

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

Rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans l'infection par le virus de l'herpès simplex 1

Par

Soumia Lahmidi

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Martin Richer
Département de microbiologie, et
immunologie
Université McGill

Examineur externe

Hugo Soudeyns
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine-Université de
Montréal

Directeur de recherche

Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Pascale Duplay
INRS-Institut Armand-Frappier

"Le succès c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme"
Winston Churchill

"Goutte à goutte, l'eau creuse la pierre"
Proverbe français

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury, Alain Lamarre, pour avoir aimablement accepté de présider ce jury de thèse et de m'avoir encadrée tout au long du doctorat, Martin Richer et Hugo Soudeyans pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance envers mes deux mentors, les professeurs Angela Pearson et Pascale Duplay. Je vous remercie pour vos nombreux conseils formateurs, pour vos encouragements, et d'avoir cru en mes capacités.

Je remercie particulièrement ma directrice de thèse, Angela Pearson, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Elle a cru en moi dès le départ en me confiant un projet de recherche différent des axes principalement étudiés au laboratoire me permettant ainsi de concilier l'immunologie et la virologie tout au long de mes travaux de recherches. Elle m'a donné beaucoup de liberté dans l'élaboration et la réalisation du projet tout en étant présente pour discuter des difficultés rencontrées, pour me guider et pour m'encourager. Merci également de m'avoir permis de proposer un autre projet, de l'avoir soutenu et d'avoir contribué à son avancement.

Je tiens aussi à remercier ma co-directrice de recherche, Pascale Duplay, pour avoir pris le temps de m'encadrer, de me guider et de m'avoir transmis ses connaissances. Vous avez su me transmettre votre passion pour les protéines Dok, votre rigueur scientifique, et votre détermination face aux épreuves qui me suivront certainement toujours. Je vous remercie pour votre indéfectible disponibilité et d'avoir su me motiver lorsque rien ne fonctionnait. Je vous serai éternellement reconnaissante d'avoir cru en mes idées, de m'avoir soutenue et d'avoir grandement contribué au second projet, qui sans vous, n'aurait pas abouti à la seconde publication. Ces années de formation sous votre supervision m'ont indéniablement aidée à me surpasser.

Je voudrais aussi remercier tous les collègues que j'ai côtoyés lors de cette aventure comme Mirana, Boury, Mitra, Constance, Annie, Pierre-Alexandre, Nawel, notre fameuse Ginette, Salihou, Maha, Fernando, Mohamed et ceux que je ne cite pas mais dont je garde de beaux souvenirs. Un remerciement plus particulier aux collègues avec qui j'ai partagé plus que des discussions purement professionnelles et qui sont devenus des amis précieux : Carmen Elena Gonzalez, la personne clé au laboratoire, et son mari Jorge. Vous êtes adorables, je vous remercie pour votre soutien, votre bienveillance et nos nombreux moments partagés ensemble. Gabriel Ouellet Lavallée avec qui nous avons traversé les nombreuses péripéties que comptait la fin de notre thèse. Merci à toi et ta chaleureuse femme Rima pour nos discussions enrichissantes et les moments agréables passés ensemble. Merci à Carolina Sanabria Solano pour son sourire, sa bonne humeur contagieuse et ses nombreux conseils. Merci à Aymeric Fabié, à ta présence, ton soutien, nos discussions avec Chloé et Slimane à refaire le monde et les moments merveilleux passés lors des fêtes de fin d'année loin de nos familles respectives.

D'autres personnes ont permis de rendre ces années à l'IAF plus vivantes, animées et harmonieuses. Un remerciement spécial à mes précieuses amies Hajer Habouria et Marwa Khabir qui m'ont épaulée et soutenue dans toutes les épreuves, à Ahlem Zaghmi (et son mari) et Asma Lamine (et sa p'tite famille) pour leur encouragement et leur présence chaleureuse. J'ai aussi fait de belles rencontres au sein de cet institut comme Asma Jaba, Sabrine Najeh, Sarra Labidi, Amina Baraketi, Sameh Rabhi et Nalia Mekarnia. Vous êtes toutes adorables, souriantes, et je vous souhaite du succès dans vos parcours respectifs. Merci à Daniel Garcia, Fares Saidi, Emré Yurdusev (et Gurbet) avec qui j'ai passé de bons moments, de bons délires lors des tournages vidéo ou encore lors des séances jardinage.

Je remercie également les nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : l'indispensable Jessy Tremblay pour ses nombreux conseils et son assistance à la cytométrie ; l'unique Michel Courcelles pour ses services tant dans l'accessibilité aux publications, ses courriels spontanés faisant objet de nouvelles publications et pour les moments agréables avec ses anecdotes et ses blagues ; la douce Esther Tarrab pour son écoute et pour son soutien tant au niveau professionnel et privé ; l'aimable Anne Philippon pour son assistance dans les démarches administratives, pour son enthousiasme et sa gentillesse mémorable ; la sympathique Josette Bourdages à l'accueil toujours aussi serviable ; l'équipe du CNBE pour leur implication dans mes travaux incluant l'utilisation d'animaux et enfin tous les collaborateurs.

Ce parcours n'aurait pas été possible sans mon partenaire, mon ami, mon bras droit, mon collègue Slimane Dridi. Je te remercie de m'avoir accompagnée et aidée dans les longues expériences parfois nocturnes. Tu as été présent dans les bons comme dans les moments moins évidents. Tu as toujours cru en moi et poussé à me surpasser.

Un grand merci à ma famille et mes proches présents en France, les Biriz, les Moustakim, les Abairs, Schokovor ;-) et ceux présents à Tadoula (surtout ma p'tite Jda) et à Imin Ouasif. À mes frères et sœurs chers à mon cœur, p'tit chou Lahcen ;-), Abderrahim, Mariama, Fatima et son mari Mohamed ainsi que mes chers neveux Assim et Yassine, je vous remercie pour votre soutien sans faille, votre affection et d'avoir grandement contribué à ma réussite. Je remercie également mes fidèles amies depuis le bac à sable, Laetitia Jakubowski et ma tite Khajou alias Khadija Zouguar, pour votre merveilleuse amitié indéfectible et pour votre influence positive depuis la petite enfance. Malgré la distance et nos vies prenantes, je sais ô combien vous pensez à moi comme je pense à vous et vos familles respectives.

Enfin, toute ma gratitude va envers mes chers parents, Aïcha et M'Barek Lahmidi, qui ont fait de nombreux sacrifices pour chacun de leurs enfants. Vous êtes mes éternels mentors, vous m'avez appris la détermination, l'humilité, à ne jamais baisser les bras, à rester positifs et savoir apprécier la vie à sa juste valeur. Je vous serai éternellement reconnaissante pour votre bienveillance, votre dévouement, votre soutien et votre amour inconditionnel. Je vous dois certainement tout et je vous dédie cette thèse, à vous et en mémoire de mes Bajdi et grande Jda.

RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex-1 (VHS-1) affecte 80% de la population mondiale et son infection est généralement associée à l'apparition de lésions au niveau de la muqueuse labiale qu'on appelle encore les feux sauvages ou boutons de fièvre. Il est aussi responsable de la kératite stromale herpétique qui est la première cause infectieuse de la cécité dans les pays développés. Le VHS-1 se réplique durant l'infection aiguë au niveau des muqueuses puis il rejoint les ganglions tri-géminaux (TG) où il établit sa latence dans les neurones. La réponse immunitaire cellulaire est importante pour le contrôle de l'infection aiguë et les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 jouent un rôle central dans le maintien de la latence virale. Les protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2 régulent négativement les réponses en aval de plusieurs récepteurs immunitaires dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes incluant le récepteur des cellules T. Cependant, l'importance des protéines Dok dans le contrôle de l'infection virale est inconnue.

Dans une première partie, nous avons tenté de déterminer si Dok-1 et Dok-2 modulent la réponse immunitaire anti-VHS-1. Pour cela, nous avons procédé à des infections oculaires sur des souris de type sauvage et des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2. Nous avons montré que l'absence de Dok-1 et Dok-2 n'a pas eu d'impact sur le contrôle de la réplication virale sur le site oculaire durant l'infection aiguë. Toutefois, l'absence de Dok-1 et Dok-2 a entraîné une diminution de la réponse T CD8⁺ dirigée contre l'épitope immunodominant de la glycoprotéine B (gB) du VHS-1 dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants lors de l'infection aiguë. Plus encore, l'absence des protéines Dok a induit une disparition presque complète des cellules T CD8⁺ spécifiques à gB dans la rate pendant la latence virale, avec une réduction plus sévère des cellules T CD8⁺ mémoires effectrices comparé aux cellules T CD8⁺ mémoires centrales. Le pourcentage de cellules T CD8⁺ spécifiques à gB dans les TG pendant la latence a été également réduit significativement en l'absence des Dok. Toutefois il n'y a pas eu d'incidence sur le phénotype des cellules T CD8⁺ spécifiques à gB dans les TG des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2. Dans des essais *ex vivo*, la réactivation du VHS-1 a été détectée plus tôt dans des cultures de TG en l'absence des protéines Dok.

Dans une seconde partie, nous avons poursuivi l'étude en évaluant si le VHS-1 pouvait cibler les protéines Dok dans les cellules T. Nous avons découvert que le VHS-1 induit la phosphorylation des protéines Dok-1 et Dok-2 et une dégradation sélective de Dok-2 dans les cellules Jurkat. Par la suite, nous avons mis en évidence que Dok-2 interagit avec la protéine virale VP11/12, et que la phosphorylation des résidus tyrosines induite par le VHS-1 et la dégradation de Dok-2 nécessitent VP11/12. Plus encore, nous avons identifié le motif de liaison à la protéine Dok-2 dans la partie C-terminale de VP11/12. L'élimination de la liaison de Dok-2 à VP11/12 a empêché la phosphorylation et la dégradation de Dok-2.

En conclusion, nous avons mis en évidence que Dok-1 et Dok-2 sont importants pour promouvoir le maintien des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gB et qu'elles favorisent le maintien de la latence du VHS-1 dans les TG. Nous proposons ainsi que la phosphorylation des Dok induite par VHS-1 et la dégradation de Dok-2 représentent un mécanisme d'évasion immunitaire pour inactiver les cellules T qui pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse du VHS-1.

Mots clés : Cellules T CD8⁺, protéines Dok, VHS-1, VP11/12, évasion immunitaire, pathogénèse virale

ABSTRACT

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) affects 80% of the world population, and is usually associated with lesions in the labial mucosa called cold sores. Among other diseases, HSV-1 causes herpetic keratitis, which is the major infectious cause of blindness in developed countries. HSV-1 typically replicates at mucosal surfaces during the acute infection, and then spreads to the trigeminal ganglia (TG) where it establishes latency in neurons. Cellular immunity plays an important role in the control of acute HSV-1 infection and in maintenance of viral latency. Notably, HSV-1-specific CD8⁺ T cells are known to suppress HSV-1 reactivation from latency in TG. Dok-1 and Dok-2 adapter proteins negatively regulate the downstream responses of several immune receptors in myeloid and lymphoid cells including the T cell receptor. However, the involvement of Dok-1 and Dok-2 in the control of viral infection is not known.

Firstly, we tried to determine if Dok-1 and Dok-2 modulate the anti-HSV-1 immune response. To test this hypothesis, we studied the impact of Dok-1 and Dok-2 proteins in the context of HSV-1 ocular infection by comparing mice deficient for Dok-1 and Dok-2 proteins and wild-type mice. We showed that the absence of Dok-1 and Dok-2 had no impact on the control of viral replication at the ocular site during acute infection. However, the absence of Dok-1 and Dok-2 resulted in a decrease in the CD8⁺ T cell response directed against the immunodominant epitope of HSV-1 glycoprotein B (gB) in spleen and draining lymph nodes during acute infection. Moreover, the absence of Dok proteins induced an almost complete disappearance of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen during viral latency, and the reduction of CD8⁺ effector memory T cells was more severe than that of CD8⁺ central memory T cells. The percentage of gB-specific CD8⁺ T cells in TG during latency was also dramatically reduced in the absence of Dok proteins; however, these CD8⁺ T cells were phenotypically similar to those from wild type mice. In *ex vivo* assays, we found that reactivation was detected earlier in TG cultures in the absence of Dok proteins.

Secondly, we continued the study by evaluating whether HSV-1 could target Dok proteins in T cells. We found that HSV-1 induced phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 proteins and the selective degradation of Dok-2 in Jurkat cells. Furthermore, we demonstrated that Dok-2 interacts with viral protein VP11/12, and that HSV-1-induced tyrosine phosphorylation and degradation of Dok-2 require VP11/12. Moreover, we have identified the Dok-2 protein binding motif in the C-terminal portion of VP11/12. Elimination of the binding of Dok-2 to VP11/12 prevented Dok-2 phosphorylation and degradation.

In conclusion, we have shown that Dok-1 and Dok-2 are important for promoting the maintenance of gB-specific CD8⁺ T cells and that they promote the maintenance of HSV-1 latency in TGs. We thus propose that the HSV-1-induced phosphorylation and degradation of Dok-2 represent an immune evasion mechanism for inactivating T cells that could play an important role in the pathogenesis of HSV-1.

Keywords: CD8⁺ T cells, Dok proteins, HSV-1, VP11/12, immune evasion, viral pathogenesis

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	17
1 LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1	18
1.1 Classification, épidémiologie et manifestations cliniques	18
1.1.1 Structure du VHS-1	21
1.1.2 Infection lytique : cycle de réplication du VSH-1	22
1.1.3 Infection latente	24
1.1.4 Réactivation virale et récurrence.....	26
2 CONTRÔLE DE L'INFECTION AIGUË DU VHS-1.....	28
2.1 Rôle des différentes composantes de l'immunité innée lors de l'infection aiguë	28
2.1.1 Les senseurs du VHS-1	28
2.1.2 La réponse immunitaire innée dans la cornée	30
2.1.3 La réponse immunitaire innée dans les TG	32
2.2 Rôle des différentes composantes de l'immunité adaptative lors de l'infection aiguë	33
2.2.1 La réponse humorale	33
2.2.2 La réponse cellulaire	34
2.2.2.1 La réponse cellulaire dans la cornée.....	36
2.2.2.2 La réponse cellulaire dans les TG	39
3 CONTRÔLE DE L'INFECTION LATENTE DU VHS-1	41
3.1 Influence de l'immunité innée dans l'infection latente	41
3.2 Influence de l'immunité adaptative dans le maintien de la latence du VHS-1	42
3.2.1 Importance des cellules T CD8 ⁺ spécifiques au VHS-1 dans le maintien de la latence	42
3.2.2 Rôle des cellules T CD4 ⁺ lors de la latence du VHS-1	47
4 MODULATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE PAR LE VHS-1	48
4.1 Interférence du VHS-1 avec le système immunitaire inné	48
4.2 Interférence du VHS-1 avec le système immunitaire adaptatif	51
4.2.1 La signalisation du TCR	52
4.2.2 Modulation de la signalisation du TCR par le VHS-1	54
4.3 La protéine virale VP11/12 et son rôle dans la signalisation des cellules T	56
5 LA FAMILLE DES PROTÉINES DOK	58
5.1 Profil d'expression des protéines Dok	59
5.2 Structure des protéines Dok	61
5.2.1 Le domaine pleckstrin homology (PH) de Dok-1 et Dok-2.....	61
5.2.2 Le domaine phosphotyrosine-binding (PTB) de Dok-1 et Dok-2	63
5.2.3 La partie carboxyterminale de Dok-1 et Dok-2.....	63
5.3 Dok-1 et Dok-2 et fonction de suppresseurs de tumeurs.....	65
5.4 Rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le développement des lymphocytes.....	66

5.5	Rôle des protéines Dok dans le système immunitaire	67
5.5.1	Dok-1 et Dok-2 et fonctions dans les cellules myéloïdes.....	67
5.5.2	Dok-1 et Dok-2 et fonctions dans les cellules NK	69
5.5.3	Dok et fonctions dans les cellules B.....	70
5.5.4	Dok-1 et Dok-2 et fonction dans les cellules T.....	72
5.6	Implication de Dok-1 et Dok-2 dans le contrôle des infections	76
6	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHES	78
CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION		80
CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION		99
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		111
1	IMPORTANCE DES PROTÉINES DOK-1 ET DOK-2 LORS DE L'INFECTION PAR LE VHS-1 DANS UN MODÈLE MURIN D'INFECTION OCULAIRE	112
1.1	Dok-1 et Dok-2 sont nécessaires pour le maintien de la réponse T CD8 ⁺ spécifique au VHS-1	112
1.1.1	Rôle des Dok dans la formation des cellules T CD8 ⁺ mémoires.....	112
1.1.2	Influence de Dok-1 et Dok-2 sur le répertoire des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8 ⁺ spécifiques au VHS-1.....	114
1.1.3	Rôle des Dok dans les capacités effectrices des lymphocytes T CD8 ⁺ gB-spécifiques	116
1.1.4	Redondance de fonction des protéines Dok	117
1.2	Dok-1 et Dok-2 ne sont pas essentielles dans le contrôle de la réplication du VHS-1 durant l'infection aiguë.....	117
1.3	Implication de Dok-1 et Dok-2 dans le maintien de la latence du VHS-1	119
2	LES PROTÉINES DOK SONT CIBLÉES PAR LE VHS-1 LORS DE L'INFECTION DES CELLULES T	123
2.1	L'expression de la protéine Dok-2 est spécifiquement diminuée lors de l'infection des cellules T par le VHS-1	123
2.2	Les protéines Dok sont phosphorylées lors de l'infection des cellules T par le VHS-1	124
2.3	VP11/12 est nécessaire pour la phosphorylation et la régulation à la baisse de l'expression de la protéine Dok-2.....	125
2.4	VP11/12 interagit avec Dok-2.....	126
2.5	Rôle spécifique de Dok-1 et de Dok-2 au cours de l'infection des cellules T par le VHS-1.....	128
2.6	Implication des Dok dans la modulation de la signalisation en aval du TCR par le VHS-1	129
2.7	Mécanismes possibles à l'origine de la diminution de l'expression de Dok-2	130
2.8	Modèle proposé.....	131
CONCLUSIONS.....		132
RÉFÉRENCES.....		137
ANNEXES		175
Liste de publications		179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Classification des virus herpétiques humains (HHV).....	18
Tableau 1.2 : PRRs et PAMPs impliqués dans la reconnaissance du VHS-1.....	29
Tableau 1.3 : Caractéristiques des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8 ⁺ mémoires de la souris et de l'homme	36
Tableau 1.4 : Expression des protéines Dok (Dok-1/-2/-3) dans les cellules hématopoïétiques	60
Tableau 1.5 : Protéines interagissant avec la région C-ter des Dok dans les cellules hématopoïétiques.	64

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 : Étapes de l'infection par le VHS-1.	19
Figure 1.2 : Structure du VHS-1.....	21
Figure 1.3 : Cycle lytique de réplication du VHS-1.	23
Figure 1.4 : Cinétique d'une réponse des cellules T CD8 ⁺ spécifiques lors d'une infection virale primaire.	35
Figure 1.5 : Interférence du VHS-1 avec la signalisation IFN de type 1 de l'hôte.	50
Figure 1.6 : La signalisation du TCR.....	53
Figure 1.7 : Diagramme schématique de VP11/12.	57
Figure 1.8 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines Dok de souris.	59
Figure 1.9 : Représentation schématique de la structure des protéines Dok.....	61
Figure 1.10 : Modèle simplifié impliquant Dok-1 et Dok-3 dans l'inhibition de la signalisation médiée par le BCR et FcγRIIB.	70
Figure 1.11 : Modèle simplifié impliquant Dok-1 et Dok-2 dans l'inhibition de la signalisation médiée par le TCR.	73

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Figure 4.1 : L'interaction de VP11/12 avec Dok-2 conduit à la phosphorylation et à la dégradation de Dok-2.	131
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abl	Abelson murine leukemia
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activator protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol	ARN polymérase
ARNm	ARN messenger
BCR	Récepteur des cellules B
Bid	Bcl-2 interacting domain
C-ter	Carboxyterminale
CBP	CREB binding protein
CCL2	Chemokine ligand 2
CCR	C-C chemokine receptor
CD	Cellules dendritiques
cGAMP	Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
Csk	C-terminal Src kinase
CTL	Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCR3	Chemokine CXC motif receptor 3
DAG	Diacylglycerol
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
Dok	Downstream of kinases
DKO	Dok-1 et Dok-2 double knock-out
E ou β	Précoce
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EGF	Facteur de croissance épidermique
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Eomes	Eomesodermin
Gads	Grb2-related adaptor downstream of Shc
gB	Glycoprotéine B
gC	Glycoprotéine C
gD	Glycoprotéine D

gE	Glycoprotéine E
GEF	Facteur d'échange de nucléotide guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
gH	Glycoprotéine H
gI	Glycoprotéine I
gL	Glycoprotéine L
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
kb	Kilobase
HA	Hémagglutinine
hCMV	Cytomégalovirus humain
HHV	Virus herpétique humain
hpi	Heures post-infection
HTLV-1	Virus lymphotrope-T humain de type 1
HVEM	Herpesvirus entry mediator
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICP	Infected cell protein
ID2	DNA binding 2
ID3	DNA binding 3
IE ou α	Immédiat précoce
IFI16	Interferon- γ -inducible protein 16
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukine
IP	Immunoprécipitation
IP-10	IFN-gamma-inducible protein 10
IP3	Inositol triphosphate
IRF	Interferon regulatory factor
IRS	Insulin receptor substrate
ISRE	IFN-stimulated response element
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITK	IL-2-inducible T-cell kinase
JNK	JUN amino-terminal kinase
jpi	Jours post-infection
kDa	Kilodalton
KLRG-1	Killer-cell lectin like receptor G1

KSHV	Virus du sarcome de Kaposi
L ou γ	Tardif
LAG	Lymphocyte-activation gene
LAT	Transcrits associés à la latence (dans le texte nommé transcrits LAT)
LAT	Linker for Activation of T-Cells
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LLMC	Long lived memory cell
LMC	Leucémies myéloïdes chroniques
LMMC	Leucémies myélo-monocytaires chroniques
LPS	Lipopolysaccharide
Lyn	Lck/Yes novel tyrosine kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein-5
MPEC	Cellules effectrices précurseurs mémoires
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NF- κ B	Nuclear Factor of KappaB
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NH ₂ -term	Amino-terminale
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
ova	Ovalbumine
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-1	Programmed death-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(3,4)P2	Phosphatidylinositol 3,4-biphosphate
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol 3,4-triphosphate
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PI5P	Phosphatidylinositol-5-phosphate
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PKC	Protein Kinase-C

PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTB	Phosphotyrosine binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTK	Protéines tyrosine kinases
RAG	Recombination-activating genes
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RasGAP	Ras GTPase activating protein
RasGRP	Ras guanyl nucleotide releasing protein
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SCID	Severe combined immune deficiency
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SFK	Src family kinase
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SAP	SLAM-associated protein
SLP-76	SH2 Domain-Containing Leukocyte Protein-76
SLEC	Cellules effectrices à courte vie
SNC	Système nerveux central
Sos	Son of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
TAP	Transporter associated with antigen processing
TBK1	TANK-binding kinase 1
T _{CM}	Cellules mémoires centrales
TCR	Récepteur des lymphocytes T
T _{EM}	Cellules mémoires effectrices
TG	Ganglions trigéminaux
TK	Thymidine kinase
TLR	Toll like receptors
TRAF	TNF receptor associated factor
Treg	Lymphocyte T régulateur

TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
T _{RM}	Cellules mémoires résidentes
TNF	Tumor necrosis factor- α
UL	Unique long
US	Unique court
Vhs	Virion host shut-off
VHS-1	Virus de l'herpès simplex de type 1
VHS-2	Virus de l'herpès simplex de type 2
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VP	Protéine du virion « virion protein »
VV	Virus de la vaccine
VV-ova	Virus de la vaccine-ova
VZV	Virus de la varicelle-zona
WT	Type sauvage
ZAP-70	70-kd ζ chain-associated protein kinase

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1 LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1

1.1 Classification, épidémiologie et manifestations cliniques

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (VHS-1), aussi nommé virus herpétique humain de type 1 (HHV-1), est un membre appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Le terme « herpes » dérive du mot grec herpein qui signifie ramper, et représente la caractéristique rampante des éruptions causées par les virus herpès. La famille *Herpesviridae* englobe entre autres les neuf virus herpétiques humains identifiés jusqu'à ce jour et qui sont répartis en trois sous-familles les *Alpha-*, *Beta-*, et *Gamma-herpesvirinae* tel qu'illustré dans le **Tableau 1.1** (Davison *et al.*, 2009). La sous famille *Alphaherpesvirinae* à laquelle le VHS-1 appartient comprend également le VHS-2 (ou HHV-2) et le virus de la varicelle-zona (VZV ou HHV-3). Cette sous famille est caractérisée par un cycle de réplication court, une propagation rapide entre les cellules en culture, une destruction efficace des cellules infectées, et la capacité à établir une infection latente principalement dans les ganglions nerveux sensitifs (Knipe *et al.*, 2013). En effet, le VHS-1 établit sa latence uniquement dans les ganglions nerveux chez l'homme et dans les modèles animales (Croen *et al.*, 1987; Stroop & Schaefer, 1987).

Tableau 1.1 : Classification des virus herpétiques humains (HHV)

Famille	Sous-famille	Genre	Virus herpétiques humains
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Simplexvirus	VHS-1, VHS-2
		Varicellovirus	VZV
	<i>Betaherpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	hCMV
		Roseolovirus	HHV-6A, HHV-6B, HHV-7
	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	EBV
		Rhadinovirus	KSHV

Classification du VHS-1 aussi connu sous le nom du virus herpétique humain de type 1 (HHV-1) par rapport aux autres virus herpétiques humains : virus de l'herpès simplex de type 2 (VHS-2 ou HHV-2), virus de la varicelle-zona (VZV ou HHV-3), virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV-4), Cytomégalovirus humain (hCMV ou HHV-5), HHV-6A, HHV6B, HHV7, et virus du sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8).

Le VHS-1 est un pathogène viral généralement associé aux lésions oro-labiales tandis que le VHS-2 est associé aux lésions du tractus génital. Le VHS-1 est très répandu avec une séroprévalence qui est estimée à plus de 90% dans de nombreux pays (Fatahzadeh & Schwartz,

2007; Whitley *et al.*, 1998). La transmission du virus s'effectue par des contacts étroits entre un individu infecté et un individu susceptible (Fatahzadeh & Schwartz, 2007). Le VHS-1 est généralement acquis durant la petite enfance essentiellement par les sécrétions orales (Xu *et al.*, 2007). En effet, l'infection initiale (ou primaire) se produit dans l'épithélium labial. Puis, le virus entre dans les neurones innervant la région mucosale et rejoint par transport rétrograde les ganglions trigéminaux (TG) situés à la base du cerveau pour y établir sa latence dans les neurones. Suite à certains stress, le virus peut se réactiver et rejoindre le site d'infection initiale où il infecte les cellules épithéliales (**Figure 1.1**).

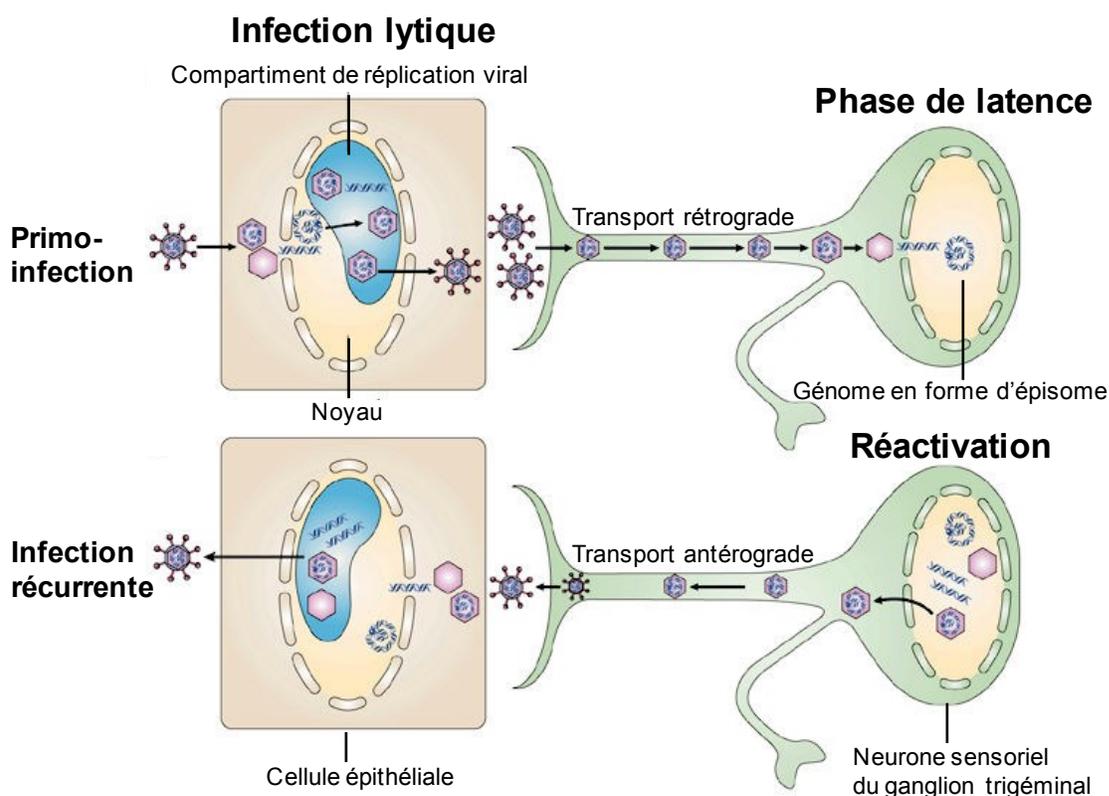


Figure 1.1 : Étapes de l'infection par le VHS-1.

L'infection des cellules épithéliales au niveau de la muqueuse par le VHS-1 va mener à une réplication productive. Les virions néoformés pénètrent dans les neurones sensoriels innervant la muqueuse et les nucléocapsides sont transportées vers le corps cellulaire neuronal. L'ADN viral relâché dans le noyau neuronal se circularise et persiste sous forme d'épisome dans les cellules neuronales, le VHS-1 est alors en état de latence. Lors de la réactivation, l'expression des gènes viraux lytiques est initiée et les capsides nouvellement formées sont transportées vers les extrémités axonales. Le virus infectieux est libéré de l'axone et infecte les cellules épithéliales, entraînant ainsi une infection récurrente. Adaptée de (Knipe & Cliffe, 2008).

La prévalence élevée du VHS-1 peut être attribuée à l'existence d'individus asymptomatiques et le fait que l'infection est rarement fatale. En effet, l'excrétion du VHS-1 par des individus ne présentant pas de symptômes contribue à une propagation efficace (Kaufman

et al., 2005). Aussi, compte tenu que l'infection est rarement fatale et que le virus est sous forme latente chez la majeure partie de la population séropositive, le réservoir considérable ainsi formé contribue à la transmission du VHS-1 lors d'épisodes d'infections productives (Knipe *et al.*, 2013). Actuellement, de nombreux efforts sont consacrés à l'étude des mécanismes immunologiques maintenant la latence virale et la prévention de la propagation virale dans l'espoir de développer un traitement.

Les manifestations cliniques associées au VHS-1 sont l'herpès labial (ou feux sauvage/boutons de fièvre), les lésions génitales, l'encéphalite herpétique, l'herpès cutané, et la kératite herpétique, entre autres. L'encéphalite herpétique est une manifestation clinique rare avec une incidence de 1/250000 individus par année (Whitley, 1991). Néanmoins, elle est la cause la plus fréquente d'encéphalite virale mortelle qui survient sporadiquement aux États-Unis et elle touche plus particulièrement les nouveau-nés (Whitley, 1991).

L'infection oculaire peut découler d'une infection de la cornée, des paupières, de la conjonctive, de la rétine, et du tractus uvéal pouvant mener à diverses maladies oculaires. L'infection oculaire peut résulter d'une infection primaire (souvent initiée par le contact des mains contaminées par une infection orale concomitante) mais aussi lors d'une réactivation au niveau du visage où le virus se rend sur le site oculaire en empruntant les branches ophtalmiques. Durant l'infection primaire, la réplication virale dans l'épithélium cornéen peut endommager les cellules épithéliales et mener à des lésions épithéliales (Liesegang, 1999). Ce sont les infections récurrentes dans la cornée qui sont problématiques et qui sont à l'origine de la kératite herpétique (atteinte de l'épithélium cornéen) et de la kératite stromale herpétique (atteinte des couches plus profondes de l'épithélium incluant le stroma et l'endothélium cornéen). Les patients atteints de la kératite épithéliale souffrent souvent de douleurs, de photophobie, de larmoiement et de vision floue. La kératite herpétique peut évoluer en kératite stromale herpétique qui implique de l'inflammation dans le stroma cornéen, menant à de l'opacité stromale, de l'œdème et la néovascularisation. Le VHS-1 est d'ailleurs la première cause infectieuse de la cécité dans les pays industrialisés (Farooq & Shukla, 2012) .

Enfin, les manifestations cliniques liées au VHS-1 peuvent se révéler plus sévères chez des personnes dont le système immunitaire est peu développé comme les nouveaux nés ou dont le système immunitaire est compromis comme les sidéens ou les greffés, qui peuvent développer des infections disséminées au niveau du système nerveux central (SNC), du foie, des poumons, de la peau, des glandes surrénales, etc. (Fatahzadeh & Schwartz, 2007; Kimberlin, 2004).

1.1.1 Structure du VHS-1

La particule virale contient un large génome à ADN double brins d'environ 152 kilo paires de bases. La molécule d'ADN est contenue dans une capsidie icosaédrique qui est elle-même entourée d'une matrice de protéines appelée le tégument. Enfin, la capsidie et le tégument sont entourés par une enveloppe externe composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines (**Figure 1.2.**).

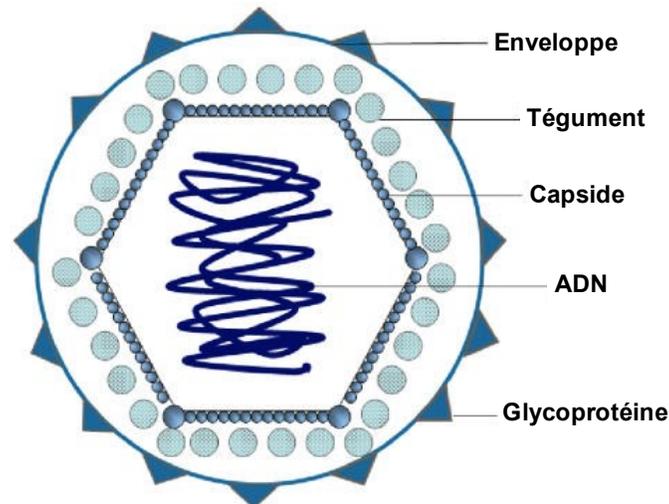


Figure 1.2 : Structure du VHS-1. Adaptée de (Novak & Peng, 2005).

Le génome du VHS-1 comporte au moins 80 gènes codant pour des protéines dont environ la moitié représente des protéines de structure incorporées dans le virion. Le génome est composé de deux segments liés de manière covalente, un segment nommé « unique long » (UL) et un segment nommé « unique court » (US) qui présentent chacun des extrémités répétées et inversées (Weller & Coen, 2012).

La capsidie, dont la taille est de 100-110 nm de diamètre, est principalement composée de quatre protéines virales (VP) : VP5 (UL19) qui est la plus abondante, VP26 (UL35), VP23 (UL18), et VP19C (UL38) (Haarr & Skulstad, 1994; Loret *et al.*, 2008).

Le tégument est une matrice de protéines virales non structurée qui occupe l'espace entre la capsidie et l'enveloppe virale. Il représente approximativement les deux tiers du volume du virion (Grunewald *et al.*, 2003). Le tégument contient au moins 18 protéines virales dont la majorité sont phosphorylées suite à l'infection. VP11/12 (UL46) est l'une des protéines abondante de cette matrice (Haarr & Skulstad, 1994; Loret *et al.*, 2008). Cette protéine sera abordée dans la section 4.3 de cette introduction. Deux protéines du tégument qui ont été grandement étudiées sont : VP16 (UL48) et virion host shut-off (vhs codée par UL41). VP16 est impliquée dans

l'induction de la transcription des gènes immédiats précoces entre autres (Triezenberg *et al.*, 1988). Vhs inhibe la synthèse protéique dans la cellule hôte en dégradant et déstabilisant les ARNm cellulaires (Kwong *et al.*, 1988).

