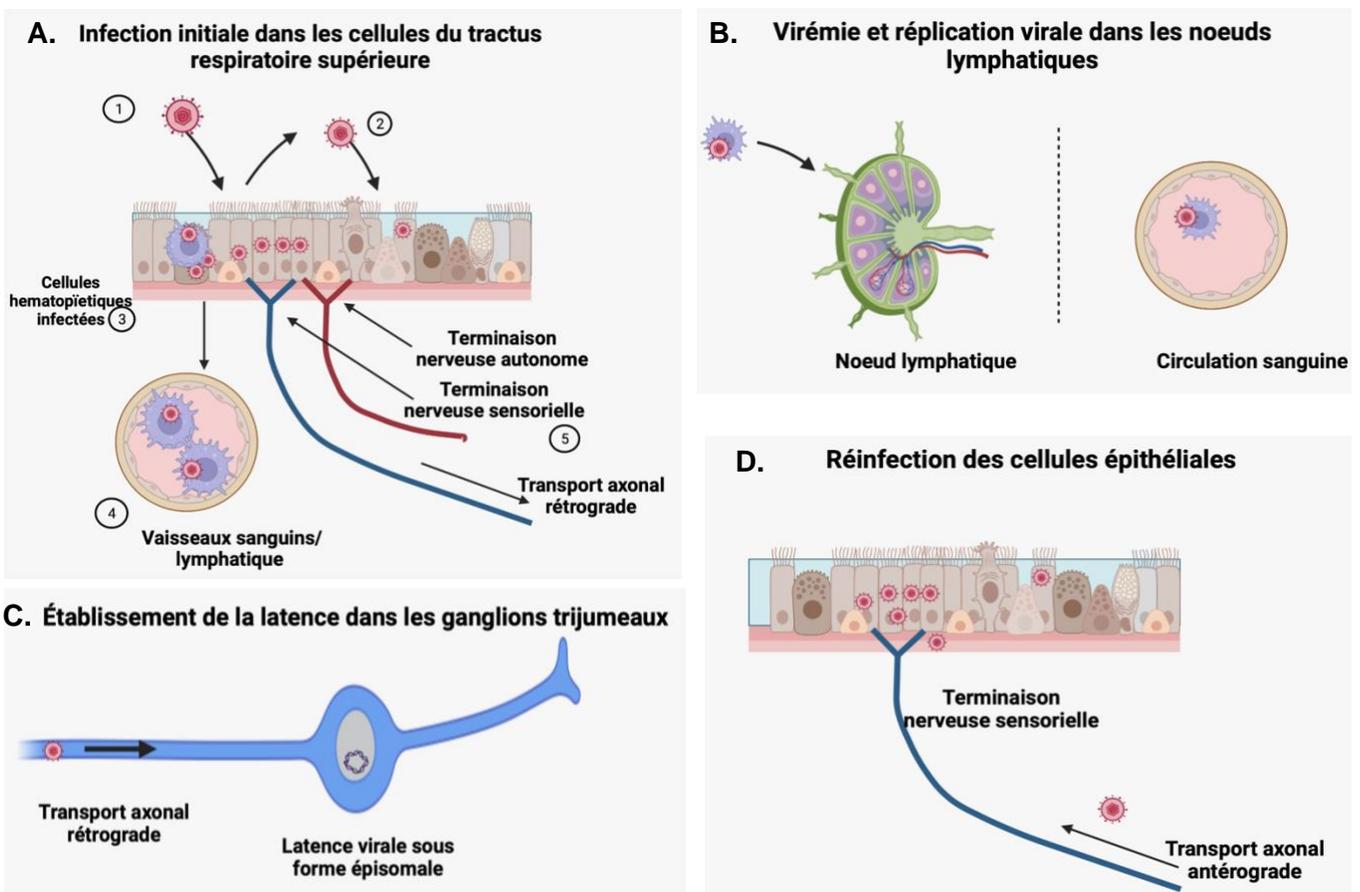


Figure 1.4 : Modèle de pathogenèse du CHV-1

(A) Primo-infection dans les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures (1) Infection par CHV-1 (en rouge); (2) Propagation virale dans l'épithélium respiratoire et sortie virale; (3) CHV-1 traverse la membrane basale (BM) par l'intermédiaire des cellules infectées; (4) le virion atteint la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques; (5) CHV-1 pénètre dans les terminaisons nerveuses du système nerveux périphérique et migre par le transport axonal rétrograde aux ganglions trijumeaux (GT). (B) Réplication du CHV-1 dans les ganglions lymphatiques et établissement d'une virémie. (C) Établissement de la latence dans les neurones des GT. (D) Réactivation du virus et production de nouveaux virions qui migrent dans la voie axonale antérograde menant à des lésions récurrentes. Les dessins sont réalisés sur le logiciel Biorender.

### 1.1.7 Cycle de réplication lytique des herpèsvirus

De manière concise, les étapes de l'infection lytique se résument à : l'attachement et l'entrée du virion dans la cellule, l'expression des gènes viraux, la réplication du génome viral dans le noyau, la formation de nouveaux virions et la sortie de nouvelles particules virales (**Figure 1.5**) (Knipe *et al.*, 2013).

L'entrée du virus commence par l'attachement du virion à la surface de la cellule. Cet attachement est médié par la glycoprotéine virale C (gC) qui interagit avec les sulfates d'héparanes, présents à la surface de la cellule (Gatherer *et al.*, 2021; Knipe *et al.*, 2021). Suivant cela, l'entrée du virus est médiée par plusieurs autres glycoprotéines virales, notamment la glycoprotéine D (gD), l'hétérodimère gH/gL, et la gB. L'hétérodimère gH/gL et la gB sont des protéines conservées pour plusieurs alphaherpèsvirus. Toutefois, la gD est unique à chaque espèce et n'est pas encodé par tous les alphaherpèsvirus. La gD est le ligand canonique du récepteur d'entrée cellulaire. L'hétérodimère gH/gL sert de régulateur fusionnel et la gB sert de protéine de fusion. Cette dernière permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. L'interaction séquentielle de ces glycoprotéines avec leurs récepteurs permet l'entrée du virion dans la cellule (Knipe *et al.*, 2021). Pour cela, l'enveloppe virale peut fusionner directement avec la membrane plasmique ou le virion peut être endocytosé dans la cellule. À la suite de la fusion, la capsid est transportée vers les pores nucléaires, et le génome entre dans le noyau. La capsid est transportée vers les pores nucléaires par le biais des microtubules. Après son internalisation dans le noyau, le génome viral se circularise et se fait chromatiniser (Gatherer *et al.*, 2021; Knipe *et al.*, 2021). S'ensuit une étape de transcription séquentielle, où il y a d'abord, transcription des gènes immédiats précoces qui encodent des protéines régulatrices; ensuite, il y a transcription des gènes précoces qui encodent pour les protéines qui participent à la formation du complexe de réplication de l'ADN viral et des protéines qui modifient le métabolisme de la cellule hôte; finalement, il y a transcription des gènes tardifs qui encodent, entre autres, pour les protéines qui forment la structure du virion et la couche protéique du tégument (Gatherer *et al.*, 2021; Knipe *et al.*, 2021).

Lorsque le génome est internalisé dans le noyau cellulaire, des protéines virales et cellulaires forment une structure appelée compartiment de réplication virale. C'est dans le compartiment de réplication qu'ont lieu la réplication du génome viral et l'encapsidation du génome. La réplication du génome se fait par un mécanisme de réplication à cercle roulant pour former des concatémères. À partir de ces concatémères, les génomes individuels sont clivés et encapsidés (Gatherer *et al.*, 2021; Knipe *et al.*, 2021). La capsid subit un premier enveloppement

avec la membrane nucléaire interne. Ensuite, la capside subit un désenveloppement par fusion avec la membrane nucléaire externe pour être libérée dans le cytoplasme. Le virion acquiert ses protéines du tégument et son enveloppe finale dans un compartiment dérivé du Golgi. Finalement, le virion mature sort de la cellule par exocytose (Gatherer *et al.*, 2021; Knipe *et al.*, 2021).

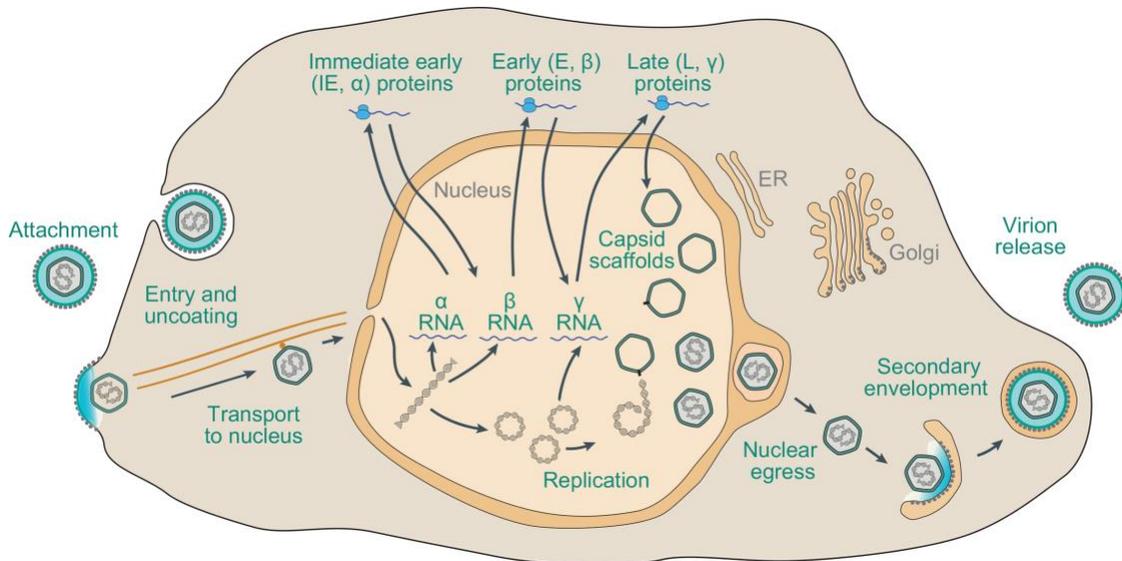


Figure 1.5 : Réplication lytique des alphaherpèsvirus.

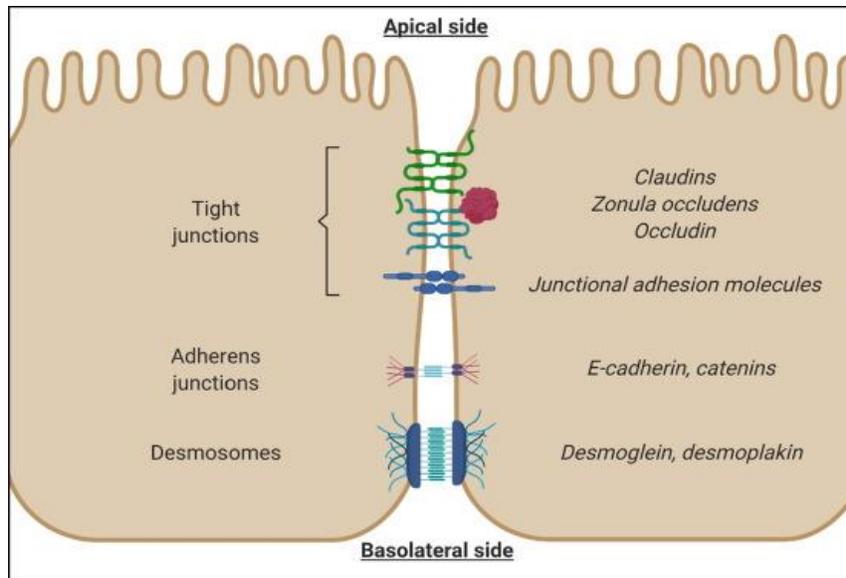
Le virion entre dans la cellule de l'hôte par endocytose ou fusion directe de son enveloppe avec la membrane plasmique. La capside est transportée vers le noyau via les microtubules. La décapsidation se fait aux pores nucléaires. Ensuite, le génome viral se circularise dans le noyau, et un compartiment de réplication virale constitué des protéines virales et cellulaires se forme. Ensuite vient l'expression séquentielle des gènes viraux immédiats précoces (IE), des gènes viraux précoces (E) impliqués dans la réplication du génome viral, et des gènes tardifs (L) codant entre autres pour les protéines structurales. Après encapsidation, le virus subit un enveloppement et désenveloppement à la membrane nucléaire. Dans le cytoplasme, le virion acquiert les protéines tégumentaires, son enveloppe finale et sort de la cellule. Image tirée de Gatherer *et al.* (2021)

## 1.2 Mécanisme d'entrée des Varicellovirus

CHV-1 a un tropisme d'hôte restreint. De manière générale, les herpèsvirus sont adaptés à leurs hôtes, de sorte que les infections qui causent une maladie grave sont observées chez les fœtus et les hôtes immunosupprimés. D'ailleurs, le virus a évolué pour moduler l'immunité de son hôte. Chez un hôte immunocompétent, suivant la primo-infection, le virus établit une latence. Le virus dormant peut se réactiver occasionnellement, entre autres à la suite d'un stress (Li *et al.*, 2016). Pour comprendre le mécanisme de pathogenèse de ce *Varicellovirus*, il faut identifier les déterminants de l'interaction du virus avec son hôte. Une des interactions clés de l'établissement de l'infection, c'est le mécanisme d'entrée du virion dans la cellule de l'hôte.

### 1.2.1 Primo-infection dans les cellules épithéliales polarisées

Pour plusieurs Varicellovirus le site de la primo-infection sont les cellules épithéliales du tractus respiratoire. À la suite de la primo-infection, les virions se propagent dans les neurones des ganglions sensoriels et y établissent une latence. L'épithélium du tractus respiratoire est un épithélium polarisé. Cet épithélium maintient son intégrité et sa polarité grâce aux jonctions intercellulaires (Pickett *et al.*, 2019). Ces jonctions sont des régions ou des sites de contact entre les cellules adjacentes. Elles forment une barrière entre les domaines apicaux et basolatéraux (Otani & Furuse, 2020). On y trouve les jonctions serrées qui sont situées du côté apical et permettent un passage sélectif de tailles et d'ions pour les molécules entre les cellules adjacentes (Otani & Furuse, 2020). Les jonctions adhérentes (AJ) et les desmosomes sont situées en dessous des jonctions serrées (**Figure 1.6**). Ces jonctions intercellulaires connectent le cytosquelette des cellules voisines et promeuvent une uniformité de l'épithélium (Otani & Furuse, 2020). Les cellules polarisées démontrent une répartition du cytosquelette asymétrique et elles expriment différents domaines apicaux et basolatéraux (Pickett *et al.*, 2019). La surface basale est en contact avec la matrice extracellulaire et elle est à proximité de la membrane basale. La surface apicale fait face à l'extérieur ou à la lumière de l'organe (Otani & Furuse, 2020).



**Figure 1.6 Caractéristiques des cellules épithéliales polarisées**

La polarité des cellules épithéliales est maintenue par plusieurs complexes jonctionnels, dont les jonctions serrées (tight junctions) composées des claudins, zona occludens, des occludins et les molécules d'adhésions jonctionnelles. De plus, parmi les complexes jonctionnels, on trouve les jonctions d'adhérence (adherens junction) formées de e-cadhérine et caténine ; et finalement on trouve les desmosomes formés des desmogleines et desmoplakines. Figure tirée de Brunner *et al.* (2021)

Les virus peuvent démontrer une différente efficacité d'infection des cellules polarisées, notamment à cause de l'expression différentielle des récepteurs cellulaires à la surface apicale et basolatérale. Par exemple, EHV-1 infecte de manière préférentielle la surface basolatérale des cellules épithéliales respiratoires équine primaires (EREC) cultivées à l'interface air-liquide (Van Cleemput *et al.*, 2017). De plus, dans des « explants » tissulaires des muqueuses respiratoires équine cultivés à l'interface air-liquide, l'infection par EHV-1 est considérablement renforcée par la destruction des jonctions intercellulaires à l'aide d'agents chélateurs, tels que l'EGTA (ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N,N*-tetraacetic acid) ou de la N-acétylcystéine qui séquestrent les ions de  $Ca^{2+}$  essentiels pour le maintien de ces jonctions (Van Cleemput *et al.*, 2017). Ainsi, la perturbation des jonctions intercellulaires rend plus accessibles les récepteurs cellulaires distribués préférentiellement à la surface basolatérale. L'infection préférentielle du EHV-1 est une stratégie d'invasion et de propagation du virus après sa réactivation à la suite de la latence. Cela s'explique par le fait que lors de la primo-infection, le virus infecte les cellules épithéliales de manière limitée pour éviter une réponse immunitaire forte, et réussir à établir une latence. Lors de sa réactivation, le virus peut infecter l'épithélium respiratoire par le domaine basolatéral, et ainsi, se propager de cellule à cellule.

### 1.2.2 *Varicella-zoster virus*

Pour le genre *Varicellovirus*, le virus prototypique est *Varicella-zoster virus* (VZV). VZV est l'agent étiologique de la varicelle, qui se caractérise par des boutons pulpeux sur la peau. C'est le seul *Varicellovirus* restreint à l'humain. L'infection se manifeste généralement dès le bas âge sous forme de la varicelle (Head & Campbell, 1900). La primo-infection se déroule sur les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires supérieures. Ensuite, le virus infecte les amygdales et les tissus lymphoïdes (Zerboni *et al.*, 2014). C'est ainsi que le virus infecte les lymphocytes T (Ku *et al.*, 2004). L'infection des lymphocytes T permet la dissémination du virus dans l'organisme de l'hôte. Subséquemment, cela permet l'établissement de la latence virale dans les neurones des ganglions dorsaux. Chez les personnes âgées ou immunocompromises, le virus peut se réactiver et migrer par le transport axonal antérograde et causer le zona qui se caractérise par les irritations dermatologiques (Zerboni *et al.*, 2014).

L'entrée du virus dans la cellule de l'hôte débute par l'attachement, qui est une interaction électrostatique non spécifique des glycoprotéines de l'enveloppe du virus, notamment la gB avec les glycosaminoglycanes telles que les sulfates d'héparanes (Shukla & Spear, 2001). VZV exprime l'homologue de la gC. Cependant, il a été difficile d'établir son rôle dans l'étape d'attachement, dû au fait qu'il est difficile d'avoir des virions infectieux libres, en d'autres mots des virions non associés aux cellules. VZV est propagé *in vitro* par la coculture des cellules infectées avec des cellules non infectées, et non par des virions libres, non associés aux cellules. Cela dit, la protéine d'attachement gC est dispensable à l'infection par VZV (Shukla & Spear, 2001). En dehors des sulfates d'héparane, gB peut interagir avec le récepteur cellulaire : Myelin associated glycoprotein (MAG) (Suenaga *et al.*, 2010). MAG est une glycoprotéine transmembranaire localisée dans les membranes périaxonales des cellules de Schwann et des oligodendrocytes. Elle participe à la myélinisation des cellules axonales et a un rôle dans les interactions gliales et axones (Quarles, 2007). Contrairement à HSV-1, VZV n'encode pas d'homologue de la gD (Oliver *et al.*, 2016). Pour l'attachement et l'entrée de VZV dans la cellule de l'hôte, la gB et l'hétérodimère gH-gL sont indispensables (Suenaga *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016). Par ailleurs, la glycoprotéine E (gE) a été rapportée comme essentielle à l'infectivité, l'entrée et la propagation cellule à cellule du VZV. La gE forme un hétérodimère avec la gI. La gE interagit avec le récepteur *Insulin-degrading enzyme* (IDE) (Li *et al.*, 2006). En bloquant gE ou en inhibant l'expression d'IDE, l'infectivité de VZV et sa propagation de cellule à cellule sont réduites (Li *et al.*, 2006). De plus, l'expression d'IDE augmente l'infectivité de VZV et son entrée dans des lignées cellulaires non humaines, notamment des cellules d'ovaire de Hamster : *Chinese hamster*

ovary (CHO) (Li *et al.*, 2006). Également, l'expression du récepteur IDE exogène dans des cellules knockdown-IDE augmente l'entrée et l'infectivité du VZV, et cela rétablit la propagation du VZV de cellule à cellule. Par ailleurs, Berarducci *et al.* (2010) ont rapporté que l'interaction gE-IDE n'est pas essentielle à l'entrée du virion libre dans les cellules T différenciées (Berarducci *et al.*, 2010). Toutefois, le récepteur de cation indépendant mannose-6-phosphate (MPRCi) facilite l'entrée du VZV en interagissant avec les glycoprotéines qui contiennent des complexes d'oligosaccharides N-liés (Chen *et al.*, 2004). Cette interaction se ferait avec la gB, gH, gI et gE qui contiennent ces complexes d'oligosaccharides. Chen *et al.* (2004) ont relevé que les cellules déficientes en MPRCi sont résistantes à l'infection par les virions libres, et non par les virions associés à la cellule (Chen *et al.*, 2004). De même, l'infection par VZV est bloquée par M6-P, le ligand de MPRCi (Zhu *et al.*, 1995).

VZV entre par un mécanisme d'endocytose médié par la clathrine pH-dépendant dans les cellules de fibroblastes humains, les cellules MeWo (melanoma-derived cells) et les U373MG (astrocytoma-derived cells) (Hambleton *et al.*, 2007). Le virion se retrouve endocytosé dans des vésicules enrobées (Hambleton *et al.*, 2007). En présence d'inhibiteur de clathrine, l'entrée du virion est bloquée. De plus, l'entrée nécessite la présence de cholestérol de la membrane de l'enveloppe virale et de la cellule hôte. La déplétion de cholestérol avec le méthyl- $\beta$ -cyclodextrane bloque l'entrée du virus (Hambleton *et al.*, 2007). Les facteurs cellulaires, tels que les tyrosines kinases sont nécessaires pour la réplication du virus, car son inhibition diminue la réplication du VZV (Hambleton *et al.*, 2007). Également, l'entrée du virion implique l'acidification endosomale, car le virus utilise un mécanisme dépendant du pH dans l'endosome pour la fusion membranaire. Dans des expériences où l'acidification endosomale a été inhibée avec le chlorure d'ammonium ou la bafilomycine (inhibiteur sélectif de la pompe vacuolaire H<sup>+</sup>/ATPase, qui augmente le pH endosomal), l'entrée du VZV est bloquée (Finnen *et al.*, 2006; Hambleton *et al.*, 2007; Yoshimori *et al.*, 1991). Sommairement, ces évidences démontrent que VZV utilise un mécanisme d'entrée endocytique.