L'enveloppe virale est une membrane lipidique dérivant des membranes cellulaires de la cellule hôte. Elle contient 12 glycoprotéines (gB à gN), dont certaines sont impliquées dans l'attachement de la particule virale (gC), dans l'entrée dans la cellule hôte (gB, gD, gH, gL) et dans la propagation de cellules à cellules (gE et gI) (Mettenleiter, 2004; Reske *et al.*, 2007; Sathiyamoorthy *et al.*, 2017).

1.1.2 Infection lytique : cycle de réplication du VSH-1

Bien qu'il soit neurotrophe, le VHS-1 peut infecter différents types cellulaires, incluant les cellules épithéliales, les fibroblastes mais également les lymphocytes *in vitro* et *in vivo* (Aubert *et al.*, 2009). Son cycle de réplication est complexe et se déroule en plusieurs étapes : l'entrée du virus dans la cellule, la transcription des gènes viraux, la réplication de l'ADN viral suivie de l'assemblage et de la sortie par exocytose des nouvelles particules virales (**Figure 1.3.**).

L'entrée du virus se fait soit par endocytose (indépendante ou dépendante du pH) ou soit par fusion avec la membrane plasmique, et le mécanisme utilisé dépend du type cellulaire (**Figure 1.3 ; A**). Dans les deux cas, l'entrée de la particule virale dans le cytoplasme nécessite l'attachement des glycoprotéines gB et gC aux héparines sulfates présentes à la surface de la cellule hôte (Shieh *et al.*, 1992). Cet attachement permet alors à gD d'interagir avec différents récepteurs appartenant à différentes familles tels que les molécules d'adhésion nectines 1 et 2 appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Geraghty *et al.*, 1998), le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM) appartenant à la famille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (Montgomery *et al.*, 1996), et l'héparine sulfate 3-O (Laquerre *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2002). L'interaction de gD avec son récepteur va permettre d'activer le mécanisme de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, entraînant l'internalisation de la nucléocapside et du tégment dans le cytoplasme. Le processus de fusion nécessite gB et l'hétérodimère gH/gL (Spear, 2004). Quelques protéines du tégment restent associées à la nucléocapside permettant son transport jusqu'au noyau (**Figure 1.3 ; B**), tandis que les autres protéines du tégment restent à la membrane plasmique ou dans le cytoplasme pour exercer leur fonction, comme vhs, qui inhibe la synthèse protéique cellulaire (Dohner & Sodeik, 2005; Granzow *et al.*, 2005; Kwong *et al.*, 1988).

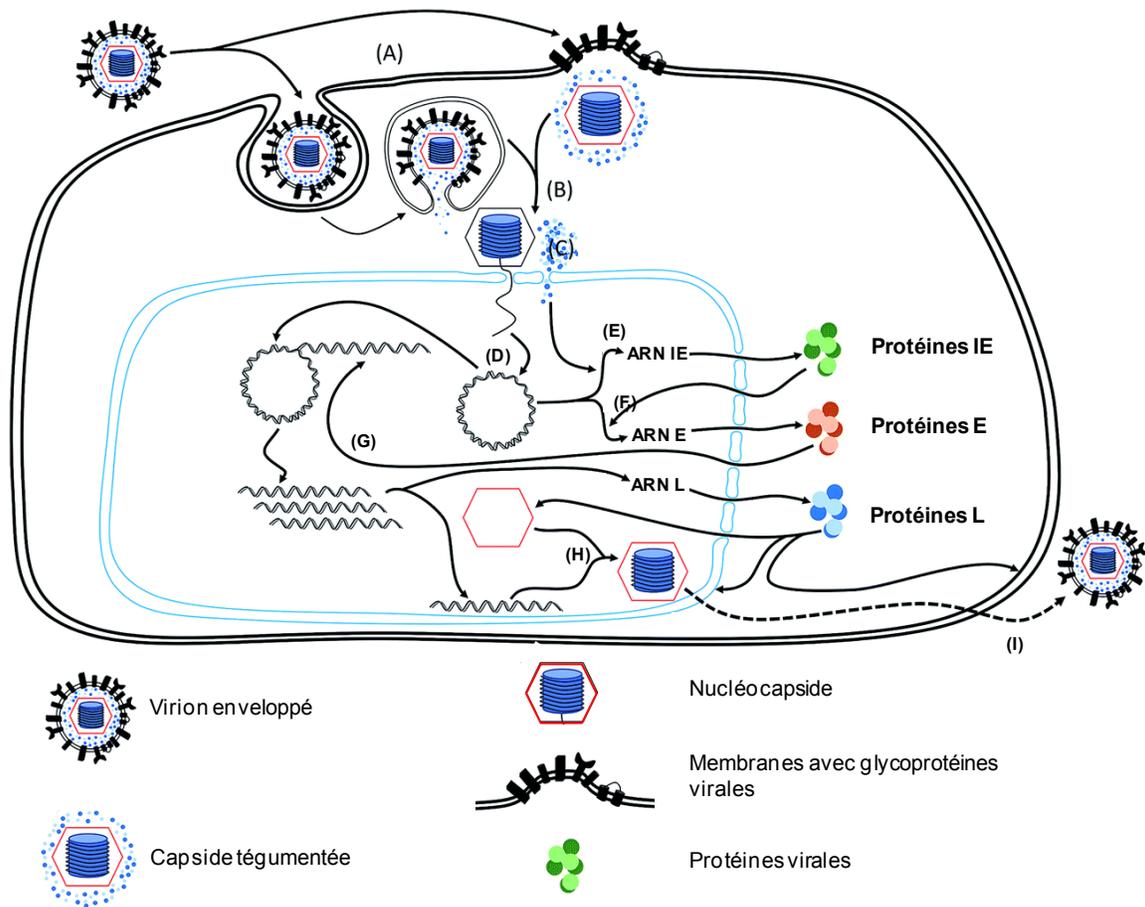


Figure 1.3 : Cycle lytique de réplication du VHS-1.

Suite à l'entrée du virus par endocytose ou fusion (A), la capside est libérée dans le cytoplasme et elle est transportée vers le noyau (B). Le génome viral est ensuite relâché dans le noyau (C) au travers des pores nucléaires et il se circularise (D). Puis l'expression des différentes classes de gènes s'effectue de manière séquentielle (E) avec l'expression des gènes immédiats précoces (ou IE) où les protéines IE qui en résultent vont servir à l'expression des gènes précoces (ou E) (F). Les protéines E vont permettre la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes tardifs (ou L) à l'origine des protéines de structures (G). Les capsides sont ensuite formées dans le noyau renfermant les ADN viraux nouvellement synthétisés (H). Enfin le virion acquiert son enveloppe dans les vésicules cellulaires et sort de la cellule par exocytose (I). Adaptée de (Szcubialka *et al.*, 2016).

Suite au relâchement du génome viral dans le noyau à travers les pores nucléaires (Figure 1.3 ; C), l'ADN se circularise (Garber *et al.*, 1993) et la transcription des gènes réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire commence (Figure 1.3 ; D). L'expression de gènes viraux s'effectue de manière séquentielle (Figure 1.3 ; E) avec tout d'abord l'expression des gènes immédiats précoces (IE ou α), puis des gènes précoces (E ou β), suivi des gènes tardifs (L ou γ) (Honess & Roizman, 1974). La transcription des gènes IE stimulée par la protéine du tégment VP16 est à l'origine des protéines immédiates précoces (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, et US1.5). Pour cela, VP16 se lie au facteur de transcription cellulaire Oct-1 ainsi qu'à la protéine

cellulaire HCF, lui permettant de se rendre au noyau et le complexe protéique lie les promoteurs des gènes IE (LaBoissiere & O'Hare, 2000; Stern *et al.*, 1989). Les protéines IE sont pour la plupart nécessaires à la transcription des gènes E et L (**Figure 1.3 ; F**) (DeLuca & Schaffer, 1985; Sacks *et al.*, 1985; Samaniego *et al.*, 1995). Les protéines E telles que l'ADN polymérase (UL30), et le complexe hélicase-primase (UL5, UL8 et UL52) initient la réplication de l'ADN viral, un processus essentiel pour l'expression de certains gènes L (**Figure 1.3 ; G**) (Conley *et al.*, 1981; Roizman & Roane, 1964). En effet, les gènes L se divisent en deux-classes : les gènes γ_1 dont l'expression dépend partiellement de la synthèse de l'ADN viral et les gènes γ_2 dont l'expression dépend strictement de la synthèse de l'ADN viral (Silver & Roizman, 1985). Les protéines L sont majoritairement des protéines de structure nécessaires à l'assemblage de la capside et des glycoprotéines virales. Les protéines de structure entrent dans le noyau cellulaire et permettent l'encapsidation d'une seule copie du génome (**Figure 1.3 ; H**) (Addison *et al.*, 1984; Addison *et al.*, 1990; al-Kobaisi *et al.*, 1991; Baines *et al.*, 1994; Deiss & Frenkel, 1986; Lamberti & Weller, 1998; McNab *et al.*, 1998; Patel & MacLean, 1995; Poon & Roizman, 1993; Salmon & Baines, 1998; Salmon *et al.*, 1998; Taus & Baines, 1998; Yu & Weller, 1998). La nucléocapside acquiert son tégument, puis son enveloppe finale à partir des vésicules cytoplasmiques (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter, 2004). Enfin, le virion sort de la cellule par fusion de la vésicule à la membrane cellulaire (**Figure 1.3 ; I**) (Mettenleiter, 2002).

1.1.3 Infection latente

La particularité principale du VHS-1 est sa capacité à établir une infection latente dans les neurones des ganglions sensoriels qui persistera tout au long de la vie de l'individu infecté. Chez la souris, la latence est établie dans les ganglions nerveux trente jours après l'infection périphérique. La latence est définie par l'absence de détection de particules virales infectieuses et la répression de l'expression des gènes lytiques. Néanmoins, cette répression n'est pas totale puisque l'expression des transcrits de gènes IE et E a été rapportée par différentes études, mais la détection de protéines virales n'a pas été observée (Derfuss *et al.*, 2009; Derfuss *et al.*, 2007; Feldman *et al.*, 2002; Kramer & Coen, 1995; Maillet *et al.*, 2006). La latence est caractérisée par la forme épisomale adoptée par l'ADN et l'expression abondante des transcrits associés à la latence (LAT). Trois phases sont distinguées durant la latence/réactivation virale : l'établissement de la latence, le maintien de la latence virale et la réactivation virale qui sera abordée dans la section suivante.

La phase de l'établissement de la latence se produit suite à l'infection primaire. Le VHS-1 se réplique dans les cellules épithéliales pour ensuite infecter les terminaisons d'un neurone sensitif innervant la région de l'infection primaire (**Figure 1.1**). La capsid rejoint alors le corps neuronal situé dans les ganglions sensoriels par transport rétrograde à l'aide des microtubules. Dans le cas d'une infection primaire sur le site oculaire (voie de l'inoculation du VHS-1 utilisée dans les expériences de cette thèse), le site labial, ou le site nasal, les ganglions sensoriels innervant ces régions sont les TG *via* les nerfs ophtalmiques, maxillaires et mandibulaires. Dans les TG, le virus se réplique brièvement dans certains neurones puis il entre en latence, qui se traduit par l'absence de production de particules virales infectieuses. Les processus qui guident l'entrée en latence du VHS-1 ne sont pas bien connus. Cependant, le virus, la nature quiescente des neurones, ainsi que le système immunitaire y jouent probablement d'importants rôles.

L'établissement de la latence est probablement dû à l'incapacité du virus à exprimer ses gènes lytiques IE à des niveaux assez élevés (Efstathiou & Preston, 2005). La perte d'expression des gènes viraux lytiques pourrait être associée à l'absence de VP16 dans le noyau neuronal, débouchant ainsi à l'établissement de la latence (Steiner *et al.*, 1990; Wysocka & Herr, 2003). En effet, suite à l'infection des terminaisons nerveuses, la protéine du tégument VP16 délivrée à ce site doit être transportée tout le long de l'axone et parvenir au corps cellulaire afin d'induire l'expression des gènes IE dans le noyau, permettant l'infection lytique (Steiner *et al.*, 1990). L'expression des transcrits LAT a été aussi associée à la répression des gènes viraux lytiques (Chen *et al.*, 1997; Garber *et al.*, 1997; Thompson & Sawtell, 1997). De plus, le maintien du génome viral sous forme d'épisome associé aux nucléosomes restreint également l'expression des gènes viraux lytiques (Deshmane & Fraser, 1989; Efstathiou & Preston, 2005). Enfin, les neurones eux même participent à la répression des gènes lytiques. Cette répression est effectuée par une protéine spécifique des neurones, Zhangfei, qui séquestre VP16 et empêche la formation du complexe VP16-Oct-1-HCF (Akhova *et al.*, 2005). La répression d'ICP0 est également effectuée par au moins un micro-ARN, miR-138, qui est produit par les neurones (Pan *et al.*, 2014).

L'expression des transcrits LAT est une caractéristique de la latence (Jones, 2003). Leur promoteur est seulement actif dans les neurones (Taharaguchi *et al.*, 2003), et les transcrits LAT ne sont pas traduits en protéines. Trois transcrits stables et abondants ont été identifiés à partir des ganglions nerveux lors de la latence, avec une taille de 2 kb, 1.5 kb, et 1.45 kb (Wagner *et al.*, 1988a; Wagner *et al.*, 1988b). De nombreux microARN viraux sont exprimés durant la latence à partir des transcrits LAT (Jurak *et al.*, 2010). À ce jour, seuls deux microARN du VHS-1, miR-

H6 et miR-H2, sont connus pour être impliqués dans le maintien de la latence virale en contribuant à la régulation à la baisse des gènes viraux IE de ICP4 et ICP0 (Umbach *et al.*, 2008). De plus, des études ont attribué une fonction supplémentaire aux transcrits LAT dans la protection des neurones contre l'apoptose (Bloom, 2004; Hamza *et al.*, 2007; Perng *et al.*, 2000). Paradoxalement, cette fonction de protection contre l'apoptose assurée par les LAT permet la persistance du VHS-1 dans l'individu. Par ailleurs, il a été montré qu'une région dans la séquence des transcrits LAT est impliquée dans la réactivation du VHS-1 dans un modèle animal (Bloom *et al.*, 1996; Perng *et al.*, 1996). Ainsi, il semble n'y avoir aucun consensus sur l'importance principale des LAT dans la latence virale. Une interrogation subsiste encore, est ce que la réactivation du VHS-1 est la cause ou la conséquence de l'échec des transcrits LAT à protéger les neurones de l'apoptose ?

Le maintien de la latence est aussi une conséquence de l'état du génome viral durant cette période. En effet, il se lie aux histones, et ainsi, l'expression des gènes viraux est sous le contrôle de l'acétylation et de la méthylation des queues d'histones (Kent *et al.*, 2004). Plus précisément, la désacétylation et la méthylation des queues d'histones rendent le génome compact (condensation de la chromatine) et les promoteurs viraux inaccessibles (Deshmane & Fraser, 1989; Knipe & Cliffe, 2008; Kubat *et al.*, 2004b). D'ailleurs durant la latence, la plupart des promoteurs des gènes viraux lytiques sont associés avec des histones méthylés et à une condensation de la chromatine, et cet effet est induit par les transcrits LAT (Wang *et al.*, 2005). À l'opposé, les régions promotrices des transcrits LAT sont associées à des histones hyperacétylées, ce qui est cohérent avec l'abondance des LAT durant la latence (Kubat *et al.*, 2004a).

Enfin, le maintien de la latence implique également la pression exercée par le système immunitaire, en particulier les lymphocytes T CD8⁺ qui reconnaissent spécifiquement le VHS-1. Cet aspect est traité dans une section ultérieure (section 3.2.1).

1.1.4 Réactivation virale et récurrence

Chez l'homme, l'aptitude du VHS-1 à se réactiver est décisive dans la pathogénèse des infections récurrentes et représente une étape importante dans la propagation du virus dans la population. La réactivation du VHS-1 peut aboutir à une infection productive asymptomatique ou une infection productive avec des symptômes cliniques évidents. Le VHS-1 latent peut se réactiver suite à un stimulus local tel qu'une lésion (comme une chirurgie invasive) dans les tissus innervés par des neurones infectés de manière latente. D'autres stimuli peuvent être à l'origine

de la réactivation virale, tel qu'un stress émotionnel ou physique, une hyperthermie, l'exposition aux ultraviolets (UV), un déséquilibre hormonal, les menstruations, et l'immunosuppression (Widener & Whitley, 2014). Cependant, les mécanismes exacts menant à la réactivation, c'est-à-dire la nature du signal transduit, sont encore inconnus. Il est admis que ces stimuli entraînent une altération de la physiologie neuronale conduisant à une réduction du contrôle de la réactivation virale par les neurones. Plus récemment, un autre facteur a été identifié comme étant affecté par un stress, il s'agit des fonctions effectrices du système immunitaire, un composant de l'hôte absolument essentiel pour contrôler la réactivation virale (Freeman *et al.*, 2007; Himmelein *et al.*, 2011). Les modèles animaux capables de faire une réactivation virale spontanée comme l'Homme sont le lapin en contexte d'infection oculaire et le cochon d'inde en contexte d'infection vaginale, alors que les souris ne font pas de réactivations spontanées aboutissant à la détection de virus en périphérie (Dasgupta & BenMohamed, 2011; Webre *et al.*, 2012).

Lors de la réactivation du VHS-1, l'expression des transcrits LAT diminue tandis que l'expression des gènes viraux lytiques augmente (Spivack & Fraser, 1988). L'expression des gènes viraux semble suivre la cinétique des différentes phases, à savoir l'expression séquentielle des gènes IE, puis E, suivi des gènes L. Cependant, cet aspect reste discuté dans la littérature et des études suggèrent une expression initialement désordonnée des gènes viraux (Cliffe & Wilson, 2017; Roizman & Zhou, 2015). Un élément semble influencer la transition d'une infection latente à lytique : il s'agit des modifications épigénétiques du génome du VHS-1 en état de latence, incluant la méthylation et l'acétylation. En effet, l'acétylation des queues d'histones permet le relâchement de l'ADN viral et l'accessibilité des promoteurs des gènes viraux, entraînant alors l'expression des gènes lytiques (Knipe & Cliffe, 2008; Kubat *et al.*, 2004b). Ce concept est davantage soutenu par l'observation qu'un inhibiteur des désacétylases d'histones, le butyrate de sodium, induit une réactivation virale en modifiant les histones associées à l'ADN dans un modèle murin d'infection oculaire (Neumann *et al.*, 2007a; Neumann *et al.*, 2007b). De même, il a été observé que, suite à la réactivation virale dans des cultures de cellules issues de ganglions nerveux, les queues d'histones associées aux régions promotrices de LAT sont rapidement désacétylées tandis que celles associées au promoteur d'ICP0 deviennent acétylées. On observe alors une augmentation de la production en ARNm de ICP0 (Amelio *et al.*, 2006). De plus, l'ajout d'un inhibiteur des désacétylases d'histones dans des cultures organotypiques de TG a augmenté l'expression des gènes viraux et diminué l'expression des transcrits LAT (Du *et al.*, 2013).

Enfin le VHS-1 va être confronté à différents éléments lors de l'infection aiguë et latente qui vont influencer sa pathogénèse. Ces éléments sont les composantes de l'immunité innée et adaptative.

2 CONTRÔLE DE L'INFECTION AIGUË DU VHS-1

2.1 Rôle des différentes composantes de l'immunité innée lors de l'infection aiguë

2.1.1 Les senseurs du VHS-1

Classiquement, comme dans toutes les infections virales, les cellules du système immunitaire inné répondent rapidement à l'infection suite à la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP ou Pathogen Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs ou Pattern Recognition Receptor). La reconnaissance des PAMPs par les PRRs conduit à l'activation de voies de signalisation menant à la production d'interféron de type 1 (IFN), de chimiokines et d'interleukines (IL). Les cellules infectées en produisant des cytokines vont induire l'établissement de l'état antiviral qui se traduit par la limitation de la réplication virale.

Les PAMPs du VHS-1 reconnus par les cellules de l'hôte incluent les protéines virales, dont les glycoprotéines et les protéines du tégument, l'ADN génomique et l'ARN viral dont la plupart sont mentionnés dans le **Tableau 1.2** (Melchjorsen, 2012).

Parmi les senseurs des protéines du VHS-1, les toll-like receptors (TLR) sont un type de PRR les plus étudiés (Akira *et al.*, 2006; Herbst-Kralovetz & Pyles, 2006; Morrison, 2004). Bien que les TLR soient principalement exprimés dans les cellules myéloïdes (Mogensen, 2009), ils sont également exprimés dans l'épithélium cornéen (Jin *et al.*, 2007; Sarangi *et al.*, 2007). Le TLR-2, un récepteur exprimé à la membrane plasmique, est impliqué dans la reconnaissance de la surface du virion (Aravalli *et al.*, 2005; Kurt-Jones *et al.*, 2005; Kurt-Jones *et al.*, 2004; Sarangi *et al.*, 2007), plus précisément dans la reconnaissance des glycoprotéines gB et gH/gL (Leoni *et al.*, 2012).

Les senseurs de l'ADN génomique du VHS-1 sont nombreux et sont situés dans le cytoplasme, les compartiments endosomaux ou dans le noyau. Dans les endosomes, le TLR-9 lie les motifs CpG non méthylés de l'ADN viral (Krug *et al.*, 2004; Wuest *et al.*, 2006). Il a été décrit que suite à une infection oculaire, des souris déficientes en TLR-9 présentaient une

production diminuée en chimiokine, un faible recrutement de neutrophiles dans la cornée, et une augmentation de la charge virale sur le site oculaire (Wuest *et al.*, 2006). Dans le cytoplasme, de nombreux senseurs sont capables de lier directement l'ADN viral (voir tableau 1.2), tel que l'interferon- γ -inducible protein 16 ou IFI16 (Unterholzner *et al.*, 2010), qui est également présent dans les cellules épithéliales de la cornée (Conrady *et al.*, 2012). L'importance de IFI16 (l'orthologue p204 chez la souris) a été mise en évidence dans la production d'IFN de type 1 et dans le contrôle de la réplication du VHS-1 sur le site oculaire même en l'absence de la signalisation TLR (Conrady *et al.*, 2012).

Tableau 1.2 : PRRs et PAMPs impliqués dans la reconnaissance du VHS-1

Type de PRRs		Localisation des PRRs	PAMPs du VHS-1 reconnus	Références
Toll-like receptors	TLR-2	Membrane plasmique	Composante du virion, gB, gH/gL	(Kurt-Jones <i>et al.</i> , 2004; Leoni <i>et al.</i> , 2012)
	TLR-3	Membrane endosomale	ARN double brin	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
	TLR-9	Membrane endosomale	ADN génomique	(Krug <i>et al.</i> , 2004)
RIG-I-like receptors	RIG-1/ARNPoI-III RIG	Cytoplasme	ADN génomique ARN	(Chiu <i>et al.</i> , 2009) (Cheng <i>et al.</i> , 2007)
	MDA5	Cytoplasme	Réplication intermédiaire / ARN	(Melchjorsen <i>et al.</i> , 2010)
AIM2-like receptors	IFI16	Cytoplasme	ADN génomique	(Conrady <i>et al.</i> , 2012; Unterholzner <i>et al.</i> , 2010)
Autres	DAI	Cytoplasme	ADN génomique	(Takaoka <i>et al.</i> , 2007)
	cGAS	Cytoplasme	ADN génomique	(Sun <i>et al.</i> , 2013)

Parmi les senseurs de l'ARN viral, le TLR-3 situé dans les compartiments endosomaux lie l'ARNdb viral. Bien qu'aucune étude ne rapporte un lien direct entre le TLR3 et l'ARN du VHS-1 (Morrison, 2004; Mossman & Ashkar, 2005; Zhang *et al.*, 2013b), l'importance du TLR3 dans l'infection à VHS-1 a été mise en évidence chez la souris (Davey *et al.*, 2010) et chez l'homme, où la déficience en TLR3 est associée à une susceptibilité accrue au développement de l'encéphalite (Casrouge *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2011; Herman *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014; Zhang

et al., 2007). De ce fait, la réponse IFN de type 1 est cruciale pour la limitation de la propagation du VHS-1 dans le SNC.

2.1.2 La réponse immunitaire innée dans la cornée

Dans le contexte d'une infection oculaire, la réponse immunitaire commence dans l'épithélium cornéen. Les cellules épithéliales contenant des PRRs vont produire des cytokines et des chimiokines qui vont mener au recrutement des neutrophiles, des cellules natural killer (NK) et des monocytes/macrophages sur le site oculaire.

Les neutrophiles infiltrent l'épithélium cornéen (Russell *et al.*, 1984; Thomas *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1989) dès les vingt-quatre heures suivant l'infection par le VHS-1 (Chen *et al.*, 1996; Royer *et al.*, 2015; Stumpf *et al.*, 2002; Tumpey *et al.*, 1996) suite à la sécrétion des chimiokines et d'IFN de type 1 par les cellules épithéliales (Conrady *et al.*, 2011; Wuest *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 1998). Bien que ce soient les cellules majoritairement présentes dès les premiers jours suivant l'infection, deux récentes études infirment leur implication dans le contrôle de la réplication du VHS-1 sur le site oculaire (Conrady *et al.*, 2013; Royer *et al.*, 2015). Ces observations sont également soutenues dans d'autres modèles d'infection impliquant le VHS-1 (Wojtasiak *et al.*, 2010a; Wojtasiak *et al.*, 2010b). En effet, il a été rapporté que la déplétion spécifique des neutrophiles n'a pas eu d'impact sur la réplication virale et sur la sévérité de la pathogénèse dans un modèle murin d'infection du flanc (Wojtasiak *et al.*, 2010a) et dans un modèle murin d'infection intra-nasale (Wojtasiak *et al.*, 2010b). Une récente étude a également écarté la possibilité que les neutrophiles soient impliqués dans l'armorçage, l'expansion et le recrutement des cellules T sur le site périphérique dans un modèle murin d'infection du flanc (Hor *et al.*, 2017). Toutefois, les neutrophiles pourraient participer au recrutement des autres cellules immunitaires sur le site oculaire en produisant des chimiokines telles que l'IP-10 (IFN-gamma-inducible protein 10) également appelé CXCL10 (Molesworth-Kenyon *et al.*, 2012). Ainsi, à ce jour, le rôle des neutrophiles dans l'infection oculaire par le VHS-1 n'est pas encore clairement établi.

Les cellules NK sont des facteurs cellulaires importants dans la réponse immunitaire innée contre le VHS-1. Elles possèdent deux fonctions majeures, de lyser les cellules infectées et de produire des cytokines comme l'IFN- γ et le tumor necrosis factor- α (TNF- α). Leur rôle dans la réponse immunitaire innée contre le VHS-1 reste très controversé dans la littérature. En effet, selon la voie d'inoculation du VHS-1 (oculaire, intra-nasale, intra-dermale...), la méthode de déplétion des cellules NK, les souches génétiques de souris et de souches virales, les résultats obtenus sont différents (Chew *et al.*, 2009). Dans les souris C57BL/6, la déplétion des NK a été

associée à une augmentation de leur susceptibilité lors de l'infection oculaire par le VHS-1 (Ghiasi *et al.*, 2000b; Rager-Zisman *et al.*, 1987; Wuest & Carr, 2008). En effet, lorsque la déplétion des NK est effectuée avant et après à l'infection oculaire, les auteurs ont observé jusqu'à 89 % de mortalité contre aucune mortalité dans le groupe contrôle (Ghiasi *et al.*, 2000b). Cependant, l'utilisation d'anticorps pour la déplétion des cellules NK a des limites. En effet, il a été rapporté que d'autres types cellulaires expriment les marqueurs associés aux cellules NK et qui sont donc aussi ciblés par les anticorps anti-asialo GM1 (Mercurio *et al.*, 1984; Schuler, 1984; Suttles *et al.*, 1986; Wiltrout *et al.*, 1985) et anti-NK1.1 (Halford *et al.*, 2005; Slifka *et al.*, 2000), rendant ainsi l'interprétation biaisée des études précédentes. Ainsi une étude a réévalué le rôle des cellules NK dans l'infection oculaire par l'utilisation combinée de souris déficientes en différentes populations, de la déplétion des cellules NK et de transfert adoptif (Halford *et al.*, 2005). Les auteurs ont montré que les cellules NK ne sont pas essentielles dans la protection contre le VHS-1 (Halford *et al.*, 2005). Cette observation a été également soutenue dans un autre modèle d'infection (Vollstedt *et al.*, 2004). En dépit de la controverse dans le modèle murin, la déficience des cellules NK a été clairement associée à plusieurs cas d'encéphalites herpétiques chez l'homme (Almerigogna *et al.*, 2011; Biron *et al.*, 1989). Ainsi, les cellules NK sont des facteurs importants dans la limitation du VHS-1 à se propager dans le SNC (Kastrukoff *et al.*, 2015).

Les monocytes/macrophages sont des composants majeurs dans la défense antivirale. Ils possèdent de nombreuses fonctions effectrices dont la sécrétion de TNF- α et l'IFN- γ , de l'oxyde nitrique (NO), de cytokines pro-inflammatoires, et de chimiokines. Ils jouent un rôle central dans le recrutement des leucocytes et dans la présentation antigénique (Ellermann-Eriksen, 2005). Il a été décrit que les macrophages sont recrutés dans l'épithélium cornéen suite à l'infection oculaire (Berra *et al.*, 1994; Ghiasi *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2015) et participent à la clairance virale (Bauer *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2000; Mott *et al.*, 2007). Plus récemment, un rôle principal dans la restriction de la réplication oculaire du VHS-1 a été attribué aux monocytes inflammatoires (Conrady *et al.*, 2013) et aux mastocytes (Royer *et al.*, 2015). Plus précisément, il a été rapporté que les monocytes inflammatoires participent à l'élimination du VHS-1 en sécrétant du NO, que leur recrutement sur le site oculaire dépend de la sécrétion en CCL2 par les cellules épithéliales infectées et que la sécrétion en CCL2 est induite suite à la reconnaissance de l'ADN viral par le senseur IFI-16/p204 (Conrady *et al.*, 2013).

Certaines populations de cellules dendritiques (CDs) et de macrophages résident sur le site oculaire, plus précisément dans la couche basale de l'épithélium cornéen (Brissette-Storkus *et al.*, 2002; Chen & Hendricks, 1998; Hamrah *et al.*, 2003; Hamrah *et al.*, 2002; Hendricks *et al.*,

1992; Hu *et al.*, 2015; Knickelbein *et al.*, 2009). Ces cellules seraient également à l'origine du recrutement des cellules immunitaires innées et des lymphocytes T *via* la sécrétion d'IFN de type 1 (Conrady *et al.*, 2011). Les CD8 participent au recrutement des cellules NK et des monocytes inflammatoires dans le centre de la cornée (Frank *et al.*, 2012), à l'activation des cellules NK, à leur production en IFN- γ et à leur capacité cytotoxique durant l'infection par le VHS-1 (Kassim *et al.*, 2009; Kassim *et al.*, 2006). De ce fait, les CD8 sont essentielles à la protection contre le VHS-1 en participant à la clairance virale sur le site oculaire (Bryant-Hudson & Carr, 2012; Frank *et al.*, 2012) et en limitant la propagation du virus dans le SNC (Kassim *et al.*, 2006; Sprecher & Becker, 1986). L'un des rôles majeurs des CD8 est de stimuler la réponse immune adaptative en migrant dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). En effet, durant l'infection au VHS-1, les CD8 sont nécessaires pour l'activation et la fonction des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ dans les ganglions lymphatiques drainants (Kassim *et al.*, 2006) en présentant les antigènes du VHS-1 aux lymphocytes T naïfs (Bosnjak *et al.*, 2005a; Bosnjak *et al.*, 2005b).

Ainsi la réponse IFN de type 1 et les cellules de la réponse immunitaire innée contribuent à la restriction de la réplication et de la propagation du VHS-1 sur le site oculaire.

2.1.3 La réponse immunitaire innée dans les TG

En dépit du contrôle de l'infection sur le site oculaire, le VHS-1 parvient à atteindre les neurites innervant la région oculaire. À travers les axones, le virus rejoint les corps cellulaires neuronaux (Dyson *et al.*, 1987) où il va se répliquer de 3 à 8 jours suivant l'infection (Lang & Nikolich-Zugich, 2005; Liu *et al.*, 1996; Shimeld *et al.*, 1995). L'IFN de type 1, probablement produit par les astrocytes (Carr *et al.*, 1998) et les neurones infectés (Delhaye *et al.*, 2006), est important pour la clairance virale dans les TG (Halford *et al.*, 1997) et la limitation de la propagation du VHS-1 vers le SNC (Casrouge *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2011; Herman *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007; Zolini *et al.*, 2014). Les cellules NK, les cellules T $\gamma\delta$ et les macrophages infiltrent les TG suite à la réplication virale (Kodukula *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1996; Shimeld *et al.*, 1995). Les macrophages en produisant du NO et du TNF- α , et les cellules NK en sécrétant le granzyme B et l'IFN- γ contrôlent la réplication virale dans les TG (Kodukula *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1996; Lucinda *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2000; Zolini *et al.*, 2014). La déplétion des macrophages a été d'ailleurs associée à l'augmentation des titres viraux dans les TG de souris (Chucair-Elliott *et al.*, 2017). De plus, les cellules T $\gamma\delta$ en produisant de l'IFN- γ contribuent également à la clairance virale dans les TG puisque leur déplétion a conduit à une persistance des titres viraux (Kodukula *et al.*, 1999; Sciammas *et al.*, 1997). Il a été aussi rapporté que les

CDs sont recrutées dans les TG suite à une infection intranasale et produisent de l'IL-1 β (Lucinda *et al.*, 2017), une cytokine impliquée dans la résistance à l'encéphalite herpétique (Sergerie *et al.*, 2007). Ainsi, les cellules de la réponse immunitaire innée infiltrant le TG durant la phase aiguë sont importantes pour le contrôle de la réplication et de la propagation du VHS-1.

Toutefois une réponse immune adaptative fonctionnelle est nécessaire pour l'élimination complète de la réplication virale. Ceci est bien illustré par l'utilisation de souris ne disposant pas d'un système immunitaire adaptatif (severe combined immune deficiency ou SCID) qui ne survivent pas à l'encéphalite virale dans les deux semaines suivant l'infection (Ellison *et al.*, 2000; Gesser *et al.*, 1994; Minagawa *et al.*, 1988; Valyi-Nagy *et al.*, 1992).

2.2 Rôle des différentes composantes de l'immunité adaptative lors de l'infection aiguë

La réponse immunitaire adaptative est constituée de la réponse humorale orchestrée par les lymphocytes B qui secrètent des anticorps neutralisants, et de la réponse cellulaire qui est associée aux lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. L'immunité adaptative est déclenchée suite à la migration des CDs dans les OLS lors de l'infection primaire. Les CDs vont présenter les antigènes aux lymphocytes naïfs T et B, qui vont alors se différencier et migrer dans les sites de réplication du VHS-1. Les lymphocytes T CD4⁺ suivis des lymphocytes T CD8⁺ infiltreront la cornée et les TG et ils procèdent, à l'aide probablement des anticorps, à l'élimination complète de la réplication virale (Banerjee & Rouse, 2007).

2.2.1 La réponse humorale

La clairance virale durant l'infection aiguë est principalement attribuée aux lymphocytes T et l'implication des cellules B reste controversée (Chew *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017). Cette hypothèse est également soutenue par l'utilisation des souris SCID, chez qui le transfert des lymphocytes T leur a permis de survivre suite à l'infection par le VHS-1 (Minagawa *et al.*, 1988). Cependant, la déficience en cellules B a conduit à une augmentation de la mortalité des souris suite à l'infection par le VHS-1 par la propagation virale dans le SNC (Beland *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 2000). Le mécanisme de protection conféré par les cellules B lors de l'infection aiguë reste tout de même discuté et non élucidé (Mester & Rouse, 1991). Il a été proposé que la protection est causée soit par la sécrétion d'anticorps (Beland *et al.*, 1999), soit par les complexes d'interaction lymphocytes T-B (Arrunategui-Correa *et al.*, 1994; Arrunategui-Correa *et al.*, 1997),

soit par les activités suppressives exercées par les cellules B ou soit par la combinaison des trois fonctions des cellules B. Chez l'homme, un faible titre d'anticorps dirigés contre le VHS-1 dans le sérum n'est pas relié à une récurrence accrue de la réactivation virale. En effet, il a été décrit que les patients asymptomatiques présentaient des titres d'anticorps anti-VHS-1 plus faibles que les patients symptomatiques (Spruance *et al.*, 1995a; Spruance *et al.*, 1995b).

2.2.2 La réponse cellulaire

Les preuves démontrant le rôle des cellules T dans le contrôle de l'infection au VHS-1 proviennent initialement des observations faites chez l'homme. En effet, les infections herpétiques sévères sont souvent observées chez des individus avec une réponse T altérée (Chretien *et al.*, 1996; Fodor *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1993). Chez l'animal, les études qui se sont initialement intéressées au rôle des cellules T au sens large dans l'infection à VHS-1 sont unanimes sur leur importance dans la survie des souris contre le VHS-1. Suite à une thymectomie néonatale (Mori *et al.*, 1967) ou à la déplétion de thymocytes ou des lymphocytes T par des sérums (Chmielarczyk *et al.*, 1985; Nahmias *et al.*, 1969; Zisman *et al.*, 1970), une augmentation de la mortalité des souris a été observée suite à l'infection intra-péritonéale ou sous-cutanée par le VHS-1. À partir des années 1980, des travaux ont été menés afin de clarifier le rôle de chaque population de lymphocytes T, à savoir les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) et les lymphocytes T CD4⁺, lors de l'infection par le VHS-1 (Bonneau & Jennings, 1989; Nash *et al.*, 1987). Bien que dans ces études, l'infection n'était pas effectuée sur le site oculaire, elles s'accordent sur l'implication des lymphocytes T CD8⁺ dans l'élimination du VHS-1 dans le SNC (Bonneau & Jennings, 1989; Caignard *et al.*, 2013; Nash *et al.*, 1987; Simmons & Tschärke, 1992). Cependant, compte tenu de la complexité de chaque modèle d'infection au VHS-1 et du fait de la controverse quant aux rôles des différentes populations des cellules T dans l'infection, nous allons particulièrement nous intéresser aux études utilisant le modèle d'infection oculaire.

Qu'il s'agisse du VHS-1 ou un autre pathogène intracellulaire, la génération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques débute dans les OLS par la présentation des antigènes assurée par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) aux lymphocytes T naïfs. Suite à l'interaction du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I portant le peptide antigénique avec le récepteur des cellules T CD8⁺ (TCR), les lymphocytes T naïfs entrent dans une phase d'expansion durant laquelle ils prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. Au niveau intracellulaire, l'interaction CMH-I/TCR aboutit à une cascade de signalisation en aval du TCR qui sera abordée dans une section ultérieure (4.2.1). Les lymphocytes T effecteurs vont

alors migrer vers les sites de réplication du VHS-1 et contribuer à la clairance virale. Parmi la population de cellules T effectrices, deux sous-groupes se distinguent par l'expression du récepteur de l'IL-7 nommé CD127 et de KLRG-1 (killer-cell lectin like receptor G1). En effet, les cellules effectrices précurseurs mémoires (MPEC) sont caractérisées par une faible expression de KLRG-1 et une forte expression de CD127, et les cellules effectrices à courte vie (SLEC) sont caractérisées par une forte expression de KLRG-1 et une faible expression de CD127 (Kaech & Cui, 2012). Les MPEC sont à l'origine de la population de cellules mémoires, tandis que les SLEC exercent leurs fonctions cytotoxiques durant la phase aiguë puis meurent par apoptose. En effet, suite à l'atteinte du pic de la phase d'expansion correspondant également à l'élimination du pathogène, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs vont subir une phase de contraction lors de laquelle la majorité d'entre eux vont mourir par apoptose (**Figure 1.4**). Seules les MPEC vont survivre et se différencier en « long lived memory cell » (LLMC) pour former la population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires fonctionnels. Ces dernières cellules auront la capacité de répondre plus rapidement et efficacement lors d'une réinfection par le même pathogène.

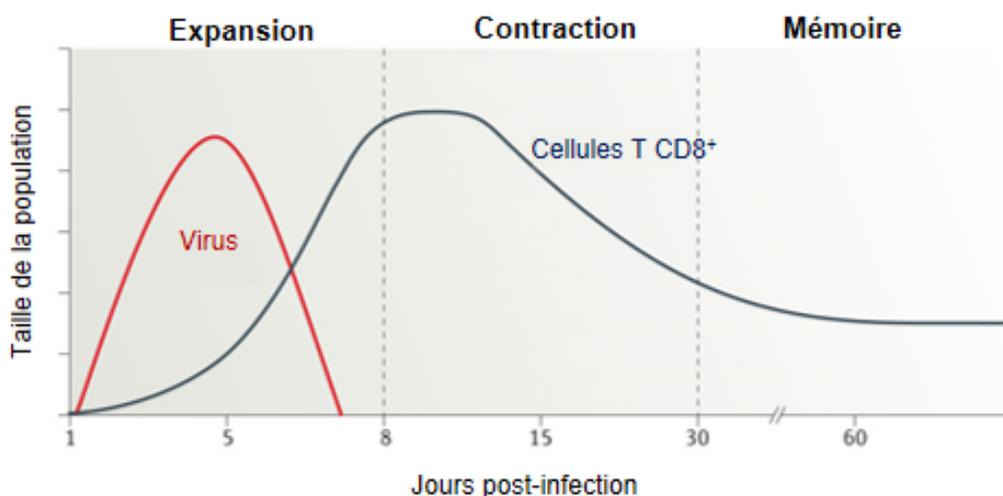


Figure 1.4 : Cinétique d'une réponse des cellules T CD8⁺ spécifiques lors d'une infection virale primaire.

Au cours d'une infection virale aiguë, les lymphocytes T spécifiques de l'antigène prolifèrent rapidement (au cours de la phase d'expansion) et se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui facilitent la clairance virale. Suite à l'élimination du pathogène, la plupart de ces cellules meurent au cours des semaines suivantes pendant la phase de contraction de la réponse. Seul un faible pourcentage de cellules T effectrices (5-10%) survivent et deviennent précurseurs mémoires, pour ensuite se développer en lymphocytes T CD8⁺ mémoires matures fonctionnelles. Adaptée de (Kaech & Cui, 2012).

Les lymphocytes T CD8⁺ mémoires sont aussi composés de différentes populations de cellules classées selon leur phénotype, leurs capacités fonctionnelles, leurs capacités de trafic à travers les OLS et d'entrée dans les tissus périphériques qui sont résumés dans le **Tableau 1.3** (Gebhardt *et al.*, 2013; Jameson & Masopust, 2009; Sallusto *et al.*, 2004). Ces populations de cellules sont les cellules mémoires effectrices (T_{EM}), qui ont la capacité de migrer dans les tissus non lymphoïdes, en particulier les tissus en état d'inflammation, et qui sont caractérisées par leurs capacités fonctionnelles rapides (Masopust *et al.*, 2001; Sallusto *et al.*, 1999), les cellules mémoires centrales (T_{CM}), qui restent dans les OLS et qui possèdent peu de fonctions effectrices mais qui prolifèrent rapidement suite à une stimulation antigénique (Sallusto *et al.*, 1999), et enfin les cellules mémoires résidentes (T_{RM}), qui vont persister dans les tissus et qui ne retournent pas dans la circulation (Gebhardt *et al.*, 2009; Sathaliyawala *et al.*, 2013; Schenkel *et al.*, 2013).

Tableau 1.3 : Caractéristiques des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ mémoires de la souris et de l'homme

Type cellulaire	Phénotype	Localisation	Propriétés fonctionnelles
T _{CM}	CD62L ^{HI} CCR7 ^{HI}	Rate, ganglions lymphatiques, sang	↑ Potentiel de prolifération ↑ Production IL-2 ↑ Migration ↓ Fonctions effectrices et cytotoxiques
T _{EM}	CD62L ^{LO} CCR7 ^{LO}	Rate, ganglions lymphatiques, foie	↓ Potentiel de prolifération ↓ Production IL-2 ↑ Migration ↑ Fonctions effectrices et cytotoxiques
T _{RM}	CD103 ^{HI} C69 ^{HI} CD62L ^{LO} CCR7 ^{LO} ; expression de récepteurs de chimiokines et d'intégrines tissulaires spécifiques	Peau, poumon, intestin, cerveau, ganglions de la racine dorsale	↓ Potentiel de prolifération ↓ Production IL-2 ↓ Migration ↑ Fonctions effectrices et cytotoxiques

Adapté de (Kaech & Cui, 2012; Paul, 2013)

Comme mentionné plus haut, la réponse cellulaire est cruciale lors de l'infection par le VHS-1. En effet, elle est nécessaire pour une clairance virale complète durant la phase aiguë sur le site oculaire (Deshpande *et al.*, 2001) et dans les TG (Ghiasi *et al.*, 1999).

2.2.2.1 La réponse cellulaire dans la cornée

Dans un modèle murin d'infection oculaire, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 commencent à infiltrer la cornée et les TG dès le 6^e jour post-infection (jpi) jusqu'à atteindre un pic au 8^e jpi (Lang & Nikolich-Zugich, 2005). Puis, ces lymphocytes subissent une phase de contraction jusqu'à former une population mémoire stable pour le reste de la vie de l'animal. Suite

à la reconnaissance de l'antigène, les lymphocytes T CD8⁺ exercent leurs fonctions effectrices *via* la sécrétion des cytokines antivirales IFN- γ et TNF- α , ainsi que la sécrétion de granzyme et de perforine (Andersen *et al.*, 2006). L'IFN- γ joue un rôle important dans la protection des souris contre l'encéphalite herpétique : en effet, des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN- γ ont présenté une mortalité augmentée comparé aux souris de type sauvage (Cantin *et al.*, 1999b). L'IFN- γ est connu pour augmenter la présentation des peptides viraux par l'augmentation de l'expression du CMH-I à la surface des cellules de l'hôte, et inhiber la transcription des gènes viraux (Boehm *et al.*, 1997). L'IFN- γ promeut également l'arrêt du cycle cellulaire (Harvat *et al.*, 1997; Xaus *et al.*, 1999) et la réponse immune de type pro-inflammatoires Th1 (Yoshida *et al.*, 1994). Le TNF- α , une fois sécrété, se fixe à son récepteur sur la cellule cible et va alors induire l'apoptose dans les cellules infectées (Gaur & Aggarwal, 2003; Wohlleber *et al.*, 2012). La sécrétion des granules contenant les granzymes et les perforines (ainsi que les granulysines chez l'Homme) par les lymphocytes T CD8⁺ va induire l'apoptose dans les cellules infectées (Voskoboinik *et al.*, 2015). La perforine va induire des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible ou dans la membrane endosomale, permettant l'entrée des granzymes (et des granulysines chez l'Homme). Cependant, les granzymes peuvent aussi entrer dans les cellules cibles par endocytose. Les granzymes sont une famille de protéases à sérine avec le granzyme A et B qui sont les plus décrits (Trapani, 2001). Le granzyme B peut induire l'apoptose soit en activant directement les caspases comme la caspase 8 et 3 (Metkar *et al.*, 2003), soit en clivant la protéine Bid (Bcl-2 interacting domain) en tBid, qui est un membre de la famille Bcl-2 pro-apoptique (Pinkoski *et al.*, 2001). tBid va alors s'insérer dans la membrane mitochondriale et permettre la libération du cytochrome c, qui va à son tour activer la voie des caspases (Waterhouse *et al.*, 2006a; Waterhouse *et al.*, 2006b). Le granzyme A induit l'apoptose indépendamment de la voie des caspases en créant des cassures d'un seul brin de l'ADN (Fan *et al.*, 2003), ou encore en activant l'IL-1 β (Irmiler *et al.*, 1995). L'apoptose peut être également induite dans les cellules cibles par les CTL *via* le ligand CD95 (ou FasL) à leur surface (Kojima *et al.*, 2002; Nagata, 1997; Nagata & Golstein, 1995). En effet, la liaison de CD95 à son récepteur CD95R (ou FasR) va induire l'activation de la caspase 8, qui va à son tour cliver la procaspase 3, le principal médiateur de l'apoptose (Medema *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1998).

L'absence des lymphocytes T CD8⁺ suite à une déplétion ou à une ablation génétique conduit à une diminution de la survie des souris C57BL/6 suite à l'infection oculaire par le VHS-1 (Ghiasi *et al.*, 2000a). Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺ protègent les souris de l'encéphalite virale, et atténuent les lésions cornéennes. Cependant, leur absence n'a pas d'incidence sur la cinétique

de la clairance virale sur le site oculaire (Ghiasi *et al.*, 2000a). L'impact des lymphocytes T CD8⁺ sur la clairance virale sur le site oculaire reste tout de même controversé. En effet, le transfert de lymphocytes T CD8⁺ provenant de souris préalablement infectées par le VHS-1 dans des souris RAG^{-/-} a permis l'élimination du virus sur le site oculaire (Banerjee *et al.*, 2004). Comme dans l'étude précédente, le transfert des lymphocytes T CD8⁺ a permis de protéger les souris RAG^{-/-} de l'encéphalite herpétique et a permis de diminuer leurs lésions cornéennes (Banerjee *et al.*, 2004). Une autre étude, réalisée dans un autre modèle d'infection (infection du flanc), soutient également l'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans la clairance du VHS-1 du site primaire d'infection (van Lint *et al.*, 2004).

Les cellules T CD4⁺ sont des médiateurs importants dans l'immunité et leurs rôles dépendent du sous type de population de lymphocytes T CD4⁺ et du fond génétique de la souris. Dans les souris dites résistantes (C57BL/6), les lymphocytes T CD4⁺ protègent les souris de l'encéphalite herpétique fatale, atténuent les lésions cornéennes et participent à la clairance virale suite à l'infection oculaire (Ghiasi *et al.*, 2000a). Dans les souris dites susceptibles (BALB/c), les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 sont considérés comme délétères. En effet, ils aggravent les lésions oculaires causées lors de l'infection par le VHS-1 et ils sont responsables du développement de la kératite stromale herpétique (Banerjee & Rouse, 2007; Doymaz & Rouse, 1992; Niemialtowski & Rouse, 1992a; Niemialtowski & Rouse, 1992b). Il a été suggéré que les cellules T CD4⁺ résidant dans la cornée produisent des chimiokines permettant le recrutement de cellules inflammatoires, dont les neutrophiles, aboutissant ainsi la perturbation de la structure cornéenne et à l'opacité cornéenne (Banerjee & Rouse, 2007). Quelques années plus tard, une autre sous population de cellules T CD4⁺ a été identifiée sur le site oculaire suite à l'infection par le VHS-1 dans un modèle murin de la kératite stromale herpétique. Il s'agit des lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4⁺ CD25⁺, qui modulent négativement l'infiltration et l'activité des lymphocytes T CD4⁺ dans la cornée (Suvas *et al.*, 2004). En effet, la déplétion des Treg a été associée à une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ dans la cornée et à l'augmentation de la sévérité de la kératite stromale herpétique (Suvas *et al.*, 2004).

Par ailleurs dans un autre modèle d'infection (infection sous-cutanée), un rôle supplémentaire est attribué aux lymphocytes T CD4⁺ durant la phase aiguë. En effet, ils sont nécessaires pour le développement d'une forte réponse T CD8⁺ cytotoxique lors de la présentation antigénique et participent à la formation de la réponse mémoire (Rajasagi *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004b). Lors de l'infection oculaire par le VHS-1, les lymphocytes T CD4⁺ n'ont pas de rôle dans la phase d'expansion des lymphocytes T CD8⁺ ni dans la formation de la réponse

mémoire (Frank *et al.*, 2010). Cependant, en l'absence des lymphocytes T CD4⁺, la population T CD8⁺ effectrice entre dans une phase de contraction plus rapide dans les TG et les cellules T CD8⁺ perdent progressivement la capacité à produire de l'IFN- γ et à libérer des granules cytotoxiques entre 14 et 35 jpi (Frank *et al.*, 2010).

2.2.2.2 La réponse cellulaire dans les TG

Dans les TG, les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ arrivent dès le 6^e jpi et contribuent ensemble à la clairance virale. Les lymphocytes T CD4⁺ soutiennent les capacités effectrices des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 dans les TG (Frank *et al.*, 2010) tandis que les lymphocytes T CD8⁺ éliminent les particules virales en réplique. Seuls les lymphocytes T CD8⁺ activés entrent dans les ganglions nerveux (van Lint *et al.*, 2005). Dans les souris C57BL/6 infectées par le VHS-1, et ce peu importe la voie d'inoculation, la majorité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 reconnaissent l'épitope immunodominant de la glycoprotéine B (gB₄₉₈₋₅₀₅), nommés ici T CD8⁺ gB-spécifiques (Bonneau *et al.*, 1993; Sheridan *et al.*, 2009; St Leger *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 1999). D'autres épitopes du VHS-1 sont également reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ (nommés ici T CD8⁺ non-gB-spécifiques), il s'agit d'épitopes subdominants qui sont au nombre de 19 dans l'infection oculaire (St Leger *et al.*, 2011; Treat *et al.*, 2017) tels que l'épitope de la ribonucléotide réductase (RR1₉₈₂₋₉₈₉), l'épitope de la glycoprotéine C (gC₈₋₁₆), ou l'épitope de la protéine ICP8 (ICP8₈₇₆₋₈₈₃)...

Dans le modèle murin C57BL/6 d'infection oculaire, 50% des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 reconnaissent l'épitope gB₄₉₈₋₅₀₅, et il y a autant de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques que de lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques dans les TG après 8 jpi. Ce ratio de 1:1 est alors maintenu tout au long de la latence virale (Sheridan *et al.*, 2009). Les facteurs qui contribuent à cette hiérarchie dans la reconnaissance des épitopes viraux ne sont pas encore bien établis. Cependant, cette hiérarchie peut être liée à plusieurs facteurs comme la voie de l'inoculation du VHS-1, la cinétique de l'expression des gènes viraux, l'efficacité de la production de peptides par le protéasome (Chen *et al.*, 2001; Vitiello *et al.*, 1996), l'affinité de liaison entre le peptide et le CMH (Chen *et al.*, 1994) et entre l'épitope et le TCR, et la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ précurseurs spécifiques à un épitope (Kotturi *et al.*, 2008; Obar *et al.*, 2008). Quelques études ont exploré différentes possibilités. Il a été montré que dans le modèle murin C57BL/6 d'infection oculaire, la hiérarchie du répertoire de la réponse T CD8⁺ n'est pas basée sur l'affinité entre l'épitope et le CMH puisque certains épitopes présentant une affinité élevée pour le CMH ne sont pas dominants dans la hiérarchie (St Leger *et al.*, 2011). Il semble aussi que la cinétique de l'expression des gènes viraux influence la hiérarchie puisqu'environ 80% des épitopes

reconnus par les cellules T CD8⁺ sont encodés par les gènes viraux précoces et tardifs (précisément $\gamma 1$). De plus, il a été mis en évidence que l'IL-10 produit essentiellement par les lymphocytes T CD4⁺ dans les TG participe aussi à la hiérarchie dans la reconnaissance des épitopes viraux durant la latence virale (St Leger *et al.*, 2013). En effet, le traitement des souris infectées par le VHS-1 avec des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-10 a conduit à l'expansion significative des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques dans les TG durant la latence virale tandis que le nombre de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques n'a pas changé (St Leger *et al.*, 2013).

Les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques et les lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques présentent des différences phénotypiques et fonctionnelles. En effet durant l'infection aiguë, la majorité des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques présents dans les TG exhibent un phénotype activé avec une expression élevée de CD69 et de CD27, une expression faible de CD62L et de CD127, et ils produisent de l'IFN- γ et du granzyme B. À l'opposé, une proportion significativement plus faible des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques présentent un phénotype activé et produisent de l'IFN- γ et du granzyme B (Sheridan *et al.*, 2009). Ces différences phénotypiques et fonctionnelles sont encore plus marquées durant la phase de latence, où une très faible proportion de lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques dans les TG restent activés et fonctionnels (Sheridan *et al.*, 2009; St Leger *et al.*, 2013).

Dans les ganglions nerveux, les lymphocytes T CD8⁺ exercent leurs fonctions effectrices sans induire l'apoptose dans les neurones infectés (Esaki *et al.*, 2010; Simmons & Tschärke, 1992). En effet, les neurones ne se régénèrent pas : il est ainsi important qu'ils soient protégés d'un quelconque dommage lytique. Le granzyme A est la protéase qui semble être impliquée dans le contrôle initial de la réplication du VHS-1 dans les ganglions nerveux durant l'infection aiguë sans induire une mortalité neuronale (Pereira *et al.*, 2000). Néanmoins, l'évaluation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ impliquées dans la clairance virale durant l'infection aiguë dans les TG a été peu étudiée. Cet aspect a été plus investigué dans le contrôle de la réactivation virale et sera alors abordé dans la section 3.2.1.

Suite à la réplication du VHS-1 durant l'infection aiguë, le virus va établir sa latence dans les neurones. L'établissement de la latence virale ne semble pas être promu par le système immunitaire puisque le VHS-1 est capable d'établir sa latence dans les TG des souris SCID, des souris déficientes en IFN- γ (souris GKO), ou des souris déficientes en cellules NK (souris Beige) (Ellison *et al.*, 2000).

3 CONTRÔLE DE L'INFECTION LATENTE DU VHS-1

Il est de plus en plus accepté que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 jouent un rôle central dans le maintien de la latence virale (Egan *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2004; St Leger & Hendricks, 2011). Toutefois, nous allons aborder dans cette partie tous les aspects du système immunitaire qui peuvent influencer la latence du VHS-1.

3.1 Influence de l'immunité innée dans l'infection latente

Dans le modèle murin, suite à l'arrivée du virus dans les TG, une augmentation des titres viraux est observée durant une courte période durant laquelle du virus infectieux peut être détecté dans les TG (Liu *et al.*, 1996). Le contrôle de la réplication virale par l'immunité innée dans la cornée et les TG est important pour limiter l'étendue de la réplication du VHS-1, et de ce fait limiter la quantité de génome latent dans les neurones (Sainz & Halford, 2002). De plus, il a été montré qu'une corrélation positive existe entre le nombre de neurones infectés de manière latente, la quantité de génome latent dans les ganglions nerveux, et la fréquence de réactivation (Sawtell, 1998; Thompson & Sawtell, 2000).

Une composante à l'interface de l'immunité innée et adaptative, les CD8, semble jouer un rôle non négligeable dans la latence du VHS-1. Des expériences avec des souris déplétées ou déficientes génétiquement en CD8 ont révélé que ces cellules sont importantes dans l'infection des neurones durant la latence. En effet, en l'absence des CD8, une diminution de la latence virale a été observée dans les TG des souris infectées sur le site oculaire (Mott *et al.*, 2014; Mott & Ghiasi, 2008). Cette diminution de la latence du VHS-1 se traduit par la diminution des transcrits LAT et des copies de gB (ADN viral). À l'opposé, l'élévation du nombre des CD8 dans les souris infectées sur le site oculaire a augmenté la charge virale dans les TG durant la latence (Mott *et al.*, 2008). Toutefois, l'impact des CD8 sur la latence du VHS-1 dépend du sous type de population cellulaire. En effet, le transfert des CD8 dans les souris a diminué la charge virale dans les TG (Mott *et al.*, 2008). Ces études suggèrent que les CD8 peuvent être utilisées comme des chevaux de Troie par le VHS-1 pour atteindre les neurones. De plus, puisque les CD8 sont impliquées dans l'amorçage des lymphocytes T CD8⁺, elles pourraient avoir un rôle indirect dans le maintien de la latence virale. En effet, le transfert de cellules d'origine myéloïde déficientes en TLR-3 dans des souris irradiées a conduit à la diminution de la proportion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 dans un modèle

d'infection du flanc ; or parmi les différentes populations de CD8, ce sont les CD8 α^+ qui expriment le plus le TLR-3 (Davey *et al.*, 2010).

3.2 Influence de l'immunité adaptative dans le maintien de la latence du VHS-1

3.2.1 Importance des cellules T CD8 $^+$ spécifiques au VHS-1 dans le maintien de la latence

Chez l'homme, les études immunohistochimiques réalisées sur des coupes de TG provenant d'individus sains ont révélé que les neurones infectés de manière latente par le VHS-1 étaient entourés majoritairement de lymphocytes T CD8 $^+$, de peu de lymphocytes T CD4 $^+$, et de macrophages CD68 $^+$ alors que les TG non infectés ne présentaient pas d'infiltrat de cellules immunitaires (Derfuss *et al.*, 2007; Held *et al.*, 2012; Hufner *et al.*, 2006; Theil *et al.*, 2003; van Velzen *et al.*, 2013). Les analyses histologiques n'ont pas révélé de dommage neuronal dans les TG infectés par le VHS-1 de manière latente (Himmelein *et al.*, 2015; Theil *et al.*, 2003; Verjans *et al.*, 2007). Ces TG infectés de manière latente ont également présenté une forte expression d'IFN- γ , de TNF- α , de RANTES (ou CCL5) et d'IP-10 (Derfuss *et al.*, 2007; Hufner *et al.*, 2006; Theil *et al.*, 2003). La chimiokine RANTES serait probablement produite par la microglie durant une infection non productive par le VHS-1 (Lokensgard *et al.*, 2001) et RANTES permettrait le recrutement de lymphocytes T dans les TG. L'IP-10 est une cytokine produite par les cellules de la microglie humaine. Il a été montré qu'elle possède une activité antivirale directe sur des neurones d'origine humaine infectés par le VHS-1 (Lokensgard *et al.*, 2001) et participe au recrutement des lymphocytes T CD8 $^+$ dans le SNC lors d'une infection virale (Christensen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2000a). Ainsi, la surveillance de la latence du VHS-1 s'opère par les lymphocytes T CD8 $^+$ *via* un mécanisme non cytolytique impliquant les cytokines IFN- γ , TNF- α , et l'IP-10. Bien qu'il n'y ait pas de dommage neuronal, les lymphocytes T conservent leur capacité à produire du granzyme A et B (Derfuss *et al.*, 2007; Verjans *et al.*, 2007).

Chez l'homme, les lymphocytes T CD8 $^+$ entourant les neurones infectés de manière latente dans les TG présentent un phénotype T_{EM} (Verjans *et al.*, 2007). En effet, ils présentent une forte expression du marqueur d'activation CD69, une faible expression des molécules de costimulation CD27 et CD28, une perte de l'expression de CD62L et de CCR7 et ils conservent leur capacité à produire de l'IFN- γ et du granzyme (Himmelein *et al.*, 2015; van Velzen *et al.*, 2013; Verjans *et al.*, 2007). Une autre étude attribue également un phénotype effecteur mémoire aux lymphocytes T CD8 $^+$ présents dans les TG durant la latence. En effet, ils co-expriment à leur

surface les récepteurs CCR5 et CXCR3 (Derfuss *et al.*, 2007). Le récepteur CXCR3 (récepteur de l'IP-10) joue un rôle important dans la migration des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs sur les sites de réplication virale dans le SNC (Christensen *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que le blocage des récepteurs CXCR3 et CCR5 chez la souris a été associé à une réduction de l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans les TG durant la phase aiguë (Himmelein *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été mis en évidence que les lymphocytes T CD8⁺ présents dans les TG de l'homme durant la latence virale expriment le marqueur CD137, un récepteur membre de la famille TNF (van Velzen *et al.*, 2013). L'expression des marqueurs CD69, CCR5 et CD137 indique une récente stimulation antigénique, ainsi la latence du VHS-1 n'est pas une infection antigénique silencieuse. En effet, durant la latence virale, quelques neurones infectés présentent une expression élevée de transcrits de gènes habituellement exprimés durant la phase lytique, plus précisément les gènes IE ou E, à savoir ICP0, ICP4, ou TK, et ceci a été mis en évidence chez l'homme (Derfuss *et al.*, 2009; Derfuss *et al.*, 2007) et chez la souris (Feldman *et al.*, 2002; Kramer & Coen, 1995; Maillet *et al.*, 2006).

Les études sont réalisées post-mortem chez l'homme et, de ce fait, elles ont des limites. Ainsi, les études menées dans le modèle murin ont apporté plus de précisions quant aux rôles des lymphocytes T CD8⁺ durant la latence virale. Chez la souris, on retrouve également dans les TG durant la latence l'expression des cytokines pro-inflammatoires l'IFN- γ , l'IL-6, et le TNF- α , l'expression des transcrits des récepteurs de chimiokines comme CXCR3 et CCR5 et l'expression des transcrits de chimiokines comme RANTES (Cantin *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2004; Halford *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Shimeld *et al.*, 1997). De plus, on retrouve également dans les TG de souris des lymphocytes T CD8⁺ entourant les corps neuronaux infectés de manière latente par le VHS-1, ainsi que des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ (Cantin *et al.*, 1995; Khanna *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1996; Shimeld *et al.*, 1995). Plus précisément, les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques au VHS-1 forment des synapses immunologiques avec les neurones infectés et expriment les marqueurs d'activation CD44 et CD69, soutenant davantage la notion d'une stimulation antigénique récente (Khanna *et al.*, 2003; Sheridan *et al.*, 2009). En effet, les auteurs mettent en évidence une polarisation des TCR des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques face aux neurones infectés de manière latente par le VHS-1, ce qui suggère la présence de complexes de CMH-I liés à des peptides de gB à la surface des neurones (Khanna *et al.*, 2003). Cette proximité étroite entre les cellules T CD8⁺ et les neurones infectés de manière latente a aussi été observée chez l'homme (Verjans *et al.*, 2007). L'absence de CMH-I à la surface des neurones a été longtemps associée à un mécanisme d'évasion face aux fonctions cytolytiques des CTL (Joly *et al.*, 1991). Toutefois, les neurones infectés par le VHS-1 expriment

le CMH-I à leur surface (Pereira & Simmons, 1999). Une autre étude soutient que la présentation antigénique est effectuée par les neurones infectés de manière latente par le VHS-1. En effet, la persistance du phénotype T_{EM} des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques durant la latence virale dépend des cellules parenchymateuses (neurones et cellules de soutien, comme les cellules de Schwann) et non des CPA dérivées de la moelle osseuse dans les ganglions nerveux (van Lint *et al.*, 2005). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques présents dans les TG possèdent une avidité fonctionnelle élevée, c'est-à-dire qu'ils sont capables de répondre à une densité faible d'épitopes (Frank *et al.*, 2010). Enfin, une étude récente démontre clairement que la rétention des lymphocytes T CD8⁺ dans les TG durant la latence dépend d'une stimulation antigénique et donc de l'expression des gènes viraux dans les TG (Treat *et al.*, 2017).

Contrairement à ce qui se produit chez l'homme, le VHS-1 ne se réactive pas de manière spontanée chez la souris. Ainsi afin d'étudier la réactivation virale, l'une des méthodes utilisées consiste à extraire les TG et de les mettre en culture après leur dissociation, une procédure suffisante pour induire la réactivation du VHS-1 dans les neurones (Webre *et al.*, 2012). La réactivation virale se traduit par l'effet cytopathique du virus sur un tapis de cellules épithéliales. L'implication des lymphocytes T CD8⁺ dans le maintien du VHS-1 en état de latence dans les TG proviennent des études *ex vivo* où la déplétion des cellules T CD8⁺ dans les cultures de TG a mené à une augmentation de la réactivation du VHS (Hoshino *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2000b). À l'inverse, l'ajout des lymphocytes T CD8⁺ provenant de ganglions lymphatiques de souris infectées par le VHS-1 ou de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques (un clone cellulaire 2D5) a permis de bloquer complètement (Liu *et al.*, 2000b) ou de restreindre de manière dose-dépendante (Khanna *et al.*, 2003) la réactivation du VHS-1 dans les cultures de TG *ex vivo*. Une autre étude soutient que l'addition de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS provenant de TG de souris infectées bloque la réactivation du VHS de manière dose-dépendante dans les cultures de TG *ex vivo* (Hoshino *et al.*, 2007). Cette étude établit que les taux de réactivation virale corrélaient inversement avec le nombre de cellules T CD8⁺ infiltrant les TG tandis qu'ils corrélaient directement avec le nombre de neurones infectés de manière latente (Hoshino *et al.*, 2007). Un autre modèle de réactivation du VHS-1 confirme l'implication des lymphocytes T CD8⁺ dans le maintien de la latence virale (Freeman *et al.*, 2007). En effet suite à l'établissement de la latence, les souris soumises à un stress physique (séquestration pendant 12 heures dans un tube durant une période de 4 jours consécutifs) ont présenté une diminution des lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG et de leur capacité à produire de l'IFN- γ accompagnée d'une augmentation de la charge virale dans les TG (Freeman *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été montré que l'augmentation du nombre et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD8⁺ T_{EM} et T_{RM} dans les TG

par l'apport local de la chimiokine IP-10/CXCL10 protège les souris des infections oculaires récurrentes lors de la réactivation du VHS-1 induite par les UV (Khan *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2017a).

Comme lors de l'infection aiguë, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 bloquent la réactivation virale sans lyser les neurones infectés. D'ailleurs, l'absence des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo* a été associée à une augmentation de la mortalité neuronale suggérant que les cellules T CD8⁺ ont un rôle protecteur dans l'intégrité neuronale (Simmons & Tschärke, 1992). L'utilisation de mécanismes non cytolytiques par les CTL n'est pas propre au VHS-1 : d'autres virus sont concernés comme le virus de l'hépatite B (Guidotti & Chisari, 2001). L'importance de la perforine et du granzyme B dans le maintien de la latence virale provient des observations où les cellules T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 provenant de souris déficientes en granzyme B ou en perforine ont présenté une capacité significativement réduite à inhiber la réactivation du VHS-1 dans des cultures de TG *ex vivo* (Knickelbein *et al.*, 2008). Le granzyme B, plutôt connu pour induire l'activation des caspases, ne mène pas à la mort neuronale dans les TG durant la latence virale. En effet, le granzyme B relâché par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 à proximité des neurones infectés va cliver spécifiquement la protéine virale ICP4, une protéine nécessaire pour l'expression des protéines précoces et tardives du VHS-1 (Knickelbein *et al.*, 2008). Ainsi, le granzyme B, en clivant ICP4, restreint la réactivation virale. L'autre mécanisme utilisé par les lymphocytes T CD8⁺ pour empêcher la réactivation du VHS-1 lors de la latence est la sécrétion d'IFN- γ ou de TNF- α (Cantin *et al.*, 1999a; Decman *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2001; Minami *et al.*, 2002). Plus précisément, l'IFN- γ peut inhiber l'expression des gènes viraux IE comme ICP0 et également des gènes L comme gC (Decman *et al.*, 2005). L'absence de cytotoxicité neuronale peut-être également expliquée par l'expression de récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 (Moser *et al.*, 2002). En effet, la majorité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 expriment à leur surface le récepteur NKG2A et CD94 (Suvas *et al.*, 2006). Une étude a révélé que la liaison de l'hétérodimère NKG2A/CD94 à son ligand majeur Qa-1^b, exprimé par les neurones dans les TG durant la latence virale, inhibe les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 (Suvas *et al.*, 2006). Enfin, les transcrits LAT, exprimés abondamment dans les neurones infectés de manière latente peuvent aussi contribuer à l'absence de cytotoxicité neuronale en inhibant l'activation des caspases induite par les lymphocytes T CD8⁺ (Henderson *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2011).

Les études menées chez l'homme et chez la souris montrent que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 présents durant la latence virale dans les TG affichent un phénotype T_{EM}.