### **1.2.3 Bovine herpesvirus**

*Bovine herpesvirus* (BHV-1) est un *Varicellovirus* spécifique aux bovins. L'infection par BHV-1 entraîne des troubles respiratoires, une conjonctivite, des troubles génitaux et une immunodépression transitoire qui déclenche le complexe de la maladie respiratoire bovine (CRBD) (Jones & Chowdhury, 2007). CRBD est une maladie multifactorielle impliquant plusieurs agents pathogènes, dont le virus respiratoire syncytial bovin, le virus de la diarrhée virale bovine

et le virus parainfluenza-3 (Kapil & Basaraba, 1997). Dans le contexte de cette immunosuppression transitoire, il a été démontré que plusieurs protéines virales du BHV-1 contribuent à l'évasion au système immunitaire. Notamment, la bICP0 inhibe l'activité du promoteur de l'interféron  $\beta$  en réduisant le niveau de la protéine IRF3 (interferon regulatory factor 3) (Jones, 2019). La protéine tégmentaire UL41 provoque la dégradation de l'ARNm cellulaire de STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1) et favorise l'expression des protéines virales dans les premiers stades de l'infection (Ma *et al.*, 2019). STAT 1 est un facteur qui participe à l'expression des gènes pro-inflammatoires en se liant à la séquence promotrice GAS (Interferon-Gamma-Activated Sequence) (Katze *et al.*, 2002). Par ailleurs, la protéine UL49.5, connue comme la gN, interfère avec le transport des peptides cytosoliques dans le réticulum endoplasmique médié par le transporteur associé au traitement de l'antigène (TAP). Ce dernier joue un rôle dans les processus de présentation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et dans la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T CD8+ (Koppers-Lalic *et al.*, 2005). De plus, la protéine tégmentaire viral protein 8 (VP8) interagit avec la protéine STAT1 et l'empêche de transloquer dans le noyau (Katze *et al.*, 2002). C'est ainsi que BHV-1 a été rapporté dans la littérature pour contrecarrer l'immunité de son hôte. Cela dit, des mécanismes similaires sont mis en branle par l'ensemble des virus herpétiques, afin de contrecarrer le système immunitaire de leur hôte.

BHV-1 infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire de son hôte. Le virus établit la latence dans les ganglions trijumeaux (Ackermann *et al.*, 1982). L'entrée du BHV-1 débute avec l'attachement de la gC aux sulfates d'héparanes. Ensuite, la gD interagit avec les récepteurs nectine-1 (PVRL1) ou le Poliovirus receptor (Pvr). La gD active et facilite l'interaction de l'hétérodimère gH-gL et la gB avec leurs récepteurs cellulaires. L'interaction de la gB avec le récepteur putatif Paired immuno-like receptor  $\alpha$  (PILR) résulte dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000; Geraghty *et al.*, 1998). Certaines études ont démontré que le récepteur cellulaire nectine-2 (PVRL2) médie l'entrée de HSV-2 et certaines souches mutantes HSV-1, mais non la souche sauvage HSV-1 ni BHV-1 dans les cellules CHO (Spear *et al.*, 2000; Struyf *et al.*, 2002; Warner *et al.*, 1998). Cela dit, récemment l'entrée de BHV-1 via le récepteur nectine-2 a été démontrée dans une étude de criblage knockout avec la technologie CRISPR à l'échelle du génome des cellules Madin-Darby bovine kidney (MDBK) avec une librairie couvrant tous les gènes codant pour des protéines bovines (Tan *et al.*, 2020b). Le knockout des gènes du récepteur Pvr, nectine-1 et la nectine-2 bloque l'entrée du BHV-1 dans la cellule hôte (Tan *et al.*, 2020a; Tan *et al.*, 2020b). Aussi, le traitement des

cellules MDBK avec une concentration d'héparine croissante cause la diminution des titres viraux. Donc, la présence de sulfates d'héparanes favorise l'entrée du virus dans la cellule.

BHV-1 entre dans les cellules MDBK, les cellules bovine turbinatae, et les cellules Vero (African green monkey kidney) par un mécanisme d'endocytose à faible pH (Pastenkos *et al.*, 2018). En traitant ces cellules avec un milieu hypertonique, qui inhibe l'entrée par mécanisme d'endocytose médié par un récepteur, l'entrée du BHV-1 est bloquée. En comparaison avec HSV-1 qui entre dans les cellules Vero par un mécanisme de fusion directe de l'enveloppe avec la membrane plasmique, le milieu hypertonique n'inhibe pas l'entrée virale, puisque le virus utilise un mécanisme non endocytique (Nicola *et al.*, 2003). L'infection par BHV-1 est inhibée en présence d'agents lysosomotropiques, tels que le chlorure d'ammonium et le monensine, qui bloquent l'acidification des endosomes (Heuser & Anderson, 1989; Pastenkos *et al.*, 2018). Pour conclure, BHV-1 utilise un mécanisme d'endocytose à faible pH pour entrer dans certaines cellules de son hôte (Pastenkos *et al.*, 2018).

#### **1.2.4 Equine herpesvirus**

Actuellement, neuf espèces de EHV ont été identifiées, notamment cinq étant reconnues dans le genre *Varicellovirus* : EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8, et EHV-9 (Khusro *et al.*, 2020). EHV-1 et EHV-4 sont génétiquement et antigéniquement reliés. EHV-1 a la capacité d'infecter différents types cellulaires, tandis que l'entrée et la réplication de l'EHV-4 semblent se limiter principalement aux cellules équinées (Davison *et al.*, 2009; Khusro *et al.*, 2020).

L'EHV-1 cause des troubles respiratoires, l'avortement, la mort néonatale des poulains et la myéloencéphalopathie herpétique équine (MME). La pathogenèse et le tropisme cellulaire de l'EHV-4 ont été beaucoup moins étudiés. Contrairement à l'infection par l'EHV-1, l'infection lytique par l'EHV-4 reste restreinte aux voies respiratoires supérieures et la virémie associée aux cellules infectées est extrêmement rare (Khusro *et al.*, 2020).

Lors de la primo-infection, EHV-1 infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieure. La lyse des cellules épithéliales respiratoires provoque des symptômes cliniques légers (Gryspeerdt *et al.*, 2010). L'infection chez l'adulte est parfois asymptomatique. Cependant, les jeunes chevaux peuvent développer des symptômes sévères, tels que la fièvre et le gonflement des ganglions lymphatiques submandibulaires et rétropharyngés (Patel *et al.*, 1982). Après l'infection initiale, le virus pénètre dans la membrane basale et infecte les leucocytes. Les leucocytes infectés par l'EHV-1 pénètrent dans les tissus conjonctifs et atteignent la circulation sanguine et le drainage du ganglion lymphatique. En conséquence, il y a une virémie associée

aux cellules infectées, durant laquelle le virus se dissémine dans différents organes, notamment dans le système nerveux central et/ou l'utérus gestante (Siedek *et al.*, 1999; van der Meulen *et al.*, 2000). Suite à cette virémie, le virus établit une latence dans les ganglions trijumeaux. Le virus peut se réactiver lors d'une immunosuppression de l'hôte, et migrer par la voie axonale antérograde pour réinfecter le site de la primo-infection (Siedek *et al.*, 1999; van der Meulen *et al.*, 2000).

L'infection par l'EHV-1 commence par l'attachement à la surface de la cellule via la gC ou la gB qui interagit avec les sulfates d'héparanes. L'infection par EHV-1 est bloquée par l'héparine soluble (Azab *et al.*, 2010). Ensuite, l'interaction de la gD avec son récepteur active le mécanisme d'entrée du virion dans la cellule. La gD de EHV-1 et EHV-4 interagit avec le récepteur, le CMH-1, dans les fibroblastes équin, dans les cellules épithéliales et endothéliales (Azab *et al.*, 2014). Le CMH-1 étant exprimé sur toutes les cellules nucléées, il confère au virus un large tropisme dans plusieurs types cellulaires, notamment les cellules CHO-K1, qui sont résistantes à l'infection par HSV-1 (Frampton *et al.*, 2005). EHV-1 est capable d'infecter plusieurs lignées cellulaires des chevaux, de bovins, de lapins, de hamster, de la souris, du porc, du singe et du chat (Whalley *et al.*, 2007). À contrario, EHV-4 est restreint aux cellules dérivées du cheval et se réplique faiblement dans les lignées cellulaires autres que les lignées équin, notamment les cellules Vero (Whalley *et al.*, 2007). Il a été rapporté dans la littérature que EHV-1 et EHV-4 infectent les cellules autres que les lignées équin, indépendamment du CMH-1, ce qui suggère que le virus utilise un autre récepteur dans ces cellules. D'autant plus, en présence d'anticorps contre le CMH-1, l'infection par EHV-1 n'est pas bloquée dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs). Donc, l'entrée du EHV-1 est médiée par un différent récepteur, autre que CMH-1 (Azab *et al.*, 2012).

Par ailleurs, il a été relevé que le mécanisme d'entrée du EHV-1 est dépendant du type cellulaire. En d'autres mots, EHV-1 entre dans les cellules CHO-K1 par un mécanisme d'endocytose, alors que dans les cellules équin dermales et les cellules de rein de lapin (rabbit kidney: RK13), le virus entre par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (Frampton *et al.*, 2005). Ainsi, EHV-1 infecte les cellules épithéliales équin, et ce, malgré la présence des inhibiteurs de la clathrine, des radeaux cholestérol/lipides, de l'endocytose médiée par la cavéoline, de la macropinocytose, de la dynamine, des tyrosines kinases et de l'acidification endosomale (Azab *et al.*, 2013). Cela suggère que le virus utilise un autre mécanisme d'entrée indépendant de l'endocytose, soit, la fusion directe. À contrario, l'entrée de EHV-4 dans les cellules épithéliales équin implique une endocytose à pH neutre qui dépend de la cavéoline 1,

du cholestérol, de la dynamine II et de l'activité tyrosine kinase (Azab *et al.*, 2013). EHV-1 et EHV-4 utilisent des voies d'entrée différentes qui dépendent de la gH et des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  cellulaires (Azab *et al.*, 2013). Fait intéressant, en remplaçant la gH du EHV-1 par la gH du EHV-4, l'entrée du EHV-1 est réacheminée vers la voie endocytique. De plus, en bloquant le récepteur d'EHV-1, avec des anticorps ciblant les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ , l'entrée du EHV-1 a été ré-acheminée vers la voie endocytique au lieu de sa voie classique. En outre, une mutation ponctuelle du motif de liaison à l'intégrine, SDI (serine-acide aspartique -isoleucine), de la gH de l'EHV-1 a également redirigé EHV-1 vers la voie endocytique (Ma *et al.*, 2013). Cela suggère que l'interaction de la gH à son récepteur est une étape déterminante dans le choix du mécanisme d'entrée du virus. En conclusion, les glycoprotéines d'enveloppe du virus et leurs récepteurs respectifs déterminent le mécanisme d'entrée du virus.

### **1.2.5 *Canid herpesvirus***

CHV-1 est un agent pathogène important et répandu dans les populations canines sauvages et domestiques. Notre laboratoire a investigué le mécanisme d'entrée du CHV-1 dans les cellules Madin Darby canine kidney (MDCK). Il a été démontré que CHV-1 entre dans les cellules MDCK par un mécanisme similaire à la macropinocytose (Eisa *et al.*, 2021). Étant donné que la macropinocytose est un processus par lequel les cellules endocytosent des fluides, des solutés, et des particules attachées à la membrane. Ce processus d'endocytose est dépendant de l'actine (Gruenheid *et al.*, 1993). Il est transitoire et non sélectif, car il permet l'internalisation de grand volume de fluide (Kerr & Teasdale, 2009).

Premièrement, notre laboratoire a démontré par microscopie électronique à transmission (MET), qu'à 30 secondes et 2 minutes post-infection, le virus est internalisé dans de grosses vésicules. Ces vésicules sont dépourvues de manteau cytoplasmique et sont d'un diamètre de 264 nm à 1943 nm (Eisa *et al.*, 2021).

Deuxièmement, pour caractériser l'entrée endocytique du CHV-1, Eisa *et al.* (2021) ont utilisé des inhibiteurs chimiques qui ciblent les différentes étapes du mécanisme d'endocytose. La macropinocytose étant un processus nécessitant l'actine et les pompes d'échange d'hydrogène et sodium, en présence d'inhibiteur : (i) de la pompe d'échange sodium/hydrogène NHE (Na/H Exchanger) ; (ii) de la polymérisation de l'actine (iii) et de la myosine light-chain kinase (MLCK), l'infection par le CHV-1 a été bloquée. Cela suggère que le virus utilise la machinerie de la macropinocytose pour être internalisé. Également, la phosphatidylinositol-3-kinase (PI(3)K) et la myosine participent à la formation des protrusions membranaires et la formation des

macropinosomes (Dowrick *et al.*, 1993). Il a été démontré que leur inhibition bloque l'entrée du virus. Donc, l'entrée du CHV-1 se fait par la machinerie macropinocytaire. De plus, la macropinocytose repose sur l'activation des récepteurs cellulaires, tels que les intégrines et les récepteurs avec activité tyrosine kinase (RTK : receptor tyrosine kinase) (Mercer & Helenius, 2009; Mercer *et al.*, 2010). En utilisant une panoplie d'inhibiteurs ciblant les RTK, les intégrines, ainsi que les différents acteurs de leurs cascades de signalisation, l'infection par CHV-1 a été une fois de plus bloquée. Cela suggère que la machinerie de la macropinocytose est impliquée dans l'entrée du CHV-1. Pour étudier l'implication d'un autre mécanisme d'entrée endocytaire outre la macropinocytose, l'infection par le CHV-1 a été étudiée en présence d'inhibiteur de l'assemblage du manteau de clathrine et l'inhibiteur de la formation des puits de calvéoline (la nystatine). La nystatine forme un complexe avec le cholestérol, inhibant ainsi la formation de radeaux lipidiques dans la membrane plasmique et la formation de puits de calvéoline (Matveev *et al.*, 2001). La présence de ces inhibiteurs n'a pas affecté l'entrée du CHV-1 dans les cellules MDCK. De plus, les images de MET ne démontraient pas la présence de vésicules revêtues. En conclusion, l'entrée du CHV-1 est médiée par un mécanisme d'endocytose clathrine indépendante et calvéoline indépendante. De plus, l'augmentation du pH endosomal avec un traitement au chlorure d'ammonium ou à la bafilomycine, au début de l'infection, n'affecte pas l'entrée du CHV-1. Cela suggère que l'acidification endosomale n'est pas essentielle à la sortie du CHV-1 du macropinosome pour accéder au cytoplasme de la cellule. Donc, l'entrée du CHV-1 est indépendante du pH, de la clathrine, et de la calvéoline/des radeaux lipidiques.

Troisièmement, le processus de macropinocytose classique induit une formation de vacuole transitoire (macropinosome) ainsi qu'une absorption de fluide extracellulaire. Cela dit, l'entrée du CHV-1 par macropinocytose ne s'accompagne pas d'une augmentation de pinocytose de fluide. Dans une analyse de microscopie confocale, il a été observé qu'un virus fluorescent se colocalise avec le marqueur de phase fluide le dextrane fluorescent (10 kDa). Cependant, le virus n'a pas induit une augmentation de l'absorption de fluide. Toutes ces évidences supportent le modèle de l'entrée du CHV-1 dans les cellules MDCK par un mécanisme similaire à la macropinocytose indépendant du pH (Eisa *et al.*, 2021).

Par ailleurs, une caractéristique essentielle de la macropinocytose est l'induction de protrusions membranaires due au réarrangement de l'actine. Ces protrusions prennent différentes formes : lamellipode, circulaire, filopode et "blebs" (Mercer & Helenius, 2009; Mercer *et al.*, 2010). Ces protrusions ont la fonction d'engloutir et d'internaliser les particules à la surface cellulaire. En analysant la surface des cellules infectées par CHV-1, 10 min et 30 min post

infection par microscopie électronique à balayage, il y a une induction généralisée de protrusions membranaires de type lamellipodes (Eisa *et al.*, 2021). Ceci suggère que l'induction des protrusions membranaires par le CHV-1 favorise l'infection du virus, possiblement en augmentant la surface de contact de la membrane plasmique, ainsi rendant les récepteurs cellulaires présents plus accessibles. Aussi, les structures membranaires lamellipodales induites par le CHV-1 à la surface des cellules MDCK non polarisées démontrent une similitude aux protrusions membranaires déjà présentes sur les cellules épithéliales polarisées. Pour cette raison, un des objectifs de ce projet est d'investiguer l'entrée du CHV-1 dans les cellules épithéliales polarisées MDCK.

### 1.3 Rôles des glycoprotéines virales dans l'entrée

L'entrée des alphaherpèsvirus n'implique pas l'interaction d'une seule glycoprotéine virale avec un seul récepteur, mais plusieurs interactions coordonnées de plusieurs glycoprotéines virales avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires. Pour plusieurs alphaherpèsvirus, cinq glycoprotéines participent à l'entrée, notamment la gC, gD, gH, gL et la gB. L'entrée se déroule en trois étapes : l'attachement du virion, l'interaction avec le récepteur et la fusion. L'attachement est une étape réversible, et elle est médiée par la gC. Tous les herpesvirus expriment les glycoprotéines gH, gL et gB, et la plupart exprime la gD, à l'exception du VZV (Davison *et al.*, 2009). La gD joue le rôle de ligand canonique du récepteur d'entrée. Cette interaction occasionne un changement de conformation de la gD qui transmet un signal à gH/gL. La gH/gL, le régulateur de la fusion, active la protéine de fusion, la gB, qui permet la fusion de l'enveloppe à la membrane cellulaire (Madavaraju *et al.*, 2021). La gB insère sa loupe de fusion hydrophobique dans la membrane cellulaire et se replie sur elle-même pour emmener à proximité les membranes virale et cellulaire, permettant ainsi la fusion (Madavaraju *et al.*, 2021).

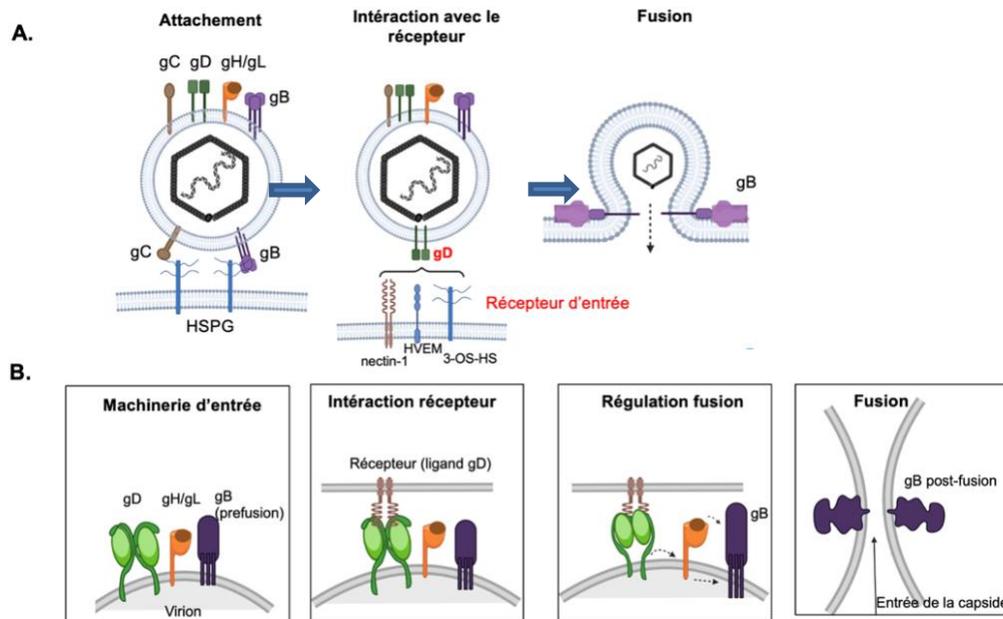


Figure 1.7: Mécanisme d'attachement et de fusion du HSV-1

(A) Attachement de la particule virale aux sulfates d'heparanes (HSPG) via la gB ou la gC. Ensuite, gD interagit avec un de ses récepteurs fonctionnels : nectine-1/2, HVEM et 3-OS-HS. À la suite de l'interaction avec le récepteur, il y a activation de la machinerie de fusion. (B) Les glycoprotéines essentielles à l'entrée sont démontrées : gD (en vert), gH/gL (en orange) et gB (en mauve). Après l'interaction de la gD avec son récepteur, le domaine C-terminal (CT) de la gD subit un changement de conformation qui permet un transfert de signal à l'hétérodimère gH/gL. À son tour, gH/gL, transmet un signal à partir de l'ectodomaine ou du domaine CT à la gB. La gB subit un changement de conformation et insère sa boucle de fusion dans la membrane de la cellule hôte. Plusieurs gB sont nécessaires pour permettre la fusion membranaire, notamment deux gB sont illustrées dans le panneau B. Dessins réalisés à l'aide du logiciel Biorender.

### 1.3.1 Glycoprotéine C (gC)

Pour les alphaherpèsvirus, la gC permet l'attachement du virion à la surface de la cellule, via son interaction électrostatique non spécifique avec les glycosaminoglycanes (GAGs), tels que les sulfates d'héparanes. Les protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG) sont exprimés de manière ubiquitaire sur les surfaces cellulaires et dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus animaux (Herold *et al.*, 1991; Laquerre *et al.*, 1998; Rux *et al.*, 2002). Les HS servent de premier point de contact entre le virion et la surface de la cellule hôte. Cette étape d'attachement augmente l'efficacité d'infection, car elle permet de concentrer les virions à la surface cellulaire, et ainsi emmène à proximité les glycoprotéines de l'enveloppe avec leurs récepteurs. (Herold *et al.*, 1991; Shukla *et al.*, 1999; WuDunn & Spear, 1989). La délétion de HSPG ou les mutations dans les sites putatifs d'interaction avec la gC ou gB réduit la production de nouvelles particules virales du HSV (Gruenheid *et al.*, 1993).