Toutefois, ces cellules sont de plus en plus assimilées à un phénotype T_{RM} (Egan *et al.*, 2013). Les cellules T_{RM} sont une population de cellules T mémoires qui est retenue dans les tissus suite à une exposition antigénique initiale (Gebhardt *et al.*, 2009). Les T_{RM} sont $CD44^+ CD69^+ CD62L^- CCR7^- CD103^+$ (Wakim *et al.*, 2012). Le CD103 est la chaîne α du récepteur intégrine $\alpha E\beta 7$ pour la cadhérine-E, que l'on retrouve exprimée sur les cellules épithéliales (Cepek *et al.*, 1994), et son expression permet vraisemblablement aux cellules T_{RM} d'être retenues dans les tissus. Une étude confirme l'expression du CD103 sur une proportion des cellules T $CD8^+$ présents dans les TG durant la latence du VHS-1 (Khan *et al.*, 2017). Néanmoins aucune étude n'a confirmé l'expression du CD103 au sein de la population de cellules T $CD8^+$ gB-spécifiques dans les TG durant la latence virale. Comme pour les cellules T_{RM} , l'IL-15 n'est pas nécessaire pour maintenir les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au VHS-1 dans les TG durant la latence alors qu'elle est nécessaire pour maintenir la population T $CD8^+$ mémoires dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes au sein du même animal (Sheridan *et al.*, 2006). Toutefois, l'IL-15 améliore les fonctions effectrices des lymphocytes T $CD8^+$ gB-spécifiques présents dans les TG durant la latence (Sheridan *et al.*, 2006). La rétention dans les tissus typique des cellules T_{RM} est aussi une particularité partagée par les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au VHS-1. En effet, suite à l'infiltration des TG, les lymphocytes T $CD8^+$ y sont retenus pour le reste de la vie de l'animal et ne quittent plus les TG (Khanna *et al.*, 2003). De plus, les lymphocytes T $CD8^+$ gB-spécifiques présents dans la circulation ne sont pas capables d'infiltrer les TG durant la latence (Himmelein *et al.*, 2011). Enfin, comme pour les cellules T_{RM} , les lymphocytes T $CD8^+$ gB-spécifiques dans les TG durant la latence prolifèrent très peu, et possèdent donc une capacité de renouvellement très faible (Himmelein *et al.*, 2011). En somme, les lymphocytes T $CD8^+$ résidant dans les TG ont des caractéristiques particulières qui les apparentent davantage à des cellules T_{RM} qu'à des cellules T_{EM} . Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

Une exposition persistante à un antigène donné peut mener à l'épuisement fonctionnel des cellules T $CD8^+$, comme par exemple lors d'une infection virale chronique (Mueller & Ahmed, 2009; Wherry *et al.*, 2003). L'épuisement des cellules T est associé à la diminution graduelle de leurs fonctions effectrices et à l'expression de molécules inhibitrices telles que le récepteur programmed death (PD)-1, cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA)-4, lymphocyte-activation gene (LAG)-3, Tim-3 (Wherry, 2011; Wherry *et al.*, 2007). Lors de l'épuisement, les cellules T subissent une série de pertes fonctionnelles débutant par la perte de la capacité à produire de l'IL-2, à proliférer, la perte des fonctions cytotoxiques suivie de la perte de la production en TNF- α . Enfin, une perte partielle ou complète de l'IFN- γ intervient dans le stade d'épuisement plus sévère et les cellules subissent l'apoptose (Wherry, 2011). Le récepteur inhibiteur PD-1 possède deux

ligands connus, PD-L1 (ou B7-H1) exprimé sur une variété de cellules et tissus incluant les cellules hématopoïétiques et les cellules non-hématopoïétiques, et PD-L2 principalement exprimé sur les CD8⁺ et les macrophages (Blank & Mackensen, 2007). Le PD-L1/B7-H1 est exprimé à la surface des neurones infectés de manière latente par le VHS-1 et son expression est régulée par l'IFN- γ (Jeon *et al.*, 2013). La possibilité que la stimulation antigénique persistante des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 dans les TG lors de latence mène à leur épuisement a été évaluée par différents groupes de recherche. Comme mentionné dans une section précédente, deux populations de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 dans les TG se distinguent par leur fonctionnalité, il s'agit des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques (épitope immunodominant gB₄₉₈₋₅₀₅) et des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques (épitopes subdominants). Durant la latence du VHS-1, les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques conservent leurs fonctionnalités, tandis que les lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques présentent une fonctionnalité significativement réduite, un taux d'apoptose (activation de caspases) plus élevé et une expression élevée du récepteur PD-1 à leur surface (Allen *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2013; St Leger *et al.*, 2013). Le blocage de l'interaction PD-1-B7-H1 a conduit à une augmentation sélective du nombre des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques, qui s'explique par une réduction du taux de leur apoptose et une hausse de leur survie (Jeon *et al.*, 2013), tandis que le blocage du récepteur à l'IL-10 a sélectivement augmenté le nombre des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques en favorisant plutôt leur prolifération (St Leger *et al.*, 2013). Ainsi, le processus d'épuisement touche principalement la population de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux épitopes subdominants du VHS-1. L'épuisement découlerait probablement d'une exposition de cette population cellulaire à l'expression élevée des épitopes subdominants dans les neurones infectés. Enfin, une étude a démontré que suite à l'infection oculaire des souris déficientes en PD-1 ou en B7-H1, une diminution des transcrits LAT était observée dans les TG lors de latence virale (Allen *et al.*, 2011).

3.2.2 Rôle des cellules T CD4⁺ lors de la latence du VHS-1

Contrairement au rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans l'infection latente par le VHS-1 qui a été largement étudié, le rôle des lymphocytes T CD4⁺ est moins bien connu. Ils sont bien présents dans les TG durant la latence et se retrouvent près des axones (Theil *et al.*, 2003). Ils n'ont pas de rôle direct dans le maintien de la latence du VHS-1 et ils ne sont pas nécessaires dans le maintien des lymphocytes T CD8⁺ mémoires après 34 jpi mais ils aident à leur fonctionnalité entre 8 et 35 jpi (Frank *et al.*, 2010). En effet, il a été montré que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺

durant l'amorçage des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 a induit l'augmentation des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques exprimant PD-1 dans les TG à 8 jpi qui ont persistés dans la population mémoire au-delà de 56 jpi (Frank *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques a été associée à une réduction de leur fonctionnalité (Frank *et al.*, 2010). Enfin, il semblerait que ce sont les lymphocytes T CD4⁺ qui sont à l'origine de l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques *via* la sécrétion d'IL-10 (St Leger *et al.*, 2013).

4 MODULATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE PAR LE VHS-1

Comme de nombreux autres pathogènes, le VHS-1 a développé des stratégies pour interférer avec les éléments de l'immunité innée et adaptative afin d'y échapper et faciliter son infection (Retamal-Díaz *et al.*, 2016). Nous allons passer en revue certains des mécanismes utilisés par le VHS-1 pour échapper au système immunitaire puis nous allons nous concentrer sur la modulation de la signalisation du TCR par le VHS-1 et comment la protéine virale VP11/12 participe à ce processus.

4.1 Interférence du VHS-1 avec le système immunitaire inné

Parmi les éléments du système immunitaire inné, différents senseurs des acides nucléiques sont ciblés par le VHS-1. Les senseurs cytoplasmiques à ARN, Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I et melanoma differentiation-associated protein (MDA)-5, qui mènent à la production d'IFN de type 1, peuvent être reconnus par la protéine virale du tégument US11. Les ARN viraux reconnus par ces senseurs sont des produits issus de la transcription des gènes viraux et la formation d'ARN db pourrait résulter de l'hybridation de transcrits complémentaires. Les transcrits viraux sont alors acheminés dans le cytoplasme pour la synthèse des protéines virales. US11 interagit *via* sa partie carboxyterminale (C-ter) avec RIG-1 et MDA-5, empêchant ainsi ces protéines de lier des protéines adaptatrices en aval, résultant en une production diminuée d'IFN- β (Xing *et al.*, 2012). Le TLR-3, un senseur à ARNdb important dans la limitation de la propagation du VHS-1 au SNC (Guo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007), est ciblé par US3, une protéine sérine/thréonine kinase virale du tégument qui est capable de réduire l'expression du TLR-3 (Peri *et al.*, 2008).

Le VHS-1 est aussi capable d'interférer avec les voies de signalisation d'IFN (Mossman & Ashkar, 2005; Paladino & Mossman, 2009; Su *et al.*, 2016). L'interferon regulatory factor (IRF)-

3 est un facteur de transcription qui joue un rôle crucial dans les réponses antivirales, y compris lors de l'infection oculaire par le VHS-1 (Menachery *et al.*, 2010), en particulier en activant la transcription des IFN de type 1. L'activation d'IRF-3 s'effectue en plusieurs étapes commençant par la phosphorylation d'IRF-3 par une kinase cellulaire suivie d'un changement conformationnel permettant sa dimérisation et sa translocation au noyau. Puis, IRF-3 va s'associer à des co-activateurs et enfin aux IFN-stimulated response element (ISRE) (Reich, 2002). La protéine kinase virale US3 inhibe la production d'IFN de type 1 en hyper-phosphorylant IRF-3, empêchant ainsi sa dimérisation et sa translocation au noyau (Wang *et al.*, 2013). La protéine virale ICP0 est également capable d'inhiber la production d'IFN de type 1 médiée par IRF-3 et IRF-7 en s'associant avec la forme active de IRF-3 et en diminuant l'expression de IRF-3 (Lin *et al.*, 2004; Melroe *et al.*, 2004; Melroe *et al.*, 2007). La protéine virale du tégument VP16 est aussi capable d'interférer avec la voie de signalisation d'IFN en interagissant avec IRF-3 et NF- κ B (Nuclear Factor KappaB) et en empêchant IRF-3 de s'associer avec le co-activateur CREB binding protein (CBP) (Xing *et al.*, 2013). NF- κ B, qui est en aval de nombreux senseurs du VHS-1, est aussi ciblé par d'autres protéines virales, comme US3, qui hyperphosphoryle la sous-unité p65 et empêche sa translocation au noyau (Wang *et al.*, 2014), ou encore ICP0, qui interagit avec p65 et p50 et empêche leur translocation au noyau et qui dégrade p50 *via* son activité E3 ubiquitine ligase (Zhang *et al.*, 2013a). La protéine virale VP11/12 inhibe également la production d'IFN de type 1 dans les cellules épithéliales (Deschamps & Kalamvoki, 2017). L'inhibition de l'IFN de type 1 passe probablement par la capacité de VP11/12 à s'associer avec Stimulator of interferon genes (STING), avec la protéine TANK-binding kinase 1 (TBK1), mais aussi à diminuer l'expression des protéines et des transcrits de IFI16 et de STING (Deschamps & Kalamvoki, 2017). D'autres mécanismes d'évasion, largement redondants, sont également utilisés par le VHS-1 pour interférer avec les voies de signalisation d'IFN, dont la plupart sont présentés dans la **Figure 1.5**.

L'apoptose est aussi un processus induit par des stimuli intrinsèques ou extrinsèques permettant de limiter la réplication du VHS-1. De nombreux facteurs viraux sont capables d'inhiber l'apoptose comme US3 dans les cellules épithéliales (Wang *et al.*, 2011) ou US5 (glycoprotéine J) et les transcrits LAT dans les cellules neuronales (Bloom, 2004; Carpenter *et al.*, 2015; Hamza *et al.*, 2007; Jerome *et al.*, 2001).

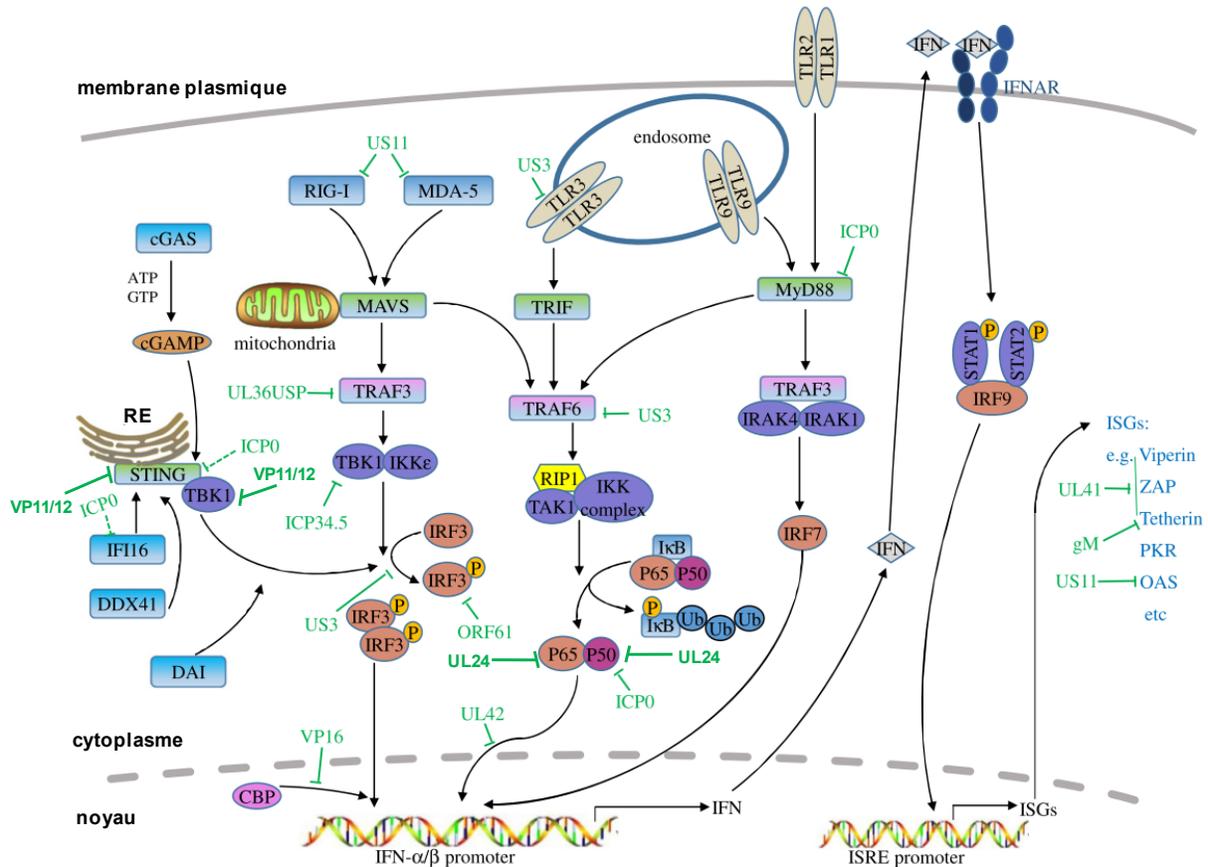


Figure 1.5 : Interférence du VHS-1 avec la signalisation IFN de type 1 de l'hôte.

Les PRRs reconnaissent les PAMPs et induisent la sécrétion d'IFN de type 1. Les TLR se localisent à la fois à la membrane plasmique et dans les endosomes, et mènent à l'activation des IRF et NF-κB à travers TRIF et MyD88. RIG-I et MDA5 détectent des structures d'ARN distinctes et mènent à l'activation de IRF3 et NF-κB à travers la protéine adaptatrice mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS). cGAS reconnaît l'ADNdb dans le cytosol et catalyse ensuite la production de cGAMP, un second messager qui active la protéine adaptatrice STING localisée dans le RE. STING recrute et active TBK1, qui active ensuite IRF3 pour induire l'IFN de type I. Plusieurs étapes des voies de signalisation menant à la sécrétion de l'IFN de type I peuvent être détournées par les protéines virales du VHS-1. Les lignes pleines vertes indiquent des interactions confirmées entre les molécules hôtes et les protéines du VHS-1. Les lignes pointillées vertes indiquent des interactions incertaines. Adaptée de (Su *et al.*, 2016) avec de l'information supplémentaire provenant de (Deschamps & Kalamvoki, 2017; Xu *et al.*, 2017).

Un autre élément du système immunitaire inné contrecarré par le VHS-1 est le complément, qui est composé de plusieurs protéines du sérum. En effet, la glycoprotéine virale gC est capable de lier C3b et de bloquer son activité en altérant l'activation du complément induite par les anticorps (Friedman *et al.*, 1984; McNearney *et al.*, 1987). Elle est aussi capable de lier C5 et de bloquer ses activités en aval, comme la lyse cellulaire par la formation de pores membranaires (Hook *et al.*, 2006; Lubinski *et al.*, 2002).

Les cellules de l'immunité innée sont aussi modulées par le VHS-1. Les fonctions effectrices des cellules NK sont altérées par le VHS-1 par la diminution à la surface des cellules infectées de l'expression de ligands permettant l'activation des NK (Schepis *et al.*, 2009; Tomazin *et al.*, 1996) ou encore par l'inhibition des fonctions cytotoxiques (Confer *et al.*, 1990). Aussi, le VHS-1 peut entraîner l'apoptose des cellules NK en induisant l'expression du CD95 (FasL) à la surface des macrophages infectés (Iannello *et al.*, 2011). Les CD, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, sont également ciblées par le VHS, qui, après infection, module leur fonction en altérant leur maturation, leur sécrétion en cytokines, et leur capacité à activer les cellules T (Bosnjak *et al.*, 2005b; Gobeil & Leib, 2012; Jin *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2003).

4.2 Interférence du VHS-1 avec le système immunitaire adaptatif

La réponse humorale est principalement dirigée contre certains antigènes viraux de surface comme les glycoprotéines virales gD, gB et gC (Eing *et al.*, 1989). Les anticorps dirigés contre ces glycoprotéines virales peuvent induire une activation du complément ou une phagocytose *via* des complexes immuns grâce à leur partie Fc. Cependant, la glycoprotéine virale gE peut interférer avec l'activation du complément en rentrant en compétition avec le composé du complément C1q pour la liaison à la partie Fc des anticorps, gE agit alors comme un récepteur Fc (Lubinski *et al.*, 2011).

L'un des mécanismes pour échapper aux CTL est d'empêcher la présentation antigénique *via* le CMH-I à la surface des cellules infectées par le VHS-1. Le transport du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique (RE) des peptides du soi ou étrangers s'effectue *via* des protéines de transport des antigènes (TAP pour Transporter associated with antigen processing). Le peptide est ensuite chargé sur le CMH-I. Le VHS est capable d'interférer avec la présentation antigénique grâce à la protéine virale ICP47, qui a la capacité d'inhiber la translocation de TAP à travers le RE (Fruh *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995; Tomazin *et al.*, 1996; York *et al.*, 1994). Aussi, ICP47 lie le TAP de l'homme avec une plus forte affinité que le TAP de la souris (Ahn *et al.*, 1996). L'autre mécanisme utilisé par le VHS-1 pour échapper aux CTL est la réduction de l'expression de CMH-I à la surface des cellules infectées assurée par la protéine virale US3 (Imai *et al.*, 2013). US3 est aussi capable d'empêcher les fonctions cytotoxiques des CTL en prévenant le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid par le granzyme B (Cartier *et al.*, 2003). La capacité du VHS-1 à inhiber les fonctions cytotoxiques des cellules T est confirmée par d'autres études (Aubert *et al.*, 2006; Confer *et al.*, 1990; Jerome *et al.*, 2001; Jerome *et al.*, 1998; Posavad *et al.*, 1993; Posavad *et al.*, 1994; Posavad & Rosenthal, 1992; Sloan *et al.*, 2003). L'interférence avec la présentation

antigénique ou la maturation des CPA est aussi une stratégie utilisée par le VHS-1 pour empêcher les CPA infectées d'activer les cellules T naïves (Jin *et al.*, 2009).

Enfin, le VHS-1 est capable de moduler l'activité des cellules T, plus particulièrement en ciblant des éléments de la signalisation en aval du TCR (Jerome, 2008). Il convient cependant de décrire brièvement la signalisation du TCR avant de citer les différents éléments ciblés par le VHS-1.

4.2.1 La signalisation du TCR

Le TCR est un complexe de différentes sous-unités (**Figure 1.6**), une sous-unité interagissant avec le ligand composée des chaînes α et β , et d'une sous-unité permettant la transmission du signal intracellulaire composée des chaînes CD3 ξ , γ , δ , et ζ (van Leeuwen & Samelson, 1999; Weiss, 1993). Suite à l'interaction du TCR avec le CMH portant un peptide, l'activation de deux membres de la famille Src kinase (SFK pour Src family kinase), Lck et Fyn, se produit, menant à la phosphorylation des tyrosines contenues dans des motifs d'activation conservés appelés ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) présents sur les domaines intracellulaires des chaînes CD3 ξ , γ , δ , et ζ (Mustelin & Tasken, 2003; Nel, 2002; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Weiss & Littman, 1994). Cette phosphorylation va permettre le recrutement de la protéine cytoplasmique ZAP-70 (70-kd ζ chain-associated protein kinase) aux ITAMs phosphorylés ce qui va permettre son activation (Chu *et al.*, 1998). ZAP-70 va à son tour phosphoryler les protéines adaptatrices LAT (Linker for Activation of T-Cells) et SLP-76 (SH2 Domain-Containing Leukocyte Protein-76) qui vont servir de plateforme pour d'autres protéines *via* leur domaine SH3 (Src homology 3) et SH2 (Src homology 2) tel que ITK (IL-2-inducible T-cell kinase), la phospholipase $Cy1$ (PLC $\gamma1$), Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) et Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) (Samelson, 2002; Smith-Garvin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 1998). Finalement, la PLC $\gamma1$ activée va permettre la production de deux second messagers en hydrolysant le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P 2) en inositol triphosphate (IP 3) et en diacylglycerol (DAG) (Rhee, 2001).

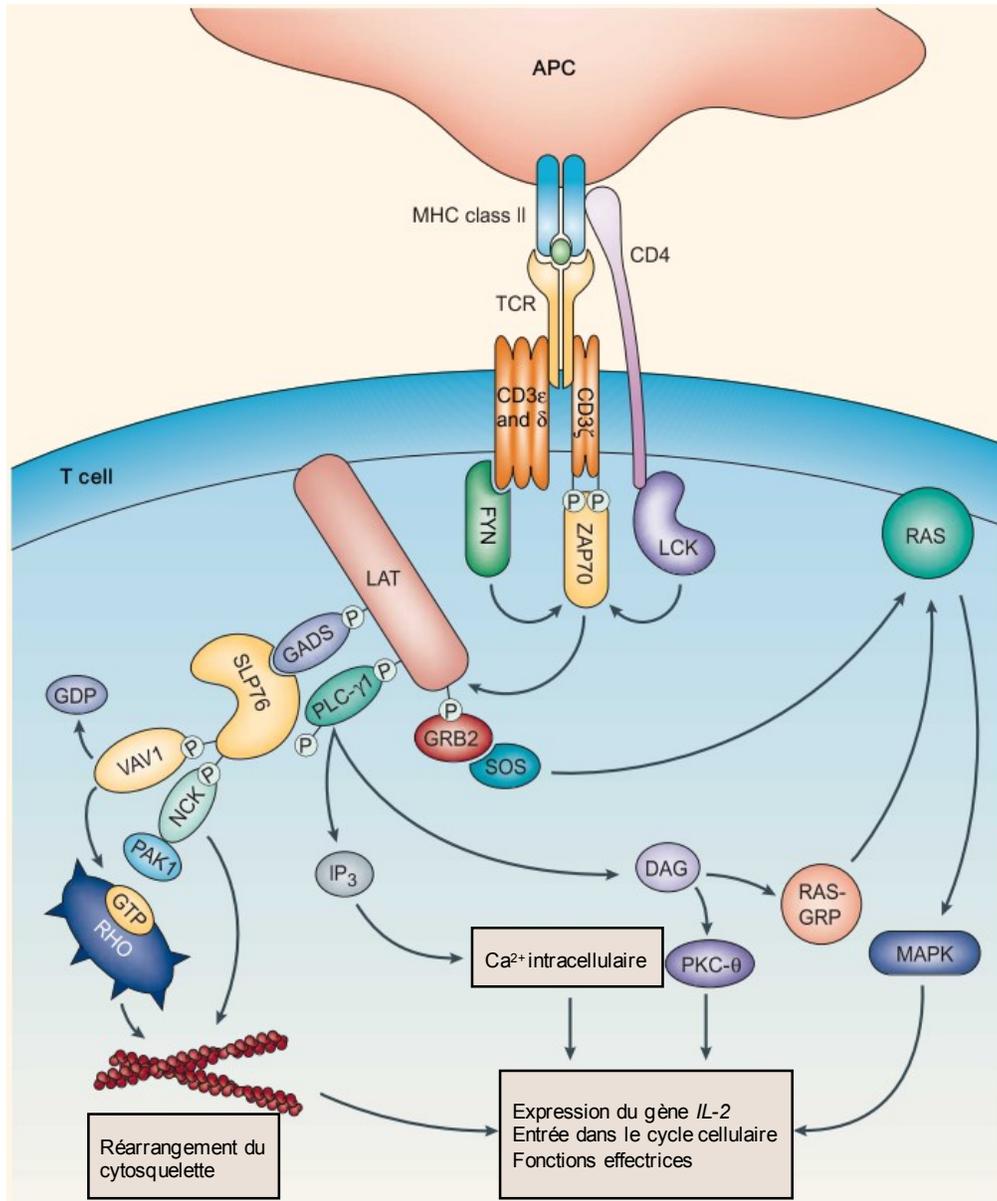


Figure 1.6 : La signalisation du TCR.

Suite à la ligature du TCR, les protéines tyrosine kinases (PTK) de la famille Src telles que Lck et Fyn sont activées, ce qui entraîne la phosphorylation des différentes chaînes du TCR et l'activation de ZAP-70. ZAP70 va à son tour phosphoryler LAT et SLP-760. La protéine LAT phosphorylée sur ses résidus tyrosines va recruter alors plusieurs protéines contenant le domaine SH2 telles que Grb2, Gads, et la phospholipase PLC γ 1. Grâce à son association constitutive avec Gads, SLP76 est également recrutée au niveau de LAT suite à une stimulation TCR. L'activation de PLC γ 1 entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en inositol 3,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). La production en IP3 entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ libre, alors que DAG va activer à la fois la protéine PKC- θ et RasGRP. La protéine LAT en s'associant avec Grb2 permet le recrutement de Sos qui est un GEF fournissant un mécanisme supplémentaire possible pour l'activation de Ras. La protéine SLP76 phosphorylée s'associe également à Vav1 et à la protéine adaptatrice, Nck. Le complexe trimoléculaire SLP76, VAV1 et PAK1 (une kinase associée à Nck) serait impliqué dans la régulation des réarrangements du cytosquelette d'actine. Adaptée de (Abraham & Weiss, 2004).

IP3 va permettre la libération du calcium du RE et va alors faciliter l'influx du calcium extracellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire conduit à l'activation de la phosphatase calcineurine, entraînant la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells), ce qui va permettre sa translocation au noyau et la transcription de gènes impliqués dans les fonctions effectrices des cellules T, comme par exemple l'IL-2 (Rao *et al.*, 1997). L'autre second messenger DAG va mener à l'activation des protéines PKC (Protein Kinase-C) et RasGRP (Ras guanyl nucleotide releasing protein). PKC est à l'origine de l'activation de différentes cascades de signalisation en aval du TCR. En effet, l'isoforme PKC θ de la protéine kinase C conduit à l'activation de la MAPK (Mitogen-activated protein kinases) JNK (JUN amino-terminal kinase), qui, à son tour, régule le facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) à l'origine de l'expression de gènes de certaines fonctions effectrices (Isakov & Altman, 2002). De plus, PKC θ est aussi impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Isakov & Altman, 2002; Schulze-Luehrmann & Ghosh, 2006; Sun *et al.*, 2000). RasGRP active la petite GTPase Ras, conduisant ainsi à l'activation de la MAPK ERK1/2 (Ebinu *et al.*, 1998; Ebinu *et al.*, 2000). La protéine Sos (son of sevenless), constitutivement liée à Grb2, est aussi un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) tout comme RasGRP, et participe également à l'activation de Ras et par conséquent de ERK1/2 (Smith-Garvin *et al.*, 2009).

Parmi les protéines se liant aux protéines adaptatrices mentionnées plus haut, LAT et SLP-76, la protéine Vav associée à SLP-76 joue un rôle central dans la régulation du cytosquelette, de la migration et de l'adhésion (Smith-Garvin *et al.*, 2009). Les réarrangements du cytosquelette sont nécessaires pour la propagation du signal et la formation de la synapse immunologique. Ainsi, la combinaison de l'activation des MAPKs, du flux calcique, et des réarrangements du cytosquelette conduit à l'activation de la cellule T, incluant l'activation de facteurs de transcription, de la synthèse de cytokines, des fonctions cytotoxiques et l'entrée dans le cycle cellulaire.

4.2.2 Modulation de la signalisation du TCR par le VHS-1

De nombreux virus modulent la signalisation du TCR dans le but de promouvoir leur propagation (Jerome, 2008). Par contre, le VHS-1 comme pour d'autres virus qui infectent majoritairement des cellules non lymphoïdes ont tendance à moduler négativement la signalisation du TCR afin d'inhiber la capacité des cellules T à répondre aux cellules infectées.

L'inhibition de l'activation des cellules T nécessite l'entrée du VHS-1 dans la cellule T ou le transfert de matériel provenant de cellules non lymphoïdes infectées vers la cellule T (Sloan *et*

al., 2006). Chez l'homme, bien que l'on retrouve des cellules T infectées par le VHS-1 dans des biopsies ou des fluides provenant de lésions herpétiques, la cellule T n'est pas le site de réplication privilégié par le virus (Aubert *et al.*, 2009). Cependant, il est possible de retrouver des cellules épithéliales ou neuronales infectées par le VHS-1 en contact étroit avec des cellules T. D'ailleurs, cette situation a été décrite lors de la latence virale dans les TG (Khanna *et al.*, 2003; Sheridan *et al.*, 2009; Verjans *et al.*, 2007). Il a été observé que le contact étroit entre une cellule T et des cellules fibroblastiques préalablement infectées par le VHS-1 favorise l'infection des cellules T primaires alors que l'infection directe des cellules T primaires est moins permissive (Aubert *et al.*, 2009). Ce contact étroit, appelé synapse virologique, est assez similaire à la synapse immunologique de type immature, avec un enrichissement de protéines d'adhésion dans la zone de contact tel que LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) et de ses ligands ICAM (intercellular adhesion molecule)-1 et ICAM-3 (Aubert *et al.*, 2009; Piguet & Sattentau, 2004). L'inhibition de l'activation des cellules T par le VHS-1 s'observe à différents niveaux dans la signalisation du TCR. En effet, suite à la stimulation avec un anticorps anti-CD3 de cellules T préalablement infectées par le VHS (ou exposées à des fibroblastes infectés par le VHS), on a observé une inhibition de la phosphorylation de la protéine adaptatrice LAT, de PLC γ 1, de la kinase ERK et de NF- κ B, une inhibition de l'augmentation du calcium intracellulaire, et enfin une inhibition de la synthèse d'IL-2 et d'IFN- γ (Sloan *et al.*, 2006; Sloan & Jerome, 2007; Yang *et al.*, 2015). L'inhibition de la phosphorylation de LAT induit par le VHS-1 dans les cellules T empêche la liaison des protéines Grb2, GADS et PLC γ 1 à LAT et donc la signalisation en aval de ces protéines est altérée (Sloan & Jerome, 2007). Plus encore, le VHS-1 inhibe la synthèse des cytokines de type Th1 alors qu'il augmente la synthèse de cytokine de type Th2 comme l'IL-10 dans des cellules T primaires d'origine humaine (Sloan & Jerome, 2007). Les mécanismes et les déterminants viraux à l'origine de la synthèse d'IL-10 ne sont pas encore clairs. Cependant, elle nécessite l'activation de la voie de signalisation MAPK p38 qui est induite par le VHS-1 dans les cellules T même en l'absence de la stimulation du TCR (Sloan & Jerome, 2007). Cette voie de signalisation est initiée suite à la phosphorylation de ZAP-70, qui n'est pas altérée par le VHS en réponse à la stimulation du TCR, et elle ne requiert pas la protéine LAT (Salvador *et al.*, 2005; Sloan *et al.*, 2006).

À ce jour, le facteur viral identifié à l'origine de l'inhibition de la signalisation du TCR serait US3 (Yang *et al.*, 2015). En effet, suite à la stimulation du TCR des cellules T préalablement infectées avec un virus déficient en US3, les auteurs ont observé une restauration de la phosphorylation de LAT, de PLC γ 1, de ERK1/2, et de l'augmentation du calcium intracellulaire et de la synthèse d'IL-2 comparativement aux cellules T préalablement infectées avec un virus de

type sauvage (Yang *et al.*, 2015). Il a été rapporté que suite à la stimulation du TCR, en plus de subir des phosphorylations, la protéine LAT est sujette à l'ubiquitination effectuée par TRAF (TNF receptor associated factor)-6 *via* son activité E3 ubiquitine ligase (Xie *et al.*, 2013). Ce processus nécessite l'association de TRAF-6 avec la protéine LAT *via* le domaine TRAF et participe à l'activation de la cellule T. La protéine virale US3 inhibe la signalisation du TCR en empêchant l'association de TRAF-6 avec LAT indépendamment de son activité kinase et, de ce fait, elle restreint l'ubiquitination de LAT par TRAF-6 (Yang *et al.*, 2015). L'implication de la kinase virale US3 dans l'inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2 par le VHS-1 a été également rapportée dans des cellules épithéliales par un mécanisme indépendant de la protéine LAT (Chuluunbaatar *et al.*, 2012).

Une autre protéine virale est capable de moduler la signalisation du TCR. Il s'agit de VP11/12 qui est capable d'activer Lck (Wagner & Smiley, 2009). Cet aspect sera abordé dans la section suivante.

4.3 La protéine virale VP11/12 et son rôle dans la signalisation des cellules T

VP11/12 représente l'une des plus abondantes protéines du tégument avec environ 1200 molécules par virion (Haarr & Skulstad, 1994; Heine *et al.*, 1974; Zhang & McKnight, 1993). À l'origine, deux bandes protéiques (VP11 et VP12) étaient distinguées sur SDS-PAGE aux poids moléculaires de 91 et 84 kDa respectivement (Spear & Roizman, 1972). Cependant, des études plus approfondies suggèrent que VP11/12 est une protéine unique encodée par l'ORF *UL46* et la variabilité de son poids moléculaire semble être attribuée à différents niveaux de phosphorylation (Lemaster & Roizman, 1980; Murphy *et al.*, 2008; Willard, 2002; Zhang & McKnight, 1993). VP11/12 est relâchée dans le cytoplasme suite à l'entrée de la particule virale dans la cellule, et elle est produite dans les derniers stades de l'infection durant lesquels sa synthèse dépend de la réplication de l'ADN viral (Kato *et al.*, 2000). VP11/12 se localise dans le cytoplasme, à la membrane plasmique, et dans les régions cytoplasmiques péri-nucléaires durant l'infection (Kato *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2008; Willard, 2002).

Des expériences de transfection transitoire ont suggéré que VP11/12 améliore la transcription des gènes IE en coopérant avec VP16, et que VP11/12 supprime la transcription des gènes IE en l'absence de VP16 (Kato *et al.*, 2000; McKnight *et al.*, 1987). L'observation que VP11/12 interagit avec VP16 a appuyé cette hypothèse (Kato *et al.*, 2000; Vittone *et al.*, 2005).

Toutefois, un virus déficient en VP11/12 est viable en culture, il ne présente pas de défaut dans la réplication virale et, plus particulièrement, il ne manifeste pas de défaut dans la transcription des gènes IE (Zahariadis *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 1991). Ainsi, la fonction primaire de VP11/12 durant l'infection n'est pas encore élucidée.

Les premières preuves montrant que VP11/12 influence les voies de signalisation cellulaires proviennent de l'observation qu'une protéine de 90 kDa, identifiée comme VP11/12, est hautement phosphorylée sur les résidus tyrosines suite à l'infection des cellules T par le VHS-1 (Zahariadis *et al.*, 2008). La phosphorylation de VP11/12 est dépendante du type cellulaire puisqu'elle n'est pas (ou très faiblement) observée dans des cellules non lymphocytaires comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales (Zahariadis *et al.*, 2008). Dans les cellules T Jurkat, les protéines SFK, principalement Lck, sont nécessaires pour la phosphorylation des résidus tyrosines de VP11/12 (Zahariadis *et al.*, 2008). Réciproquement, VP11/12 est nécessaire pour l'activation de Lck (Wagner & Smiley, 2009). De plus, VP11/12 se lie à Lck et cette interaction est requise pour induire la phosphorylation du résidu tyrosine Y394 de Lck (Strunk *et al.*, 2013; Wagner & Smiley, 2009). En effet, deux motifs conservés pour les virus VHS-1 et VHS-2 identifiés dans la partie C-ter de VP11/12 (**Figure 1.7**), YETV (au résidu Y613) et/ou YEEI (au résidu Y624) sont impliqués dans l'interaction avec le domaine SH2 de Lck et dans l'activation de Lck (Strunk *et al.*, 2013). Cependant, la kinase cellulaire ou virale induite par VP11/12 qui phosphoryle les SFK est encore inconnue. Pour le moment, deux kinases virales, US3 et UL13, ont été testés et ne sont pas responsables de la phosphorylation des SFK médiée par VP11/12 (Wagner & Smiley, 2009).