### 1.3.2 Glycoprotéine D (gD)

La gD est la protéine d'attachement au récepteur. Elle est essentielle à l'entrée de plusieurs alphaherpèsvirus à l'exception de VZV. En bloquant l'interaction de la gD avec son récepteur, soit avec une version soluble de la gD ou l'ectodomaine de son récepteur, l'infection par HSV est inhibée (Johnson *et al.*, 1990; Montgomery *et al.*, 1996; Nicola *et al.*, 1997; Warner *et al.*, 1998; Whitbeck *et al.*, 1997). Cette observation a aussi été faite par plusieurs autres groupes de recherche : en présence d'anticorps contre la gD ou son récepteur, l'infection par HSV se retrouve inhibée. Donc, la gD est une glycoprotéine essentielle à l'infection. La gD de HSV interagit avec 3 types de récepteurs cellulaires : HveB (la nectine et les protéines similaires à la nectine) ; HveA (HVEM : Herpesvirus entry mediator); et HveC (sulfate d'héparane 3-O-sulfaté : 3-OST HS) (Shukla *et al.*, 1999; Spear *et al.*, 2000; Whitbeck *et al.*, 1997).

Le premier type de récepteur, les nectines, sont des protéines d'adhésions présentes à la surface cellulaire et entre les jonctions intercellulaires où elles participent au maintien de l'intégrité des jonctions cellulaires en formant des homo ou hétérodimères avec les nectines des cellules adjacentes. Les nectines font partie des récepteurs de la superfamille des immunoglobuline-like. Elles ont un domaine variable (V-like) et deux domaines constants similaires à l'Ig (C-like) (Nakanishi & Takai, 2004). Elles sont distribuées sur la surface de la plupart des tissus épithéliaux et neuronaux. La nectine-1 est un récepteur pour HSV-1, HSV-2, PRV et BHV-1 (Cocchi *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2012; Galen *et al.*, 2006; Warner *et al.*, 1998). La nectine-2 est un récepteur d'entrée pour HSV-2, PRV et certains mutants HSV-1. Le récepteur Poliovirus (un récepteur de

la famille des nectines) est la porte d'entrée de PRV et BHV-1. Certaines évidences suggèrent que sous pression sélective, HSV-1 peut acquérir des mutations lui permettant d'utiliser la nectine-2, la nectine-3 et la nectine-4 comme récepteur d'entrée (Cocchi *et al.*, 2004b).

Le second type de récepteur est le HVEM, qui est un récepteur membre de la superfamille des Tumor Necrosis Factor (TNF). HVEM est exprimé à la surface des lymphocytes T où ses ligands naturels sont BTLA (B et T lymphocyte attenuator), CD160 et TNFSF14 (tumor necrosis factor superfamily member 14). Ces ligands ont une fonction d'interrupteur donnant soit un signal pro-inflammatoire d'activation, soit un signal inhibiteur aux cellules T et aux cellules Natural killer (NK)(Mauri *et al.*, 1998).

Le troisième type de récepteur est le sulfate d'héparane 3-O-sulfaté (3-OST HS). Ils sont générés par l'enzyme HS 3-O sulfotransférase. Ils sont présents sur les cellules neuronales de souris dans les ganglions trijumeaux (Shukla *et al.*, 1999). À ce jour, leur fonction dans l'infection du HSV n'est pas totalement élucidée.

La structure cristallographique de la gD du HSV-1, HSV-2 et PRV révèle une organisation similaire entre certains domaines de ces virus. Notamment, le domaine « core » ou le noyau de la gD consiste d'une région variable Ig-Like (Ig-V) et est encadrée par une longue extension N- et C terminale. Les domaines N- et C-terminaux sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur cellulaire et l'activation de la cascade fusogénique respectivement (Connolly *et al.*, 2003). L'interaction du récepteur nectine-1 ou de HVEM avec la gD se fait sur l'épingle N-terminal (Carfí *et al.*, 2001; Connolly *et al.*, 2003; Geraghty *et al.*, 1998). **(Figure 1.7)**. Le site d'interaction de la gD avec la nectine-1 est situé à l'intérieur du noyau du repliement IgV, près du site d'interaction avec HVEM **(Figure 1.7)**. Cependant, les deux sites ne se chevauchent pas. En revanche, HVEM et nectine-1 ne peuvent pas se lier à la gD simultanément. L'épingle N-terminale de la gD où se situe le site d'interaction avec le récepteur HVEM occulte partiellement le site de la nectine-1. À l'inverse, la liaison nectine-1 à la gD empêche la formation de l'épingle N-terminale liant HVEM (Di Giovine *et al.*, 2011; Krummenacher *et al.*, 2005).

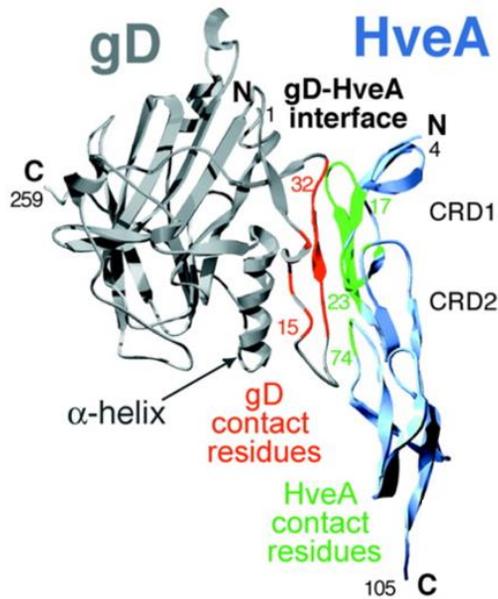


Figure 1.8 : Structure cristallographique de la gD liée à HveA.

Les résidus N- et C-terminaux observés dans la structure cristallographique sont indiqués. La gD est représentée en gris, les résidus de contact situés dans la boucle N-terminale de la gD sont représentés en rouge. HveA est représentée en bleu. Image tirée de Connolly *et al.* (2003).

Dans la forme non liée au récepteur, l'extrémité C de l'ectodomaine de la gD se trouve au-dessus de la région de liaison au récepteur (Krummenacher *et al.* 2005). Après que la gD se lie à HVEM ou à nectine-1, le récepteur occupe le site précédemment occupé par l'extrémité C terminale de gD. L'interaction de la gD avec son récepteur a pour effet de causer le déplacement de la queue C-terminale qui transmet un signal à la gH/gL et médie la fusion. Par conséquent, la queue C-terminale elle-même joue un rôle important dans le déclenchement de la fusion membranaire (Gallagher *et al.*, 2013). Cela a été démontré dans des expériences utilisant des mutants gD conçus pour forcer le déplacement de la queue C-terminale (Gallagher *et al.*, 2013). Notamment, une mutation du tryptophane (W) à la place de la valine (V) à la position 231 de la gD du HSV-1 augmente l'activité de fusion cellulaire, et ce, même en l'absence des récepteurs de la gD (Gallagher *et al.*, 2013). Et donc, gD V231W est une mutation qui confère un état actif à la gD pour activer directement la gH/gL et la gB, et ce, sans le récepteur. Par ailleurs, la substitution d'une région de la queue C-terminale (résidus 261-285) inhibe l'entrée du virus. Cette région de la gD du HSV a été appelée " domaine profusion " en raison de sa nécessité pour l'entrée du virus (Cocchi *et al.*, 2004a). Ce résultat suggère que l'extrémité C-terminale ne fait pas que permettre la liaison des récepteurs en inhibant directement la fusion lorsqu'il recouvre l'interface de liaison des récepteurs, mais aussi, il promeut la fusion via la gH/gL en exposant les interfaces sur la gD qui activent la fusion lorsque l'extrémité C-terminale est déplacée. Aussi, il a

été rapporté dans la littérature, que la gD a la capacité de lier gH/gL à partir d'une région qui est distincte du domaine profusion (Lazear *et al.*, 2012). Les anticorps qui se lient au domaine profusion inhibent la fusion cellule-cellule et la dissémination du virus. Les épitopes de plusieurs autres anticorps anti-gD qui neutralisent le virus sans bloquer la liaison gD/récepteur se situent dans des régions situées en dehors du domaine profusion (résidus 54 et 67) (Lazear *et al.*, 2012). Cela suggère la présence d'une région de liaison potentielle de gH/gL sur la gD adjacente au site de liaison du récepteur. De plus, il a été relevé dans la littérature que les récepteurs HVEM ou nectine-1, et la gH/gL sont capable de se lier simultanément à la gD (Cairns *et al.*, 2014). Cela suggère des sites d'interaction distincts pour chaque partenaire de la gD.

### 1.3.3 Glycoprotéine H/gL (gH/gL)

La gH et la gL forme un complexe hétérodimerique à un ratio 1:1. La gL sert de molécule chaperonne qui donne la forme fonctionnelle à la gH (Peng *et al.*, 1998). La gH est une protéine transmembranaire, alors que la gL n'est pas une protéine associée à la membrane : cependant elle est associée à l'ectodomaine de la gH de manière non covalente (Peng *et al.*, 1998). Auparavant, la gH/gL était considérée comme une protéine de fusion, soit, une protéine participant activement à la fusion des membranes virales et cellulaires. Cela était en partie dû à des analyses de séquences qui ont démontré la présence de peptides de fusion dans la séquence gH (Galdiero *et al.*, 2005). Des études cristallographiques de la gH/gL de HSV-2 et VZV ont permis de réfuter son rôle fusogénique, puisque la structure ne ressemble pas à une protéine fusogénique connue, mais plutôt à un complexe de protéines en forme de botte (Chowdary *et al.*, 2010).

La gH a cinq domaines, notamment H1A, H1B, H2A, H2B et H3. La gL est positionnée entre H1A et H1B et interagit avec ces deux domaines (Chowdary *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2015) (**Figure 1.8**). L'expression de la gH/gL chez tous les herpèsvirus suggère une fonction conservée pour l'entrée et la fusion cellule à cellule. Cependant, le mécanisme par lequel la gH/gL promeut l'entrée n'est pas complètement élucidé. Pour HSV, le modèle qui a été proposé est que la gH transmet le signal activateur de la protéine interagissant avec le récepteur, gD, à la protéine de fusion : la gB. Par des expériences de complémentation fluorescente, Atanasiu *et al.* (2007) ont démontré que la gH interagit avec l'ectodomaine de la gB en présence de la gD avec son récepteur (Atanasiu *et al.*, 2010). La gH pleine longueur active la gB plus efficacement que sa forme soluble (Atanasiu *et al.*, 2010). Des expériences mutationnelles ont démontré que l'insertion ou la délétion dans la région de la queue cytoplasmique de la gH régulent la machinerie

de fusion en réduisant l'infectivité et la fusion intercellulaire (Rogalin & Heldwein, 2015). La queue cytoplasmique de la gH interagit de manière transitoire avec la région du cytodomaine de la gB (Rogalin & Heldwein, 2015), ce qui perturbe les interactions entre les différents protomères au sein du cytodomaine de la gB. Cela permet à la gB de subir un changement de conformation qui active la fusion (Rogalin & Heldwein, 2015). À son tour, la gH transmet un signal qui permet la transition de la gB de sa forme préfusion à la forme activée pour la fusion (Chowdary *et al.*, 2010)

Pour les betaherpèsvirus et les gammaherpèsvirus, la gH/gL seule ou en complexe avec une autre protéine virale agit comme ligand du récepteur (Chen *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2015). Par exemple, pour HCMV, gH/gL forme un complexe trimérique avec la gO et interagit avec Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), un récepteur de la famille des RTK, dans les fibroblastes (Ciferri *et al.*, 2015). À l'inverse, pour la plupart des alphaherpèsvirus, la gD est le ligand canonique du récepteur. Cela dit, pour VZV qui n'encode pas la gD, la fusion cellule-cellule est médiée par la gB et gH/gL. La gH interagit avec ses propres ligands cellulaires, notamment, les intégrines. Pour HSV-1, trois types d'intégrines sont connus comme récepteurs de la gH :  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$  (Gianni *et al.*, 2013; Parry *et al.*, 2005).  $\alpha\beta3$  interagit avec une faible affinité avec la gH, bien que, lorsqu'il est inhibé, la route d'entrée du HSV est détournée (Parry *et al.*, 2005). De plus, il est intéressant de noter que pour EHV-1, le blocage du récepteur cellulaire—les intégrines  $\alpha4\beta1$ —a permis de modifier la voie d'entrée du EHV-1, qui passe de la fusion directe à une endocytose médiée par les calvéolines/les radeaux lipidiques. Cependant, en remplaçant la gH<sub>4</sub> de EHV-4 par la gH<sub>1</sub> du EHV-1, il n'y a pas eu redirection de l'entrée du EHV-4 de l'endocytose à la fusion directe (Azab *et al.*, 2013). Et donc, la gH jouerait un rôle dans le choix du mécanisme d'entrée des alphaherpèsvirus.

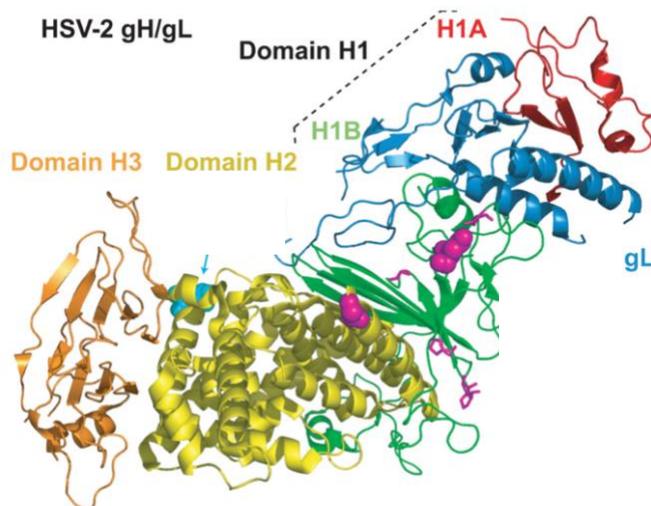


Figure 1.9: Structure cristallographique de l'hétérodimère gH/gL

La gH/gL adopte une conformation en forme de botte. Le domaine gH N-terminal H1, composé des sous-domaines H1A (rouge) et H1B (vert) encadre la gL (bleu). Les domaines gH C-terminaux H2 (jaune) et H3 (orange) sont représentés. Figure tirée de Connolly *et al.* (2011)

### 1.3.4 Glycoprotéine B

La gB est la glycoprotéine la plus conservée parmi les herpèsvirus. La structure cristallographique a démontré une protéine de fusion de type 3 (Backovic & Jardetzky, 2009; Vollmer *et al.*, 2020). La gB est une protéine trimérique (trois protomères) transmembranaire avec un ectodomaine, une région membranaire proximale (RMP), un domaine unique transmembranaire (TMD) et une queue cytoplasmique (CTD) ou connue comme le cytodomaine. La gB du HSV existe sous deux formes : la forme pré-fusion et la forme post-fusion (Cooper & Heldwein, 2015).

Un protomère est organisé en cinq domaines. Le domaine I (domaine de fusion) est localisé à la base de l'ectodomaine proche de la membrane (Falanga *et al.*, 2012). Il est formé des feuilletts  $\beta$  qui contiennent les résidus hydrophobiques à leur extrémité qui sont insérés dans la membrane pour créer la boucle de fusion (Backovic & Jardetzky, 2009). Les boucles de fusion de la gB sont cruciales pour la fusion membranaire. Le domaine II sert de médiateur d'interactions avec la gH-gL (Atanasiu *et al.*, 2010). Le domaine III est le domaine noyau qui est formé d'une longue bobine hélicoïdale  $\alpha$ , une caractéristique typique de nombreuses protéines de fusion

virales, y compris celles de classe I et de classe III. La protéine trimérique est formée de trois hélices qui s'enroulent pour former une boucle. Le domaine IV, aussi connu comme le domaine couronne, serait responsable de lier les récepteurs cellulaires (Madavaraju *et al.*, 2021). Cette hypothèse est étayée par des études qui montrent que la liaison d'anticorps au domaine IV (la couronne) empêche la gB de se lier à son récepteur cellulaire (Hannah *et al.*, 2009). Le domaine V d'un protomère s'emboîte contre le domaine III de deux autres protomères. Il sert d'extension qui relie les protomères entre eux (**Figure 1.9**).

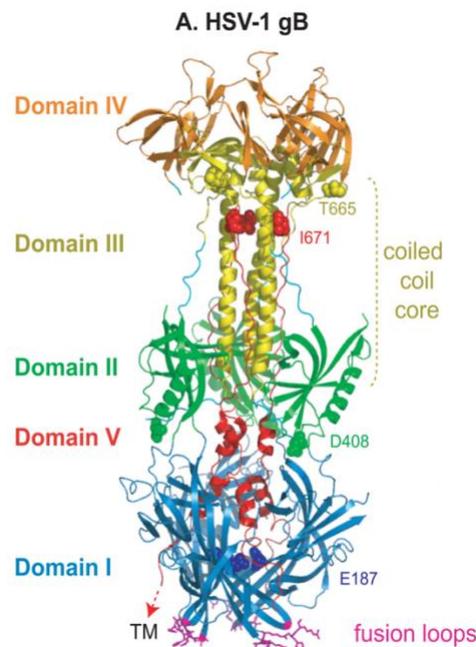


Figure 1.10: **Structure cristallographique de la gB**

Les différents domaines de la gB sont identifiés : domaine I (en bleu) avec la boucle de fusion (en violet), domaine V (en rouge), domaine II (en vert), domaine III (en jaune) qui est formé du noyau en bobine en hélice (coiled coil core), domaine IV (en beige). Figure tirée de Connolly *et al.* (2011)

La région membranaire proximale de la gB (MPR) est une structure hélicoïdale hautement hydrophobe. Elle est située entre l'ectodomaine et la région transmembranaire (Maurer *et al.*, 2013). Sa fonction n'est pas totalement élucidée. Cependant, des expériences d'altération dans cette région de la gB, notamment par des mutations ponctuelles, des délétions ou insertions, ont un effet inhibiteur sur l'infectivité du HSV-1 (Wanas *et al.*, 1999). Les boucles de fusion des protéines fusogéniques de classe III sont connues pour être proche de l'enveloppe virale, et pour interagir avec les membranes lorsqu'elles sont exposées à la surface de l'ectodomaine. Cependant, les constructions de l'ectodomaine et la MPR de la gB n'interagissent pas avec les

membranes (Maurer *et al.*, 2013). La proximité de la MPR avec la membrane pourrait suggérer que la MPR protège les boucles de fusion pour empêcher leur insertion non productive dans l'enveloppe virale et sa composition hautement hydrophobique contribue directement au processus de fusion en facilitant le mélange des lipides. Par ailleurs, le domaine transmembranaire (TM) sert d'ancrage membranaire pour la gB. De plus, il a été démontré, par des expériences de remplacement du domaine TM par un ancrage lipidique, que le processus de fusion est interrompu au stade de l'hémi-fusion. Cette dernière est l'étape intermédiaire de la fusion où les feuillettes externes des deux membranes fusionnent, alors que les feuillettes membranaires distaux restent séparés jusqu'à l'ouverture du pore de fusion. Donc, le domaine TM joue un rôle dans les étapes ultérieures de la fusion, possiblement dans le mélange lipidique et la formation du pore de fusion (Cooper & Heldwein, 2015).



**Figure 1.11 Structure du cytodomaine de la gB**

La gB formée d'un ectodomaine (en bleu), le domaine membranaire proximal (MPR) (en vert), le domaine transmembranaire (TM) (en jaune) et le cytodomaine (en rouge). Le cytodomaine est formé des domaines H1a, H1b, H2a, H2b et H3. Figure adaptée de Rogalin and Heldwein (2015)

Des analyses structurales ont révélé que le cytodomaine de la gB est composé de trois domaines (H1, H2 et H3). Le domaine H1 est formé des sous-domaines H1a et H1b et le domaine H2 est formé des sous-domaines H2a et H2b. Les domaines H1a et H2 forment des hélices  $\alpha$ , et H1b forme une hélice. De longues  $\alpha$ -hélices H2 forment le noyau trimérique central (Cooper *et al.*, 2018). Le cytodomaine sous la membrane forme une base qui confère une stabilité structurale globale à la gB. Et donc, les études mutationnelles du cytodomaine de la gB, notamment les tronquages et les insertions dans cette région affectent l'infectivité virale, notamment en améliorant la fusion cellulaire (Weed & Nicola, 2017). Ces observations suggèrent que le cytodomaine de la gB régule négativement la réaction de fusion et maintient la forme pré-fusionnelle, empêchant ainsi la fusion cellulaire. De plus, cela est en accord avec le modèle (Rogalin & Heldwein, 2015) qui suggère que la queue cytoplasmique de la gH déstabilise le cytodomaine de la gB en interagissant de manière transitoire, ce qui permet à la gB de se déplier pour prendre une forme activée et favoriser la fusion cellulaire.

Les anticorps générés contre la gB sont neutralisants et sont capables de se lier à gB dans sa conformation post-fusion (Cairns *et al.*, 2015; Cairns *et al.*, 2014). Ils se lient à différentes régions fonctionnelles de la gB importantes pour la fusion et l'interaction avec d'autres glycoprotéines, notamment la gH (Cairns *et al.*, 2015; Cairns *et al.*, 2014). La gB contient quatre régions fonctionnelles (FR) : la FR1, FR2, FR3 et FR4. La FR1 est la base de la structure de post-fusion ; elle contient les boucles de fusion et les régions du domaine V. La FR2 est le domaine II et se chevauche à un site d'interaction de la gH/gL. La FR3 est la couronne de la gB et comprend des régions du domaine III et du domaine V. La FR4 est la région N-terminale de la gB qui n'a pas été résolue dans sa structure ; elle comprend le site de liaison des HSPG (Bender *et al.*, 2007).

La gB peut se lier à trois types de récepteurs à la surface de la cellule hôte. Notamment, le récepteur PILR $\alpha$ , MAG et la myosine-9 (également appelée chaîne lourde de myosine non musculaire IIA (NMMHC-IIA)) (Arii *et al.*, 2010). Rappelons-le, le modèle d'entrée proposé à ce jour, suggère que le signal de fusion est transmis à gB à partir de la gH/gL, et non via son interaction avec ses récepteurs. La gB interagit avec MAG sur les résidus d'acides sialiques (Suenaga *et al.*, 2015). Les résidus d'acide sialique sont une famille d'acides à neuf carbones qui sont positionnés à l'extrémité non-réduite des chaînes d'oligosaccharidiques des glycoprotéines et des glycolipides (Lehmann *et al.*, 2006). Il a été démontré que les mutations du récepteur MAG ciblant les sites de liaison à l'acide sialique empêchent la liaison de la gB, et cela bloque la fusion membranaire et l'entrée du VZV. De même, des mutations dans les sites de N-glycosylation de la gB du VZV empêchent la liaison à MAG et réduisent l'efficacité de la fusion membranaire (Suenaga *et al.*, 2015).



## 2 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

---

Le *Canid herpesvirus 1* (CHV-1) cause une infection fatale pour les chiots nouveau-nés et des avortements spontanés. Il représente un enjeu pour les éleveurs de chiens. Pour développer des stratégies thérapeutiques, il est important d'identifier les interactions entre l'hôte et le virus qui sont essentielles à la réplication et à la dissémination du virus. Notre laboratoire a démontré que le CHV-1 entre dans les cellules Madin Darby canine kidney (MDCK) par un mécanisme similaire à la macropinocytose. Par contre, le récepteur cellulaire—élément clé pour la première étape du cycle de la réplication virale—reste un mystère. L'objectif général du projet était d'investiguer le mécanisme d'entrée du CHV-1.

Notre premier objectif était de purifier des protéines cellulaires ligands de la glycoprotéine virale D dans le but d'identifier le récepteur. À cet effet, nous émettons l'hypothèse que la glycoprotéine majeure du virus D (gD) lie directement le(s) récepteur(s) cellulaire(s) de l'hôte, la stratégie étant de produire la gD fusionnée avec le domaine Fc d'un anticorps IgG1 humain et d'utiliser la glycoprotéine recombinante pour purifier par d'affinité le(s) récepteur(s) à partir d'un lysat cellulaire MDCK. Les protéines interagissant avec la gD du CHV-1 purifiées par affinité dans une expérience « pull-down » seront identifiées par un service externe de spectrométrie de masse.

Toujours dans l'optique d'investiguer le mécanisme d'entrée du CHV-1, le second objectif en collaboration avec un autre étudiant au laboratoire, est de caractériser l'infection du CHV-1 dans les cellules épithéliales MDCK polarisées. Les cellules épithéliales polarisées du tractus respiratoire sont le site de la primo-infection. De ce fait, investiguer l'entrée dans les cellules MDCK polarisées nous permet d'utiliser un modèle cellulaire polarisé qui mime le site de la primo-infection *in vivo*. À cet effet, premièrement par microscopie électronique à balayage, nous avons analysé l'ultrastructure des cellules MDCK polarisées, suite à l'infection par le CHV-1. Deuxièmement, nous avons comparé l'efficacité d'infection de la surface apicale et basolatérale. Pour cela, nous avons comparé la production de nouvelles particules virales, suite à l'infection apicale et basolatérale, en titrant par *plaque assay* les titres viraux de chaque compartiment (apicale, basolatérale et la monocouche cellulaire).

## 3 MÉTHODOLOGIE

---

### 3.1 Cellules et virus

Les cellules MDCK et HEK (Human embryogenic kidney) 293 T ont été ensemencées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Wisent) supplémenté avec 8% du sérum fœtal de bœuf, 50 U/ml pénicilline et 50 µg/ml streptomycines. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub>.

La souche virale CHV-1 V777 (Papageorgiou *et al.*, 2016) a été fournie par le Dr Andrew Davison de l'université de Glasgow.

### 3.2 Clonage de gD-Fc

L'ectodomaine de la gD (US6) a été cloné dans le vecteur pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen #pfuse-hg1fc2), pour générer le vecteur pFUSE-gD-Fc2, et ensuite produire la protéine de fusion gD-Fc dans des cellules mammifères. La particularité du vecteur pFUSE-hIgG1-Fc2 est qu'il encode le signal de sécrétion d'interleukin-2 (IL-2) pour la sécrétion de la protéine de fusion, en 5' du site de multi-clonage (MCS). Du côté 3' du MCS, il contient la partie Fc de la chaîne lourde de l'IgG1 humain pour capturer la protéine recombinante sur les billes d'agarose couplées à la protéine A. La partie du gène codant pour l'ectodomaine de la gD a été déterminée à l'aide du logiciel de prédiction des hélices transmembranaires des protéines : TMHMM-2.0 (Technical University of Denmark) (Krogh *et al.*, 2001). Ensuite, l'ectodomaine de la gD a été amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR) à partir du génome viral de la souche CHV-1 V777. Une amorce sens (5'-CCGGAATTCGAAATGGGTAGACCCTCCTC-3') et une amorce antisens (5'-CCGCCATGGCATTTCCTGGGGTATTATTTATTGG-3') ont servi à insérer des sites de restriction EcoRI et NcoI de côté 5' et 3' respectivement. La PCR a été réalisée avec l'enzyme Q5 polymérase (New England Biolabs M0491S). Le fragment correspondant à l'ectodomaine de la gD amplifié par PCR d'une taille de 900 paires de base a été vérifié en migrant 1/10 du volume total de la réaction PCR sur un gel d'agarose 1% à 90V pendant 50 min. Le fragment du restant du volume total de la réaction PCR (9/10) a été purifié avec un kit de purification de produit PCR : PCR Clean-up (Macherey-Nagel 740609). 1 µL du produit purifié a été dosé avec le spectrophotomètre : NanoDrop (Thermo Scientific ND-ONE-W). Ensuite, l'insert et le vecteur ont été doublement digérés avec les enzymes de restriction EcoRI HF (NEB R3101S) et NcoI (NEB R0193S) dans le tampon de digestion Cutsmart buffer (NEBB6004) à 37°C durant la nuit. Le produit digéré a été purifié avec un kit PCR *clean-up* (Macherey-Nagel 740609). L'insert (gène

de l'ectodomaine gD) et le vecteur pFUSE-hlgG1-Fc2 digérés ont été ligués avec ratio 4:1 à température ambiante avec la T4 ligase (NEB M0202) dans le tampon T4 ligase (NEB B0202). Le produit de la ligation a été transformé dans les bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$ . L'ADN plasmidique des clones de bactéries transformées a été purifié avec le kit de EZNA Plasmid Mini Kit I (VWR D6942-02). Le plasmide purifié a été doublement digéré pour vérifier la présence de l'insert avec les enzymes de restriction EcoRI et NcoI. Le produit de la digestion a été migré sur un gel d'agarose 1 % à 90 V pendant 50 min. Les clones positifs (pFUSE-gD-Fc2) ont démontré deux bandes correspondantes au vecteur (4200 paires de bases) et à l'insert (900 paires de bases). Deux clones positifs ont été caractérisés par séquençage Sanger auprès du service externe Génome Québec, pour s'assurer qu'aucune mutation n'était présente (**Tableau 3.1**).

**Tableau 3.1 Amorces utilisées pour séquencer les vecteurs recombinants pFUSE-gD-Fc2**

Direction	Séquence (direction 5'-3')
<b>Sens</b>	CCGGAATTCGAAATGGGTAGACCCTCCTC
<b>Sens</b>	AGATTTTTGGAAACCATCG
<b>Sens</b>	GAATTACCATCGAGGCC
<b>Antisens</b>	CCGCCATGGCATTTTTTGGGGTATTATTTATTGG
<b>Antisens</b>	TGTGTAACCAACTAACG

### 3.3 Transfection des cellules mammifères HEK293T

Pour produire la glycoprotéine recombinante gD-Fc, des cellules de mammifères ont été transfectées avec le vecteur recombinant pFUSE-gD-Fc. Pour cela, 5 x 10<sup>6</sup> de cellules HEK 293T ont étéensemencées dans des pétris de 150 mm avec le milieu de culture DMEM avec 8 % FBS et P/S. 24 heures post-ensemencement, les cellules ont été transfectées de manière transitoire en utilisant l'agent de transfection Polyéthylèneimine (Lim & Chu) branched  $\approx$ MW 25000 (Sigma 408727-250ML) à un ratio 1:2.5 ADN :PEI (Hsu & Uludağ, 2012). Le ratio 1 :2.5 (ADN : PEI) a été déterminé expérimentalement dans des essais d'optimisation de transfection des cellules HEK293T avec le plasmide pEGFP-N1 dans les plaques de 6 puits. Le vecteur pEGFP-N1 a permis d'estimer l'efficacité de la transfection par microscopie à la fluorescence. Finalement, 6h post-transfection, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM avec 8 % FBS et P/S. 30  $\mu$ g

du vecteur recombinant pFUSE-gD-Fc et 30 µg du vecteur vide pFUSE-hlgG1-Fc2 ont été respectivement combinés avec 75 µg de PEI dans une solution hypotonique de 20 mM de la HEPES (acide hydroxyéthylpipérazineéthane sulfonique) pH 7,5 pour la formation du complexe ADN-PEI.

### **3.4 Purification de gD-Fc et Fc**

Pour purifier les protéines gD-Fc et Fc, le surnageant de la culture des cellules HEK 293T transfectées avec les vecteurs d'expression respectif, a été récupéré dans un tube Falcon de 50 mL, 72 h post-transfection. Le surnageant a été centrifugé à 3000 rpm pour 15 min à 4°C dans le Sorvall Legend RT Plus, pour enlever les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant neutralisé à pH 7 avec le tampon Tris-HCl 1M, a été incubé avec 150 µL de billes d'agarose de la protéine A (50%w/v) (Biobasic rProteinA Beads 4FF MSA015005) à 4°C en rotation pendant 4h. Les billes récoltées par centrifugation à 3000 rpm pour 10 min ont été lavées trois fois avec le tampon phosphate salin (PBS). Après le dernier lavage, les protéines capturées sur les billes ont été éluées avec 375 µL (5x volume des billes) du tampon d'éluat glycine 0,1M pH 3 pendant 10 min à température ambiante en rotation. Le pH de l'éluat a été neutralisé avec le tampon glycine Tris-HCl 3 M pH 8,8. Les protéines ont été conservées à -80 °C.

### **3.5 Immunobuvardage de type Western**

Pour vérifier l'expression de la protéine gD-Fc et la protéine Fc produites, suite à la transfection, 1/10 des protéines précédemment purifiées ont été dénaturées dans un tampon de chargement (60 mM Tris-HCl ; 2% SDS (sodium dodecyl sulfate) ; 0,01% bromophenol bleu ; 238 mM β-mercaptoéthanol et 8% glycerol) et chauffées à 95°C pendant 5 min. L'échantillon a été analysé par électrophorèse sur un gel de 10% polyacrylamide (SDS-PAGE) à 120 V pendant 1h30. Les protéines ont été transférées à une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) pendant 30 min à 16 V à l'aide du Trans-Blot Semi-Dry de Bio-Rad. La membrane a été bloquée avec la solution saline Tris tamponnée et 0,25% Tween-20 (TBS-T) + 1% BSA (Bovine serum albumin) à 4°C en agitation durant la nuit. Le lendemain, après le lavage dans du TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire « mouse anti-human » IgG1-Fc (Abcam ab99759) dans une dilution de 1 :1000 dans le TBS-T+1% BSA. Après trois lavages dans la solution TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire « goat anti-mouse » conjugué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch 899180) dans une dilution de 1 : 10 000 dans du TBS-T + 1% BSA. Après deux lavages dans la solution TBS-T et le dernier lavage avec le TBS, la

membrane a été recouverte de la solution de révélation, le substrat de peroxyde et le luminol dans un ratio 1 : 1 (Promega W1601). Les protéines ont été observées avec l'instrument « Sapphire Biomolecular Imager » de Azure.

### **3.6 Quantification des protéines recombinantes gD-Fc et Fc**

La protéine de fusion purifiée a été analysée sur SDS-PAGE avec un gradient de quantité connue de la protéine BSA pour établir un comparatif et estimer la concentration de protéine produite. Pour ce faire, un volume égal de l'éluat des protéines gD-Fc et Fc a été chargé sur un gel 8 % polyacrylamide SDS-PAGE. Sur le même gel, des quantités connues de la protéine BSA ont été chargées : 0,25 µg, 0,50 µg, 0,75 µg, 1,0 µg, 1,25 µg et 1,50 µg. Les protéines ont été séparées par électrophorèse à 120 V pendant 1 h 30. Ensuite, le gel a été coloré avec une solution de bleu de Coomassie pendant 1 h, puis incubé durant la nuit dans une solution de décoloration (10 % d'acide acétique ; 10 % de méthanol). Après décoloration, le gel a été numérisé avec l'instrument Azure 200.

### **3.7 SDS-PAGE en conditions non-réductrices**

La protéine de fusion gD-Fc a été analysée en condition dénaturante, réductrice et non réductrice, c'est-à-dire en présence et absence d'agent réducteur  $\beta$ -mercaptoéthanol, pour vérifier la formation d'oligomères. À cet effet, 1 µg de gD-Fc et de Fc ont été dénaturés avec le SDS dans le tampon de chargement (60 mM Tris-HCl ; 0,01% bromophenol bleu ; 8% glycerol) contenant ou pas 238mM de l'agent  $\beta$ -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures. Les échantillons ont été chauffés à 95 °C pendant 5 min et analysés par électrophorèse sur un gel de 8 % polyacrylamide SDS-PAGE. Les protéines ont été détectées suivant le protocole d'immunobuvardage de type Western.

### **3.8 Déglycosylation de la gD-Fc**

La protéine recombinante gD-Fc a été traitée avec une enzyme qui déglycosyle tous les oligosaccharides N-liés des glycoprotéines : la PNGase F (Peptide-*N*-Glycosidase F). Pour cela, 1 µg de gD-Fc et de Fc ont été dénaturés avec le tampon commercial, Glycoprotein Denaturing Buffer (0.5% SDS, 40 mM DTT) (NEB B1704S), et chauffés à 100°C pendant 10 minutes. Ensuite, 2 µl du tampon GlycoBuffer 2 (B3704S), 2 µl de NP-40 (NEB B2704S) à 10% et 1 µl de PNGase F (NEB P0704S) ont été ajoutés aux glycoprotéines dénaturées dans un volume total de 20 µl. La réaction a été incubée à 37°C pendant 1 h. Le volume total a été analysé par électrophorèse

sur un gel 8% de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines ont été marquées suivant le protocole d'immunobuvardage de type Western.

### **3.9 Préparation du lysat cellulaire MDCK**

Pour observer une monocouche confluente 24 h post-ensemencement,  $3,22 \times 10^6$  cellules MDCK ont été ensemencées dans des pétri de culture cellulaire de 100 mm. Après lavage avec le PBS, les cellules ont été grattées dans 1 mL tampon de lyse composé de 3,3 mg/mL du détergent n-decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) (Thermofisher AAJ6686903) avec l'inhibiteur de protéases cOmplete mini (Roche 11836153001)(Chae *et al.*, 2010). La suspension cellulaire a été transférée dans un tube et agitée sur un agitateur orbital à 4 °C pendant 15 min, pour favoriser la lyse cellulaire. Après centrifugation à 12 000 rpm dans une microcentrifugeuse prérefroidie (Eppendorf 5415R) pendant 10 min, le surnageant (lysat cellulaire) a été transféré dans un nouveau tube. Le lysat a directement été utilisé pour procéder au Pull-down assay.

### **3.10 Pull-down assay de la gD-Fc**

Le lysat cellulaire a été prétraité avec les billes d'agarose de protéine A. Pour cela, 50  $\mu$ l des billes d'agarose de protéine A (Biobasic rProteinA Beads 4FF MSA015005) pré-équilibrées avec le tampon de lyse DDM 3.3 mg/mL ont été ajoutés à 1.0 mL de lysat cellulaire et incubés à 4°C pendant 1 h sur un agitateur orbital. Les billes ont été retirées par centrifugation à 5000 rpm à 4 °C pendant 5 min à l'aide de la microcentrifugeuse Eppendorf 5415R et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. 10  $\mu$ g de la protéine de fusion gD-Fc et Fc respectivement ont été ajoutés à 1 mL de lysat cellulaire. Ensuite, les lysats ont été incubés à 4°C pendant 2 h sur un agitateur orbital. 50  $\mu$ l des billes d'agarose de protéine A ont été ajoutés aux lysats et les tubes ont été incubés pendant 1h à 4°C sur un agitateur rotatif. Les billes ont été récupérées par centrifugation (1 min à 5 000 rpm à 4°C). Après trois lavages dans 1 mL du tampon de lyse DDM 3.3 mg/mL et un autre lavage dans 1 mL de PBS, les billes ont été suspendues dans 50  $\mu$ l de tampon de chargement (0.1% SDS+ 25 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) et chauffées pendant 5 min à 95°C.  $\frac{1}{2}$  du volume total de chaque échantillon a été analysé par électrophorèse sur un gel de 8% polyacrylamide et migré pendant 5h à 200V dans la chambre d'électrophorèse PROTEAN® II xi (Biorad1651801). Ensuite, le gel a été coloré à l'argent avec le kit ProteoSilver™ Silver Stain (Sigma-Aldrich PROTSIL1-1KT) suivant le protocole du fournisseur. Le gel a été numérisé avec l'instrument Azure 200. Les bandes correspondantes aux protéines capturées spécifiquement ont été découpées du gel et transférées dans un tube eppendorf. Les protéines ont été décolorées

avec la solution de décoloration du ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich PROTSIL1-1KT). Les protéines ont été envoyées au service externe d'analyse protéomique de l'Institut de recherche du Centre universitaire de santé McGill. Les protéines ont été identifiées à l'aide du spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific Ultimate 3000 HPLC et Orbitrap Fusion MS: Quadrupole-Orbitrap-Linear ion trap hybrid).

### **3.11 Polarisation des cellules MDCK**

Les cellules MDCK ont été polarisées telles que décrites dans Eisa *et al.* (2022). Essentiellement, les cellules MDCK ont étéensemencées sur des inserts trans-well™ en polyéthylène téréphtalate (PET) dans des plaques de 24 puits pour l'analyse de SEM et des inserts de polycarbonate de 12 puits pour l'expérience de production virale. Chaque jour, pendant cinq jours, le milieu de culture a été remplacé dans chaque compartiment (apical et basal) et la résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée à l'aide d'un voltmètre/ohmmètre épithélial EVOM2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

### **3.12 Analyse de microscopie électronique à balayage**

Initialement,  $5 \times 10^4$  cellules MDCK ont été polarisées sur les inserts de PET avec des pores de  $3.0 \mu\text{m}$  (Corning cat # 3472) dans des plaques de 24 puits. Cinq jours post-ensemencement, les cellules ont été pré-réfrigérées à  $4^\circ\text{C}$  pendant 20 min. Ensuite, les cellules ont été soit non infectées, soit infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 2 par le CHV-1 V777 sur la surface apicale dans un volume de  $200 \mu\text{l}$ . Ensuite, les cellules ont été incubées à  $4^\circ\text{C}$  pendant 2 h, pour permettre l'adsorption du virus à la surface cellulaire. Suivant cela, les cellules ont été transférées à  $37^\circ\text{C}$  et incubées pendant 10 min ou 30 min, pour permettre l'entrée du virus. Les cellules ont été fixées avec 2.5% glutaraldehyde dans 0.05 M de tampon cacodylate contenant 3% sucrose (pH 7.4). Ensuite, elles ont été traitées par le laboratoire de microscopie électronique de l'INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie pour une analyse de microscopie électronique à balayage (SEM). L'acquisition d'images pour les micrographies électroniques à balayage a été réalisée à l'aide d'un instrument Hitachi SU-8230.

### **3.13 Production virale du CHV-1 dans les cellules MDCK polarisées**

Les cellules MDCK polarisées sur des inserts de 12 puits en polycarbonate avec des pores de  $3 \mu\text{m}$  (Corning # 3402) ont été infectées en duplicata, soit à la surface apicale, soit à la surface basolatérale avec le CHV-1 V777 à une MOI de 1-2. 1 h après l'infection (h.p.i.), l'inoculum a été

retiré et les cellules ont été lavées avec le PBS. Ensuite, le milieu a été remplacé par 1 mL de milieu de culture complet DMEM 8% FBS, P/S dans chaque compartiment. 24 h.p.i., les milieux des compartiments apical et basolatéral ont été recueillis séparément. Ensuite, la couche cellulaire sur l'insert a été lavée avec 0,5 ml de tampon citrate glacé (0.1 M acide citrique, 0.1 M sodium citrate, pH 3) pendant 30 s pour éliminer les virus associés à la surface de la cellule. La couche cellulaire a été lavée avec le PBS et la membrane a été excisée de l'insert à l'aide d'une lame. La couche cellulaire a été transférée dans un cryotube et 1 mL de DMEM 8 % FBS a été ajouté. Les cellules ont subi trois cycles de congélation-décongélation sur glace sèche, pour permettre la lyse cellulaire. Le titre viral dans chaque compartiment, apical, basal et intracellulaire a ensuite été déterminé par *plaque assay* sur des cellules MDCK.

### **3.14 Plaque assay**

Pour procéder au titrage du virus, suite à l'expérience de production virale,  $2.5 \times 10^5$  cellules MDCK ont été ensemencées dans des plaques à 12 puits. 24h post-ensemencement, la monocouche cellulaire confluente a été infectée avec une dilution en série de la souche virale CHV-1 V777 en duplicata. Ensuite, les cellules infectées ont été recouvertes de DMEM contenant 2% de FBS et 0,4% de méthylcellulose. Trois jours post-infection, les cellules ont été fixées et colorées avec du cristal violet. Les plaques ont été visualisées et comptées à l'aide d'un stéréomicroscope Nikon SMZ800.