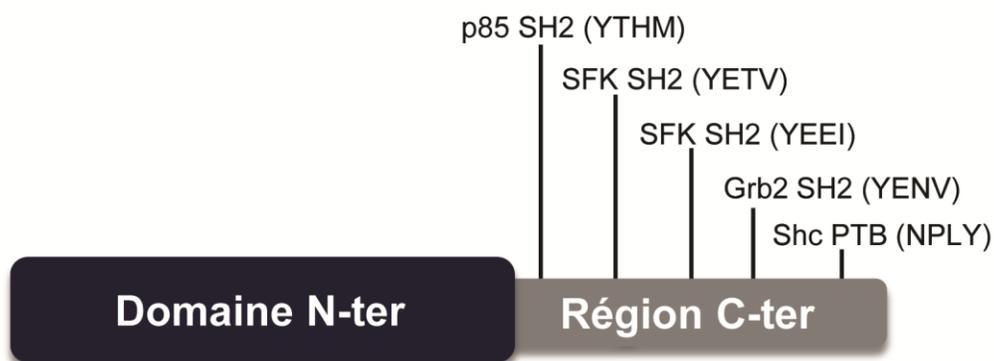


Figure 1.7 : Diagramme schématique de VP11/12.

La protéine VP11/12 se compose d'un domaine N-terminal de fonction inconnue hautement conservé dans tous les alphaherpesvirus et une région C-terminale moins conservée qui contient des motifs de signalisation contenant des résidus tyrosines impliqués dans la liaison avec p85, SFK, Grb2 et Shc.

L'infection des cellules T par le VHS-1 est suffisante pour induire l'activation de la voie PI3K/Akt (Strunk *et al.*, 2013; Wagner & Smiley, 2011). La phosphorylation de la sous-unité p85 de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et de Akt nécessite VP11/12 et l'activation des SFK médiée par VP11/12 (Wagner & Smiley, 2011). En effet, l'interaction de VP11/12 avec Lck permet à Lck de phosphoryler (directement ou indirectement) à son tour VP11/12 sur différentes tyrosines en C-ter, permettant le recrutement de plusieurs protéines par leur domaine SH-2 ou PTB (phosphotyrosine binding). Ainsi, il a été montré que les motifs YTHM (Y519) et YENV (Y633) de VP11/12 sont essentiels pour la liaison à PI3K, qui permet à son tour d'activer Akt (Strunk *et al.*, 2016; Strunk *et al.*, 2013; Wagner & Smiley, 2011). VP11/12 lie aussi le domaine SH2 de Grb2 *via* le motif YENV (Y633), et la liaison à Grb2 contribue à l'interaction entre VP11/12 et PI3K (Strunk *et al.*, 2016; Strunk *et al.*, 2013). VP11/12 interagit également avec le PTB de la protéine Shc *via* son motif NPLY (Y657). Enfin, l'activation d'Akt nécessite la formation du complexe VP11/12, Lck, Grb2 et PI3K (Strunk *et al.*, 2016). L'impact de la liaison de VP11/12 avec Lck, PI3K, Grb2 et Shc sur les voies de signalisation, la réplication, la pathogénèse et la latence virale reste encore à déterminer.

5 LA FAMILLE DES PROTÉINES DOK

L'activation de la signalisation du TCR, comme lors de l'activation d'une cellule T naïve, est un phénomène qui met en jeu plusieurs types de voies effectrices de la signalisation. Lors de l'activation d'une cellule T naïve, ces voies sont initiées par l'interaction du TCR avec un antigène, un signal de co-stimulation (CD28, CD27..) et un signal induit par les cytokines inflammatoires (Williams & Bevan, 2007). L'activation de ces voies nécessite une régulation fine pour assurer une réponse appropriée et optimale d'une cellule T à son ligand. Pour cela des signaux inhibiteurs sont nécessaires, et cette régulation est soit tardive ou précoce. La régulation tardive met en jeu des récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4), permettant principalement le recrutement des phosphatases (Paul, 2013; Saito & Yamasaki, 2003). La régulation précoce s'effectue en aval du TCR, soit en ciblant les PTK telles que les SFK *via* Csk (C-terminal Src kinase), ou soit *via* le recrutement de protéines adaptatrices telles que Dok-1 et Dok-2 (Paul, 2013). Les protéines Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de la fonction des cellules T (Acuto *et al.*, 2008; Mashima *et al.*, 2009) et les travaux mettant en lumière leur rôle dans la signalisation du TCR seront abordés dans la section 5.5.4.

Chez les mammifères, les protéines Dok-1 et Dok-2 appartiennent à la famille des protéines Dok (pour Downstream of kinases) qui comptent sept membres (Dok-1 à Dok-7)

(Mashima *et al.*, 2009). Les protéines Dok sont des molécules adaptatrices qui, dans diverses voies de signalisation cellulaire, sont des substrats des PTK cytoplasmiques ou de récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Mashima *et al.*, 2009). À l'origine, Dok-1 fut le premier membre de cette famille à être identifié et était nommé p62^{dok}. La protéine Dok-1 a été identifiée comme étant une cible des PTK dans des cellules transformées avec des oncoprotéines ou dans des cellules traitées avec le facteur de croissance épidermique (EGF) (Ellis *et al.*, 1990). Depuis, d'autres études ont montré que Dok-1 est rapidement phosphorylée sur ses résidus tyrosines en aval d'une large gamme de PTK, et qu'elle s'associe avec la protéine p120 RasGAP (Ras GTPase activating protein) suite à sa phosphorylation (Carpino *et al.*, 1997; DeClue *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1990; Yamanashi & Baltimore, 1997). Par la suite, les autres membres de la famille ont été identifiés et cette famille a été divisée en trois sous-groupes basés sur leur structure, leur expression tissulaire et sur leur séquence d'acides aminés (**Figure 1.8**). Le premier groupe est composé de Dok-1/-2/-3, le deuxième groupe est constitué de Dok-4/-5/-6 et le troisième groupe est formé par Dok-7 qui est le membre le plus éloigné de cette famille (Guittard *et al.*, 2018).

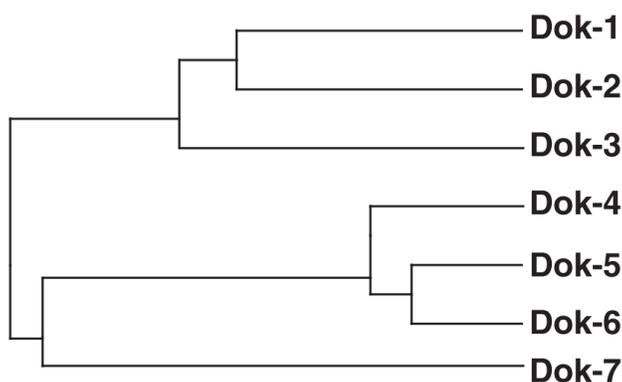


Figure 1.8 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines Dok de souris.
Adaptée de (Mashima *et al.*, 2009).

5.1 Profil d'expression des protéines Dok

Le premier groupe de la famille des protéines Dok (Dok-1/-2/-3) est préférentiellement exprimé dans les cellules immunitaires (**Tableau 1.4**), alors que les autres membres de la famille Dok sont exprimés dans des cellules non hématopoïétiques (Guittard *et al.*, 2018).

Tableau 1.4 : Expression des protéines Dok (Dok-1/-2/-3) dans les cellules hématopoïétiques

Dok	Cellules B	Cellules T	Cellules myéloïdes
Dok-1	+	+	+
Dok-2	-	+	+
Dok-3	+	-	+

+, forte expression ; -, faible ou aucune expression
Adapté de (Mashima *et al.*, 2009)

Plus précisément, l'ARNm de Dok-1 est exprimé dans les lignées de lymphocytes T, de lymphocytes B et dans les cellules myéloïdes comme les macrophages et les neutrophiles. De même, l'ARNm de Dok-2 est préférentiellement exprimé dans les lymphocytes T et les cellules myéloïdes (Guittard *et al.*, 2018; Yasuda *et al.*, 2007; Yasuda *et al.*, 2004). À l'opposé, l'ARNm de Dok-3 est exprimé dans les cellules myéloïdes et dans les lymphocytes B (Guittard *et al.*, 2018; Lemay *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2007). Cependant, l'expression de Dok-1 a été aussi rapportée dans d'autres types cellulaires non hématopoïétiques, lui suggérant alors une fonction non immunologique (Carpino *et al.*, 1997; Hosooka *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2004a; Yamanashi & Baltimore, 1997). Il a été décrit que l'expression de Dok-1 est induite chez des souris ayant une diète enrichie en gras, et que Dok-1 induit une hypertrophie des adipocytes (Hosooka *et al.*, 2008). Bien que des travaux n'ont pas détecté l'expression de Dok-1 dans les cerveaux de souris et humains (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi & Baltimore, 1997), une étude a mis en évidence l'expression de Dok-1 dans les neurones du cortex pré-frontal de singes et suggère un rôle potentiel de Dok-1 en aval du récepteur du facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (ou IGF-1 pour insulin-like growth factor-1) (Smith *et al.*, 2004a).

Dok-4 est ubiquitaire : elle est présente dans le cœur, le cerveau, les poumons, les reins, les muscles squelettiques, alors que Dok-5 et Dok-6 sont principalement exprimées dans les cellules neuronales (Crowder *et al.*, 2004; Grimm *et al.*, 2001). De plus, des études ont rapporté l'expression faible des ARNm de Dok-4 et Dok-5 dans les cellules T humaines (Favre *et al.*, 2003; Guittard *et al.*, 2018). Quant à Dok-7, elle est exprimée dans le cœur et dans les muscles squelettiques, plus particulièrement dans les régions postsynaptiques des jonctions neuromusculaires (Okada *et al.*, 2006).

5.2 Structure des protéines Dok

Tous les membres de la famille des Dok partagent une structure similaire (**Figure 1.9**) et qui semble être conservée à travers différentes espèces de vertébrés (Abramson *et al.*, 2003; Di Cristofano *et al.*, 2001; Guittard *et al.*, 2018; Wotton *et al.*, 2008). Cette structure est composée d'un domaine PH (pleckstrin homology) et d'un domaine PTB dans la partie amino-terminale (NH₂-term), et d'une partie C-ter contenant plusieurs tyrosines pouvant être phosphorylées et des motifs riches en proline (Mashima *et al.*, 2009).

Les protéines Dok ne possèdent pas de domaines avec une activité catalytique évidente : leurs activités biologiques sont vraisemblablement attribuées aux activités de leurs partenaires protéiques auxquels elles s'associent *via* leurs différents domaines. Ces molécules adaptatrices régulent différentes voies de signalisation qui sont dictées par leurs partenaires d'interaction. Nous allons nous intéresser aux différents domaines de Dok-1 et Dok-2, qui sont les protéines étudiées dans nos travaux de recherches.

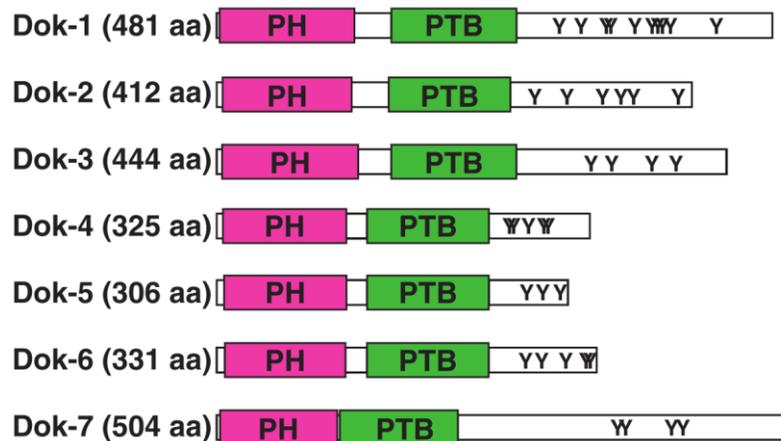


Figure 1.9 : Représentation schématique de la structure des protéines Dok.

Ici le Y désigne les résidus tyrosines dans la partie carboxyterminale. Adaptée de (Mashima *et al.*, 2009).

5.2.1 Le domaine pleckstrin homology (PH) de Dok-1 et Dok-2

Le domaine PH des protéines Dok a une taille approximative de 120 acides aminés. Ces domaines confèrent aux protéines qui les possèdent la capacité de lier des phospholipides et, de ce fait, ils jouent un rôle essentiel dans la localisation et la translocation des protéines aux membranes cellulaires (Lemmon & Ferguson, 2000; Rebecchi & Scarlata, 1998).

À l'état basal, Dok-1 est retrouvée dans le cytosol et à la membrane plasmique, et son recrutement à la membrane plasmique est augmenté suite à certains stimuli (Liang *et al.*, 2002; Nemorin *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001). Le domaine PH permet à Dok-1 d'être phosphorylée par les PTK associées à la membrane (Noguchi *et al.*, 1999). En effet, la perte du domaine PH entraîne alors une perte de la localisation membranaire et de la phosphorylation des tyrosines de Dok-1 par les PTK (Liang *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001). Plus précisément, le domaine PH de Dok-1 est capable de lier de multiples phosphoinositides phosphorylés, comme le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, et le phosphatidylinositol 3,4-triphosphate PI(3,4,5)P₃ (Zhao *et al.*, 2001).

La génération de ces phosphoinositides est dépendante de plusieurs kinases et phosphatases dont SHIP (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase), PTEN (Phosphatase and tensin homolog) ou la PI3K (Lemmon, 2008). D'ailleurs, il a été montré que l'activité de la PI3K est nécessaire au recrutement et à la phosphorylation de Dok-1 à la membrane plasmique, puisque le traitement avec un inhibiteur de la PI3K (wortmannin) des fibroblastes préalablement stimulés par le PDGF inhibe son recrutement (Zhao *et al.*, 2001). L'importance de l'activité PI3K dans la phosphorylation de Dok-1 a été également rapportée dans des érythroblastes stimulées au niveau du récepteur c-Kit (van Dijk *et al.*, 2000).

Il a aussi été montré que le domaine PH de Dok-1 et de Dok-2 lie les phosphatidylinositol monophosphates comme le phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P), PI3P et PI4P dans des cellules T immortalisées et cette liaison semble être impliquée dans la phosphorylation des tyrosines de ces deux molécules adaptatrices (Guittard *et al.*, 2009). Ainsi il semble y avoir un lien plus ou moins direct entre la production des phosphatidylinositols (à savoir PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ et PIP₅) et la phosphorylation et/ou le recrutement des Dok. Néanmoins, la nécessité de la PI3K dans la régulation des protéines Dok ne semble pas être un mécanisme général. En effet, l'engagement de la molécule de costimulation CD28, mutée sur le site YxxM de fixation de la PI3K et donc incapable d'activer PI3K, est toujours capable d'induire la phosphorylation sur les résidus tyrosine de Dok-1 (Klasen *et al.*, 1998).

Enfin, ces différents travaux suggèrent que le domaine PH permet une régulation des protéines Dok-1/-2, puisqu'il est nécessaire à leur recrutement et à leur phosphorylation sur les résidus tyrosine, et que ces deux étapes semblent nécessaires à la fonction de Dok-1/-2.

5.2.2 Le domaine phosphotyrosine-binding (PTB) de Dok-1 et Dok-2

Le domaine PTB est retrouvé dans de nombreuses protéines adaptatrices et il permet les interactions protéines-protéines. Ce domaine interagit généralement avec des courtes séquences peptidiques incluant un motif NPXpY où X désigne un acide aminé quelconque et pY représente une tyrosine phosphorylée (Forman-Kay & Pawson, 1999).

Le domaine PTB de Dok-1 reconnaît des motifs consensus de type NXLPY (Songyang *et al.*, 2001). Cependant, il peut également se lier à des motifs NPXpY (Dunant *et al.*, 2000; Latour *et al.*, 2001; Sattler *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004).

Suite à leur phosphorylation, Dok-1 et Dok-2 peuvent aussi former des homo-oligomères ou des hétéro-oligomères *via* leur domaine PTB. D'ailleurs, cette oligomérisation est fondamentale pour la fonction de Dok-1 et Dok-2 (Boulay *et al.*, 2005; Songyang *et al.*, 2001). Un nombre relativement limité de protéines a été rapporté s'associant avec le domaine PTB de Dok-1/-2/-3 (Mashima *et al.*, 2009). Parmi celles-ci, on retrouve SHIP-1, TCR ζ , CD3 ξ , le récepteur EGF, Dok-1 et Dok-2.

5.2.3 La partie carboxyterminale de Dok-1 et Dok-2

La partie C-ter contient différentes tyrosines qui, une fois phosphorylées, permettent la liaison avec des domaines SH2 (Songyang *et al.*, 2001). La partie C-ter contient aussi des motifs riches en proline permettant la liaison avec un domaine SH3 (Rickles *et al.*, 1994). L'ensemble de ces sites de liaison de protéines cibles va permettre la régulation de différentes fonctions dans les voies de signalisation cellulaires.

De nombreuses protéines interagissent *via* leur domaine SH2 avec les protéines Dok et celles décrites dans des cellules hématopoïétiques sont présentées dans le **Tableau 1.5**. L'interaction la plus étudiée est l'interaction de RasGAP (un inhibiteur de Ras) avec Dok-1 et Dok-2 (Carpino *et al.*, 1997; Di Cristofano *et al.*, 1998; Gugasyan *et al.*, 2002; Jones & Dumont, 1999; Lock *et al.*, 1999; Nelms *et al.*, 1998b; Noguchi *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 2004; Songyang *et al.*, 2001; van Dijk *et al.*, 2000; Wick *et al.*, 2001; Yamanashi & Baltimore, 1997). En effet les tyrosines phosphorylées 295 et 361 dans le cas de Dok-1 murin (Songyang *et al.*, 2001) et les tyrosines phosphorylées 276 et 304 dans le cas de Dok-2 murin (Di Cristofano *et al.*, 1998) contenues dans des motifs YXXP dans la partie C-ter vont être reconnus par les domaines SH2 de RasGAP.

Tableau 1.5 : Protéines interagissant avec la région C-ter des Dok dans les cellules hématopoïétiques.

Protéines Dok	Protéine d'interaction	Type cellulaire	Références
Dok-1	Abl	Lymphocytes T (Mo7e)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Cas	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	Crk	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	CrkL	Mastocytes (RBL-2H3) Lymphocytes T (Mo7e, Jurkat)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003) (Martelli <i>et al.</i> , 2001; van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Fgr	Lymphocytes T (Mo7e)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Hck	Lymphocytes T (Mo7e)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Lyn	Mastocytes (RBL-2H3) Lymphocytes T (Mo7e)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003) (van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Nck	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	p85 PI3K	Lymphocytes T (BI-141)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	PLCy1	Lymphocytes T (BI-141)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	RasGAP	Lymphocytes T (Mo7p210, Mo7e, de PBMC, Jurkat) Mastocytes (RBL-2H3, primaires murin) Macrophages primaires murins	(Carpino <i>et al.</i> , 1997; Gerard <i>et al.</i> , 2004; Rider <i>et al.</i> , 2007; van Dijk <i>et al.</i> , 2000) (Abramson & Pecht, 2002; Abramson <i>et al.</i> , 2003; Hiragun <i>et al.</i> , 2005; Zhang & Phillips, 2006) (Berg <i>et al.</i> , 1999; Shinohara <i>et al.</i> , 2005)
	SHIP-1	Mastocytes (RBL-2H3) Lymphocytes T (Mo7p210, Mo7e, BI-141)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003; Ott <i>et al.</i> , 2002) (Dunant <i>et al.</i> , 2000; van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	SH2D1A	Lymphocytes B (BJAB)	(Sylla <i>et al.</i> , 2000)
	Src	Lymphocytes T (Mo7e)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)
	Tec	Lymphocytes T (Mo7e, Jurkat) et B (Ramos)	(Gerard <i>et al.</i> , 2004; van Dijk <i>et al.</i> , 2000; Yoshida <i>et al.</i> , 2000)
Vav	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)	
Yes	Lymphocytes T (Mo7e)	(van Dijk <i>et al.</i> , 2000)	
Dok-2	Cas	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	Crk	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	CrkL	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	Lyn	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	Nck	Mastocytes (RBL-2H3)	(Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	RasGAP	Lymphocyte T (Mo7p210, BI-141, 32D) et B (BaF/3) Macrophages primaires murins Mastocytes (RBL-2H3, primaires murin)	(Di Cristofano <i>et al.</i> , 1998; Latour <i>et al.</i> , 2001; Lock <i>et al.</i> , 1999; Nelms <i>et al.</i> , 1998b) (Shinohara <i>et al.</i> , 2005) (Abramson <i>et al.</i> , 2003; Zhang & Phillips, 2006)
	SHIP-1	Lymphocyte T (BI-141) Mastocytes (RBL-2H3)	(Latour <i>et al.</i> , 2001) (Abramson <i>et al.</i> , 2003)

RasGAP augmente l'activité GTPasique de Ras et donc elle diminue la forme RasGTP, la forme active de Ras. L'association des protéines Dok à RasGAP va permettre le recrutement de RasGAP à proximité de Ras et ainsi inactiver la voie de signalisation ERK/MAPK (Campbell *et al.*, 1998). Dok-1 et Dok-2 sont effectivement largement reconnus comme des régulateurs négatifs de la voie ERK/MAPK *via* leur association avec RasGAP suite à la stimulation de divers récepteurs de cellules lymphoïdes tels que CD2 (Nemorin *et al.*, 2001), les récepteurs de cellules myéloïdes tels que FcεRI dans les mastocytes (Hiragun *et al.*, 2005) et le TLR4 dans les macrophages (Shinohara *et al.*, 2005).

La reconnaissance des motifs riches en proline dans la région C-ter des Dok par des domaines SH3 est bien moins documentée dans la littérature. Ce type de liaison a seulement été observé pour c-Abl avec Dok-2 (Cong *et al.*, 1999; Master *et al.*, 2003).

5.3 Dok-1 et Dok-2 et fonction de suppresseurs de tumeurs

Dok-1 a été identifiée initialement comme substrat de nombreuses oncoprotéines comme v-src ou v-abl (Ellis *et al.*, 1990). Par la suite, Dok-1 et Dok-2 ont été identifiées comme des molécules hyperphosphorylées dans des cellules de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) contenant l'oncoprotéine Bcr-Abl (Carpino *et al.*, 1997; Di Cristofano *et al.*, 1998; Wisniewski *et al.*, 1994). L'oncoprotéine Bcr-Abl est une kinase chimérique constitutivement active issue d'une translocation t(9;22) (ou chromosome de Philadelphie) aboutissant à la fusion des gènes *Bcr* et *Abl1* (Stam *et al.*, 1987). Le chromosome de Philadelphie est retrouvé chez la majorité des personnes atteintes de la LMC et il est admis que l'oncoprotéine Bcr-Abl est l'agent causatif de la LMC. D'ailleurs, des souris transgéniques exprimant l'oncoprotéine chimérique Bcr-Abl développent la LMC. Il a été observé que les animaux provenant du croisement entre ces souris transgéniques avec des souris déficientes pour les gènes *Dok-1* ou *Dok-2* ont démontré une accélération dans la phase aiguë de la LMC, résultant ainsi en une mort plus rapide de ces souris (Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). Ces travaux ont suggéré que les protéines Dok-1 et Dok-2 ont un rôle suppresseur de tumeur dans ce type de pathologie et qu'elles réguleraient de manière négative l'oncoprotéine Bcr-Abl. Ce rôle est également soutenu par des expériences *in vitro* qui montrent que l'expression de Dok-1 est suffisante pour inhiber la transformation des fibroblastes NIH3T3 induite par l'oncoprotéine c-src (Songyang *et al.*, 2001).

De plus, les souris doublement déficientes pour les gènes *Dok-1* et *Dok-2* (DKO) développent à l'âge de douze mois un syndrome myéloprolifératif assimilé à la LMC et aux

leucémies myélo-monocytaires chroniques (LMMC). Ces souris développent une hyperplasie des précurseurs de la lignée myéloïde mais pas de la lignée lymphoïde autant dans la moelle osseuse que dans la rate (Yasuda *et al.*, 2004). Plus encore, les progéniteurs des macrophages et des granulocytes ont un fort potentiel leucémique puisque le syndrome myéloprolifératif peut être développé chez des souris transplantées avec la moelle osseuse provenant de souris DKO (Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). En périphérie, les cellules CD3⁺ et les cellules B220⁺ ne sont pas altérées dans la rate, ce qui est cohérent avec l'absence de l'altération des précurseurs de la lignée lymphoïde (Coppin *et al.*, 2016; Niki *et al.*, 2004). Il y a par contre une augmentation du nombre des monocytes et des neutrophiles dans le sang périphérique et dans la rate, conduisant ainsi à une splénomégalie (Coppin *et al.*, 2016; Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). La moitié des souris DKO développent un sarcome histiocytaire à l'âge de quinze mois avec des macrophages infiltrant les reins (Yasuda *et al.*, 2004).

Depuis les dix dernières années, le rôle de Dok-1 et Dok-2 en tant que suppresseurs de tumeurs a été rapporté dans d'autres études chez la souris comme dans le cancer de l'ovaire (Mercier *et al.*, 2011) et le cancer du poumon (Berger *et al.*, 2010). De plus, l'absence de Dok-1, Dok-2 et Dok-3 a été associée au développement du sarcome histiocytaire chez la souris, avec des histiocytes infiltrant de nombreux organes, et également au développement de l'inflammation pulmonaire typique de l'asthme (Mashima *et al.*, 2013; Mashima *et al.*, 2010). Enfin, des études suggèrent qu'une régulation à la baisse de l'expression de Dok-1, soit par des mutations dans la séquence du gène ou soit par l'hyperméthylation de son promoteur, est associée à différents cancers chez l'homme comme les tumeurs de poumons, de la tête et du cou, les leucémies lymphoïdes aiguës (lymphome de Burkitt) et les leucémies lymphoïdes chroniques (Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Nelms *et al.*, 1998a; Saulnier *et al.*, 2012).

5.4 Rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le développement des lymphocytes

Récemment, il a été montré que Dok-1 et Dok-2 jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie du compartiment hématopoïétique (Coppin *et al.*, 2016). Bien que dans les cellules myéloïdes, Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont exprimées, il apparaît que l'absence de Dok-1 et Dok-2 est suffisante pour altérer l'hématopoïèse. En effet, Dok-1 et Dok-2 régulent négativement le cycle cellulaire et agissent comme des freins pour maintenir la quiescence des cellules souches hématopoïétiques. L'absence de Dok-1 et Dok-2 a été associée à une augmentation dans l'entrée du cycle cellulaire pour les progéniteurs de la lignée myéloïde.

De plus, plusieurs éléments suggèrent que Dok-1 et Dok-2 sont impliquées dans le développement thymique et qu'elles jouent un rôle négatif dans la maturation des thymocytes. En effet, la surexpression de Dok-2 a altéré la transition des thymocytes du stade CD4⁻CD8⁻ (DN) à CD4⁺CD8⁺ (DP) dans le thymus de souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant Dok-2 (Gugasyan *et al.*, 2002). Cette observation a été également faite avec des souris transgéniques surexprimant Dok-1 sous le contrôle du promoteur de CD2, chez qui on a observé un blocage partiel de la transition de DN à DP dans le thymus (Besin *et al.*, 2012). À l'opposé, en l'absence de Dok-1 et Dok-2, le nombre de thymocytes DP augmente tandis que le nombre de thymocytes DN reste inchangé (Yasuda *et al.*, 2007). Enfin, les thymocytes DP provenant des souris transgéniques surexprimant Dok-1 ont présenté une diminution de la phosphorylation de ZAP-70, de LAT et de PLC γ 1 lors de l'activation du TCR *in vitro* (Besin *et al.*, 2012). Ainsi, la surexpression de Dok-1 inhibe la prolifération des thymocytes, et cette observation pourrait expliquer l'augmentation du nombre des thymocytes DP en l'absence des protéines Dok.

Une récente étude implique également les protéines Dok dans le développement des cellules NK (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Les auteurs rapportent une diminution des cellules NK dans la rate, le sang, le foie et les ganglions lymphatiques provenant de souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Aussi, les souris hétérozygotes, c'est-à-dire exprimant soit Dok-1 ou Dok-2 ont présenté un phénotype intermédiaire suggérant ainsi un effet dose dépendant des Dok sur le nombre de cellules NK en périphérie (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Les souris DKO ont, par contre, présenté une proportion normale de cellules NK dans la moelle osseuse (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Toutefois, elles ont présenté une diminution de la proportion des NK matures tandis que la proportion des NK immatures était augmentée dans la moelle osseuse et en périphérie (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). De plus à l'aide de reconstitution chimérique de souris, les auteurs ont mis en évidence que l'altération de la maturation des cellules NK en l'absence des protéines Dok était due à un défaut intrinsèque des cellules NK et non à l'environnement cellulaire (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014).

5.5 Rôle des protéines Dok dans le système immunitaire

5.5.1 Dok-1 et Dok-2 et fonctions dans les cellules myéloïdes

Les macrophages expriment Dok-1, Dok-2 et Dok-3. Les études réalisées sur des macrophages dérivés de la moelle osseuse issus de souris DKO ont montré une réponse

proliférative plus importante et une survie augmentée en réponse à des cytokines impliquées dans l'hématopoïèse (Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). À l'opposé, la surexpression de Dok-2 dans une lignée de macrophages murins a réduit la prolifération des cellules en réponse à plusieurs cytokines (Suzu *et al.*, 2000). Au niveau intracellulaire, les macrophages provenant des souris DKO présentent une augmentation de l'activation de Ras, de ERK1/2 et de Akt en réponse à la cytokine macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Yasuda *et al.*, 2004). Ainsi, Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs dans les voies de signalisation en aval des récepteurs des cytokines impliquées dans l'hématopoïèse et la prolifération/survie des macrophages.

D'autres voies de signalisation sont modulées par les protéines Dok dans les macrophages, comme la signalisation du TLR4. Dans une étude, le lipopolysaccharide (LPS) est utilisé pour stimuler le TLR4 à la surface des macrophages (Shinohara *et al.*, 2005). Les auteurs ont observé que suite à l'activation des macrophages par le LPS, Dok-1 et Dok-2 sont rapidement phosphorylées et se lient à RasGAP (Shinohara *et al.*, 2005). De plus, des macrophages activés par le LPS provenant de souris déficientes en Dok-1 ou Dok-2 ont démontré une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, de la production en NO et en TNF- α (Shinohara *et al.*, 2005). Les autres MAPK investiguées, comme JNK et p38 et, en aval, NF- κ B, ne sont pas activées en l'absence de Dok-1 ou Dok-2. À l'opposé, la surexpression de Dok-1 ou Dok-2 dans les macrophages diminue l'activation de ERK1/2 et la production de TNF- α en réponse au LPS, et l'effet de Dok-1 sur la signalisation nécessite son interaction avec RasGAP (Shinohara *et al.*, 2005). Quant à Dok-3, il joue également un rôle de régulateur négatif dans la signalisation du TLR4, où il régule négativement l'activation de ERK1/2 et NF- κ B et la production en cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages en réponse au LPS (Liu *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2012).

Une étude plus récente rapporte toutefois que Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs positifs dans les capacités fonctionnelles des macrophages en réponse à l'infection par *Leishmania major* (Alvarez de Celis *et al.*, 2015). En effet, les macrophages dérivés de la moelle osseuse provenant des souris DKO puis infectés par *Leishmania major* ont présenté une diminution de la production en NO et en TNF- α suite à leur stimulation par l'IFN- γ (Alvarez de Celis *et al.*, 2015).

Les mastocytes sont des cellules que l'on retrouve principalement dans les tissus et ils expriment à leur surface le récepteur de haute affinité des IgE, Fc ϵ RI. La stimulation des mastocytes, comme par exemple l'agrégation par des complexes IgE-allergène, va initier une réponse par la sécrétion rapide de granules qui contiennent des médiateurs inflammatoires préformés et la production d'une variété de lipides inflammatoires et de cytokines dérivées de l'acide arachidonique. Au niveau intracellulaire, cette réponse est initiée par l'activation des PTK

de la famille Src, Syk et Lyn, puis par l'activation des voies de signalisation en aval (Gilfillan & Rivera, 2009). Les mastocytes expriment également Dok-1, Dok-2 et Dok-3. Une étude rapporte que Dok-1 se retrouve associée au récepteur FcεRI à l'état basal, et la stimulation des mastocytes conduit à la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 (Abramson *et al.*, 2003). Suite à la stimulation des mastocytes, Dok-1 et Dok-2 se retrouvent aussi associées à de nombreuses protéines dont Lyn, Nck, et RasGAP (Abramson *et al.*, 2003). La surexpression de Dok-1 dans les mastocytes a conduit à une inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2, de Ras, et de la production en TNF-α par les mastocytes lors de l'activation de FcεRI (Abramson *et al.*, 2003). À l'opposé, l'utilisation d'ARN interférant ciblant Dok-1 restaure la phosphorylation d'ERK1/2 et la production de TNF-α (Hiragun *et al.*, 2005). Ainsi, les protéines Dok, du moins Dok-1, sont des régulateurs négatifs de l'activation des mastocytes. La prévention de la dégranulation mastocytaire est un enjeu important dans les allergies. On sait que le traitement des mastocytes avec certains glucocorticoïdes comme la dexaméthasone ou la co-agrégation du récepteur inhibiteur FcγRIIB avec FcεRI inhibe l'activation des mastocytes (Oppong *et al.*, 2013). Cependant, les mécanismes utilisés pour l'inhibition ne sont pas encore clairs. Différentes études suggèrent l'implication de Dok-1 dans l'inhibition induite par le traitement à la dexaméthasone et par la co-agrégation des récepteurs (Hiragun *et al.*, 2005; Kepley *et al.*, 2004; Ott *et al.*, 2002).

5.5.2 Dok-1 et Dok-2 et fonctions dans les cellules NK

Dok-1 et Dok-2 sont phosphorylées dans les cellules NK suite à l'activation des récepteurs activateurs tels que NKp30, NKG2D et des récepteurs inhibiteurs tels que NKG2A (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). La surexpression de Dok-2 dans les cellules NK immortalisées induit une inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt et une inhibition de la production en IFN-γ lors de l'activation du récepteur NKp30, et ces effets nécessitent le domaine PH de Dok-2 (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). La surexpression de Dok-1 ou de Dok-2 dans les cellules NK réduit leur cytotoxicité et le domaine PH est essentiel à cet effet (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). À l'opposé, les cellules NK provenant de la rate de souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 ont présenté une augmentation de la production en IFN-γ, de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt lors de l'activation récepteur NKp46 ou Ly49D (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Toutefois, ces effets sont observés lors d'une activation sous-optimale des récepteurs activateurs. Ainsi, Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de la fonction des cellules NK en aval des récepteurs d'activation.

5.5.3 Dok et fonctions dans les cellules B

La première fonction attribuée aux protéines Dok fut découverte dans les voies de signalisation du récepteur des cellules B (BCR). En effet, Dok-1 est phosphorylée dans les premières étapes suivant l'activation du BCR et se lie à RasGAP, et la phosphorylation de ses tyrosines est dépendante de la PTK Lyn (Yamanashi *et al.*, 2000). De plus, les cellules B provenant de la rate de souris déficientes en Dok-1 ont présenté une augmentation de la phosphorylation de ERK2 en réponse à l'activation du BCR, indiquant que Dok-1 est un régulateur négatif de la signalisation du BCR (Yamanashi *et al.*, 2000).

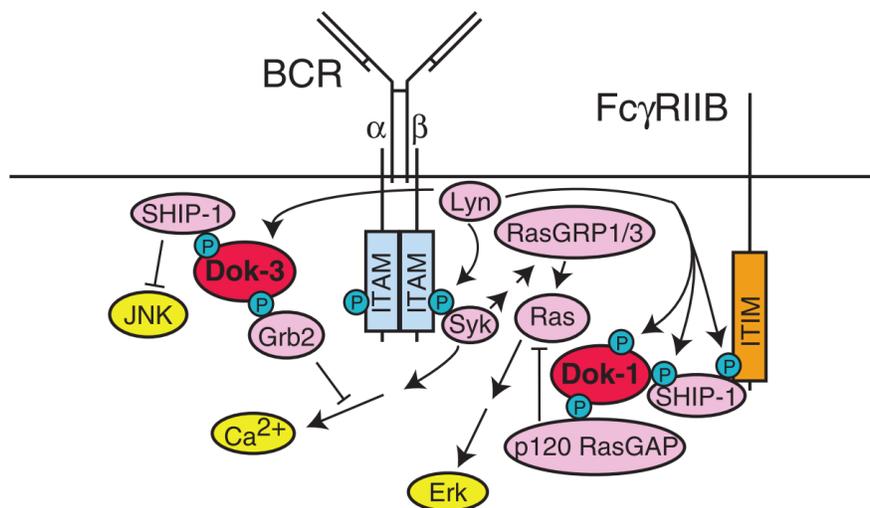


Figure 1.10 : Modèle simplifié impliquant Dok-1 et Dok-3 dans l'inhibition de la signalisation médiée par le BCR et FcγRIIB.

Lors de l'engagement du BCR, la PTK Lyn de la famille Src est activée. Lyn, à son tour, phosphoryle les motifs ITAMs de Ig-α et Ig-β, qui est suivie par le recrutement de Syk aux motifs ITAMs. Cet événement conduit à l'activation de la voie de Ras-Erk *via* RasGRP1 et RasGRP3. L'engagement du BCR induit également la phosphorylation des tyrosines de Dok-1 médiée par Lyn suivie par le recrutement de RasGAP. RasGAP régule à son tour négativement la voie de signalisation Ras-Erk. La co-agrégation de FcγRIIB avec BCR induit la phosphorylation des tyrosines du motif ITIM de FcγRIIB, qui se retrouve associé à SHIP-1. SHIP-1 est alors à son tour phosphorylée sur ses tyrosines et recrute Dok-1. Ce processus induit une phosphorylation robuste de Dok-1 et une forte inhibition de la voie de Ras-Erk. Par ailleurs lors de l'engagement du BCR, Dok-3 est également phosphorylée sur ses tyrosines d'une manière dépendante de Lyn et elle est associée à SHIP-1 et/ou Grb2 qui est suivie de la suppression de l'activation de JNK et/ou de la mobilisation du calcium respectivement. P représente la phosphorylation d'une tyrosine ; BCR, récepteur des cellules B ; PTK, protéine tyrosine kinase ; ITAM, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs ; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; Ig, immunoglobuline ; SHIP, SH2-containing inositol phosphatase. (Mashima *et al.*, 2009).

La signalisation médiée par le récepteur inhibiteur FcγRIIB induit une inhibition des cellules B. En effet, le domaine intracellulaire du récepteur FcγRIIB possède des motifs ITIM

(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Lors de l'activation de ce récepteur, il y a phosphorylation des tyrosines contenues dans ces ITIM qui permettent le recrutement et l'activation de la phosphatase SHIP-1. Comme pour les mastocytes, l'inhibition de la signalisation induite par la stimulation simultanée du BCR et du FcγRIIB semble impliquer Dok-1 (Tamir *et al.*, 2000; Yamanashi *et al.*, 2000). Suite à la co-agrégation des deux récepteurs, il y a phosphorylation de Dok-1 qui s'associe avec RasGAP et Dok-1 est également recrutée au niveau des motifs ITIM de FcγRIIB (Mashima *et al.*, 2009; Tamir *et al.*, 2000). La phosphorylation de Dok-1 et son association avec RasGAP nécessitent l'activation de la phosphatase SHIP-1 médiée par FcγRIIB (Tamir *et al.*, 2000). Les cellules B déficientes en Dok-1 présentent une augmentation de la phosphorylation d'ERK2 comparé aux cellules normales lors de la co-stimulation du BCR et du FcγRIIB (Yamanashi *et al.*, 2000). Cette observation permet de comprendre pourquoi les cellules B déficientes en Dok-1 mais pas les cellules normales ont la capacité de proliférer quand la signalisation induite par le BCR est inhibée par le co-engagement de FcγRIIB (Yamanashi *et al.*, 2000). Ainsi, le recrutement et l'activation de Dok-1 semblent être essentiels à l'inhibition de l'activation du BCR médiée par FcγRIIB (**Figure 1.10**).

En plus de Dok-1, les cellules B expriment Dok-3, qui est également un régulateur négatif de la signalisation du BCR (Ng *et al.*, 2007; Robson *et al.*, 2004; Stork *et al.*, 2007). Néanmoins, il ne s'agit pas d'une redondance de fonction puisque les voies de signalisation ciblées par Dok-1 et Dok-3 sont différentes (**Figure 1.10**). Les souris déficientes en Dok-3 ne présentent pas d'altération dans la génération et la maturation des cellules B (Ng *et al.*, 2007). Toutefois, ces souris présentent une réponse augmentée suite à leur immunisation avec un antigène T-indépendant, avec un taux d'IgM élevé dans leur sérum, mais pas suite à une immunisation avec un antigène T-dépendant (Ng *et al.*, 2007). Lors de l'activation du BCR, les cellules déficientes en Dok-3 présentent une activation augmentée des MAPK JNK et p38, une augmentation plus élevée du calcium intracellulaire et une hyperprolifération (Ng *et al.*, 2007). Par contre, la prolifération cellulaire et le flux calcique ne sont pas affectés par la perte de Dok-1 (Yamanashi *et al.*, 2000). De même, l'activation de ERK1/2 n'est pas affectée en l'absence de Dok-3 (Ng *et al.*, 2007). Ces différences phénotypiques peuvent être attribuées à la différence du mode d'action. En effet Dok-1, mais pas Dok-3, recrute RasGAP qui peut alors inhiber l'activation de Ras et de ERK, alors que Dok-3, mais pas Dok-1, recrute Grb2, qui peut inhiber la signalisation calcique dans les cellules B (Stork *et al.*, 2007). De plus, il a été rapporté que Dok-3 recrute SHIP-1 afin de supprimer l'activation de la MAPK JNK lors de la stimulation du BCR (Robson *et al.*, 2004). En plus de s'associer à SHIP-1, Dok-3 peut atténuer la signalisation du BCR en s'associant à la PTK Csk, qui est un inhibiteur des kinases de la famille Src (Lemay *et al.*, 2000). Toutefois,

ces travaux ne permettent pas d'exclure que Dok-1 et Dok-3 exercent des rôles similaires, puisque des études précédentes rapportent que Dok-3 inhibe l'activation de ERK dans certains types cellulaires (Cong *et al.*, 1999; Honma *et al.*, 2006).

5.5.4 Dok-1 et Dok-2 et fonction dans les cellules T

Dok-1 et Dok-2, mais pas Dok-3, sont préférentiellement exprimées dans les cellules T. Elles sont également rapidement phosphorylées lors de l'engagement du TCR (Dong *et al.*, 2006). L'attribution du rôle de régulateurs négatifs à Dok-1 et Dok-2 dans la signalisation du TCR provient des travaux utilisant des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 (Yasuda *et al.*, 2007). Ces souris ont présenté une augmentation de la réponse IgG suite à l'immunisation avec un antigène T-dépendant, indiquant ainsi que Dok-1 et Dok-2 jouent un rôle négatif dans les réponses immunitaires dépendant des cellules T (Yasuda *et al.*, 2007). De plus, les cellules T CD4⁺ provenant des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 présentent une augmentation de leur prolifération et de leur production en IL-2 et en IFN- γ lors de la stimulation du TCR *in vitro* (Yasuda *et al.*, 2007). Lorsque les auteurs se penchent sur les différents intermédiaires clés de la signalisation du TCR, ils observent que les cellules T CD4⁺ provenant des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 présentent une augmentation de la phosphorylation de ZAP-70, de LAT et d'ERK lors de la stimulation du TCR (Yasuda *et al.*, 2007). Dok-1 et Dok-2 inhibent l'activation de ZAP-70 durant la signalisation médiée par le TCR. Toutefois les mécanismes utilisés ne sont pas clairs. Une autre étude rapporte cette observation. En effet, la diminution de l'expression de Dok-1 et Dok-2 à l'aide d'ARN interférant entraîne lors de la stimulation du TCR une augmentation de l'activation ZAP-70 et de la signalisation en aval à savoir LAT, SLP-76, et PLC- γ 1 (Dong *et al.*, 2006). À l'opposé, la surexpression de Dok-1 ou de Dok-2 entraîne lors de la stimulation du TCR une atténuation de l'activation de ZAP-70, engendrant une baisse de la phosphorylation de LAT et ERK (Yasuda *et al.*, 2007).

Bien que les mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition de l'activation de ZAP-70 par les Dok ne soient pas clairs, ce pourrait être dû à une compétition entre ZAP-70 et Dok pour les sites d'attachement des ITAMs du TCR ζ et de CD3 (**Figure 1.11**). En effet, suite à l'activation du TCR, la phosphorylation des tyrosines des ITAMs permet le recrutement de ZAP-70 qui s'y lie conduisant ainsi à l'activation de ZAP-70 et de la signalisation en aval. Dok-1 et Dok-2 pourraient interférer avec l'activation de ZAP-70 en se liant aux ITAMs phosphorylés et empêchant ainsi la liaison de ZAP-70 aux ITAMs. Cette théorie concorde d'ailleurs avec la réduction de la phosphorylation de ZAP-70 lors de la surexpression des protéines Dok dans les

cellules T (Yasuda *et al.*, 2007). Puisque le domaine PH et le domaine PTB de Dok-1 et Dok-2, mais pas la partie C-ter incluant ses motifs ciblant les domaines SH2, sont nécessaires à la régulation négative de la signalisation du TCR, alors le domaine PTB semble être un bon candidat pour la liaison aux ITAMs phosphorylés (Yasuda *et al.*, 2007). Il a été montré que le domaine PH permet le recrutement des protéines Dok à la membrane plasmique en se liant au PI(5)P (Guittard *et al.*, 2009) tandis que le domaine PTB interagit avec les motifs NQLY et NPDY des ITAMs phosphorylés du TCR ζ et de CD3 (Yasuda *et al.*, 2007). La localisation des protéines Dok à la membrane cellulaire est également soutenue par une autre étude rapportant que la perte du domaine PH bloque les effets de Dok-1 et Dok-2 dans les cellules T (Guittard *et al.*, 2009).

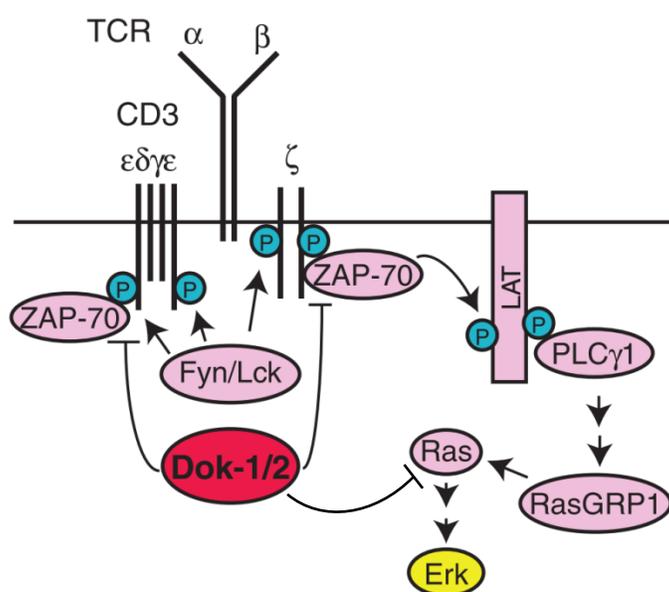


Figure 1.11 : Modèle simplifié impliquant Dok-1 et Dok-2 dans l'inhibition de la signalisation médiée par le TCR.

Lors de l'engagement du TCR, les PTK de la famille Src Fyn et Lck sont activées. Ces kinases, à leur tour, phosphorylent les ITAMs des chaînes du TCR ζ et CD3, suivi alors du recrutement de la PTK ZAP-70 de la famille Syk, qui phosphoryle à son tour LAT. Cet événement conduit à l'activation de la voie de Ras-Erk *via* RasGRP1. Bien que les mécanismes ne soient pas clairs, Dok-1 et Dok-2 inhibent la signalisation du TCR, soit en inhibant l'activation de ZAP-70 par compétition pour la liaison aux ITAMs phosphorylés, et/ou soit en inhibant l'activation de Ras en recrutant RasGAP. P représente la phosphorylation d'une tyrosine ; TCR, récepteur des cellules T ; PTK, protéine tyrosine kinase ; ITAM, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs. Adaptée de (Mashima *et al.*, 2009).

Un autre mécanisme d'inhibition de la signalisation du TCR notamment de la voie Ras-ERK, émane de la capacité de Dok-1 et Dok-2 à interagir avec RasGAP une fois phosphorylées (Nemorin *et al.*, 2001). En effet, le recrutement de RasGAP médié par les protéines Dok à proximité de la protéine Ras pourrait atténuer la signalisation de ERK1/2 lors de l'activation du TCR (**Figure 1.11**).

Dok-1 et Dok-2 font partie d'un complexe protéique formé de SHIP-1, Grb2 et LAT (Dong *et al.*, 2006). SHIP-1 est liée de manière constitutive à Grb2 à l'état basal et l'association entre ces deux protéines est augmentée lors de l'engagement du TCR. De la même manière, SHIP-1 est liée à Dok-2 à l'état basal et la liaison entre Dok-2 et SHIP-1 augmente lors de l'engagement du TCR (Dong *et al.*, 2006). Par l'utilisation d'ARN interférant ciblant LAT ou SHIP-1, cette étude révèle que la phosphorylation de Dok-2 lors de la stimulation du TCR semble dépendre de l'expression de LAT et SHIP-1 dans les cellules T (Dong *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que LAT est lié au complexe protéique de Dok/SHIP-1, et que le complexe multimoléculaire LAT/SHIP-1/Grb2/Dok-2 participe à l'inhibition de ZAP-70 durant l'activation des cellules T (Dong *et al.*, 2006).

L'implication des protéines Dok a été également démontrée dans d'autres voies de signalisation dans les cellules T, comme les voies de signalisation induites par les signaux de co-stimulation. Il a été observé que Dok-1 est rapidement phosphorylée suite à une stimulation du CD28 des cellules T immortalisées (Klasen *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1999). Dok-1 et Dok-2 sont également phosphorylées suite à la stimulation de CD2 (Boulay *et al.*, 2005; Harriague *et al.*, 2000; Nemorin & Duplay, 2000; Nemorin *et al.*, 2001) et la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 nécessite la PTK Lck de la famille Src (Nemorin & Duplay, 2000). La surexpression de Dok-1 ou Dok-2 dans les cellules T a été associée à une diminution de la phosphorylation de la PLC γ 1 et d'ERK1/2, une diminution de la mobilisation du calcium intracellulaire, et une diminution de la sécrétion en IL-2 (Boulay *et al.*, 2005; Nemorin *et al.*, 2001). L'oligomérisation hétérotypique ou homotypique de Dok-1 et Dok-2 est nécessaire à cet effet (Boulay *et al.*, 2005). Ainsi, il apparaît que les protéines Dok sont des régulateurs négatifs de la signalisation médiée par CD2. Cependant, les rôles physiologiques des protéines Dok dans la signalisation de CD2 et CD28 ne sont pas encore compris.

Une autre voie de signalisation induite par un signal de co-stimulation semble impliquer les protéines Dok. Il s'agit de la stimulation médiée par le récepteur à la surface des cellules T signaling lymphocytic activation molecule (SLAM), qui appartient à la superfamille des récepteurs immunoglobulines (Cocks *et al.*, 1995). Une protéine adaptatrice nommée SLAM-associated protein (SAP) se retrouve associée à la région intracytoplasmique de SLAM lorsqu'il est activé (Sayos *et al.*, 1998). L'absence ou la dysfonction de SAP cause le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X, caractérisé par une réponse immunitaire inappropriée contre l'EBV. Il a été observé que suite à l'activation de SLAM, Dok-1 et Dok-2 sont phosphorylées, et leur phosphorylation dépend de SAP et de la PTK Fyn (Latour *et al.*, 2001). En effet, suite à l'activation

de SLAM, SAP se retrouve associée aux tyrosines phosphorylées du récepteur et permet le recrutement et l'activation de la PTK Fyn, qui va permettre à son tour effectuer la phosphorylation de Dok-1, Dok-2, SHIP et, dans une moindre mesure Shc (Latour *et al.*, 2001). Plus précisément, SHIP va s'associer avec les tyrosines phosphorylées de SLAM et puisque SHIP lie les domaines PTB des protéines Dok et Shc, elle permet alors le rapprochement des protéines Dok et Shc avec la PTK Fyn qui les phosphoryle (Latour *et al.*, 2001). Il a été observé aussi que suite à l'activation de SLAM, les protéines Dok se lient à RasGAP *via* leurs tyrosines phosphorylées et le domaine SH2 de RasGAP (Latour *et al.*, 2001). Bien que les rôles physiologiques des protéines Dok dans la signalisation médiée par SLAM ne soient pas encore clairs, ces protéines peuvent recruter RasGAP et potentiellement inhiber la voie Ras et Erk en aval de la signalisation de SLAM (Latour *et al.*, 2001).

Un rôle supplémentaire a été attribué aux protéines Dok dans la voie de signalisation en aval du récepteur de chimiokine CXCR4 et de son ligand SDF-1 α /CXCL12 (Okabe *et al.*, 2005). Les chimiokines jouent un rôle central dans la migration et le chimiotactisme des cellules T. La stimulation des cellules T Jurkat par la chimiokine SDF-1 α /CXCL12 induit la phosphorylation des tyrosines de Dok-1 médiée par la PTK Lck et l'association de Dok-1 avec RasGAP et d'autres protéines adaptatrices telles que Crk-L et Nck (Okabe *et al.*, 2005). Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ provenant de la rate de souris déficientes en Dok-1 ont présenté un chimiotactisme élevé en réponse à la chimiokine SDF-1 α /CXCL12 (Okabe *et al.*, 2005). À l'opposé, bien que ce soit dans des fibroblastes primaires ou une lignée de cellules B, la surexpression de Dok-1 a réduit le chimiotactisme en réponse au SDF-1 α /CXCL12 et la diminution de la phosphorylation d'ERK (Okabe *et al.*, 2005).

Les voies de signalisation dans les lymphocytes ou les cellules myéloïdes mentionnées jusqu'à présent suggèrent que les protéines Dok exercent seulement une régulation négative. Toutefois, une étude rapporte un rôle positif de Dok-1 dans la signalisation de l'IL-4 (Inoue *et al.*, 2007). Les cellules T CD4⁺ ainsi que les cellules B issues de la rate de souris déficientes en Dok-1 ont présenté une diminution de la prolifération en réponse à l'IL-4. À l'opposé, la surexpression de Dok-1 dans une lignée cellulaire myéloïde a augmenté la prolifération des cellules en réponse à l'IL-4, indiquant ainsi un rôle positif de Dok-1 dans la signalisation en aval du récepteur à l'IL-4 (Inoue *et al.*, 2007). La signalisation en aval de l'IL-4 implique l'activation de deux protéines cytoplasmiques importantes pour la prolifération des cellules : il s'agit de signal transducer and activator of transcription (Stat)-6 et insulin receptor substrate (IRS)-2, cette dernière molécule conduisant à l'activation de PI3K/Akt. On a observé que la phosphorylation de Stat6 en réponse

à l'IL-4 est diminuée dans les splénocytes provenant des souris déficientes en Dok-1 (Inoue *et al.*, 2007).

5.6 Implication de Dok-1 et Dok-2 dans le contrôle des infections

Au moment de débiter nos travaux, aucune n'étude n'avait investigué le rôle de Dok-1 et Dok-2 lors d'une infection *in vivo*. Comme décrit précédemment, en tant que régulateurs en réponse à différents récepteurs, l'implication des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le contrôle d'une infection est très probable. Toutefois, au cours de nos travaux, les études suivantes ont été publiées et ont montré l'importance des Dok dans l'infection.

Les souris déficientes en Dok-1 ou Dok-2 présentent une hypersensibilité accrue suite à une injection intrapéritonéale de l'endotoxine LPS (Shinohara *et al.*, 2005). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une infection, le LPS peut causer un choc septique fatal qui peut se produire suite à une infection par des bactéries à Gram négatif. Dans cette étude, les auteurs démontrent que Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de ERK1/2 dans la signalisation en aval du TLR4 dans les macrophages. Tandis que 90% des souris de type sauvage survivent à l'injection de LPS, 90% des souris déficientes en Dok-1 ou Dok-2 décèdent dans les trois jours suivant l'injection de LPS et elles présentent des taux de TNF- α dans leur sérum trois à quatre fois plus élevés que les souris de type sauvage une heure après l'injection (Shinohara *et al.*, 2005). Ainsi Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de l'immunité innée, du moins dans la réponse inflammatoire au LPS *in vivo*.

Suite à l'infection par *Leishmania major in vitro*, les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris DKO présentent une diminution de la production en TNF- α et NO comparativement aux macrophages issus de souris WT (Alvarez de Celis *et al.*, 2015). De plus, la capacité du parasite à cliver les protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 par l'intermédiaire de sa métalloprotéase GP63 a retenu notre attention (Alvarez de Celis *et al.*, 2015). Bien que les répercussions de ce clivage ne soient pas encore déterminées, le fait que les protéines Dok soient ciblées lors d'une infection suggère qu'elles jouent un rôle non négligeable lors d'une l'infection.

Dans une autre étude, les souris DKO ont été infectées par le cytomégalovirus murin, qui est un *Betaherpersvirus* et dont le contrôle de l'infection nécessite les cellules NK et leurs fonctions effectrices (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). Il a été observé que le contrôle de la réplication virale a été retardé chez les souris DKO. Bien que les auteurs aient montré que les protéines Dok sont des régulateurs négatifs de la fonction des cellules NK lors de l'activation sous optimale des

récepteurs activateurs *in vitro*, ils n'ont pas observé une différence dans les réponses antivirales (IFN- γ et granzyme B) des cellules NK de la rate des souris DKO suite à l'infection (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014). La proportion des cellules NK globale recrutée dans la rate durant l'infection des souris DKO est similaire aux souris de type sauvage. Néanmoins, la proportion des cellules NK matures est diminuée et pourrait être à l'origine du retard du contrôle de la réplication virale (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014).

Enfin, une étude menée dans le laboratoire de Pascale Duplay en parallèle de mon projet de thèse a évalué l'impact de Dok-1 et Dok-2 dans l'infection par le virus de la vaccine exprimant le peptide ova₂₅₇₋₂₆₄ (VV-ova) par l'utilisation d'un modèle de transfert adoptif de cellules T CD8⁺ naïves isolées de souris C57BL/6 OTI WT ou OTI DKO dans des souris sauvages puis infectées par voie intra-veineuse (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). L'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence un défaut dans l'expansion des cellules T CD8⁺ spécifiques à l'épitope ova exprimé par VV et dans la formation des cellules mémoires en l'absence des protéines Dok et que ce défauts était intrinsèque aux cellules T (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). De plus, les cellules T CD8⁺ OTI DKO effectrices n'ont pas présenté de défaut dans la prolifération suite à l'infection par VV-ova, ni au niveau de l'induction de leur apoptose lors de la phase d'expansion (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Par ailleurs, les auteurs ont aussi observé que l'expression des protéines Dok est régulée lors de l'activation des cellules T CD8⁺ primaires *ex vivo* (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). En effet, suite à la stimulation antigénique des cellules T CD8⁺ effectrices, une diminution sélective de la quantité protéique de Dok-2 mais pas de Dok-1 a été observée, et l'expression de la protéine Dok-2 retourne à l'état basal dans les cellules T CD8⁺ mémoires. Les auteurs ont donc conclu qu'au cours d'une infection, le retour de l'expression à l'état basal de Dok-2 est probablement nécessaire pour prévenir l'activation excessive des cellules T et maintenir la survie des cellules T mémoires.

6 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHES

Dok-1 et Dok-2 sont des régulateurs négatifs de différentes fonctions dans les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T. Nous avons donc testé l'impact de Dok-1 et Dok-2 dans l'infection par le VHS-1. Or, la réponse immunitaire cellulaire est critique dans l'infection par le VHS-1. Le modèle d'infection utilisée dans cette étude est un modèle murin d'infection oculaire qui récapitule l'infection aiguë dans les muqueuses, l'infection neuronale dans les TG, l'établissement de la latence et la capacité du virus latent à se réactiver. Nous avons émis l'hypothèse que Dok-1 et Dok-2 modulent la réponse immunitaire anti-VHS-1. Afin de tester notre hypothèse, nous avons travaillé avec des souris C57BL/6 de type sauvage (WT) et des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 (Dok-1^{-/-}Dok-2^{-/-} nommées DKO). Nous avons évalué différents aspects en comparant les souris WT et DKO :

- a. Le premier objectif était d'étudier l'implication des protéines Dok dans la réplication aiguë du VHS-1.
- b. Le second objectif était de déterminer le rôle des protéines Dok dans la réponse immune suite à l'infection par le VHS-1.
- c. Le troisième objectif était d'évaluer l'impact des protéines Dok sur la réactivation *ex vivo* du VHS-1.

La seconde partie de mon projet de doctorat était basée sur différentes études qui rapportent la capacité du VHS-1 à induire la phosphorylation de nombreuses protéines cellulaires ou virales et à inhiber les fonctions effectrices des lymphocytes T afin d'échapper au système immunitaire. Le VHS-1 inactive la signalisation du TCR en ciblant différents éléments, comme la diminution de la phosphorylation de LAT et l'inhibition de la phosphorylation d'ERK lors de l'engagement du TCR. Puisque les protéines Dok-1 et Dok-2 régulent négativement la signalisation du TCR en amont de la voie de signalisation ERK, nous avons testé si le VHS-1 module les protéines Dok-1 et Dok-2. Nous avons émis l'hypothèse que le VHS-1 cible les protéines Dok dans les lymphocytes T et que ce processus représente un mécanisme d'évasion immunitaire. Ainsi nos objectifs ont été :

- a. De déterminer si les protéines Dok sont ciblées par le VHS-1 dans les cellules T.
- b. De déterminer les facteurs viraux qui régulent les protéines Dok durant l'infection des cellules T par le VHS-1.

CHAPITRE 2 :
PREMIÈRE PUBLICATION

Dok-1 and Dok-2 are required to maintain herpes simplex virus 1-specific CD8⁺ T cells in a murine model of ocular infection

doi : 10.1128/JVI.02297-16

Soumia Lahmidi, Mitra Yousefi*, Slimane Dridi, Pascale Duplay, Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

** Present address: Mitra Yousefi, McGill University, Department of Microbiology and Immunology, Montreal, Quebec, Canada.*

P.D. and A.P. are co-senior authors.

Résumé

Dok-1 et Dok-2 régulent négativement les réponses en aval de plusieurs récepteurs immunitaires dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Des récents rapports ont montré que les protéines Dok sont essentielles pour la formation de lymphocytes T CD8⁺ mémoire à un épitope exogène exprimé par le virus de la vaccine ; toutefois l'importance de Dok-1 et Dok-2 dans le contrôle de l'infection virale est inconnue. Dans cette étude, nous avons évalué le rôle des protéines Dok dans la modulation de la réponse immunitaire contre le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) dans un modèle murin d'infection oculaire. Au cours de l'infection aiguë, les titres viraux sur le site oculaire étaient similaires chez les souris sauvages (WT) et celles déficientes en Dok-1 et Dok-2 (DKO), et les pourcentages de leucocytes infiltrant étaient similaires dans les cornées et les ganglions trigéminaux (TG) des souris DKO et WT. Lors de l'infection aiguë, les souris DKO ont présenté une diminution de la réponse T CD8⁺ dirigée contre l'épitope immunodominant de la glycoprotéine B (gB) du VHS-1 dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants comparativement aux souris WT. Plus encore, les cellules T CD8⁺ spécifiques à gB ont presque complètement disparu dans les rates des souris DKO pendant la latence virale, et la réduction des cellules T CD8⁺ effectrices mémoires (T_{EM}) était plus sévère que celle des cellules T CD8⁺ mémoires centrales (T_{CM}). Le pourcentage de cellules T CD8⁺ spécifiques à gB dans les TG pendant la latence a été significativement réduit chez les souris DKO ; toutefois ces cellules étaient phénotypiquement similaires à celles des souris WT. Dans des essais *ex vivo*, la réactivation du VHS-1 a été détectée plus tôt dans des cultures de TG provenant des souris DKO infectées de manière latente comparativement aux TG WT. Ainsi, Dok-1 et Dok-2 favorisent la survie des cellules T CD8⁺ spécifiques à gB dans les TG infectés de manière latente par le VHS-1.

Contribution des auteurs

Soumia Lahmidi : Conception et réalisation des manipulations, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

Mitra Yousefi : Génération des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 (DKO).

Slimane Dridi : Évaluation de la réactivation virale *ex vivo* à l'aveugle. Participation dans les manipulations pour les analyses des cellules en cytométrie.

Pascale Duplay : Conception des expériences. Révision et correction du manuscrit.

Angela Pearson : Conception des expériences. Révision et correction du manuscrit.



Dok-1 and Dok-2 Are Required To Maintain Herpes Simplex Virus 1-Specific CD8⁺ T Cells in a Murine Model of Ocular Infection

Soumia Lahmidi, Mitra Yousefi,* Slimane Dridi, Pascale Duplay, Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

ABSTRACT Dok-1 and Dok-2 negatively regulate responses downstream of several immune receptors in lymphoid and myeloid cells. Recent evidence showed that Dok proteins are essential in the formation of memory CD8⁺ T cells to an exogenous epitope expressed by vaccinia virus; however, the importance of Dok-1 and Dok-2 in the control of viral infection is unknown. Here, we investigated the role of Dok proteins in modulating the immune response against herpes simplex virus 1 (HSV-1) in a mouse model of ocular infection. During acute infection, viral titers in the eye were similar in wild-type (WT) and Dok-1 and Dok-2 double-knockout (DKO) mice, and the percentages of infiltrating leukocytes were similar in DKO and WT corneas and trigeminal ganglia (TG). DKO mice exhibited a diminished CD8⁺ T cell response to the immunodominant HSV-1 glycoprotein B (gB) epitope in the spleen and draining lymph nodes compared to WT mice during acute infection. Remarkably, gB-specific CD8⁺ T cells almost completely disappeared in the spleens of DKO mice during latency, and the reduction of CD8⁺ effector memory T (Tem) cells was more severe than that of CD8⁺ central memory T (Tcm) cells. The percentage of gB-specific CD8⁺ T cells in TG during latency was also dramatically reduced in DKO mice; however, they were phenotypically similar to those from WT mice. In *ex vivo* assays, reactivation was detected earlier in TG cultures from infected DKO versus WT mice. Thus, Dok-1 and Dok-2 promote survival of gB-specific CD8⁺ T cells in TG latently infected with HSV-1.

IMPORTANCE HSV-1 establishes lifelong latency in sensory neurons of trigeminal ganglia (TG). In humans, HSV-1 is able to sporadically reactivate from latently infected neurons and establish a lytic infection at a site to which the neurons project. Most herpetic disease in humans is due to reactivation of HSV-1 from latency rather than to primary acute infection. CD8⁺ T cells are thought to play an important role in controlling recurrent infections. In this study, we examined the involvement of Dok-1 and Dok-2 signaling proteins in the control of HSV-1 infection. We provide evidence that Dok proteins are required to maintain a CD8⁺ T cell response against HSV-1 during latency—especially CD8⁺ Tem cells—and that they negatively affect HSV-1 reactivation from latency. Elucidating Dok-mediated mechanisms involved in the control of HSV-1 reactivation from latency might contribute to the development of therapeutic strategies to prevent recurrent HSV-1-induced pathology.

KEYWORDS CD8⁺ T cell, T cell immunity, Dok proteins, herpes simplex virus, herpesviruses, viral pathogenesis

Following experimental corneal infection of C57BL/6 (B6) mice, herpes simplex virus 1 (HSV-1) replicates in epithelial cells and then spreads to the trigeminal ganglia (TG) via nerve termini, where it replicates but then ultimately establishes latency in neurons (1). In humans, reactivation of HSV-1 can lead to recurrent lesions on labial

Received 30 November 2016 Accepted 2 May 2017

Accepted manuscript posted online 10 May 2017

Citation Lahmidi S, Yousefi M, Dridi S, Duplay P, Pearson A. 2017. Dok-1 and Dok-2 are required to maintain herpes simplex virus 1-specific CD8⁺ T cells in a murine model of ocular infection. *J Virol* 91:e02297-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02297-16>.

Editor Jae U. Jung, University of Southern California

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

Address correspondence to Pascale Duplay, pascale.duplay@iaf.inrs.ca, or Angela Pearson, angela.pearson@iaf.inrs.ca.

* Present address: Mitra Yousefi, McGill University, Department of Microbiology and Immunology, Montreal, Quebec, Canada. P.D. and A.P. are co-senior authors.

mucosa and on the cornea, among other sites, and is associated with HSV-1 stromal keratitis, which can lead to blindness (2).

Cell-mediated immunity plays a critical role in limiting viral replication and spread in TG and cornea through the action of cells such as macrophages (3–6), NK cells (7), NKT cells (8), neutrophils (9), and $\gamma\delta$ T cells (10). In addition, both CD4⁺ and CD8⁺ T cell-mediated immune responses are involved in protection against primary HSV-1 infection (11–14). The majority of HSV-1-specific CD8⁺ T cells in lymphoid organs during acute infection of B6 mice are directed against a single immunodominant glycoprotein B (gB) epitope (15, 16). During acute infection in an ocular model, HSV-1-specific CD8⁺ T cells infiltrate sites of infection, namely, the cornea and TG, and promote viral clearance (17). A proportion of HSV-1-specific CD8⁺ T cells reside in the TG for the life of the animal and are necessary for the maintenance of HSV-1 latency. TG-resident HSV-1-specific CD8⁺ T cells display an activated phenotype, form close contacts with infected neurons (18–20), remain functional (21), and are tissue-resident memory-type cells (22, 23). In *ex vivo* viral-reactivation assays, depletion of CD8⁺ T cells from TG cultures increases reactivation frequency, and CD8⁺ T cells inhibit reactivation of HSV-1 from latency (24, 25).

Dok-1 and Dok-2, two members of the Dok protein family, are preferentially expressed in hematopoietic cells and are involved in the negative regulation of signaling downstream of a variety of immunoreceptors, such as B cell receptor (BCR), T cell receptor (TCR), Fc receptor (FcR), and Toll-like receptor (TLR) (reviewed in references 26, 27, and 28). T cells and myeloid cells express Dok-1 and Dok-2, while B cells express only Dok-1 (28). These two closely related Dok family members are involved in the regulation of several cellular processes, such as proliferation, differentiation, and migration. Using Dok-1- and -2 (Dok-1/2)-deficient mice, biological roles for Dok-1 and Dok-2 have been demonstrated in antibody responses to thymus-dependent antigens, NK and hematopoietic cell development and function, innate immune response to lipopolysaccharide (LPS), myeloid homeostasis, and leukemia suppression (29–36). In addition, we recently demonstrated that Dok proteins regulate the CD8⁺ T cell response to an exogenous epitope expressed by vaccinia virus (VV) (37). In particular, we showed that Dok proteins negatively regulate the effector function of CD8⁺ effector T cells and play a critical role in the generation of CD8⁺ memory T cells (37). As mentioned above, during HSV-1 infection, CD8⁺ T cells are important in controlling the infection, in particular in maintaining HSV-1 latency (24, 25). In this study, we investigated the impact of Dok-1 and Dok-2 proteins in a model of HSV-1 ocular infection by comparing viral clearance, periocular virus-induced disease, and the HSV-1 gB-specific CD8⁺ T cell response in wild-type (WT) and Dok-1- and Dok-2-deficient mice. Our data demonstrate that Dok proteins positively control the amplitude of the gB-specific CD8⁺ T cell response during both the acute and latent phases of HSV-1 infection and are particularly important for the survival of effector memory T (Tem) cells.

RESULTS

Dok proteins are not necessary for the control of HSV-1 replication in the cornea and TG during acute infection. We tested the functional importance of Dok-1 and Dok-2 for viral replication during acute HSV-1 infection using a murine model of ocular infection. Dok-1 and Dok-2 double-knockout (DKO) mice and WT control C57BL/6 mice (referred to here as WT mice) were infected with HSV-1 strain 17, and viral titers in the eye and TG were measured. We observed similar titers in the tear films of DKO and WT mice at 1, 2, and 3 days postinfection (dpi) (Fig. 1A). Similar results were obtained on a different genetic background than C57BL/6 mice, comparing 129/Sv WT and 129/Sv DKO mice (data not shown). At 3 dpi, viral titers in TG for DKO compared to WT mice were of the same magnitude, although we noted a modest reduction (approximately 3-fold lower) for the DKO samples (Fig. 1B). Furthermore, the kinetics of viral clearance in the eyes, monitored from 2 to 8 dpi, were similar for WT and DKO mice (data not shown). Thus, our results show that Dok-1 and Dok-2 are not essential for the control of HSV-1 replication during acute infection.