### **3.15 Analyse statistique**

Les résultats présentés pour l'expérience de microscopie à balayage ont été recueillis à partir de deux expériences indépendantes effectuées en duplicata. De même, la production virale du CHV-1 dans les cellules polarisées a été mesurée dans deux expériences indépendantes effectuées en duplicata. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Dans la figure 4.10A, les différences statistiques entre les trois compartiments (apical, basal et la monocouche cellulaire) des deux conditions d'infections (apicale et basolatérale) ont été déterminées par une analyse de variance à deux sens (Two-way ANOVA). Dans la figure 4.10B, les statistiques présentées sont le résultat d'un test bilatéral de Student (*t-test*). Les valeurs  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## 4 RÉSULTATS

---

### 4.1 PURIFICATION DES PROTÉINES CELLULAIRES LIGANDS DE LA gD

#### 4.1.1 Expression de la glycoprotéine recombinante gD-Fc

Pour identifier la protéine cellulaire qui sert de récepteur cellulaire pour la gD du CHV-1, nous avons d'abord voulu exprimer une forme recombinante de la gD qui sert de matrice d'affinité pour capturer le récepteur. Tout d'abord, nous avons exprimé cette forme recombinante de l'ectodomaine de gD fusionnée au segment de la chaîne lourde d'IgG1 dans les cellules mammifères HEK293T. L'ectodomaine de la gD est la partie de la protéine encodant le domaine d'interaction avec le récepteur (RBD : receptor binding domain). Nous avons analysé la structure de la protéine gD pour déterminer l'ectodomaine à l'aide du logiciel de prédiction des domaines transmembranaire des protéines TMHMM (Krogh *et al.*, 2001). Dans la figure 4.1 A, un schéma de la structure de la gD démontre du côté N-terminal (résidu 1-17) le peptide signal endogène de la glycoprotéine qui permet l'acheminement de la protéine dans la voie de sécrétion. Le domaine 18-309 correspond à l'ectodomaine de la gD qui contient deux sites de glycosylations (résidus 27 et 89). Du côté C-terminal se trouve le domaine transmembranaire qui permet l'ancrage de la glycoprotéine dans la membrane de l'enveloppe virale. Les sites de glycosylation ont été prédits à l'aide du logiciel de prédiction NetNGlyc (Gupta & Brunak, 2002). Pour exprimer la protéine recombinante gD-Fc, la séquence codante pour l'ectodomaine (acides aminés 18-309) a été clonée dans le vecteur d'expression pFUSE-hIgG1-Fc2 (**Figure 4.1 B**). Le vecteur est conçu pour que la protéine recombinante possède du côté N-terminal la séquence du peptide signal IL-2. Celui-ci permet la sécrétion de la protéine recombinante dans le surnageant de la culture cellulaire transfectée. Du côté C-terminal se trouve la séquence du gène de la portion Fc de l'immunoglobuline G1 (IgG1) humaine (**Figure 4.1 C**). La partie Fc a permis d'immobiliser la protéine recombinante sur des billes d'agarose de protéine A, et ainsi, générer une matrice d'affinité.

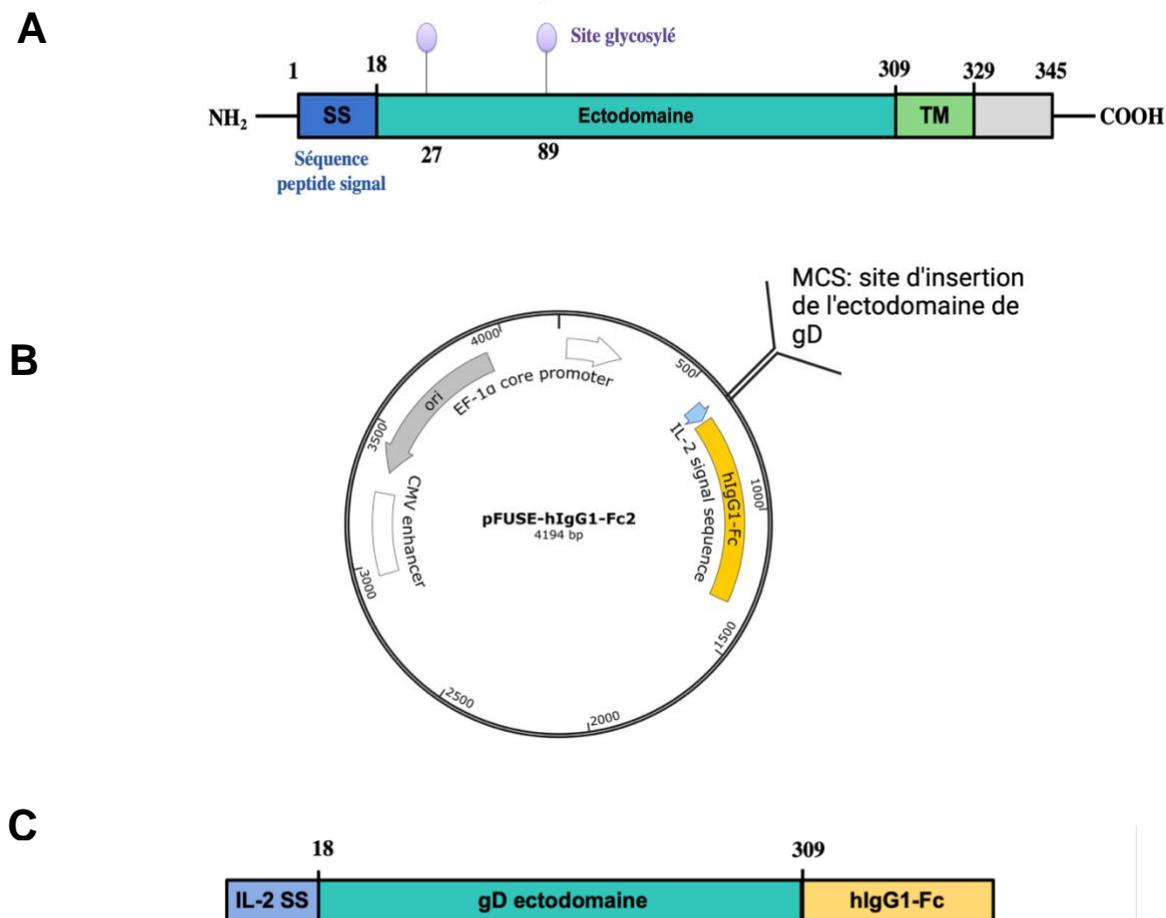
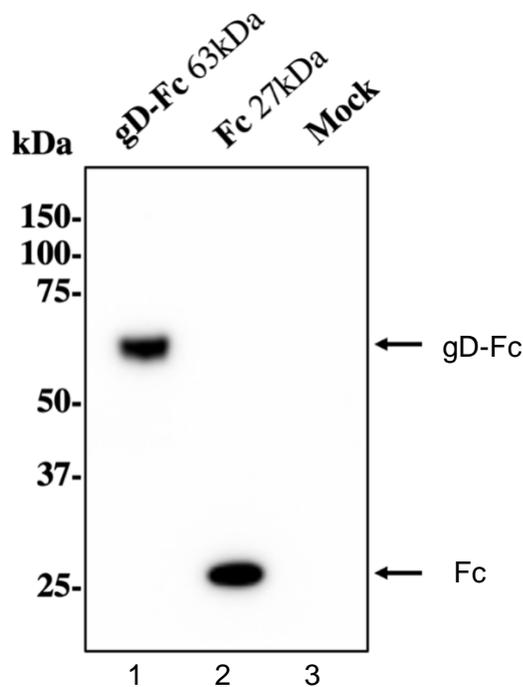


Figure 4.1 : Schéma de la protéine gD-Fc du CHV-1.

(A) La gD contient du côté N-terminal un peptide signal endogène de sécrétion et 2 sites de glycosylations des résidus Asn (résidus 27 et 89) dans l'ectodomaine (résidus 18 à 309). Du côté C-terminal, se trouve le domaine transmembranaire qui permet l'ancrage dans l'enveloppe virale. (B) La séquence de l'ectodomaine amplifiée par PCR a été clonée dans le vecteur d'expression pFUSE-hlgG1-Fc2. (C) Le gène de la protéine recombinante contient le peptide signal de sécrétion d'IL-2 (en bleu) du côté N-terminal, les résidus de l'ectodomaine de gD (résidus 18 à 309) et du côté C-terminal le gène Fc de la chaîne lourde de l'IgG1 humaine.

Pour notre premier objectif, qui est de produire la protéine recombinante gD-Fc, les cellules mammifères HEK 293T ont été transfectées avec des vecteurs d'expression des protéines gD-Fc et Fc seule. L'utilisation des cellules mammifères pour produire la protéine virale recombinante présente l'avantage de générer toutes les modifications post-traductionnelles nécessaires au repliement de la protéine, en plus d'avoir une expression transitoire à la suite de la transfection. Contrairement aux systèmes des cellules bactériennes ou des cellules d'insectes, les

modifications post-traductionnelles obtenues avec le système de cellule mammifère HEK293T reproduisent ce qui serait observé dans un contexte infectieux. Dès lors, 72h post-transfection, le surnageant de la culture cellulaire transfectée a été récolté. La présence de la protéine recombinante dans le surnageant résulte de l'action du signal de sécrétion d'IL-2, qui permet l'acheminement de la protéine produite dans la voie de sécrétion et ultimement la sécrétion dans le milieu extracellulaire. Cela dit, bien que le surnageant ne soit pas exempt d'autres protéines, en choisissant de purifier la protéine recombinante dans le surnageant de la culture cellulaire, nous réduisons le nombre de protéines non spécifiques qui peuvent s'attacher aux billes d'agarose de protéine A. Ainsi, les protéines recombinantes ont été capturées sur les billes, qui ont une affinité pour la protéine Fc. Les protéines immobilisées sur les billes ont été analysées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) L'expression des protéines de fusion a été confirmée par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-Fc. Dans la figure 4.1, on observe la bande correspondante à la gD-Fc de 63kDa. Dans le puits 2, on observe la bande du témoin : la protéine Fc seule de 27kDa.



**Figure 4.2 : Expression de l'ectodomain de la gD du CHV-1 fusionné avec la protéine Fc**

Immunoblot de la protéine recombinante gD-Fc et la protéine Fc seule. À gauche est démontré l'échelle de poids moléculaire. Dans le puits 1, se trouve l'expression de la gD-Fc de 63kDa. Dans le puits 2 on observe la bande de l'expression de la protéine Fc de 27 kDa. Finalement, dans le puits 3, le MOCK (cellules HEK293T transfectées avec l'eau). Les protéines ont été produites à partir des cellules HEK293T transfectées de manière transitoire.

Une fois l'expression de la protéine recombinante gD-Fc confirmée, nous avons voulu produire à grande échelle nos protéines et les quantifier. Pour ce faire,  $1 \times 10^7$  de cellules HEK 293T ont été transfectées dans des plaques de 150 mm. À la suite de la transfection, les protéines ont été récoltées du surnageant avec les billes de protéine A et éluées avec le tampon acide Glycine-HCl pH 3, qui affaiblit l'interaction de la protéine Fc et la protéine A. Ensuite, nous avons fait migrer sur un gel SDS-PAGE un volume précis de l'éluat de nos protéines avec un gradient de la protéine de sérum d'albumine bovin (BSA), soit 0,25  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,75  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,25  $\mu$ g et 1,5  $\mu$ g, pour évaluer la quantité de protéine produite. Après la migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (**Figure 4.3**). Pour 12  $\mu$ L de la protéine purifiée gD-Fc, nous observons une bande de 63 kDa de l'intensité de 0,75  $\mu$ g de protéine BSA. Pour 6  $\mu$ L de la protéine Fc, nous observons une bande de 27 kDa de l'intensité de 1  $\mu$ g de protéine BSA. (**Figure 4.3**). Nous en avons calculé que dans le volume total d'éluat (375  $\mu$ L), il y avait approximativement 23  $\mu$ g de gD-Fc et 62,5  $\mu$ g de Fc produits et élués par transfection de  $1 \times 10^7$  cellules HEK 293 T.

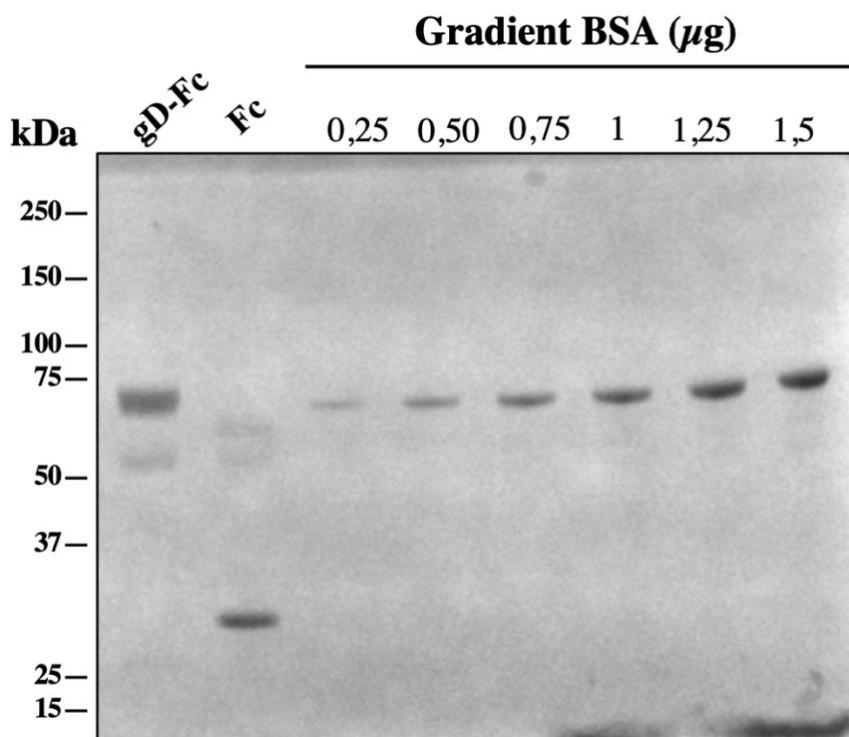


Figure 4.3 : Quantification de la protéine gD-Fc produite avec un gradient comparatif de la protéine BSA

Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la protéine recombinante gD-Fc et Fc en comparaison à un gradient de quantité connue de BSA. À gauche est démontré l'échelle de poids moléculaire, suivi des bandes correspondantes à gD-Fc, Fc et le gradient de quantité connue de la protéine BSA. Les protéines gD-Fc et Fc ont été produites à partir des cellules mammifères HEK293T 72 h post-transfection.

#### 4.1.2 Caractérisation de la protéine recombinante gD-Fc

Pour vérifier que la protéine recombinante gD adopte une conformation fonctionnelle, c'est-à-dire la forme interagissant avec le récepteur, nous avons investigué son oligomérisation sur gel dénaturant en condition non réductrice. La littérature suggère que gD de HSV-1 forme un dimère dans sa forme fonctionnelle interagissant avec le récepteur (Krummenacher *et al.*, 2005). Plusieurs mécanismes induisent l'oligomérisation, notamment la dimérisation induite par un ligand, les mutations des domaines sur les interfaces des dimères, les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation sur les interfaces des dimères et la formation de liaisons disulfures entre deux sous-unités (Hashimoto & Panchenko, 2010). Les ponts disulfures participent à la formation et au maintien de la structure protéique. À cet effet, nous avons vérifié les différentes conformations de la gD-Fc en présence et en absence de l'agent réducteur de pont disulfure le  $\beta$ -mercaptoéthanol (BME). En présence de l'agent dénaturant SDS et en absence de BME, on peut observer la protéine dans sa forme dénaturée non réduite. Tel que présenté dans la figure 4.4, l'on observe qu'en présence (+BME) ou en absence du (-BME), la gD-Fc est exprimée sous différentes conformations représentées par des bandes de différentes tailles. En présence de BME, la protéine gD-Fc est présente sous une seule forme correspondant à une bande de 63 kDa. En absence de BME, gD-Fc est présente sous trois formes, soit trois bandes : 63 kDa, 120 kDa et 190 kDa. La forme monomérique de gD-Fc attendue est de 63 kDa. Et donc, en absence d'agent réducteur (-BME), les bandes de 120 kDa et 190 kDa correspondent aux formes oligomériques de la gD-Fc qui se forment via des ponts disulfures. La bande de 120 kDa correspond à la forme dimérique de gD-Fc et la bande de 190 kDa correspond à la forme trimérique de gD-Fc. En revanche, la forme monomérique observé, en absence de BME, est possiblement due à une réduction des ponts disulfures causée par la chaleur.

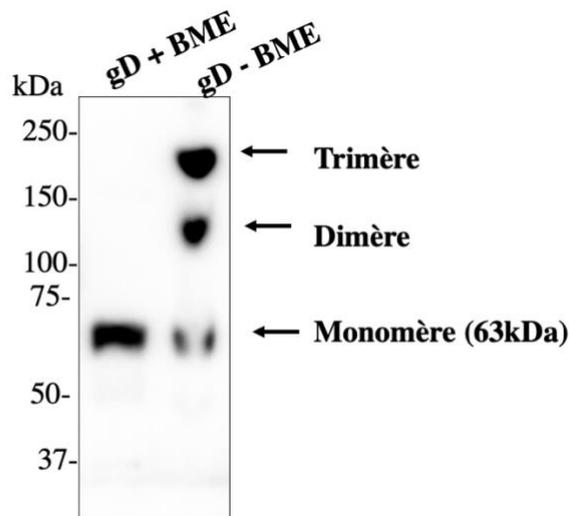


Figure 4.4 Oligomérisation de la gD-Fc

Immuno-blots de la protéine recombinante gD-Fc en présence d'agent réducteur  $\beta$ -mercaptoéthanol (+BME) et en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (-BME). En absence de BME, la bande de 63 kDa correspond à la forme monomérique; la bande de 120 kDa correspond à la forme dimérique et la bande de 190 kDa correspond au trimère de gD-Fc.

Bien que la forme dimérique rapportée dans la littérature soit présente dans l'immuno-blot, nos résultats démontrent que gD-Fc a la capacité de former des trimères. Il a déjà été rapporté par Handler *et al.* (1996) que gD de HSV-1 a la capacité de former des trimères en présence d'agents de pontages (crosslinks). Cela dit, bien que les trimères et les dimères de gD-Fc soient formés, il faut préciser que la forme active et fonctionnelle, i.e. la forme dimérique est présente.

Pour les protéines d'attachement des virus, la glycosylation est une modification post-traductionnelle cruciale, car elle affecte le repliement des protéines virales et subséquemment leur interaction avec les récepteurs cellulaires. Dans l'optique de caractériser les protéines recombinantes gD-Fc produites, nous avons analysé la glycosylation des résidus *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) et asparagine *N*-liés avec la glycosydase Peptide:*N*-glycosidase-F, communément appelée PNGase-F (Plummer & Tarentino, 1991). La PNGase F est une amidase qui clive entre les résidus GlcNAc et asparagine internes des oligosaccharides riches en mannose. 1  $\mu$ g de la gD-Fc a été dénaturée et traitée avec la PNGase F. Nous avons détecté un changement dans la migration sur gel de la gD-Fc en raison de la déglycosylation par la PNGase-F. Nous avons observé que la protéine déglycosylée a une taille plus petite que la protéine non traitée, glycosylée (**Figure 4.5**).

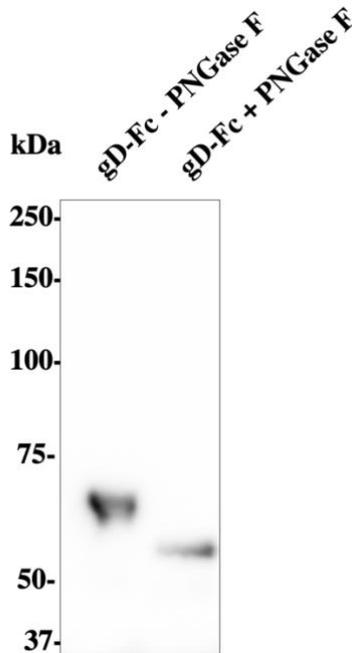


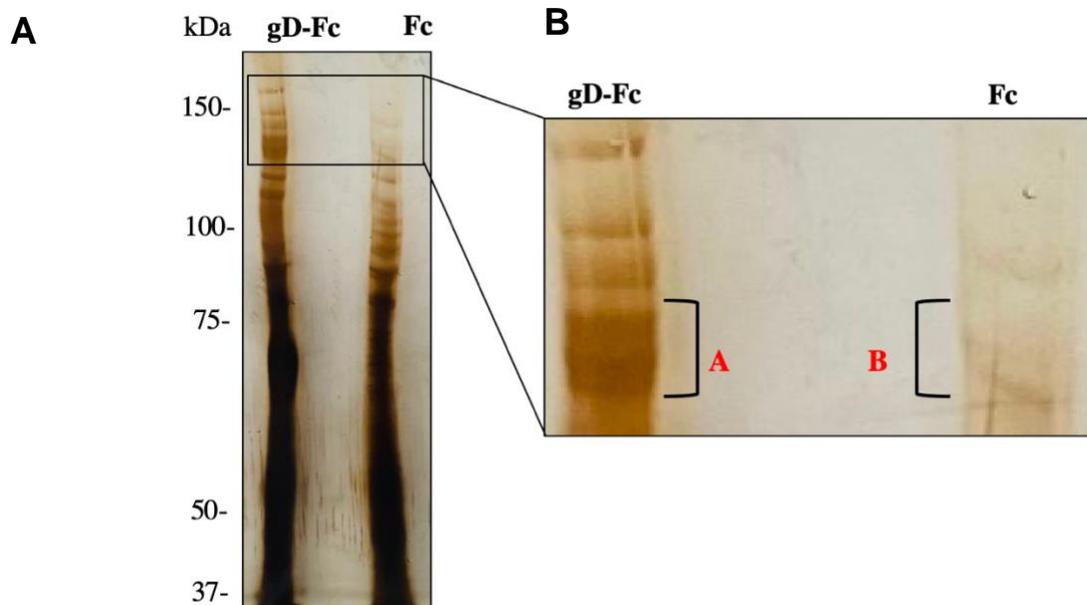
Figure 4.5 : Analyse de la glycosylation de la gD-Fc traitée avec la PNGase

Immunoblot de la gD-Fc non traité avec la PNGase (puits 1) et traité pendant 1 h avec la PNGase (puits 2). La gD-Fc glycosylée a une taille de 63kDa et la protéine déglycosylée a une taille approximative de 55 kDa. La gD-Fc a été produite à partir des cellules mammifères HEK293T transfectées transitoirement.

#### 4.1.3 Immunoprécipitation des protéines cellulaires interagissant avec la gD-Fc

Nous avons utilisé la protéine de fusion gD-Fc comme matrice d'affinité pour capturer à partir d'un lysat cellulaire, les protéines cellulaires interagissant spécifiquement avec la gD. Le lysat cellulaire a été préparé avec un détergent amphipathique non-ionique :  $\beta$ -D-maltopyranoside. Celui-ci permet la solubilisation et la stabilisation des protéines membranaires. Étant des molécules amphipathiques, les détergents portent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. En raison de cette nature, les détergents insèrent leurs queues hydrophobes dans la membrane lipidique et la perturbent pour extraire les protéines membranaires (Stetsenko & Guskov, 2017). Le lysat a subi une étape de prélavage avec les billes d'agarose de protéine A pour éliminer toute interaction non spécifique qui se produirait avec les billes. Ensuite, la protéine de fusion a été immobilisée sur les billes de protéine A pour générer la matrice d'affinité. Celle-ci a servi pour capturer tous les ligands de gD. Comme contrôle, nous avons utilisé la protéine Fc seule, pour pouvoir distinguer les protéines cellulaires ayant interagi avec la partie Fc. Le complexe de protéines sur les billes a été soumis à une électrophorèse sur gel de 8% de polyacrylamide, qui par la suite a été coloré à l'argent. Dans la figure 4.6A, on observe de manière général un marquage intense dans les deux puits correspondant aux protéines capturées par gD-Fc et Fc

seule, sur la section du bas du gel (les protéines de tailles inférieures à 75 kDa). Ce marquage intense est dû en grande partie aux protéines de la matrice. En outre, on peut observer le marquage de bandes spécifiques de taille supérieur à 75 kDa pour la gD-Fc et Fc seule. Dans la figure 4.6 B, une section du gel agrandie démontre la présence de bandes de protéines autour de 130 kDa. On observe quatre bandes spécifiques pour la gD-Fc. Dans le puits correspondant à la gD-Fc, la bande de 130 kDa identifiée (**A**) est plus intense que la bande correspondante de Fc seule (**B**) (**Figure 4.6 B**). La présence de cette bande est reproductible dans les deux autres expériences indépendantes de *pull-down* effectuées auparavant (résultats non présentés). Un premier échantillon de ces protéines a été analysé par spectrométrie de masse (service d'analyse protéomique de l'institut de recherche de l'université de McGill).



**Figure 4.6: Protéines du lysat cellulaire MDCK capturées par les protéines recombinantes gD-Fc et Fc**

Les protéines de fusion gD-Fc et Fc ont chacune été incubées avec le lysat cellulaire MDCK. Le complexe de protéine gD-Fc, Fc et leurs ligands cellulaires respectifs ont été analysés sur gel par électrophorèse. (A) Le gel coloré à l'argent démontre les protéines interagissant avec gD-Fc et Fc. (B) Une section agrandie du gel démontre des protéines ayant interagi spécifiquement avec gD-Fc et non Fc. Les bandes correspondant aux protéines identifiées A et B ont été coupées et envoyées à un service d'analyse protéomique à des fins d'identification par spectrométrie de masse.

#### 4.1.4 Profil des protéines interagissant avec l'ectodomaine de la gD du CHV-1

Les bandes protéiques des ligands de gD-Fc et Fc ont été coupées et envoyées à un service de spectrométrie de masse pour être identifiées. 224 protéines ont été identifiées dans la bande de protéines ayant interagi avec gD-Fc et 259 protéines ont été identifiées comme ligands de Fc.

Parmi ces protéines 203 protéines sont communes aux deux protéines gD-Fc et Fc. 21 protéines ont été identifiées comme interagissant spécifiquement avec gD-Fc. Parmi les 21 protéines, 17 sont des protéines intracellulaires, et donc, ne correspondent pas à des récepteurs permettant l'entrée du CHV-1. Cependant, 4 protéines sont des récepteurs membranaires de la famille des cadhérines, des récepteurs tyrosine kinase, des transporteurs d'ATP binding cassette et des serine/threonine kinase. La taille des protéines identifiées par spectrométrie de masse est dans la gamme de taille des protéines découpées sur le gel et envoyé pour analyse. Le *pull-down* assay a été répétée trois fois et la présence de la bande identifiée (A) dans la figure 4.6B est reproductible. L'analyse protéique sera poursuivie sur les autres échantillons.

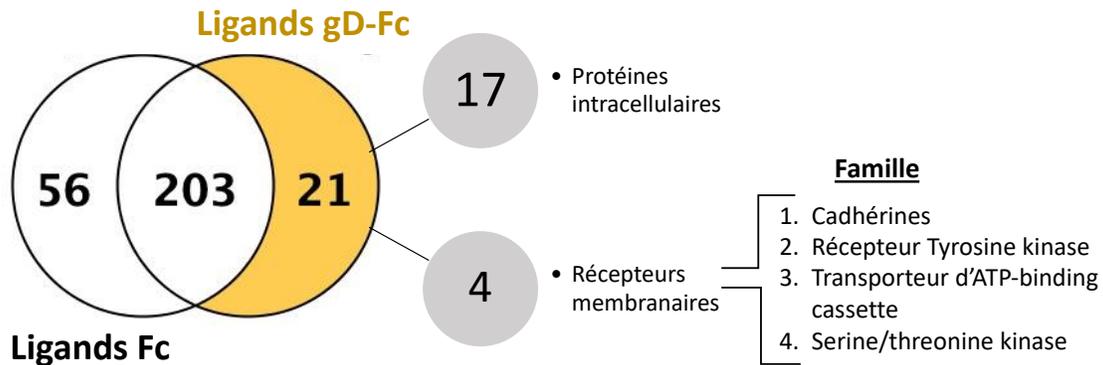


Figure 4.7: Profil des protéines interagissant avec l'ectodomaine de la gD du CHV-1

Diagramme des protéines identifiées à la suite de l'analyse par spectrométrie de masse des ligands de Fc (56 protéines) et de gD-Fc (21 protéines en jaune). Parmi les ligands de gD-Fc, 17 sont des protéines intracellulaires et 4 sont des récepteurs membranaires, appartenant aux familles des : cadhérines, récepteurs tyrosine kinase, transporteurs d'ATP binding cassette et serine/threonine kinases.

## 4.2 CARACTÉRISATION DE L'INFECTION DU CHV-1 DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES MDCK POLARISÉES

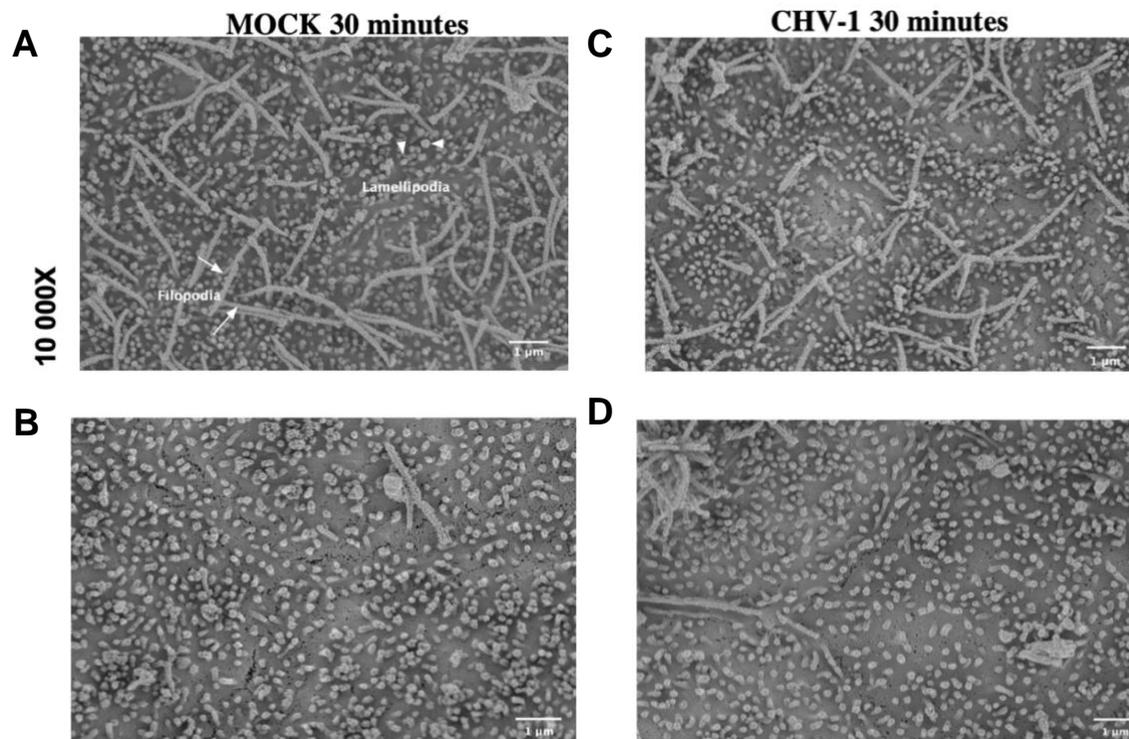
Les résultats présentés dans cette section sont publiés dans : Eisa Mohamed\*, Micky Samar\*, Pearson Angela, Canid herpesvirus 1 Preferentially Infects Polarized Madin- Darby Canine Kidney Cells from the Basolateral Surface, *Viruses*. 2022; 14(6):1291.

\*Les auteurs ont contribué de manière égale

Ce sous-chapitre représente ma contribution à l'article.

### 4.2.1 Impact du CHV-1 sur les protubérances membranaires des cellules MDCK polarisées

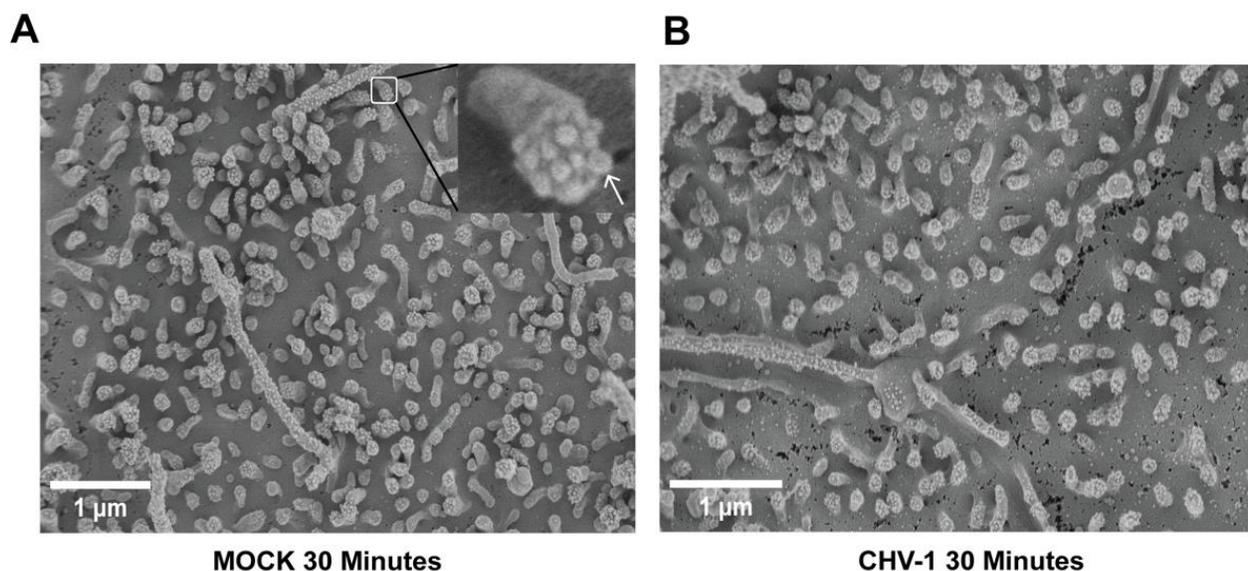
Précédemment, notre laboratoire a démontré que le CHV-1 pénètre dans les cellules MDCK non polarisées par un mécanisme similaire à la macropinocytose. De plus, dans les cultures de cellules non polarisées, l'infection par le CHV-1 induit la formation des protrusions membranaires lamellipodales de manière généralisée (Eisa *et al.* 2021). En collaboration avec un autre étudiant au laboratoire, nous avons investigué l'infection du CHV-1 dans les cellules MDCK polarisées. Premièrement, nous avons voulu vérifier si le CHV-1 altère la surface cellulaire des cellules MDCK polarisées. De ce fait, nous avons analysé l'ultrastructure de la surface membranaire des cellules polarisées infectées par le CHV-1. En conséquence, les cellules MDCK ont été polarisées sur des inserts PET et cinq jours postensemencement, les cellules ont été soit non-infectées (MOCK) soit infectées sur la surface apicale à un MOI de 2,5 pendant 30 min. Ensuite, les cellules ont été traitées pour analyse par SEM. Deux expériences indépendantes ont été réalisées, chacune d'elles a été réalisée en duplicata, i.e. deux cultures de cellules polarisées distinctes sur des inserts pour chaque condition. Des micrographies électroniques sont présentées dans les Figures 4.8 et 4.9. Dans les cellules MOCK-infectées, on a observé la présence des extensions membranaires lamellipodales et filopodales. Ces structures étaient aussi présentes sur les cellules infectées. Lorsqu'on a comparé les deux conditions, nous n'avons pas observé de différence évidente dans la forme des extensions de la membrane des cellules non infectées (**Figure 4.8 A, B**) par rapport aux cellules infectées par le CHV-1 (**Figure 4.8 C, D**). De plus, on constate que la surface apicale n'est pas homogène, car sur certaines zones on observe des groupes de longs filopodes et sur d'autres zones la présence des lamellipodes, autant pour les cellules mock-infectées que les cellules infectées. (**Figure 4.8 A, C**).



**Figure 4.8 : L'ultrastructure de la surface apicale des cellules MDCK polarisées n'est pas modifiée par le CHV-1**

Micrographies électroniques montrant la surface apicale des cellules MDCK polarisées qui ont été soit infectées pendant 30 minutes (panneaux C, D) par le CHV-1, soit non infectées (MOCK) pendant 30 minutes (panneaux A, B). Pour chaque condition, deux sections différentes de la surface cellulaire sont montrées pour illustrer l'hétérogénéité à la surface de la cellule. Les pointes de flèches indiquent des exemples de lamellipodes. Les flèches montrent des exemples de filopodes. Les résultats présentés sont des images de l'une des deux expériences indépendantes et ils sont représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus (Eisa *et al.*, 2022).

À plus fort grossissement (20 000X), on peut observer la présence de petites protrusions à l'extrémité des extensions lamellipodales (**Figure 4.9 A, B**). Ces extensions ont été quantifiées sur 25 lamellipodes pour chaque condition. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée. Le nombre moyen de lamellipodes était de 9,4 dans les cellules non infectées et de 8,5 dans les cellules infectées (**Figure 4.9 A, B**). Ces valeurs sont possiblement sous-estimées à cause de l'angle auquel un lamellipode individuel est imagé, car cela peut affecter la visibilité des protubérances terminales. En conclusion, nous n'avons pas observé de différences dans la surface apicale de la membrane plasmique dans les cellules infectées par le CHV-1.



**Figure 4.9:** La structure des extensions lamellipodales de la surface apicale des cellules MDCK polarisées n'est pas altérée par le CHV-1

Micrographies électroniques montrant la surface apicale de cellules MDCK polarisées qui ont été, soit non infectée (Mock), soit infectées par CHV-1 pendant 30 minutes. Une section de l'image est agrandie pour montrer un seul lamellipode ; une flèche pointe vers l'une des protubérances à l'extrémité du lamellipode. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata (n = 2) (Eisa *et al.*, 2022).

#### 4.2.2 Efficacité de l'infection apicale et basolatérale du CHV-1

La polarisation cellulaire implique une distribution asymétrique du cytosquelette de la cellule et de certains récepteurs cellulaires (Pickett *et al.*, 2019). Notamment, dans le cas du HSV-1, le récepteur d'entrée Nectin-1 est exprimé préférentiellement à la surface apicale des cellules polarisées Caco-2 et y favorise une entrée préférentielle du HSV-1 (Galen *et al.*, 2006). Cela dit, nous avons voulu tester si CHV-1 infecte de façon plus efficace la surface apicale ou basolatérale des cellules MDCK polarisées. Les cellules polarisées MDCK ont été infectées par CHV-1 à une MOI de 1-2 pendant 1 h à partir du compartiment apical ou basolatéral, puis l'inoculum a été retiré et les cellules ont été lavées avec du PBS. Ensuite 1 mL de milieu DMEM complet a été ajouté à chaque compartiment. À 24 h.p.i., les milieux des compartiments apical et basal ont été récoltés. Ensuite, les cellules sur l'insert ont été rincées avec un tampon à faible pH afin d'inactiver le virus lié à la surface, puis collectées et lysées dans un volume de 1 mL. Le virus intracellulaire a été relâché des cellules par congélation-décongélation. Les virus des trois compartiments ont été titrés sur des cellules MDCK par *plaque assay* (**Figure 4.10**). Deux expériences indépendantes ont été réalisées, et chacune d'elles a été réalisée en duplicata. Nous avons déterminé que CHV-1 est capable d'infecter les cellules MDCK à partir des surfaces apicales et basolatérales (**Figure**

**4.10 A).** De plus, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre la quantité de virus produite dans les 3 compartiments lors de l'infection apicale (**Figure 4.10 A**). Cependant, dans l'infection basolatérale, nous avons observé une différence statistiquement significative entre la quantité de virus dans la monocouche cellulaire et les milieux du compartiment apical et basal. Les titres les plus élevés étaient associés à la monocouche cellulaire. Ce résultat est conforme avec ce qui est connu pour les *Varicellovirus*, qui sont des virus associés aux cellules. Aussi, nous avons observé des titres de virus total produite par les cellules 759 fois plus élevés, suite à l'infection de la surface basolatérale (**Figure 4.10 B**).

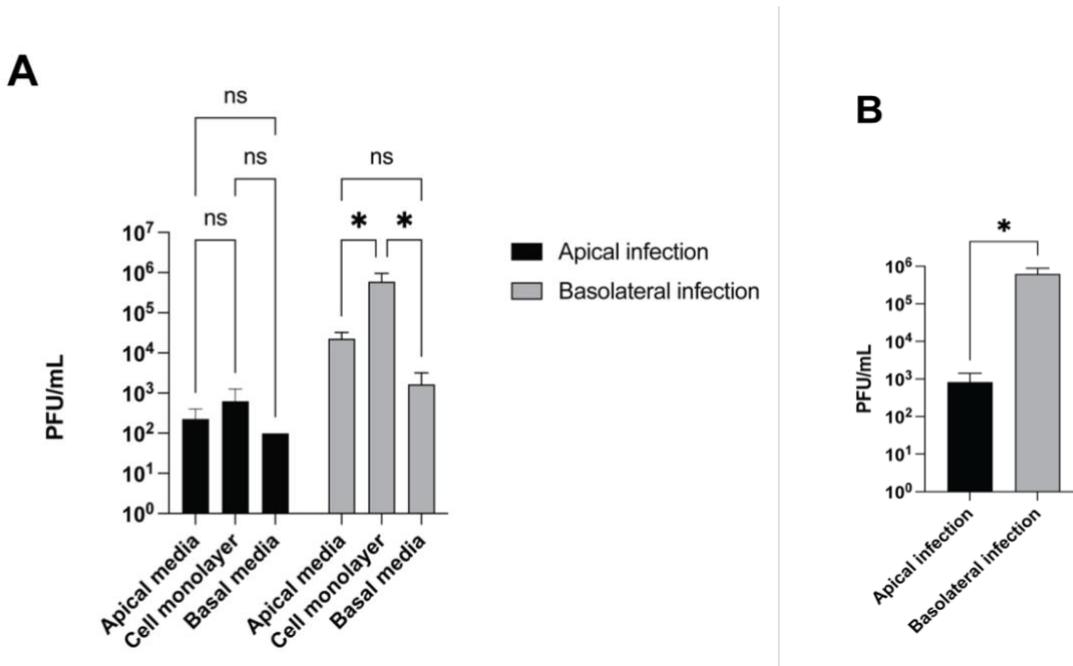


Figure 4.10 : L'infection par CHV-1 est plus efficace sur la surface basolatérale

(A) La production virale dans le surnageant de la culture cellulaire dans le compartiment apical, dans le compartiment basolatéral et dans la monocouche cellulaire a été déterminé. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. Test statistique Two-way ANOVA : \*p < 0.05. (B) Production virale totale des trois compartiments (chambre apicale, monocouche cellulaire, chambre basolatérale) pour les cellules MDCK polarisées infectées apicalement et basolatéralement. Test bilatéral de Student *t-test* : \*p<0,05, ns, non significatif. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata (n = 2). (Eisa et al., 2022).