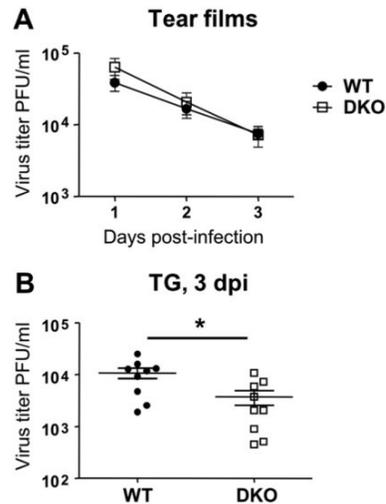


FIG 1 Impact of Dok proteins on the control of acute HSV-1 replication in the cornea and TG. Shown is quantification of virus titers during acute HSV-1 infection in DKO mice and WT mice. (A) Titers of virus present in tear films of mice 1 to 3 dpi. The data shown were pooled from three independent experiments ($n = 11$ mice). (B) Titers of virus present in the TG at 3 dpi. The data are from four independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test (*, $P < 0.05$). The results are shown as means \pm SEM.

HSV-1-induced clinical signs are not mediated by Dok proteins. To assess the involvement of Dok-1 and Dok-2 in HSV-induced pathology, we scored in a blinded manner for the severity of disease by daily visual inspection from 4 dpi, when clinical signs begin to appear, to 18 dpi. Following HSV-1 infection, DKO mice developed progressive clinical disease that was similar in kinetics to that observed in WT mice (Fig. 2). Although clinical signs were evident in DKO infected mice, we noted a slight reduction in severity compared to WT mice. There were statistically significant reductions of scores for the DKO mice compared to WT mice at 6 and 7 dpi, although the differences were very small (2.0 versus 2.5 at 6 dpi and 2.1 versus 2.7 at 7 dpi), and inflammatory responses resolved by day 16 in both WT and DKO animals. The influx of innate and adaptive immune cells in the cornea influences early control of the infection and virus-induced inflammation (38, 39). The total numbers of leukocytes (CD45⁺ cells) infiltrating the corneas and TG of DKO and WT mice at 3 and 8 dpi were similar (Fig. 3B and C). Furthermore, after normalizing each cellular subpopulation to the percentage

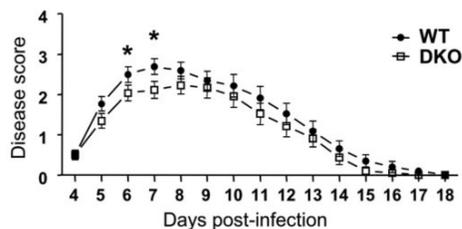


FIG 2 The absence of Dok proteins does not alter overall periocular HSV-induced inflammation. Following infection of WT and DKO mice, the mean disease score, as determined on a scale of 0 to 4, was assessed each day from 4 to 18 dpi. The graph shows the average scores from data pooled over four independent experiments ($n = 26$). The value indicated for each day is the mean of the values obtained for each animal analyzed on that day postinfection. Statistical analysis was carried out to compare values two by two for WT versus DKO mice at each day using a Mann-Whitney test (*, $P < 0.05$). The results are shown as means \pm SEM.

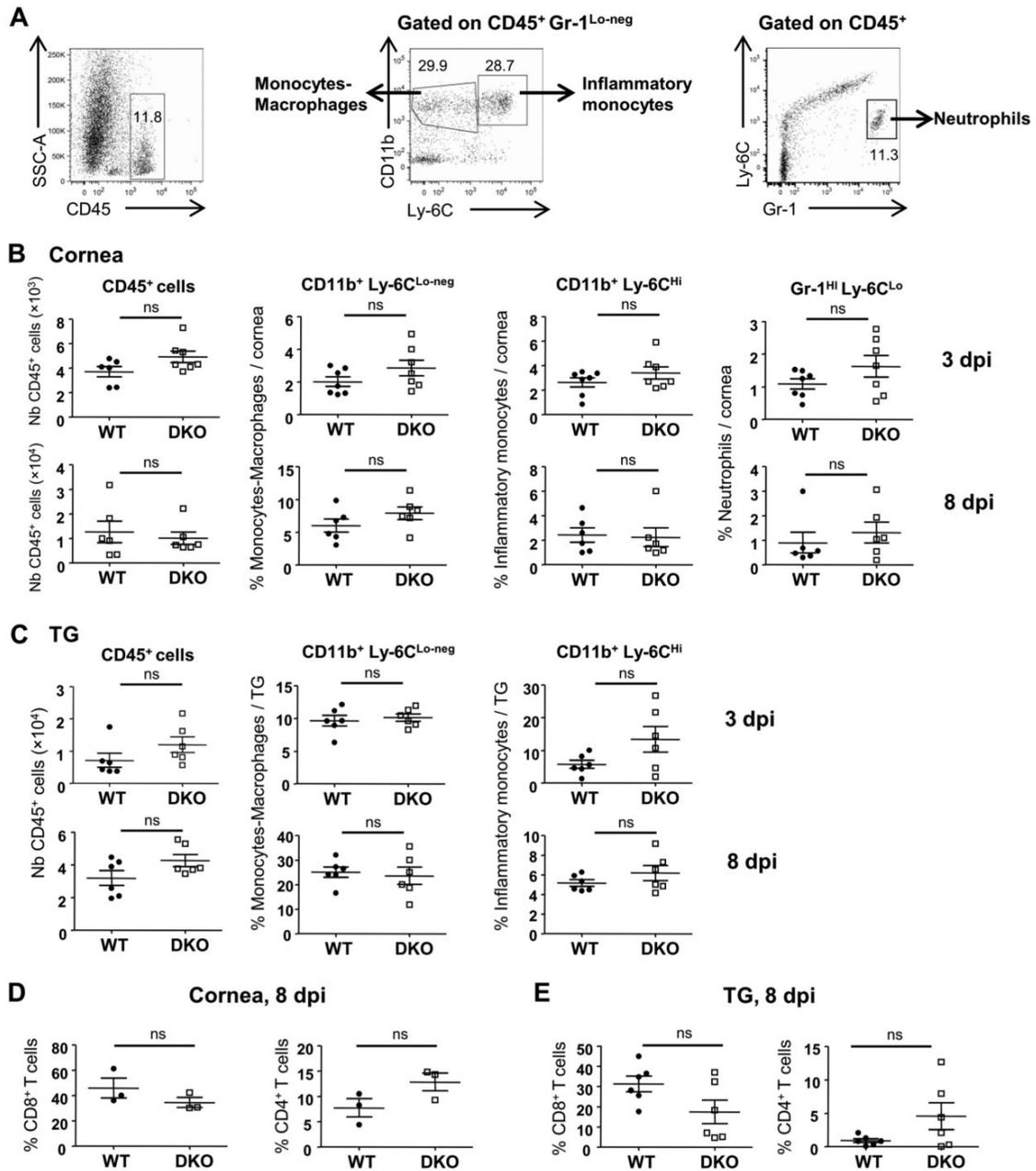


FIG 3 Dok proteins do not regulate the influx of leukocytes into the cornea and TG during acute infection. (A) Representative gating strategies for leukocyte characterization in the cornea and TG. Live cells from WT cornea at 3 dpi were gated for expression of CD45⁺ to identify total leukocytes; CD45⁺ Gr-1^{Lo-neg} cells were gated for coexpression of CD11b⁺ Ly-6C^{Lo-neg} and CD11b⁺ Ly-6C^{Hi} to identify monocytes/macrophages and inflammatory monocytes, respectively; and CD45⁺ cells were gated for coexpression of Gr-1^{Hi} and Ly-6C^{Lo} to identify neutrophils. (B) Total numbers (Nb) of leukocytes (CD45⁺) and the percentages of monocytes/macrophages (CD11b⁺ Ly-6C^{Lo-neg}), inflammatory monocytes (CD11b⁺ Ly-6C^{Hi}), and neutrophils (Gr-1^{Hi} and Ly-6C^{Lo}) among CD45⁺ cells in corneas at 3 and 8 dpi. (C) Total numbers of leukocytes (CD45⁺) and percentages of monocytes/macrophages (CD11b⁺ Ly-6C^{Lo-neg}) and inflammatory monocytes (CD11b⁺ Ly-6C^{Hi}) among CD45⁺ cells in TG at 3 and 8 dpi. (B and C) Each symbol represents one mouse, where the two eyeballs (B) or two TG (C) were pooled prior to analysis. (D and E) Percentages of total CD8⁺ and CD4⁺ T cells among CD45⁺ cells in the cornea (D) and TG (E) at 8 dpi. The data shown represent the pooled results from three independent experiments, and each symbol represents two mice (D) or one mouse (E). Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test. ns, not significant. The results are shown as means ± SEM.

of CD45⁺ cells, we found similar percentages of inflammatory monocytes and monocytes/macrophages infiltrating in corneas and TG for DKO and WT mice at 3 and 8 dpi (Fig. 3A to C). The percentages of neutrophils were also similar in corneas of DKO and WT mice at 3 and 8 dpi (Fig. 3B). In addition, the numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in corneas and TG of DKO and WT mice at 8 dpi were similar (Fig. 3D and E). Together, these results suggest that early during infection, the absence of Dok proteins does not have a major impact on the overall periocular HSV-induced inflammation or on leukocyte influx in the cornea.

Dok proteins positively regulate the HSV-1-specific CD8⁺ T cell response in the spleen and draining lymph nodes. We tested the importance of Dok proteins in the expansion of HSV-1-specific CD8⁺ T cells. At 8 dpi, which corresponds to the peak of the response in WT B6 mice (40), the number of HSV-1-specific CD8⁺ T cells was assessed using H2K^b gB tetramers corresponding to the immunodominant HSV-1 epitope (15). DKO mice exhibited a significant decrease in the absolute numbers and percentages of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen (4-fold lower in absolute numbers) and draining lymph nodes (dLN) (approximately 2-fold lower in absolute numbers) compared to WT mice (Fig. 4A to C). This decrease was not due to a reduction of total CD8⁺ T cells in the spleen or dLN because the absolute CD8⁺ T cell numbers were similar in DKO and WT mice (data not shown). WT and Dok-1 or Dok-2 single-KO mice exhibited similar absolute numbers of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen at 8 dpi (data not shown). These results are consistent with previous studies that showed redundant functions for Dok-1 and Dok-2 (34). We next assessed the gB-specific CD8⁺ T cell response in the spleen at a time corresponding to a latent infection. At 43 dpi, the absolute number and percentage of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen were significantly reduced in DKO mice compared to WT mice (Fig. 4D). Moreover, the number of gB-specific CD8⁺ T cells in DKO mice was below the level of detection, producing values similar to those corresponding to background nonspecific tetramer staining. Thus, our data demonstrate that Dok-1 and Dok-2 proteins are critical for the maintenance of gB-specific memory CD8⁺ T cells in the spleen.

Dok proteins do not regulate the proportion of effectors and memory CD8⁺ T cell precursors or the functional abilities of gB-specific CD8⁺ T cells at the effector phase. We examined if the disappearance of gB-specific CD8⁺ T cells in DKO mice was due to an inability of gB-specific CD8⁺ T cells to differentiate into memory precursor effector cells (MPECs). To address this question, we assessed the proportions of short-lived effector cells (SLECs) and MPECs by evaluating expression of KLRG1 and CD127 on gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen at 8 dpi. The proportion of SLECs (KLRG1^{hi} CD127^{lo}) and the proportion of MPECs (KLRG1^{lo} CD127^{hi}) were similar in DKO and WT mice (Fig. 5A), suggesting that Dok-1 and Dok-2 do not modulate the proportions of effector and memory CD8⁺ T cell precursors.

To determine if the functional capacity of splenocytes from infected DKO mice was altered, we examined gamma interferon (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and granzyme B (GrzB) synthesis in response to stimulation *ex vivo* with a peptide corresponding to the HSV-1 gB epitope in the presence of anti-CD107a monoclonal antibody (MAb) (to detect lytic-granule release). Since there were fewer gB-specific CD8⁺ T cells in DKO mice, we normalized the IFN- γ /TNF- α secretion (IFN- γ ^{hi} TNF- α ^{hi} cells) or cytotoxic response (GrzB^{hi} CD107a^{hi}) to the numbers of tetramer⁺ (Tet⁺) CD8⁺ cells present in the spleens of DKO and WT mice. While we observed a small decrease in the relative numbers of IFN- γ ^{hi} TNF- α ^{hi} cells and in the relative cytotoxic response of gB-specific CD8⁺ T cells in DKO mice compared to those in WT mice, the differences were not significant (Fig. 5B and C). Although our evidence suggests that the Dok-1 and Dok-2 proteins do not modulate the functional abilities of gB-specific CD8⁺ T cells, given the trend we observed, we cannot completely rule out this possibility.

Dok proteins regulate the number of gB-specific CD8⁺ Tem cells in the spleen. It was possible that HSV-1 infection resulted in the generation of CD8⁺ T cells with different abilities to survive and to respond to antigen after the effector phase. To address this possibility, we compared the memory phenotype (CD44^{high} CD62L⁻

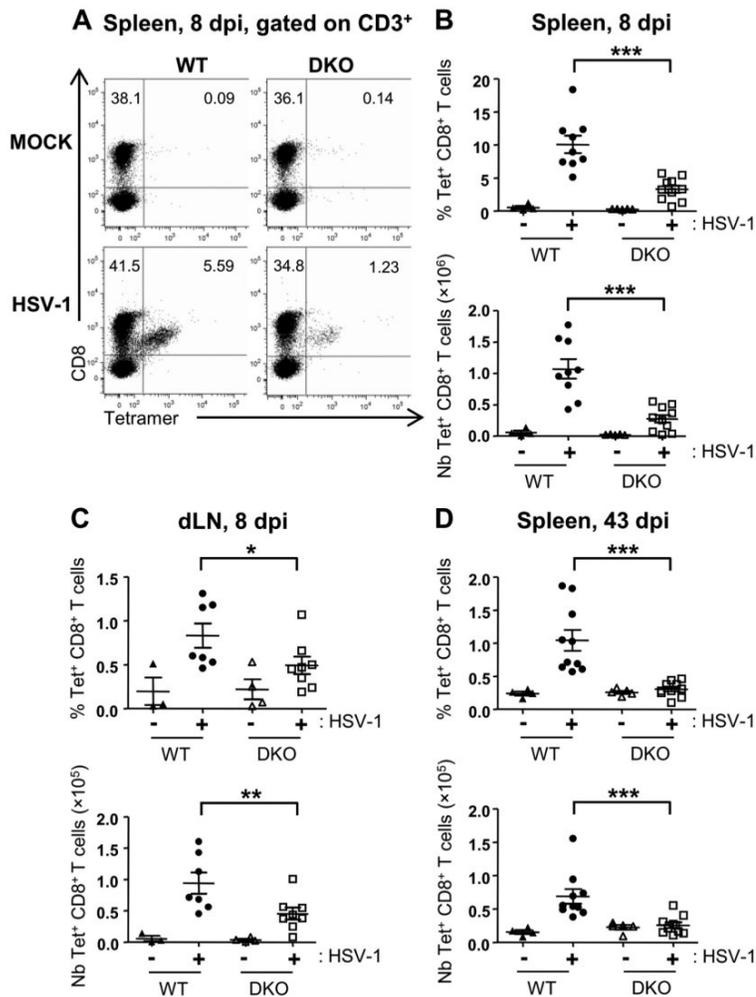


FIG 4 Dok proteins positively regulate the number of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleen and dLN. WT and DKO mice were infected with HSV-1 or not (Mock), and then spleens or dLN were harvested at the indicated times and stained with anti-CD3, anti-CD8, and H2-K^b gB tetramers. (A) Representative dot plots of gB-specific CD8⁺ T cells gated on CD3⁺ cells. (B to D) Frequencies of gB-specific CD8⁺ T cells (%Tet⁺ CD8⁺ T cells) (top) and absolute numbers of gB-specific CD8⁺ T cells (Nb Tet⁺ CD8⁺ T cells) (bottom) in the spleen (B) and dLN (C) at 8 dpi and in the spleen at 43 dpi (D). The data shown represent the pooled results from four (B) or three (C and D) independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. Statistical analysis was carried out to compare values two by two for WT versus DKO mice using a Mann-Whitney test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). The results are shown as means \pm SEM.

Tem/CD44^{high} CD62L⁺ central memory T [Tcm] cells) and the rates of proliferation of gB-specific CD8⁺ T cells in the spleens of HSV-1-infected WT and DKO mice at an early phase (14 dpi) and at a later phase (33 dpi) of effector-to-memory CD8⁺ T cell transition. At 14 dpi and 33 dpi, DKO mice had significantly lower percentages of gB-specific CD8⁺ Tem cells in spleen (Fig. 6A and B) and blood (data not shown) than their WT counterparts. By 33 dpi, there were 6-fold fewer gB-specific CD8⁺ Tem cells and 2-fold fewer gB-specific CD8⁺ Tcm cells in the spleens of DKO mice than in those of WT mice (Fig. 6B). Of note, no such reduction in the number of CD8⁺ Tem cells was observed in the total CD44⁺ memory CD8⁺ T cell population between WT and DKO mice at 33 dpi (Fig. 6C).

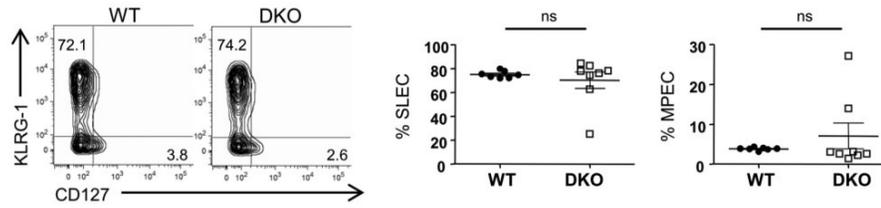
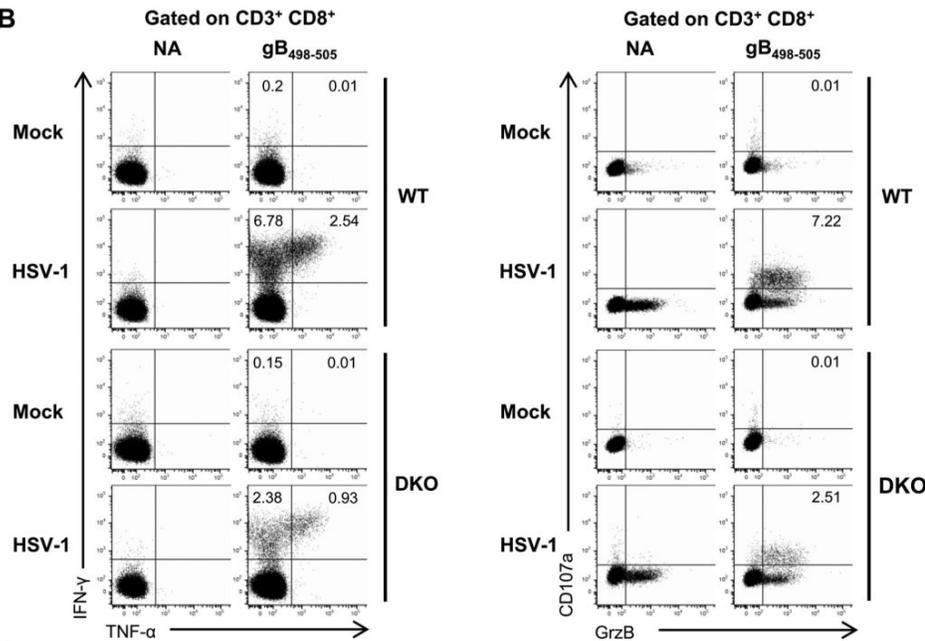
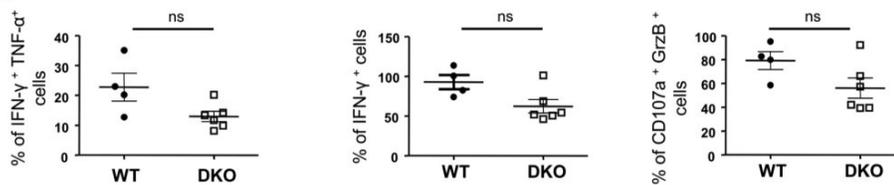
A Spleen, 8 dpi, gated on Tet⁺ CD8⁺**B****C**

FIG 5 Dok proteins do not modulate the proportions of effectors and memory CD8⁺ T cell precursors or the functional abilities of gB-specific CD8⁺ T cells. (A) (Left) Representative dot plot gated on gB-specific CD8⁺ T cells (Tet⁺ CD8⁺) showing KLRG-1 and CD127 in the spleen at 8 dpi. (Right) Percentages of SLECs (KLRG-1^{hi} CD127^{lo}) and MPECs (KLRG-1^{lo} CD127^{hi}). The data represent the pooled results from three independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. (B and C) WT and DKO mice were infected with HSV-1 or not (Mock), and splenocytes harvested at 8 dpi were stimulated *ex vivo* with gB peptide or left in medium (nonactivated [NA]) for 4 h. (B) Plots gated on CD3⁺ CD8⁺ cells showing IFN- γ and TNF- α expression and CD107a and GrzB expression. (C) Representative graphs showing the percentages of IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺, and CD107a⁺ GrzB⁺ cells among Tet⁺ CD8⁺ cells. The numbers were obtained by dividing the percentage of cytokine⁺ cells in the CD8⁺ CD3⁺ cell population by the percentage of gB-tetramer⁺ cells before *ex vivo* stimulation of the cells. The data shown represent results pooled from two independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test. ns, not significant. The results are shown as means \pm SEM.

We also assessed the proportion of actively cycling cells *in vivo* by giving mice an injection of bromodeoxyuridine (BrdU) 12 h before harvesting the cells. Staining cells for BrdU incorporation at 8, 14, and 33 dpi showed that the percentages of cycling BrdU⁺ WT and DKO gB-specific CD8⁺ cells were very similar (Fig. 6D). This result

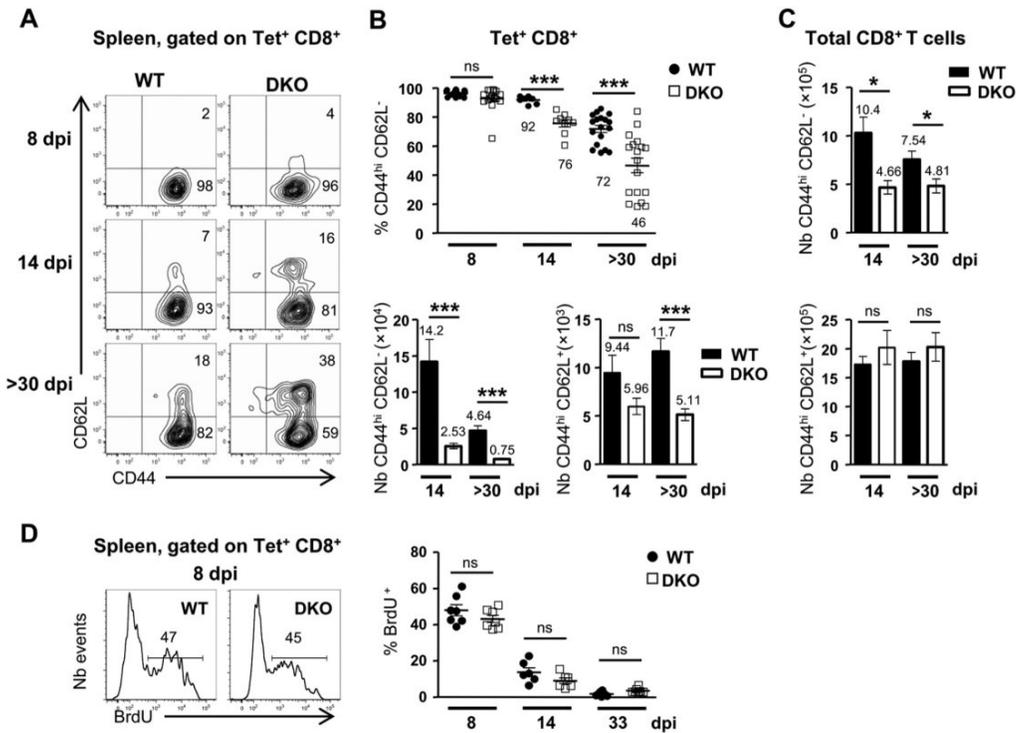


FIG 6 Reduced numbers of gB-specific CD8⁺ Tem cells are present in the spleens of Dok-1/2 DKO mice. (A) Representative contour plot gated on gB-specific CD8⁺ T cells (Tet⁺ CD8⁺) showing CD44 and CD62L in the spleen at 8, 14, and >30 (33 to 48) dpi. (B) (Top) Percentages of gB-specific CD8⁺ T cells (CD44^{hi} CD62L⁻) in the spleen at 8, 14, and >30 (33 to 48) dpi. Each symbol represents an individual mouse. The numbers below the symbols indicate the means. (Bottom) Absolute numbers of gB-specific CD8⁺ T cells (CD44^{hi} CD62L⁻) and gB-specific CD8⁺ T cells (CD44^{hi} CD62L⁺) in the spleen at 8, 14, and >30 dpi. The error bars indicate the standard deviations, and the numbers above indicate the means. The results are representative of five independent experiments (8 dpi), four independent experiments (>30 dpi), and two independent experiments (14 dpi), with at least two mice analyzed per condition in each experiment. (C) Absolute numbers of total CD8⁺ T cells (CD44^{hi} CD62L⁻ [top] and CD44^{hi} CD62L⁺ [bottom]) in the spleen at 8, 14, and >30 (33 to 48) dpi. The error bars indicate standard deviations, and the numbers above indicate the means. (D) Mice were given an intraperitoneal injection of BrdU, and spleens were harvested 12 h after BrdU exposure. Cells were stained with anti-CD3, anti-CD8, and H2-K^b gB tetramers and then for BrdU incorporation at the indicated times. (Left) Representative histograms gated on gB-specific CD8⁺ T cells (Tet⁺ CD8⁺) showing the percentages of BrdU⁺ cells. (Right) Kinetics of percentages of gB-specific CD8⁺ BrdU⁺ T cells. The data shown are from six to eight mice per condition tested. Each symbol represents an individual mouse. Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test (***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, not significant).

indicates that the reduced numbers of gB-specific CD8⁺ T cells in the DKO spleen is due their reduced survival rather than an impaired proliferative capacity.

Dok proteins positively regulate the numbers of HSV-1-specific CD8⁺ T cells recruited to the cornea and TG. We showed that Dok-1 and Dok-2 proteins are required for maintenance of the gB-specific CD8⁺ T cell response in lymphoid tissues. To determine whether the same effect occurs in nonlymphoid tissues, we extended our analyses to TG and cornea during acute and latent infection. To ensure sufficient numbers of cells for accurate counts, two to four TG were pooled for each data point, and four eyeballs were pooled for each sample tested. We quantified gB-specific CD8⁺ T cells among CD45⁺ CD3⁺ cells. Although the total numbers of CD8⁺ T cells infiltrating TG were reproducibly reduced in DKO mice in comparison to WT mice at 8, 14, and >30 dpi, the numbers did not reach statistical significance (Fig. 7A). Importantly, at 8 and 14 dpi, the percentage of gB-specific CD8⁺ T cells among total CD8⁺ T cells and the number of gB-specific CD8⁺ T cells were significantly reduced in TG from DKO mice compared to those from WT mice (approximately 1.5-fold lower and 2-fold lower, respectively) (Fig. 7B and C). During latency (>30 dpi), the reduction of gB-specific

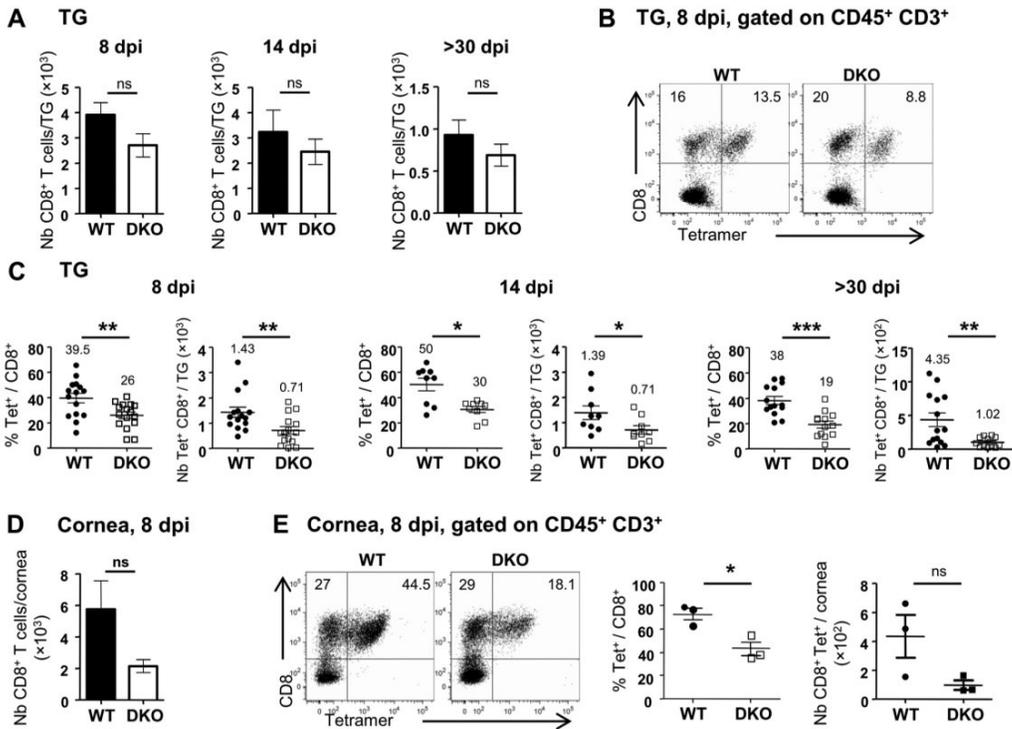


FIG 7 Dok proteins positively regulate gB-specific CD8⁺ T cells recruited to the cornea and TG. (A to C) WT and DKO mice were infected with HSV-1, and TG were harvested at 8, 14, and >30 (33 to 48) dpi. The graphs show the total numbers of CD8⁺ T cells per TG (A) and the percentages and numbers of gB-specific CD8⁺ T cells per TG (C). (B) Representative dot plots of CD45⁺ CD3⁺ cells stained with anti-CD8 MAb and gB tetramers at 8 dpi. The data shown are pooled from five independent experiments (8 dpi), four independent experiments (>30 dpi), and two independent experiments (14 dpi). Each individual symbol corresponds to one or two mice (two or four TG). (D and E) Corneas were harvested at 8 dpi. (D) Numbers of CD8⁺ T cells per cornea. (E) Representative dot plots of CD45⁺ CD3⁺ cells stained with anti-CD8 MAb and gB tetramers (left) and graphs illustrating the percentages and numbers of gB-specific CD8⁺ T cells per cornea (right). The data shown are pooled from three independent experiments, and each symbol represents two mice (four corneas). Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant). The results are shown as means \pm SEM.

CD8⁺ T cells in DKO TG was even more pronounced (approximately 4-fold lower) (Fig. 7C). In the cornea at 8 dpi, DKO mice also exhibited a significant decrease in the percentage of gB-specific CD8⁺ T cells among total CD8⁺ T cells (approximately 2-fold lower). Although not significant, there was a reduction in the numbers of total and of gB-specific CD8⁺ T cells (3-fold and 4.5-fold lower) (Fig. 7D and E) compared to WT mice. Just as was seen in the spleen, the proliferation of gB-specific CD8⁺ T cells in the TG in WT mice was similar to that in DKO mice (Fig. 8A). The PD-1–B7-H1 interaction has been shown to be important for the survival of CD8⁺ resident T cells in TG (41). Expression of PD-1 is also associated with reduced functionality (41, 42). We next determined whether there was a difference in the expression of PD-1 receptor. At 8, 14, and 33 dpi, PD-1 expression levels on WT and DKO gB-specific CD8⁺ T cells in TG were similar (Fig. 8B). In addition, the majority of gB-specific CD8⁺ T cells displayed similar CD44^{hi} CD62L⁻ Tem phenotypes in WT and Dok-1/2 DKO TG (Fig. 8C). Likewise, at 33 dpi, the percentages of CD103⁺ gB-Tet⁺ and gB-Tet⁻ CD8⁺ memory resident T cells were similar in WT and DKO TG (Fig. 8D). In conclusion, in acutely (8 dpi) and latently (>30 dpi) infected TG, WT and DKO gB-specific CD8⁺ T cells were phenotypically similar. Moreover, the fold difference found in the frequencies and numbers of gB-specific CD8⁺ T cells between WT and DKO mice progressively increased during the contraction phase of the effector cells in the TG. These results suggest that reduced

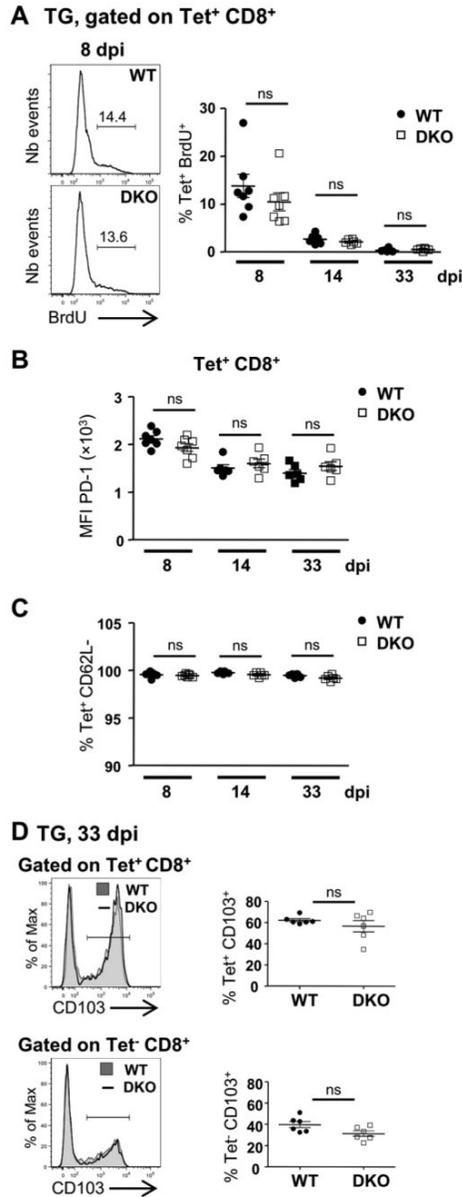


FIG 8 Dok-1/2 DKO CD8⁺ T cells in TG are phenotypically similar to WT cells. (A) Mice were given an intraperitoneal injection of BrdU, and TG were harvested 12 h after BrdU exposure. Cells were stained with anti-CD3, anti-CD8, and H2-K^b gB tetramers and then for BrdU incorporation at the indicated times. (Left) Representative histograms gated on gB-specific CD8⁺ T cells (Tet⁺ CD8⁺) showing the percentages of BrdU⁺ cells. (Right) Kinetics of percentages of gB-specific CD8⁺ BrdU⁺ T cells. (B and C) Mean fluorescence intensities (MFI) of PD1 expression on gB-specific CD8⁺ T cells (B) and percentages of CD62L⁻ gB-specific CD8⁺ T cells (C). (D) (Left) Representative histograms gated on gB-specific CD8⁺ T cells (Tet⁺ CD8⁺) and gB tetramer⁻ cells (Tet⁻ CD8⁺) showing the percentages of CD103⁺ cells at 33 dpi. (Right) Percentages of CD103⁺ cells gated on gB tetramer⁺ (Tet⁺) and gB tetramer⁻ (Tet⁻) CD8⁺ T cells. The data shown are from six to eight mice per condition tested. Each symbol represents an individual mouse. Statistical analysis was carried out using a Mann-Whitney test. ns, not significant. The results are shown as means \pm SEM.