## 5 DISCUSSION

---

### 5.1 L'ectodomaine de la gD du CHV-1 interagit avec des récepteurs de la famille des molécules d'adhésion et des récepteurs tyrosine kinase

Notre laboratoire a démontré que le CHV-1 infecte les cellules MDCK par un mécanisme similaire à la macropinocytose (Eisa *et al.* 2021). Cependant, le récepteur d'entrée du virus à ce jour n'est pas identifié. Pour cela, notre premier objectif a été de purifier les protéines cellulaires ligands de la glycoprotéine virale gD dans le but d'identifier le récepteur. À cette fin, nous avons produit la gD fusionnée avec le domaine Fc de l'IgG1 dans les cellulaires mammifères HEK293T, pour générer une matrice d'affinité et capturer les protéines cellulaires interagissantes. Tel que démontré dans la figure 4.2, la gD-Fc de 63kDa et Fc 27 kDa seule ont bel et bien été exprimées. L'interaction de la protéine recombinante produite avec son ligand cellulaire nécessite que la protéine adopte une structure fonctionnelle. Cela dépend du repliement et des modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité de la protéine. Tel que démontré dans la figure 4.4, la protéine gD-Fc a la capacité d'adopter différentes conformations, notamment une conformation dimérique et trimérique. Pour HSV-1, le dimère de gD est la forme fonctionnelle interagissant avec le récepteur. Il a aussi été démontré que gD-Fc du HSV-1 a la capacité de former des trimères en présence d'agent de pontage (Handler *et al.*, 1996; Krummenacher *et al.*, 2005). Similairement, nous avons observé que gD-Fc du CHV-1 forme des dimères et des trimères en absence de l'agent réducteur, le BME. La présence des trimères de gD pourrait susciter l'interrogation à savoir si cette forme peut altérer l'interaction avec le récepteur d'intérêt ou du moins réduire les probabilités d'interactions. Cette possibilité n'est pas exclue, pour autant, il faut préciser que la forme fonctionnelle, la forme dimérique est exprimée et permettra de purifier les ligands cellulaires. De plus, pour diminuer l'interférence que peut causer les formes trimériques, d'autres expériences de purification de la forme dimérique gD-Fc par exclusion de taille, pourraient être conduites. De plus, nous avons constaté que la protéine recombinante gD-Fc a subi les modifications posttraductionnelles de glycosylation sur les résidus asparagine N-liés. La glycosylation permet le suivi et la régulation du repliement et de la sécrétion de la protéine. En contexte infectieux, la glycosylation affecte le repliement des protéines virales et leur trafic ultérieur, mais module également leurs interactions avec les récepteurs et la réponse immunitaire innée et adaptative (Watanabe *et al.*, 2019). Il a été rapporté que la N-glycosylation de la gB du HSV-2 est importante pour l'entrée virale. En particulier, elle a un impact sur la fusion membranaire (Luo *et al.*, 2015). Tel que révélée dans la figure 4.5, la gD-Fc a subi une glycosylation sur les résidus Asn. Cela suppose que la protéine est proprement repliée et contient

les modifications post-traductionnelles nécessaires pour être fonctionnelle, soit d'interagir avec son ligand, le récepteur d'entrée. Suite à l'analyse par spectrométrie de masse des ligands cellulaires de la gD-Fc et des ligands cellulaires de Fc, en tout, 280 protéines ont été identifiées. 203 sont des protéines capturées communément par gD-Fc et Fc ; 21 sont des ligands capturés par gD-Fc spécifiquement. Quatre ligands capturés par gD sont des récepteurs appartenant à la famille des cadhérines, récepteurs de la famille des ATPases, des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et des serine-thréonine kinases (**Figure 4.7**). Ces ligands pourraient potentiellement être impliqués dans l'entrée du CHV-1. De plus, certaines protéines intracellulaires identifiées sont impliquées dans la signalisation intracellulaire des récepteurs appartenant à la famille des RTK. Ces protéines intracellulaires pourraient interagir avec les récepteurs membranaires ligands de la gD, et donc, seraient indirectement impliquées dans l'interaction de gD avec son ligand. Nous allons réaliser d'autres investigations pour analyser chaque protéine membranaire identifiée, afin de tester leur fonctionnalité dans l'entrée du CHV-1. L'identité du ligand sera révélée à la suite d'analyses plus approfondies pour confirmer son rôle dans l'entrée du CHV-1.

Par ailleurs, l'on peut déjà vérifier la plausibilité de chaque ligand membranaire identifié en analysant leurs fonctions cellulaires respectives. Tout d'abord, les cadhérines sont des membres de la superfamille des Immunoglobulines, dans lequel on retrouve les récepteurs tyrosines kinases et les nectines. Ils participent à maintenir les jonctions cellulaires dépendant du  $Ca^{2+}$ . Certaines cadhérines promeuvent la macropinocytose (Sabatini *et al.*, 2011; Yonemura, 2011). Les cadhérines forment les « adherens jonction » et font partie des molécules d'adhésions. Parmi les molécules d'adhésions, on trouve les nectines qui sont des récepteurs pour plusieurs Alphaherpèsvirus. La nectine-1 est une molécule d'adhésion cellulaire de type immunoglobuline indépendante du  $Ca^{2+}$ . Par ailleurs, les récepteurs tyrosine kinase et les intégrines sont impliqués dans l'activation du mécanisme d'endocytose, notamment de la macropinocytose. Ainsi, il a été rapporté que HSV utilise les molécules d'adhésions comme récepteur d'entrée, notamment les nectines et les intégrines (Spear *et al.*, 2000). Les nectines peuvent être localisées aux jonctions intercellulaires et être inaccessibles au virus tant que les jonctions ne sont pas rompues (Spear, 2004). Par conséquent, l'entrée du virus dans les cellules d'un épithélium intact peut nécessiter soit une détérioration de l'épithélium, soit l'utilisation d'un autre récepteur présent à la surface apicale. Il convient de noter que les *Varicellovirus* sont des virus associés à la cellule, et produisent peu de particules virales libres. Ainsi, les récepteurs cellulaires de la famille des molécules d'adhésions confèrent au virus un avantage qui est d'améliorer la propagation du virus de cellule à cellule.

Nous pourrions valider la fonctionnalité des récepteurs identifiés en exprimant de manière inductible le(s) récepteur(s) putatif(s) dans les cellules non permissives à l'infection MBDK (Madin-Darby Bovin Kidney) (Nakamichi *et al.*, 2000). Ensuite, on pourrait tester la susceptibilité des cellules non permissives à l'infection exprimant le(s) récepteur(s) putatif(s), à l'infection par CHV-1, par qPCR (pour détecter la présence du génome viral) et microscopie électronique à transmission (pour visualiser les capsides intracellulaires).

## **5.2 CHV-1 infecte préférentiellement la surface basolatérale des cellules MDCK polarisées**

Lors de la pathogenèse du CHV-1, le site de la primo-infection est l'épithélium polarisé des cellules du tractus respiratoire supérieure. Ainsi, les modèles d'études utilisant des cellules polarisées sont essentiels pour parvenir à une compréhension complète de l'interaction du CHV-1 avec son hôte. Dans les cellules MDCK non-polarisées, notre laboratoire a démontré que le virus induit des extensions lamellipodales. Nous avons donc étendu l'étude du mécanisme d'entrée du CHV-1 dans les cellules MDCK polarisées, car nous voulions utiliser un système cellulaire ressemblant au site primaire d'infection du CHV-1, à savoir les cellules épithéliales polarisées des voies respiratoires. En utilisant le modèle des cellules MDCK polarisées sur des inserts transwell™, nous avons caractérisé l'infection du CHV-1. Nous avons donc examiné la surface cellulaire des cellules polarisées infectées par microscopie électronique à balayage. Nos résultats ont montré que l'ultrastructure de la surface apicale de la membrane plasmique des cellules MDCK polarisées présente des extensions lamellipodales ainsi que des filopodes. Cette observation a déjà été rapportée dans la littérature (Sambuy & Rodriguez-Boulan, 1988). Nous avons constaté que la surface apicale des cellules n'est pas homogène comme le montrent les exemples de surface de différentes parties des mêmes cellules (**Figure 4.8**). Néanmoins, nous avons pu montrer que l'infection par le CHV-1 n'a pas entraîné une modification généralisée de la surface apicale de la membrane plasmique. À plus fort grossissement, nous avons pu voir à l'extrémité d'un lamellipode, la présence de protubérances. Nous avons quantifié ces protubérances sur 25 lamellipodes, et la moyenne sur un lamellipode est de 9,4 dans les cellules infectées et dans les cellules non infectées, la moyenne est de 8,5 (**Figure 4.9**). Il n'y a donc pas de différence statistiquement significative observée entre les cellules non infectées et les cellules infectées. Ces résultats suggèrent que les protrusions présentes dans les cellules polarisées sont suffisantes pour permettre l'entrée du virus. En d'autres mots, les protrusions membranaires présentes sur les cellules fournissent une surface adéquate pour permettre une liaison efficace du virus et, finalement, son entrée. Cependant, nos résultats n'excluent pas la possibilité

d'altérations restreintes, ou une accentuation des protubérances localisées aux sites de contact avec le virus. Utiliser une infection avec une MOI plus élevée que celle utilisée dans nos expériences pourrait permettre d'observer ces changements. De plus, le marquage immuno-gold pourrait permettre de localiser et d'observer ces changements d'ultrastructure localisés.

Par ailleurs, nous avons voulu évaluer si le CHV-1 a une surface d'infection préférentielle dans les cellules polarisées. Nous avons comparé l'infection apicale et basolatérale du CHV-1 en titrant la production virale de l'infection apicale et basolatérale par *plaque assay*. Tel qu'observé dans la figure 4.10, nous avons observé que le virus peut infecter les cellules à partir de la surface apicale et de la surface basolatérale. Dans l'infection basolatérale, nous avons vu que les titres les plus élevés étaient associés à la monocouche cellulaire. Ce résultat est conforme à ce qui est observé pour les *Varicellovirus*, qui sont des virus associés aux cellules. Lorsque nous avons comparé le virus total produit dans tous les compartiments à partir de l'infection apicale et basolatérale, nous avons observé que des titres viraux plus élevés étaient produits après l'inoculation basolatérale.

Ces résultats s'intègrent dans le modèle de pathogenèse du CHV-1, qui à la suite de la primo-infection, infecte les cellules hématopoïétiques et cause une virémie. Et donc, lors de la virémie médiée par les cellules infectées, le virus réinfecte les cellules épithéliales du côté basolatérale, causant des lésions. Ainsi, l'infection efficace des cellules épithéliales à partir de la surface basolatérale favorise une propagation efficace du virus de cellule à cellule. De plus, à la suite de la latence, le virus se réactive dans les neurones des ganglions sensoriels, les virions nouvellement formés sont libérés à partir de l'extrémité des axones et infectent les cellules épithéliales (Evermann *et al.*, 2011; Ledbetter *et al.*, 2009), du côté basolatéral. Une infection basolatérale efficace des cellules épithéliales à partir des terminaisons axonales provoque des lésions récurrentes, ce qui confère un avantage dans la propagation et la transmission du virus à de nouveaux hôtes.

L'infection basolatérale préférentielle du CHV-1 peut être en raison d'une expression spécifique des récepteurs à cette surface cellulaire. Cela a aussi été observé *in vitro* pour l'entrée préférentielle du HSV-1 du côté apical dans les cellules humaines polarisées de l'utérus (ECC-1), du côlon (CaCo-2) et du pigment rétinien (ARPE-19), en raison de la présence de la nectine-1 (Galen *et al.*, 2006). À contrario, EHV-1 et BHV-4 (Bovine herpesvirus 4) infectent les cellules épithéliales respiratoires préférentiellement à la surface basolatérale (Van Cleemput *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019), en raison d'une expression préférentielle d'un récepteur putatif.

Nos résultats soulèvent la question de savoir quels sont les mécanismes responsables de cette différence. Nous émettons l'hypothèse qu'il existe une distribution asymétrique des récepteurs cellulaires du virus, avec une expression préférentielle sur la surface basolatérale qui pourrait expliquer l'efficacité de l'infection par le CHV-1 (**Figure 6.1**). L'identification du ou des récepteurs cellulaires du CHV-1 sera une étape importante pour expliquer pourquoi le virus infecte la surface basolatérale de manière plus efficace. En perspective, nous pourrions tester le niveau d'expression apicale versus basolatérale du récepteur identifié par des expériences de microscopie confocale avec des anticorps ciblant ce récepteur. De plus, l'utilisation de nouveaux modèles d'infection des cellules épithéliales par le CHV-1, tels que les modèles de culture d'interface air/liquid, sera utile pour comprendre les mécanismes de l'infection par le CHV-1 (Harman *et al.*, 2014).

## 6 CONCLUSION

---

Les résultats de ce projet ont permis d'identifier des protéines cellulaires potentielles ligands de la glycoprotéine virale gD par spectrométrie de masse. Nous avons trouvé que la gD s'est liée aux récepteurs de la famille des cadhérines, des ATPases, des récepteurs tyrosine kinase et serine-thréonine kinase. La plupart des récepteurs identifiés sont de la famille des molécules d'adhésions. Les molécules d'adhésions ont pour fonction de maintenir l'intégrité des cellules épithéliales. L'utilisation des membres de cette famille comme récepteur d'entrée peut améliorer la propagation du virus de cellule à cellule. Ainsi, le virus échappe aux défenses immunitaires en se propageant de cellule à cellule. Pour faire suite à cette première étape vers l'identification du récepteur, nous allons poursuivre l'analyse des autres échantillons de protéines capturées par le *pull-down assay*, et déterminer quelles protéines se lient à gD de manière reproductible. Ensuite, d'autres investigations seront réalisées pour valider la fonctionnalité des ligands de gD dans l'entrée du CHV-1. Par exemple, nous pourrions bloquer les potentiels récepteurs avec des anticorps, et tester la susceptibilité du virus à entrer dans les cellules MDCK. De plus, nous pourrions inhiber l'expression de ces potentiels récepteurs avec des si-RNA, et tester la susceptibilité des cellules à l'infection par CHV-1.

Par ailleurs, notre étude a permis d'analyser l'ultrastructure des cellules MDCK polarisées, suite à l'infection par le CHV-1 par microscopie électronique à balayage. Nous avons démontré que le CHV-1 n'induit pas de changement généralisé de la surface apicale des cellules polarisées (Eisa et al. 2022), ce qui suggère que les protrusions membranaires déjà à la surface apicale sont suffisantes pour favoriser l'entrée et l'infection du virus, contrairement à ce que notre laboratoire a démontré sans les cellules MDCK non polarisées, où le virus induit de manière généralisée des protrusions de type lamellipodales. (Eisa et al. 2021).

Par la suite, nous avons démontré que le CHV-1 infecte préférentiellement la surface basolatérale des cellules polarisées. Cette infection préférentielle confère un avantage au virus, notamment en favorisant la propagation virale de cellule à cellule. De plus, lors de la réactivation après la phase latente, les nouveaux virions réinfectent les cellules épithéliales à la surface basolatérale à partir des extrémités axonales. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection préférentielle du CHV-1 à la surface basolatérale serait la résultante d'une expression asymétrique des récepteurs cellulaires à cette surface (**Figure 6.1**). Ainsi, identifier le récepteur cellulaire contribuera à une meilleure compréhension de la première étape de l'infection de ce

*Varicellovirus* dans les cellules épithéliales polarisées, en plus de mener à une compréhension du tropisme d'hôte. Ces informations pourront contribuer au développement de nouvelles stratégies pour bloquer l'infection de ces virus.

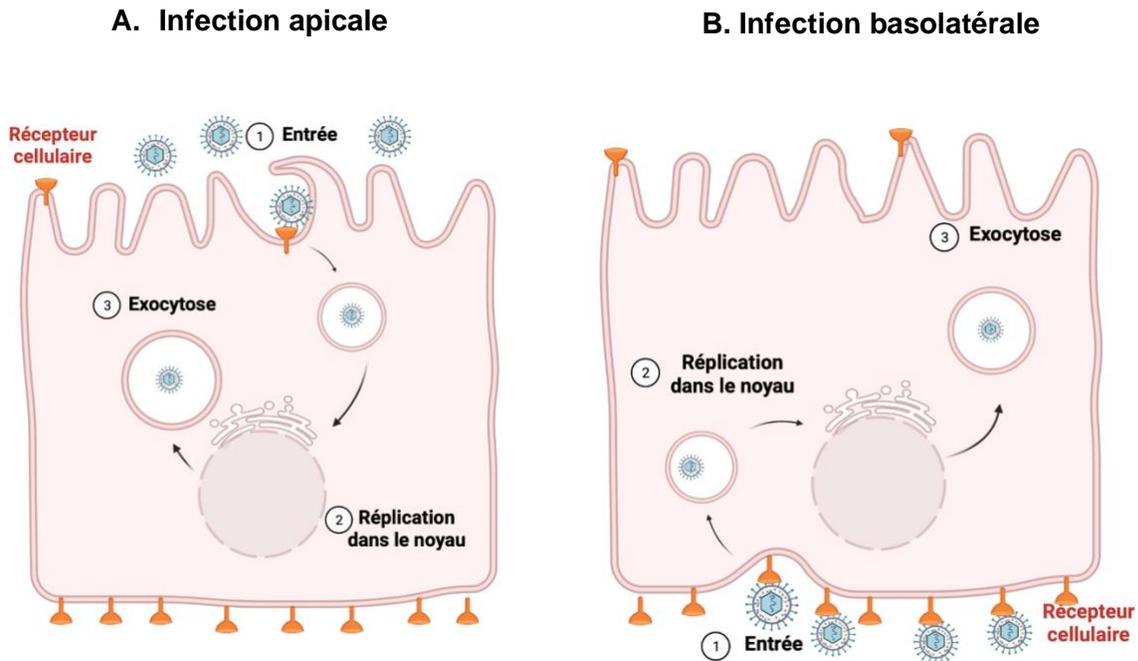


Figure 6.1 Modèle d'infection du CHV-1 dans les cellules MDCK polarisées

Dans les cellules épithéliales polarisées, le récepteur d'entrée du CHV-1 est préférentiellement exprimé à la surface basolatérale (A) La faible expression des récepteurs (en orange) à la surface apicale cause l'accumulation des virions (en bleu), non internalisés. (B) Une plus grande disponibilité du récepteur à la surface basolatérale améliore l'entrée du virus et subséquemment une infection et une propagation virale plus efficace.



## 7 BIBLIOGRAPHIE

---

- Ackermann M, Peterhans E, Wyler R (1982) DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *American journal of veterinary research* 43(1).
- Appel MJ, Menegus M, Parsonson IM, Carmichael LE (1969) Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *American journal of veterinary research* 30(12):2067-2073.
- Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y, Kawaguchi Y (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
- Atanasiu D, Saw WT, Cohen GH, Eisenberg RJ (2010) Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *Journal of Virology* 84(23):12292-12299.
- Azab W, Harman R, Miller D, Tallmadge R, Frampton AR, Antczak DF, Osterrieder N (2014) Equid herpesvirus type 4 uses a restricted set of equine major histocompatibility complex class I proteins as entry receptors. *Journal of General Virology* 95(Pt 7):1554-1563.
- Azab W, Lehmann MJ, Osterrieder N (2013) Glycoprotein H and  $\alpha$ 1 Integrins Determine the Entry Pathway of Alphaherpesviruses. *Journal of Virology* 87(10):5937-5948.
- Azab W, Tsujimura K, Maeda K, Kobayashi K, Mohamed YM, Kato K, Matsumura T, Akashi H (2010) Glycoprotein C of equine herpesvirus 4 plays a role in viral binding to cell surface heparan sulfate. *Virus research* 151(1):1-9.
- Azab W, Zajic L, Osterrieder N (2012) The role of glycoprotein H of equine herpesviruses 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) in cellular host range and integrin binding. *Veterinary Research* 43(1):1-12.
- Backovic M & Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Current opinion in structural biology* 19(2):189-196.
- Bender FC, Samanta M, Heldwein EE, Leon MPd, Bilman E, Lou H, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH (2007) Antigenic and Mutational Analyses of Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Reveal Four Functional Regions. *Journal of Virology* 81(8):3827-3841.
- Berarducci B, Rajamani J, Zerboni L, Che X, Sommer M, Arvin AM (2010) Functions of the unique N-terminal region of glycoprotein E in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1):282-287.
- Bohannon KP, Jun Y, Gross SP, Smith GA (2013) Differential protein partitioning within the herpesvirus tegument and envelope underlies a complex and variable virion architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(17):E1613-E1620.
- Bottinelli M, Rampacci E, Stefanetti V, Marenzoni ML, Malmlov AM, Coletti M, Passamonti F (2016) Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. *Journal of Veterinary Medicine Science* 78(5):797-802.
- Brunner J, Ragupathy S, Borchard G (2021) Target specific tight junction modulators. *Advanced Drug Delivery Reviews* 171.
- Cairns TM, Huang Z-Y, Gallagher JR, Lin Y, Lou H, Whitbeck JC, Wald A, Cohen GH, Eisenberg RJ (2015) Patient-Specific Neutralizing Antibody Responses to Herpes Simplex Virus Are

- Attributed to Epitopes on gD, gB, or Both and Can Be Type Specific. *Journal of Virology* 89(18):9213-9231.
- Cairns TM, Huang Z-Y, Whitbeck JC, Leon MPd, Lou H, Wald A, Krummenacher C, Eisenberg RJ, Cohen GH (2014) Dissection of the Antibody Response against Herpes Simplex Virus Glycoproteins in Naturally Infected Humans. *Journal of Virology* 88(21):12612-12622.
- Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M (2000) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Reviews in Medical Virology* 10(5):305-319.
- Carfi A, Willis SH, Whitbeck JC, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Wiley DC (2001) Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor HveA. *Mol Cell* 8(1):169-179.
- Carmichael LE & Barnes FD (1969) Effect of temperature on growth of canine herpesvirus in canine kidney cell and macrophage cultures. *Journal of infectious disease* 120(6):664-668.
- Carmichael LE, Squire RA, Krook L (1965) Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American journal of veterinary research* 26(113):803-814.
- Chae PS, Rasmussen SGF, Rana RR, Gotfryd K, Chandra R, Goren MA, Kruse AC, Nurva S, Loland CJ, Pierre Y, Drew D, Popot J-L, Picot D, Fox BG, Guan L, Gether U, Byrne B, Kobilka B, Gellman SH (2010) Maltose–neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nature Methods* 7(12):1003-1008.
- Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, Schaller S, Perez White BE, Jardetzky TS, Longnecker R (2018) Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology* 3(2):172-180.
- Chen JJ, Zhu Z, Gershon AA, Gershon MD (2004) Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster. *Cell* 119(7):915-926.
- Chowdary TK, Cairns TM, Atanasiu D, Cohen GH, Eisenberg RJ, Heldwein EE (2010) Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nat Struct Mol Biol* 17(7):882-888.
- Ciferri C, Chandramouli S, Donnarumma D, Nikitin PA, Cianfrocco MA, Gerrein R, Feire AL, Barnett SW, Lilja AE, Rappuoli R, Norais N, Settembre EC, Carfi A (2015) Structural and biochemical studies of HCMV gH/gL/gO and Pentamer reveal mutually exclusive cell entry complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(6):1767-1772.
- Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH, Campadelli-Fiume G (2004a) The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(19):7445-7450.
- Cocchi F, Menotti L, Di Ninni V, Lopez M, Campadelli-Fiume G (2004b) The herpes simplex virus JMP mutant enters receptor-negative J cells through a novel pathway independent of the known receptors nectin1, HveA, and nectin2. *Journal of Virology* 78(9):4720-4729.
- Cocchi F, Menotti L, Mirandola P, Lopez M, Campadelli-Fiume G (1998) The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the

- attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *Journal of Virology* 72(12):9992-10002.
- Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews Microbiology* 9(5):369-381.
- Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Wiley DC, Cohen GH, Eisenberg RJ (2003) Structure-Based Mutagenesis of Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Defines Three Critical Regions at the gD-HveA/HVEM Binding Interface. *Journal of General Virology* 10.1128/JVI.77.14.8127-8140.2003.
- Cooper RS, Georgieva ER, Borbat PP, Freed JH, Heldwein EE (2018) Structural basis for membrane anchoring and fusion regulation of the herpes simplex virus fusogen gB. *Nature Structural Molecular Biology* 25(5):416-424.
- Cooper RS & Heldwein EE (2015) Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. *Viruses* 7(12):6552-6569.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Archives of virology* 154(1):171-177.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2022) The order Herpesvirales. *Archives of virology* 154(1):171-177.
- Decaro N, Martella V, Buonavoglia C (2008) Canine adenoviruses and herpesvirus. *Veterinary clinics of North American Small Animal Practice* 38(4):799-814, viii.
- Di Giovine P, Settembre EC, Bhargava AK, Luftig MA, Lou H, Cohen GH, Eisenberg RJ, Krummenacher C, Carfi A (2011) Structure of Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor Nectin-1. *PLOS Pathogens* 7(9):e1002277.
- Dowrick P, Kenworthy P, McCann B, Warn R (1993) Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *European journal of cell biology* 61(1):44-53.
- Eisa M, Loucif H, van Grevenynghe J, Pearson A (2021) Entry of the Varicellovirus Canid herpesvirus 1 into Madin-Darby canine kidney epithelial cells is pH-independent and occurs via a macropinocytosis-like mechanism but without increase in fluid uptake. *Cell Microbiology* 23(12):e13398.
- Eisa M, Micky S, Pearson A (2022) Canid herpesvirus 1 Preferentially Infects Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells from the Basolateral Surface. *Viruses*. 2022; 14(6):1291. .
- Evermann JF, Ledbetter EC, Maes RK (2011) Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice* 41(6):1097-1120.
- Falanga A, Tarallo R, Vitiello G, Vitiello M, Perillo E, Cantisani M, D'Errico G, Galdiero M, Galdiero S (2012) Biophysical characterization and membrane interaction of the two fusion loops of glycoprotein B from herpes simplex type I virus. *Plos one* 7(2):e32186.
- Fan D, Wang M, Cheng A, Jia R, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Zhao X, Chen S, Liu M, Zhang S, Ou X, Mao S, Gao Q, Sun D, Wen X, Liu Y, Yu Y, Zhang L, Tian B, Pan L, Chen X (2020) The Role of VP16 in the Life Cycle of Alphaherpesviruses. *Front Microbiol* 11:1910.
- Fan Q, Amen M, Harden M, Severini A, Griffiths A, Longnecker R (2012) Herpes B virus utilizes human nectin-1 but not HVEM or PILR $\alpha$  for cell-cell fusion and virus entry. *Journal of Virology* 86(8):4468-4476.

- Finnen RL, Mizokami KR, Banfield BW, Cai G-Y, Simpson SA, Pizer LI, Levin MJ (2006) Postentry events are responsible for restriction of productive varicella-zoster virus infection in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Virology* 80(21):10325-10334.
- Frampton AR, Jr., Goins WF, Cohen JB, von Einem J, Osterrieder N, O'Callaghan DJ, Glorioso JC (2005) Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *Journal of Virology* 79(5):3169-3173.
- Gadsden BJ, Maes RK, Wise AG, Kiupel M, Langohr IM (2012) Fatal canine herpesvirus 1 infection in an adult dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(3):604-607.
- Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, Browne H, Pedone C, Galdiero M (2005) Fusogenic domains in herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *Journal of biological chemistry* 280(31):28632-28643.
- Galen B, Cheshenko N, Tuyama A, Ramratnam B, Herold BC (2006) Access to Nectin Favors Herpes Simplex Virus Infection at the Apical Surface of Polarized Human Epithelial Cells. *Journal of Virology* 80(24):12209-12218.
- Gallagher JR, Saw WT, Atanasiu D, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH (2013) Displacement of the C terminus of herpes simplex virus gD is sufficient to expose the fusion-activating interfaces on gD. *Journal of Virology* 87(23):12656-12666.
- Gatherer D, Depledge DP, Hartley CA, Szpara ML, Vaz PK, Benko M, Brandt CR, Bryant NA, Dastjerdi A, Doszpoly A, Gompels UA, Inoue N, Jarosinski KW, Kaul R, Lacoste V, Norberg P, Origi FC, Orton RJ, Pellett PE, Schmid DS, Spatz SJ, Stewart JP, Trimpert J, Waltzek TB, Davison AJ (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J Gen Virol* 102(10):001673.
- Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG (1998) Entry of Alphaherpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor. *Science* 280(5369):1618-1620.
- Gianni T, Salvioli S, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, Campadelli-Fiume G (2013)  $\alpha\beta 6$ - and  $\alpha\beta 8$ -integrins serve as interchangeable receptors for HSV gH/gL to promote endocytosis and activation of membrane fusion. *PLoS Pathog* 9(12):e1003806.
- Gruenheid S, Gatzke L, Meadows H, Tufaro F (1993) Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Virology* 67(1):93-100.
- Gryspeerd AC, Vandekerckhove AP, Garré B, Barbé F, Van de Walle GR, Nauwynck HJ (2010) Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Veterinary microbiology* 142(3-4):242-253.
- Gupta R & Brunak S (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* :310-322.
- Hambleton S, Steinberg SP, Gershon MD, Gershon AA (2007) Cholesterol Dependence of Varicella-Zoster Virion Entry into Target Cells. *Journal of Virology* 81(14):7548-7558.
- Handler CG, Cohen GH, Eisenberg RJ (1996) Cross-linking of glycoprotein oligomers during herpes simplex virus type 1 entry. *Journal of Virology* 70(9):6076-6082.
- Hannah BP, Cairns TM, Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH (2009) Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Associates with Target Membranes via Its Fusion Loops. *Journal of Virology* 83(13):6825-6836.

- Harman RM, Bussche L, Ledbetter EC, Walle GRVd (2014) Establishment and Characterization of an Air-Liquid Canine Corneal Organ Culture Model To Study Acute Herpes Keratitis. *Journal of Virology* 88(23):13669-13677.
- Hashimoto A, Hirai K, Suzuki Y, Fujimoto Y (1983) Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *American journal of veterinary research* 44(4):610-614.
- Hashimoto A, Hirai K, Yamaguchi T, Fujimoto Y (1982) Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *American journal of veterinary research* 43(5):844-850.
- Hashimoto K & Panchenko AR (2010) Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(47):20352-20357.
- Head H & Campbell AW (1900) The pathology of herpes zoster and its bearing on sensory localisation. *Brain* 23(3):353-362.
- Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG (1991) Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of Virology* 65(3):1090-1098.
- Heuser JE & Anderson RG (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *Journal of Cell Biology* 108(2):389-400.
- Hsu CYM & Uludağ H (2012) A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols* 7(5):935-945.
- Johnson DC, Burke RL, Gregory T (1990) Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *Journal of Virology* 64(6):2569-2576.
- Jones C (2019) Bovine Herpesvirus 1 Counteracts Immune Responses and Immune-Surveillance to Enhance Pathogenesis and Virus Transmission. *Frontiers in Immunology* 10:1008.
- Jones C & Chowdhury S (2007) A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* 8(2):187-205.
- Kapil S & Basaraba RJ (1997) Infectious Bovine Rhinotracheitis, Parainfluenza-3, and Respiratory Coronavirus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13(3):455-469.
- Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE (1968) Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *American journal of veterinary research* 29(6):1251-1257.
- Katze MG, He Y, Gale M (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology* 2(9):675-687.
- Kerr MC & Teasdale RD (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* 10(4):364-371.
- Khusro A, Aarti C, Rivas-Caceres RR, Barbabosa-Pliego A (2020) Equine Herpesvirus-1 Infection in Horses: Recent Updates on its Pathogenicity, Vaccination, and Preventive Management Strategies. *Journal Equine Veterinary Science* 87:102923.
- Knipe D, Heldwein E, Mohr I, Sodroski C (2021) The family Herpesviridae: A brief Introduction. *Field's Virology: DNA Viruses; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA* :212-233.

- Knipe D, Howley P, Griffin D (2013) Herpes simplex viruses. In Fields' Virology D.M. Knipe, P. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, V.R. Racaniello, B. Roizman (Eds.), New York, N.Y. (6th edition), Wolters Kluwer/Lippincott-Williams and Wilkins (2013), pp. 1823-1897
- Kolb AW, Lewin AC, Moeller Trane R, McLellan GJ, Brandt CR (2017) Phylogenetic and recombination analysis of the herpesvirus genus varicellovirus. *BMC Genomics* 18(1):887.
- Koppers-Lalic D, Reits EAJ, Rensing ME, Lipinska AD, Abele R, Koch J, Rezende MM, Admiraal P, Leeuwen Dv, Bienkowska-Szewczyk K, Mettenleiter TC, Rijsewijk FAM, Tampé R, Neefjes J, Wiertz EJHJ (2005) Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Journal of Virology* 10.1073/pnas.0501463102.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3):567-580.
- Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, Cohen GH, Wiley DC, Carfi A (2005) Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO Journal* 24(23):4144-4153.
- Ku CC, Zerboni L, Ito H, Graham BS, Wallace M, Arvin AM (2004) Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J Exp Med* 200(7):917-925.
- Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 72(7):6119-6130.
- Lazear E, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Cairns TM, Willis SH, Zuo Y, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ (2012) Antibody-induced conformational changes in herpes simplex virus glycoprotein gD reveal new targets for virus neutralization. *Journal of Virology* 86(3):1563-1576.
- Ledbetter EC, Kim SG, Dubovi EJ, Bicalho RC (2009) Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary microbiology* 138(1):98-105.
- Ledbetter EC, Marfurt CF, Dubielzig RR (2013) Metaherpetic corneal disease in a dog associated with partial limbal stem cell deficiency and neurotrophic keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 16(4):282-288.
- Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J (2006) Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(12):1331-1354.
- Lewin AC, Coghill LM, McLellan GJ, Bentley E, Kousoulas KG (2020) Genomic analysis for virulence determinants in feline herpesvirus type-1 isolates. *Virus Genes* 56(1):49-57.
- Li Q, Ali MA, Cohen JI (2006) Insulin Degrading Enzyme Is a Cellular Receptor Mediating Varicella-Zoster Virus Infection and Cell-to-Cell Spread. *Cell* 127(2):305-316.
- Li Y, Negussie H, Qiu Y, Reddy VR, Mateusen B, Nauwynck HJ (2016) Early events of canine herpesvirus 1 infections in canine respiratory and genital mucosae by the use of ex vivo models. *Research in veterinary science* 105:205-208.

- Lim PJ & Chu JJH (2014) A Polarized Cell Model for Chikungunya Virus Infection: Entry and Egress of Virus Occurs at the Apical Domain of Polarized Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(2):e2661.
- Luo S, Hu K, He S, Wang P, Zhang M, Huang X, Du T, Zheng C, Liu Y, Hu Q (2015) Contribution of N-linked glycans on HSV-2 gB to cell–cell fusion and viral entry. *Virology* 483:72-82.
- Ma G, Azab W, Osterrieder N (2013) Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Veterinary microbiology* 167(1-2):123-134.
- Ma W, Wang H, He H (2019) Bovine herpesvirus 1 tegument protein UL41 suppresses antiviral innate immune response via directly targeting STAT1. *Veterinary microbiology* 239:108494.
- Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D (2021) Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10:617578-617578.
- Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ (2001) The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Advanced Drug Delivery Reviews* 49(3):237-250.
- Maurer UE, Zeev-Ben-Mordehai T, Pandurangan AP, Cairns TM, Hannah BP, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH, Topf M, Huiskonen JT, Grünewald K (2013) The structure of herpesvirus fusion glycoprotein B-bilayer complex reveals the protein-membrane and lateral protein-protein interaction. *Structure* 21(8):1396-1405.
- Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu G-L, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF (1998) LIGHT, a New Member of the TNF Superfamily, and Lymphotoxin  $\alpha$  Are Ligands for Herpesvirus Entry Mediator. *Immunity* 8(1):21-30.
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117(1):90-104.
- Mercer J & Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology* 11(5):510-520.
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A (2010) Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry* 79:803-833.
- Metrick CM, Koenigsberg AL, Heldwein EE (2020) Conserved Outer Tegument Component UL11 from Herpes Simplex Virus 1 Is an Intrinsically Disordered, RNA-Binding Protein. *mBio* 11(3).
- Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
- Morgan RW, Xie Q, Cantello JL, Miles AM, Bernberg EL, Kent J, Anderson A (2001) Marek's disease virus latency. *Current Topic Microbiology Immunology* 255:223-243.
- Nakamichi K, Ohara K, Matsumoto Y, Otsuka H (2000) Attachment and Penetration of Canine Herpesvirus 1 in Non-Permissive Cells. in *Journal of Veterinary Medical Science*, p 965-970.
- Nakanishi H & Takai Y (2004) Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biological chemistry* 385(10):885-892.

- Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE (2003) Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Virology* 77(9):5324-5332.
- Nicola AV, Peng C, Lou H, Cohen GH, Eisenberg RJ (1997) Antigenic structure of soluble herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D correlates with inhibition of HSV infection. *Journal of Virology* 71(4):2940-2946.
- Oliver SL, Yang E, Arvin AM (2016) Varicella-Zoster Virus Glycoproteins: Entry, Replication, and Pathogenesis. *Current clinical microbiology reports* 3(4):204-215.
- Otani T & Furuse M (2020) Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology* 30(10):805-817.
- Papageorgiou KV, Suárez NM, Wilkie GS, McDonald M, Graham EM, Davison AJ (2016) Genome sequence of canine herpesvirus. *Plos one* 11(5):e0156015.
- Parry C, Bell S, Minson T, Browne H (2005) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to  $\alpha\beta 3$  integrins. *Journal of General Virology* 86(1):7-10.
- Pastenkos G, Lee B, Pritchard SM, Nicola AV (2018) Bovine Herpesvirus 1 Entry by a Low-pH Endosomal Pathway. *Journal of Virology* 92(20):e00839-00818.
- Patel JR, Edington N, Mumford JA (1982) Variation in cellular tropism between isolates of Equine herpesvirus-1 in Foals. *Archives of virology* 74(1):41-51.
- Pellett P, Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, Lacoste V, Minson AC, Nicholas J, Roizman B, Studdert M, Wang F (2011) Herpesvirales. *Virus Taxonomy, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* :99-107.
- Peng T, Ponce-de-Leon M, Jiang H, Dubin G, Lubinski JM, Eisenberg RJ, Cohen GH (1998) The gH-gL complex of herpes simplex virus (HSV) stimulates neutralizing antibody and protects mice against HSV type 1 challenge. *Journal of Virology* 72(1):65-72.
- Pickett MA, Naturel VF, Feldman JL (2019) A Polarizing Issue: Diversity in the Mechanisms Underlying Apico-Basolateral Polarization In Vivo. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 35(1):285-308.
- Plummer TH, Jr. & Tarentino AL (1991) Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* 1(3):257-263.
- Poulet H, Guigal PM, Soulier M, Leroy V, Fayet G, Minke J, Chappuis Merial G (2001) Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *The Veterinary record* 148(22):691-695.
- Quarles RH (2007) Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *Journal Neurochemistry* 100(6):1431-1448.
- Rogalin HB & Heldwein EE (2015) Interplay between the Herpes Simplex Virus 1 gB Cytodomain and the gH Cytotail during Cell-Cell Fusion. *Journal of Virology* 89(24):12262-12272.
- Rux AH, Lou H, Lambris JD, Friedman HM, Eisenberg RJ, Cohen GH (2002) Kinetic analysis of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 binding to heparin, heparan sulfate, and complement component C3b. *Virology* 294(2):324-332.
- Sabatini PJB, Zhang M, Silverman-Gavrila RV, Bendeck MP (2011) Cadherins at cell-autonomous membrane contacts control macropinocytosis. *Journal of Cell Science* 124(12):2013-2020.

- Sambuy Y & Rodriguez-Boulan E (1988) Isolation and characterization of the apical surface of polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(5):1529-1533.
- Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
- Shukla D & Spear PG (2001) Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *The Journal of Clinical Investigation* 108(4):503-510.
- Siedek E, Whelan M, Edington N, Hamblin A (1999) Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: stimulation of T lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 67(1):17-32.
- Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology* 6(5):401-410.
- Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH (2000) Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology* 275(1):1-8.
- Stetsenko A & Guskov A (2017) An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals* 7(7):197.
- Strandberg J & Carmichael L (1965) Electron microscopy of a canine herpesvirus. *Journal of bacteriology* 90(6):1790-1792.
- Struyf F, Martinez WM, Spear PG (2002) Mutations in the N-terminal domains of nectin-1 and nectin-2 reveal differences in requirements for entry of various alphaherpesviruses and for nectin-nectin interactions. *Journal of Virology* 76(24):12940-12950.
- Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H (2015) Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *Journal Biological Chemistry* 290(32):19833-19843.
- Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(2):866-871.
- Tan WS, Rong E, Dry I, Lillico S, Law A, Whitelaw B, Dalziel RG (2020a) Host cell factors important for BHV-1 cell entry revealed by genome-wide CRISPR knockout screen. 10.1101/2020.06.18.160523.
- Tan WS, Rong E, Dry I, Lillico SG, Law A, Whitelaw CBA, Dalziel RG (2020b) Genome-wide CRISPR knockout screen reveals membrane tethering complexes EARP and GARP important for Bovine Herpes Virus Type 1 replication. 10.1101/2020.06.17.155788.
- Van Cleemput J, Poelaert KCK, Laval K, Maes R, Hussey GS, Van den Broeck W, Nauwynck HJ (2017) Access to a main alphaherpesvirus receptor, located basolaterally in the respiratory epithelium, is masked by intercellular junctions. *Scientific Reports* 7(1):1-15.
- van der Meulen KM, Nauwynck HJ, Buddaert W, Pensaert MB (2000) Replication of equine herpesvirus type 1 in freshly isolated equine peripheral blood mononuclear cells and changes in susceptibility following mitogen stimulation. *Journal of General Virology* 81(1):21-25.
- Vollmer B, Pražák V, Vasishtan D, Jefferys EE, Hernandez-Duran A, Vallbracht M, Klupp BG, Mettenleiter TC, Backovic M, Rey FA, Topf M, Grünewald K (2020) The prefusion structure of herpes simplex virus glycoprotein B. *Sciences advances* 10.1126/sciadv.abc1726.

- Wanas E, Efler S, Ghosh K, Ghosh HP (1999) Mutations in the conserved carboxy-terminal hydrophobic region of glycoprotein gB affect infectivity of herpes simplex virus. *Journal of General Virology* 80 ( Pt 12):3189-3198.
- Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG (1998) A Cell Surface Protein with Herpesvirus Entry Activity (HveB) Confers Susceptibility to Infection by Mutants of Herpes Simplex Virus Type 1, Herpes Simplex Virus Type 2, and Pseudorabies Virus. *Virology* 246(1):179-189.
- Watanabe Y, Bowden TA, Wilson IA, Crispin M (2019) Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863(10):1480-1497.
- Weed DJ & Nicola AV (2017) Herpes simplex virus Membrane Fusion. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 223:29-47.
- Whalley JM, Ruitenbergh KM, Sullivan K, Seshadri L, Hansen K, Birch D, Gilkerson JR, Wellington JE (2007) Host cell tropism of equine herpesviruses: glycoprotein D of EHV-1 enables EHV-4 to infect a non-permissive cell line. *Archives of virology* 152(4):717-725.
- Whitbeck JC, Peng C, Lou H, Xu R, Willis SH, Ponce de Leon M, Peng T, Nicola AV, Montgomery RI, Warner MS, Soulika AM, Spruce LA, Moore WT, Lambris JD, Spear PG, Cohen GH, Eisenberg RJ (1997) Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *Journal of Virology* 71(8):6083-6093.
- WuDunn D & Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology* 63(1):52-58.
- Xing Y, Oliver SL, Nguyen T, Ciferri C, Nandi A, Hickman J, Giovani C, Yang E, Palladino G, Grose C, Uematsu Y, Lilja AE, Arvin AM, Carfi A (2015) A site of varicella-zoster virus vulnerability identified by structural studies of neutralizing antibodies bound to the glycoprotein complex gH/gL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(19):6056-6061.
- Yang B, Xie J, Van Cleemput J, Wei R, Opsomer G, Nauwynck HJ (2019) Gammaherpesvirus BoHV-4 infects bovine respiratory epithelial cells mainly at the basolateral side. *Veterinary Research* 50(1):11.
- Yang E, Arvin AM, Oliver SL (2016) Role for the  $\alpha$ V Integrin Subunit in Varicella-Zoster Virus-Mediated Fusion and Infection. *Journal of Virology* 90(16):7567-7578.
- Yonemura S (2011) Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* 23(5):515-522.
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal Biological Chemistry* 266(26):17707-17712.
- Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM (2014) Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 12(3):197-210.
- Zhou M, Lanchy JM, Ryckman BJ (2015) Human Cytomegalovirus gH/gL/gO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, whereas gH/gL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *Journal of Virology* 89(17):9999-9009.

Zhu Z, Gershon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA (1995) Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3546-3550.