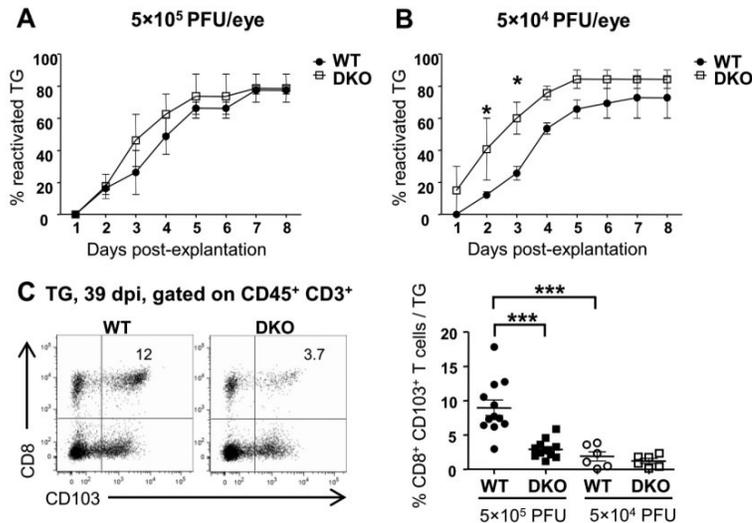


FIG 9 Dok proteins hinder HSV-1 reactivation from latency in *ex vivo* cultures of TG. (A and B) WT and DKO mice were infected with 5×10^5 PFU/eye (A) or 5×10^4 PFU/eye (B) of HSV-1, and TG were harvested following the establishment of latency and dissociated. Half of each TG sample was tested in an *ex vivo* reactivation assay by daily monitoring for virus-induced cytopathic effects of Vero cells on which the dissociated TG was overlaid. The graphs show the percentages of reactivated TG on the indicated days postexplant. The data shown were pooled from two independent experiments ($n = 24$ [A] and $n = 18$ [B]). Statistical analysis was carried out using a chi-squared test (*, $P < 0.05$). (C) The other half of each TG tested in an *ex vivo* reactivation assay was pooled and analyzed by cytometry to quantify TG-resident CD8⁺ T cells. (Left) Representative dot plot of TG-resident CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD103⁺) gated on CD45⁺ CD3⁺ cells in TG at 36 to 39 dpi. (Right) Percentages of TG-resident CD8⁺ T cells per TG at high (5×10^5 PFU/eye) and low (5×10^4 PFU/eye) infectious doses. The data represent the results from three (5×10^5 PFU/eye) or two (5×10^4 PFU/eye) independent experiments. Statistical analysis was carried out to compare values two by two for WT versus DKO mice and for WT mice at two infectious doses using a Mann-Whitney test (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$). The results are shown as means \pm SEM.

numbers of gB-specific CD8⁺ T cells infiltrate the acutely infected TG (8 dpi) in DKO mice and that the survival of DKO gB-specific CD8⁺ T cells in the TG is reduced compared to WT cells.

Absence of Dok proteins promotes HSV-1 reactivation from latency in *ex vivo* TG cultures. CD8⁺ T cells specific for the immunodominant gB epitope are functional in latently infected TG and contribute to the control of HSV-1 reactivation from latency (21, 24). Furthermore, the frequency of HSV-1 reactivation from latency in *ex vivo* TG cultures has been shown to correlate inversely with the number of infiltrating CD8⁺ T cells (25). Since the lack of Dok-1 and Dok-2 proteins caused a decrease in the proportion and numbers of gB-specific CD8⁺ T cells present in TG during HSV-1 latency, we tested the impact of Dok proteins on HSV-1 reactivation from latency in *ex vivo* TG cultures. At an infectious dose of 5×10^5 PFU/eye, despite the fact that viral DNA was more readily detected in TG from latently infected WT mice than in TG from DKO mice (12/13 versus 8/13 HSV-1-positive samples, respectively), reactivation was detected on average a half day earlier from infected DKO TG than from WT TG (3.6 versus 4.1 days postexplant) (Fig. 9A). This trend became significant at a lower infectious dose (5×10^4 PFU/eye), where reactivation was detected on average 1.1 days ($P \leq 0.05$) earlier for the DKO TG than for WT TG. Moreover, the percentage of reactivated TG from DKO mice was significantly greater at 2 and 3 days postexplant than for WT mice (Fig. 9B). As shown in Fig. 9C, at a high infectious dose, there was a high percentage of CD103⁺ CD8⁺ T cells in TG of WT mice, while the percentage was significantly lower in TG of DKO mice (8.9% for WT and 2.9% for DKO mice). Consistent with previous reports, at a low infectious dose, the percentage of memory-resident CD103⁺ CD8⁺ T cells was

reduced compared to that observed for a high infectious dose (25); however, at the lower infectious dose, the percentage of TG-resident CD8⁺ T cells was too close to the background nonspecific staining for DKO mice to accurately assess the difference between WT and DKO samples. Our results suggest that Dok proteins have a negative impact on HSV-1 *ex vivo* reactivation from latency.

DISCUSSION

In this study, we examined the roles of Dok-1 and Dok-2 in regulating HSV-1 infection in a mouse model of ocular infection. We found that Dok-1 and Dok-2 are important for the formation of long-lived HSV-1-specific CD8⁺ T cells in lymphoid and nonlymphoid organs. We previously reported the importance of Dok-1/2 in memory T cell formation in response to vaccinia virus expressing OVA peptide using an adoptive-transfer system of DKO OT-I cells (37). Just as we showed for VV OVA infection, the number of HSV-specific CD8⁺ T cells in response to HSV-1 infection was diminished at the peak of the effector response. Thus, the fate of HSV-specific DKO CD8⁺ T cells in the present study was similar to that obtained with OVA-specific DKO CD8⁺ OT-I T cells adoptively transferred into WT mice in our previous study. Although we cannot exclude other hypotheses, this finding suggests that the defect in the formation of gB-specific CD8⁺ memory T cells in DKO mice is T cell intrinsic. Moreover, we demonstrated that Dok proteins are dispensable for differentiation of MPECs, suggesting that Dok proteins do not regulate the differentiation of gB-specific CD8⁺ memory precursor T cells. Nevertheless, our data clearly indicate that the survival of CD8⁺ Tem cells is more affected than that of CD8⁺ Tcm cells. Because of the importance of CD8⁺ Tem cells in protective immunity against herpesvirus infection (43, 44), studies aimed at gaining a better understanding of how Dok-1/2 deficiency affects the survival of gB-specific CD8⁺ Tem cells are under way.

In addition to T and B cells, Dok-1 and Dok-2 proteins are expressed in myeloid cells (28). We have previously shown that in IFN- γ -primed macrophages, nitric oxide (NO) and TNF secretion is reduced in DKO cells (45). Thus, Dok-1/2 deficiency could be expected to result in less efficient clearing of the virus during acute infection; however, we found that viral titers in tear films and the kinetics of viral clearance in the eyes were similar in DKO and WT mice. This observation was consistent with our finding that there were no statistically significant differences in the degrees of leukocytic infiltration (monocytes/macrophages, neutrophils, inflammatory monocytes, and T cells) into the cornea at 3 and 8 dpi in DKO and WT mice. In contrast, we showed that the numbers of gB-specific CD8⁺ T cells were reduced in the cornea but that Dok-1 and Dok-2 deficiency did not affect *ex vivo* functional abilities. Thus, our results imply that although the number of gB-specific T cells is lower in DKO mice, there were sufficient cells to clear the virus.

We found that reactivation in *ex vivo* TG cultures was detected earlier for DKO than for WT mice. This observation was surprising, because viral titers in TG were reduced during acute infection of DKO mice versus WT mice. Several studies have suggested that CD8⁺ T cells resident in the TG delay HSV-1 reactivation from latency (24, 25). Thus, the apparent contradiction of more efficient reactivation despite lower viral titers in TG during acute infection may be due to the reduced numbers of HSV-1-specific resident CD8⁺ T cells in DKO TG during the latent phase. It should be noted that we assessed only the gB-specific HSV-1 CD8⁺ T cell response (15); however, the HSV-specific CD8⁺ TCR repertoire recognizes other subdominant epitopes (46), and it remains to be determined if Dok proteins affect the entire HSV-specific CD8⁺ T cell repertoire. Regardless, subdominant CD8⁺ T cells should not be capable of blocking reactivation, since TG-resident CD8⁺ T cells specific for subdominant epitopes lose functionality, whereas those specific for the immunodominant gB epitope exhibit increased functionality in latently infected TG (21). In addition, regardless of the HSV specificity of the CD8⁺ T cells in latently infected TG, we clearly demonstrated that Dok proteins control the number of CD8⁺ T cells that harbor a resident phenotype as assessed by the CD103⁺ marker (23). Thus, Dok-1 and Dok-2 may contribute to protection against HSV-1 reactivation from latency by controlling the numbers of HSV-specific CD8⁺

resident T cells in the TG. Further studies are required to determine whether Dok-mediated regulation of the kinetics of HSV-1 reactivation is mediated exclusively by HSV-specific CD8⁺ T cells. In particular, we cannot exclude the possibility that Dok proteins regulate the functionality or the numbers of cells other than CD8⁺ T cells, such as CD8 α ⁺ dendritic cells (DCs), that contribute to the establishment and maintenance of HSV latency (47, 48). Future studies will help to delineate the precise functions of Dok proteins in latent HSV-1 infection.

In conclusion, our findings identify Dok-1 and Dok-2 as novel cellular immune regulators in HSV-1 infection that are important for promoting the maintenance of HSV-1 gB-specific CD8⁺ T cells. As such, Dok proteins promote latency in TG. Elucidation of the mechanisms by which Dok proteins may hinder HSV-1 reactivation from latency could provide insights into possible strategies to block HSV-1 reactivation.

MATERIALS AND METHODS

Mice and virus strains. HSV-1 strain 17 was originally provided by Donald M. Coen (Harvard Medical School). The virus was propagated and titrated on Vero cells as described previously (49). Dok-1-deficient (Dok-1 KO) mice, Dok-2-deficient (Dok-2 KO) mice, and Dok-1/Dok-2 double-deficient (DKO) mice have been described previously (37). All colonies were maintained under pathogen-free conditions at the INRS Centre for Experimental Biology. All animal experiments were performed at the INRS Centre for Experimental Biology in accordance with institutional good animal care practices.

Flow cytometry reagents. The gB peptide (₄₉₆SSIEFARL₅₀₃) was purchased from Genemed Synthesis, Inc. H-2K^b tetramers complexed with the gB peptide and coupled to phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC), or brilliant violet 421 were kindly provided by the National Institutes of Health Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, Alexa Fluor 700-conjugated, or APC-conjugated anti-CD8 α (clone 53-6.7); APC-conjugated, APC/Cy7-conjugated, or brilliant violet 421-conjugated anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11); PE/Cy7-conjugated anti-CD4 (clone GK1.5); Alexa Fluor 700-conjugated anti-CD45 (clone 30-F11); FITC-conjugated anti-CD107a (clone 1D4B); PE-conjugated anti-KLRG1 (clone 2F1/KLRG1); FITC-conjugated anti-CD127 (clone A7R34); APC-conjugated anti-IFN- γ (clone XMG1.2); brilliant violet 650-conjugated anti-TNF- α (clone MP6-XT22); PE-conjugated anti-CD103 (clone 2E7); APC/Cy7-conjugated anti-Ly-6C (clone HK1.4); APC/Cy7-conjugated or PE-conjugated anti-CD44 (clone IM7); PE-conjugated or PE/Cy7-conjugated anti-CD62L (clone MEL-14); brilliant violet 605-conjugated anti-CD279 (PD-1 clone 29F.1A12); and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) viability staining solution were purchased from Biolegend. PE-conjugated anti-GrzB (clone NGZB), APC/Cy7-conjugated anti-Gr-1 (clone RB6-8C5), streptavidin-PE/Cy5, and intracellular fixation and permeabilization buffer (plus brefeldin A) were purchased from eBioscience. FITC-conjugated anti-CD11b (clone M1/70), the FITC BrdU flow kit, and the BD CompBeads Compensation Particles set were obtained from BD Biosciences.

Murine model of ocular infection. Six- to 12-week-old male mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg kg of body weight⁻¹; Bioniche) and xylazine (10 mg kg⁻¹; Bayer) in saline solution. The corneas of the anesthetized mice were lightly scarified 12 times with a sterile 30-gauge needle, and each eye was infected with 5 μ l of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5 \times 10⁵ PFU of virus unless otherwise indicated. Analyses of acute replication in the eye and TG were conducted essentially as described previously (50). Viral titers were determined for three mice per condition in the eye and for two or three mice per condition in TG. Back titers of inocula were verified following infection of the mice. Data points below the level of detection of the experiment were treated as the limit values for calculation of means.

Disease scoring. Acute disease was assessed visually daily in a blind manner for the indicated period and scored on a scale of 0 to 4 as follows: 0, no change; 1, mild inflammation (swelling); 2, moderate inflammation and mild periocular hair loss; 3, severe inflammation, moderate periocular hair loss, and mild skin lesions; and 4, severe inflammation, severe periocular hair loss, and severe skin lesions.

Flow cytometry and tetramer staining. At the indicated times postinfection (p.i.), spleens and dLN were removed and dissociated mechanically to obtain single-cell suspensions using 100- μ m nylon cell strainers (BD Falcon). Pooled TG (2 TG equivalents) and pooled eyeballs (4 eyeball equivalents) were incubated in DMEM containing 51 U/ml of collagenase type 1 (Invitrogen) for 1 to 2 h at 37°C, dispersed into single-cell suspension by pipetting, and filtered through 40- μ m-pore-size filters to remove debris prior to staining. Spleens and TG were treated with red blood cell lysis buffer prior to their use, as described previously (37). Single-cell suspensions of various organs were stained with gB tetramers for 30 min at room temperature (RT), followed by cell surface marker staining for 20 min at 4°C in fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer (phosphate-buffered saline [PBS], 1% fetal bovine serum, 0.05% sodium azide, 2 mM EDTA). For TG and corneas, anti-CD45 was added to permit gating exclusively on bone marrow-derived cells. Cells were washed and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) and analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by selective gating on 7-AAD-negative cells. Data were acquired on a BD LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star) at the INRS-Institut Armand-Frappier Cytometry Facility.

Flow cytometry and phenotypic analysis. To characterize gB-specific CD8⁺ T cells, dispersed spleens or TG (pooled TG; 2 TG at 8 and 14 dpi and 4 TG at 33 dpi) were stained with gB tetramers, followed by cell surface marker staining with anti-CD8 α , -CD3 ϵ , -CD127, -KLRG-1, -CD44, -CD62L, -PD-1,

or -CD103 as required, and then fixed as described above. To assess TG-resident CD8⁺ T cells at 36 to 39 dpi, dispersed TG were stained with anti-CD45, -CD8 α , -CD3 ϵ , and -CD103 and then fixed as described above. To analyze leukocytes within TG and corneas at the indicated times p.i., single-cell suspensions were obtained as described above and treated with unconjugated anti-CD16/CD32 for 15 min at RT prior to surface staining. Neutrophils were identified as CD45⁺ Gr-1^{Hi} Ly-6C^{Lo}, inflammatory monocytes were identified as CD45⁺ Gr-1^{Lo-neg} CD11b⁺ Ly-6C^{Hi}, and global monocytes/macrophages were identified as CD45⁺ Gr-1^{Lo-neg} CD11b⁺ Ly-6C^{Lo-neg}.

BrdU incorporation. Mice were injected intraperitoneally with 1 mg BrdU (in PBS). Twelve hours later, dispersed spleens or TG were stained for cell surface markers, followed by fixation, permeabilization, and intracellular staining for BrdU following the manufacturer's instructions (BD Biosciences).

Intracellular cytokine staining and lytic-granule exocytosis. To assess lytic-granule release, at 8 dpi, single-cell suspensions were prepared from spleens as described above and pulsed with 10⁻⁶ M gB peptide in the presence of FITC-conjugated anti-CD107a MAb and brefeldin A (eBioscience) for 4 h at 37°C and 5% CO₂ (51–53). Following stimulation, the cells were stained for surface expression of CD8 α and CD3 ϵ , after which they underwent fixation, permeabilization (intracellular fixation and permeabilization buffer; eBioscience), and intracellular staining for IFN- γ , TNF- α , and GrzB.

Ex vivo reactivation assays. Following corneal infection of mice and the subsequent establishment of a latent infection, TG were excised and dissociated as described above at the indicated time points (between 36 and 39 dpi). Dissociated cells from individual TG were overlaid on a monolayer of Vero cells. Reactivation for each TG was determined by the appearance of virus-induced cytopathic effect of the Vero cells, which were monitored for 10 days postexplant.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using the Mann-Whitney test; *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Graphed results are shown as means \pm standard errors of the mean (SEM). For *ex vivo* reactivation assays, the chi-squared test was used to determine significant differences (*P* < 0.05).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Institutes of Health Tetramer Core Facility for supplying tetramers. We thank P. P. Pandolfi for the 129/Sv *Dok-1*^{-/-} and *Dok-2*^{-/-} mice.

This work was funded by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research to A.P. (MOP-82924) and P.D. (MOP-74445).

REFERENCES

- Knipe DM, Howley PM. 2013. Fields virology, 6th ed, vol II. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Fatahazadeh M, Schwartz RA. 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* 57:737–763. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.06.027>.
- Bauer D, Mrzyk S, van Rooijen N, Steuhl KP, Heiligenhaus A. 2000. Macrophage-depletion influences the course of murine HSV-1 keratitis. *Curr Eye Res* 20:45–53. [https://doi.org/10.1076/0271-3683\(200001\)2011-HFT045](https://doi.org/10.1076/0271-3683(200001)2011-HFT045).
- Mott K, Brick DJ, van Rooijen N, Ghiasi H. 2007. Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5605–5615. <https://doi.org/10.1167/iov.07-0894>.
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. 1999. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* 162:2895–2905.
- Liu T, Tang Q, Hendricks RL. 1996. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol* 70:264–271.
- Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL. 2000. The role of natural killer cells in protection of mice against death and corneal scarring following ocular HSV-1 infection. *Antiviral Res* 45:33–45. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(99\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(99)00075-3).
- Grubor-Bauk B, Arthur JL, Mayrhofer G. 2008. Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol* 82:11073–11083. <https://doi.org/10.1128/JVI.00205-08>.
- Tumpey TM, Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. 1996. Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J Virol* 70:898–904.
- Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Bluestone JA. 1997. T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J Exp Med* 185:1969–1975. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1969>.
- Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL. 2000. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved in protection against HSV-1 induced corneal scarring. *Br J Ophthalmol* 84:408–412. <https://doi.org/10.1136/bjo.84.4.408>.
- Rajasagi NK, Kassim SH, Kollias CM, Zhao X, Chervenak R, Jennings SR. 2009. CD4⁺ T cells are required for the priming of CD8⁺ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:5256–5268. <https://doi.org/10.1128/JVI.01997-08>.
- Frank GM, Lepisto AJ, Freeman ML, Sheridan BS, Cherpes TL, Hendricks RL. 2010. Early CD4(+) T cell help prevents partial CD8(+) T cell exhaustion and promotes maintenance of herpes simplex virus 1 latency. *J Immunol* 184:277–286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902373>.
- Simmons A, Tscharke DC. 1992. Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J Exp Med* 175:1337–1344. <https://doi.org/10.1084/jem.175.5.1337>.
- Wallace ME, Keating R, Heath WR, Carbone FR. 1999. The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J Virol* 73:7619–7626.
- Wallace ME, Bryden M, Cose SC, Coles RM, Schumacher TN, Brooks A, Carbone FR. 2000. Junctional biases in the naive TCR repertoire control the CTL response to an immunodominant determinant of HSV-1. *Immunity* 12:547–556. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80206-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80206-X).
- Lang A, Nikolich-Zugich J. 2005. Development and migration of protective CD8⁺ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* 174:2919–2925. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2919>.
- Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR, Hendricks RL. 2003. Herpes simplex virus-specific memory CD8⁺ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 18:593–603. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00112-2).
- Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, Langerak AW, Kinchington PR, Osterhaus AD. 2007. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3496–3501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610847104>.

20. Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinel E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. 2003. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 163: 2179–2184. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63575-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63575-4).
21. St Leger AJ, Jeon S, Hendricks RL. 2013. Broadening the repertoire of functional herpes simplex virus type 1-specific CD8⁺ T cells reduces viral reactivation from latency in sensory ganglia. *J Immunol* 191:2258–2265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300585>.
22. Himmelein S, St Leger AJ, Knickelbein JE, Rowe A, Freeman ML, Hendricks RL. 2011. Circulating herpes simplex type 1 (HSV-1)-specific CD8⁺ T cells do not access HSV-1 latently infected trigeminal ganglia. *Herpesviridae* 2:5. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-2-5>.
23. Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G, Bevan MJ. 2012. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol* 189:3462–3471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201305>.
24. Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. 2000. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* 191:1459–1466. <https://doi.org/10.1084/jem.191.9.1459>.
25. Hoshino Y, Pesnicak L, Cohen JL, Straus SE. 2007. Rates of reactivation of latent herpes simplex virus from mouse trigeminal ganglia ex vivo correlate directly with viral load and inversely with number of infiltrating CD8⁺ T cells. *J Virol* 81:8157–8164. <https://doi.org/10.1128/JVI.00474-07>.
26. Janssen E, Zhang W. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 15:269–276. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00044-X).
27. Veillette A. 2004. Specialised adaptors in immune cells. *Curr Opin Cell Biol* 16:146–155. <https://doi.org/10.1016/j.cceb.2004.01.002>.
28. Mashima R, Hishida Y, Tezuka T, Yamanashi Y. 2009. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol Rev* 232: 273–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00844.x>.
29. Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, Nagai Y, Yasuda T, Suzuki H, Horai R, Iwakura Y, Yamamoto T, Karasuyama H, Miyake K, Yamanashi Y. 2005. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J Exp Med* 201:333–339. <https://doi.org/10.1084/jem.20041817>.
30. Niki M, Di Cristofano A, Zhao M, Honda H, Hirai H, Van Aelst L, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J Exp Med* 200:1689–1695. <https://doi.org/10.1084/jem.20041306>.
31. Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T, Yamanashi Y. 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J Exp Med* 200:1681–1687. <https://doi.org/10.1084/jem.20041247>.
32. Mashima R, Honda K, Yang Y, Morita Y, Inoue A, Arimura S, Nishina H, Ema H, Nakauchi H, Seed B, Oda H, Yamanashi Y. 2010. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab Invest* 90:1357–1364. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.121>.
33. Berger AH, Niki M, Morotti A, Taylor BS, Socci ND, Viale A, Brennan C, Szoke J, Motoi N, Rothman PB, Teruya-Feldstein J, Gerald WL, Ladanyi M, Pandolfi PP. 2010. Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat Genet* 42:216–223. <https://doi.org/10.1038/ng.527>.
34. Yasuda T, Bundo K, Hino A, Honda K, Inoue A, Shirakata M, Osawa M, Tamura T, Nariuchi H, Oda H, Yamamoto T, Yamanashi Y. 2007. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int Immunol* 19:487–495. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm015>.
35. Celis-Gutierrez J, Boyron M, Walzer T, Pandolfi PP, Jonjic S, Olive D, Dalod M, Vivier E, Nunes JA. 2014. Dok1 and Dok2 proteins regulate natural killer cell development and function. *EMBO J* 33:1928–1940. <https://doi.org/10.15252/embj.201387404>.
36. Coppin E, De Grandis M, Pandolfi PP, Arcangeli ML, Aurrand-Lions M, Nunes JA. 2016. Dok1 and Dok2 proteins regulate cell cycle in hematopoietic stem and progenitor cells. *J Immunol* 196:4110–4121. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501037>.
37. Laroche-Lefebvre C, Yousefi M, Daudelin JF, Charpentier T, Tarrab E, Klinck R, Lamarre A, Labrecque N, Stager S, Duplay P. 2016. Dok-1 and Dok-2 regulate the formation of memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 197:3618–3627. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600385>.
38. Banerjee K, Biswas PS, Rouse BT. 2005. Elucidating the protective and pathologic T cell species in the virus-induced corneal immunoinflammatory condition herpetic stromal keratitis. *J Leukoc Biol* 77:24–32.
39. Banerjee K, Rouse BT. 2007. Immunopathological aspects of HSV infection, p 642–655. *In* Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (ed), *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
40. Sheridan BS, Cherpes TL, Urban J, Kalinski P, Hendricks RL. 2009. Reevaluating the CD8 T-cell response to herpes simplex virus type 1: involvement of CD8 T cells reactive to subdominant epitopes. *J Virol* 83: 2237–2245. <https://doi.org/10.1128/JVI.01699-08>.
41. Jeon S, St Leger AJ, Cherpes TL, Sheridan BS, Hendricks RL. 2013. PD-L1/B7-H1 regulates the survival but not the function of CD8⁺ T cells in herpes simplex virus type 1 latently infected trigeminal ganglia. *J Immunol* 190:6277–6286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300582>.
42. Chentoufi AA, Kritzer E, Tran MV, Dasgupta G, Lim CH, Yu DC, Afifi RE, Jiang X, Carpenter D, Osorio N, Hsiang C, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L. 2011. The herpes simplex virus 1 latency-associated transcript promotes functional exhaustion of virus-specific CD8⁺ T cells in latently infected trigeminal ganglia: a novel immune evasion mechanism. *J Virol* 85:9127–9138. <https://doi.org/10.1128/JVI.00587-11>.
43. Srivastava R, Khan AA, Garg S, Syed SA, Furness JN, Vahed H, Pham T, Yu HT, Nesburn AB, BenMohamed L. 9 November 2016. Human asymptomatic epitopes identified from the herpes simplex virus tegument protein VP13/14 (UL47) preferentially recall polyfunctional effector memory CD44high CD62Llow CD8⁺ TEM cells and protect humanized HLA-A*02:01 transgenic mice against ocular herpesvirus infection. *J Virol* <https://doi.org/10.1128/JVI.01793-16>.
44. Khan AA, Srivastava R, Spencer D, Garg S, Fremgen D, Vahed H, Lopes PP, Pham TT, Hewett C, Kuang J, Ong N, Huang L, Scarfone VM, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L. 2015. Phenotypic and functional characterization of herpes simplex virus glycoprotein B epitope-specific effector and memory CD8⁺ T cells from symptomatic and asymptomatic individuals with ocular herpes. *J Virol* 89:3776–3792. <https://doi.org/10.1128/JVI.03419-14>.
45. Alvarez de Celis H, Gomez CP, Descoteaux A, Duplay P. 2015. Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during Leishmania major infection. *Microbes Infect* 17:285–294. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.011>.
46. St Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A, Hendricks RL. 2011. Defining the herpes simplex virus-specific CD8⁺ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J Immunol* 186:3927–3933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003735>.
47. Mott KR, Allen SJ, Zandian M, Konda B, Sharifi BG, Jones C, Wechsler SL, Town T, Ghiasi H. 2014. CD8alpha dendritic cells drive establishment of HSV-1 latency. *PLoS One* 9:e93444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093444>.
48. Mott KR, Gate D, Matundan HH, Ghiasi YN, Town T, Ghiasi H. 29 April 2016. CD8⁺ T cells play a bystander role in HSV-1 latently infected mice. *J Virol* <https://doi.org/10.1128/jvi.00255-16>.
49. Lymberopoulos MH, Pearson A. 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleovirus. *Virology* 363:397–409. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.028>.
50. Leiva-Torres GA, Rochette PA, Pearson A. 2010. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* 91:1109–1116. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017921-0>.
51. Betts MR, Brechley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65–78. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00265-5).
52. Betts MR, Koup RA. 2004. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol* 75:497–512. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)75020-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)75020-7).
53. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. 2004. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 199:925–936. <https://doi.org/10.1084/jem.20031799>.

CHAPITRE 3 :
DEUXIÈME PUBLICATION

Herpes simplex virus 1 infection of T cells causes VP11/12-dependent phosphorylation and degradation of the cellular protein Dok-2

doi : 10.1016/j.virol.2017.08.018

Soumia Lahmidi^a, Ulrike Strunk^b, James R. Smiley^b, Angela Pearson^{a,*}, Pascale Duplay^{a,*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

^b Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2S2

* Corresponding authors

Résumé

Des études antérieures ont montré que l'infection des lymphocytes T par le VHS-1 induit la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines qui pourraient correspondre à des protéines virales ou des protéines de l'hôte. VP11/12, une protéine virale du tégment, a été identifiée comme la protéine principalement phosphorylée au niveau de ses résidus tyrosines suite à l'infection par le VHS-1. Dans cette étude, nous avons démontré que les protéines cellulaires adaptatrices Dok-2 et Dok-1 sont phosphorylées au niveau de leurs résidus tyrosines suite à l'infection par le VHS-1. De plus, le VHS-1 induit la dégradation sélective de Dok-2. Enfin, nous mettons en évidence que Dok-2 interagit avec VP11/12, et que la phosphorylation des résidus tyrosines et la dégradation de Dok-2 nécessitent VP11/12. L'inactivation des motifs de liaison aux kinases de la famille Src ou du motif de liaison à la protéine Shc dans la partie C-terminale de VP11/12 a éliminé l'interaction de Dok-2 avec VP11/12. L'élimination de la liaison de Dok-2 à VP11/12 a empêché la phosphorylation et la dégradation de Dok-2. Nous proposons que la phosphorylation des Dok induite par VHS-1 et la dégradation de Dok-2 est un mécanisme d'évasion immunitaire pour inactiver les cellules T qui pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse du VHS-1.

Contribution des auteurs

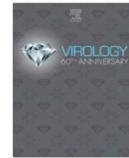
Soumia Lahmidi : Conception et réalisation des manipulations, préparation des figures, rédaction et révision du manuscrit.

Ulrike Strunk : Génération des virus recombinants et mutants (HSV-1 KOS37-derived mutants Δ UL46 (VP11/12null), RUL46 (VP11/12 repaired), KOS37-UL46 GFP, KOS37-UL46 GFP Y613F/Y624F, KOS37-UL46 GFP Y633F, KOS37-UL46 GFP Y657F). Révision du manuscrit.

Angela Pearson : Conception des expériences. Révision et correction du manuscrit.

James R. Smiley : Révision et correction du manuscrit. Don de réactifs.

Pascale Duplay : Conception des expériences. Rédaction, révision et correction du manuscrit.



Herpes simplex virus 1 infection of T cells causes VP11/12-dependent phosphorylation and degradation of the cellular protein Dok-2



Soumia Lahmidi^a, Ulrike Strunk^b, James R. Smiley^b, Angela Pearson^{a,*}, Pascale Duplay^{a,*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

^b Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2S2

ARTICLE INFO

Keywords:

Dok
Herpes simplex virus
VP11/12
Tegument
T cell
Immune evasion

ABSTRACT

Previous studies have shown that HSV-1 infection of lymphocytes induces the tyrosine phosphorylation of several proteins that might correspond to viral or host proteins. VP11/12, a viral tegument protein, is the major HSV-induced tyrosine phosphorylated protein identified thus far. In this report, we demonstrated that the cellular adaptor proteins Dok-2 and Dok-1 are tyrosine phosphorylated upon HSV-1 infection. In addition, HSV-1 induced the selective degradation of Dok-2. Finally, we provide evidence that Dok-2 interacts with VP11/12, and that HSV-induced tyrosine phosphorylation and degradation of Dok-2 require VP11/12. Inactivation of either the Src Family Kinases binding motifs or the SHC binding motif of VP11/12 eliminated the interaction of Dok-2 with VP11/12. Elimination of the binding of Dok-2 to VP11/12 prevented Dok-2 phosphorylation and degradation. We propose that HSV-induced Dok phosphorylation and Dok-2 degradation is an immune evasion mechanism to inactivate T cells that might play an important role in HSV pathogenesis.

1. Introduction

As seen for many other viral infections, herpes simplex virus 1 (HSV-1) induces a potent T cell response. CD8⁺ and CD4⁺ T cells are crucial components of the anti-viral response at multiple stages of the infection (Banerjee et al., 2005; Manickan and Rouse, 1995; St Leger et al., 2011). They control the acute phase of infection by eliminating infected cells and producing cytokines. In addition, T cells are present in HSV-1-latently infected trigeminal ganglia (Khanna et al., 2003; Sheridan et al., 2009; St Leger et al., 2011). In HSV-1 mouse models, it has been demonstrated that virus-specific CD8⁺ T cells play a critical role in preventing HSV-1 reactivation from latently infected neurons (Liu et al., 2000; St Leger et al., 2013). Since a T cell-mediated immune response is important to control HSV infection, it is not surprising that HSV-1 has evolved different mechanisms to evade T-cell mediated immune responses such as inhibition of TAP-mediated peptide loading on MHC class I (Hill et al., 1995), induction of T cell death by the activation of an intrinsic apoptosis pathway (Han et al., 2007; Raftery et al., 1999) and direct inhibition of T cell function including cytotoxicity and cytokine secretion (Confer et al., 1990; Sloan et al., 2006, 2003; Sloan and Jerome, 2007).

Inhibition of T cell function depends on direct inhibition of several T cell receptor (TCR)-mediated signaling events distal to ZAP-70 activation including LAT phosphorylation, ERK1/2 activation and

calcium flux (Sloan et al., 2006). The HSV-1 proteins VP11/12 and Us3 have been identified as modulators of signaling pathways in T cells (Wagner and Smiley, 2009; Yang et al., 2015). Molecular mechanisms and the nature of the cellular proteins targeted by these viral proteins have only been partially characterized. HSV-1 Us3 protein has been shown to disrupt T cell signal transduction by inhibiting the ubiquitination of LAT (Yang et al., 2015). In addition, upon HSV-1 infection of T cells, the viral protein VP11/12 activates the src family tyrosine kinase (SFK), including Lck, and the downstream PI3K/AKT signaling pathway but is not required for HSV-mediated inhibition of TCR signaling (Wagner and Smiley, 2009, 2011). Akt activation is dependent on Lck-mediated tyrosine phosphorylation of VP11/12, and binding of GRB2, p85 and Lck to tyrosine-based phosphorylated motifs in the C-terminal region of VP11/12 (Strunk et al., 2016, 2013). Moreover, VP11/12-dependent Akt activation occurs in absence of TCR engagement (Wagner and Smiley, 2011). Thus, VP11/12 utilizes specific tyrosine-based phosphorylated motifs to recruit several signaling molecules in a fashion analogous to an activated growth factor receptor (Strunk et al., 2013).

HSV antigens have been detected in T cells isolated from human HSV lesions (Aubert et al., 2009) and in mouse $\gamma\delta$ T cells in HSV-infected skin (Puttur et al., 2010). However, it is not known whether the virus targets a special T cell population in vivo. Infection of T cells might be direct at sites where activated T cells and free virus are

* Corresponding authors.

E-mail addresses: angela.pearson@iaf.inrs.ca (A. Pearson), pascale.duplay@iaf.inrs.ca (P. Duplay).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.018>

Received 27 June 2017; Received in revised form 4 August 2017; Accepted 14 August 2017
Available online 23 August 2017

0042-6822/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

present together but can also occur via cell to cell spread upon contact with infected cells and therefore could occur *in vivo* in trigeminal ganglia where CD8⁺ T cells become closely associated with latently infected sensory neurons (Khanna et al., 2003).

HSV-1 infection of lymphocytes induces the tyrosine phosphorylation of several proteins. Among them, only the viral protein VP11/12 has been unambiguously identified. To better understand HSV interference of T cell signaling, we sought to characterize Lck-mediated signaling pathways in HSV-infected T cells and determine whether HSV-induced tyrosine phosphorylated proteins correspond to known cellular negative modulators of T cell signaling. Dok proteins are attractive candidates since they negatively regulate TCR signaling and are tyrosine phosphorylated in a Lck-dependent manner upon activation of T cells (Dong et al., 2006; Nemorin and Duplay, 2000). The negative function of Dok proteins in T cells was demonstrated using Dok-1/2 double knock-out (DKO) T cells *ex vivo* (Yasuda et al., 2007). TCR-stimulated Dok DKO T cells exhibit hyper-proliferation, increased cytokine secretion and increased phosphorylation of signaling molecules including ZAP, LAT and ERK1/2. More importantly, we recently demonstrated the critical role of Dok proteins in the negative regulation of T cell responses *in vivo*. Indeed, we showed that in the absence of Dok proteins the number of CD8⁺ effector and memory cells generated in response to vaccinia virus (Laroche-Lefebvre et al., 2016) and HSV-1 infection (Lahmidi et al., 2017) is greatly diminished. We proposed that Dok proteins act in a negative feedback loop that prevents over-activation of virus-specific CD8⁺ T cells.

To test our hypothesis that tyrosine phosphorylation of Dok proteins is a mechanism by which HSV-1 modulates T cell function, we have carried out studies in Jurkat cells infected with HSV-1. In this report, we demonstrate that Dok-2 and Dok-1 are tyrosine phosphorylated upon HSV-1 infection. In addition, we show that HSV-1 induces the selective degradation of Dok-2 protein. Finally, we provide evidence that HSV-induced tyrosine phosphorylation and degradation of Dok-2 require the viral tegument protein VP11/12.

2. Material and methods

2.1. Cells and viruses

Jurkat cells 77.6 (Duplay et al., 1994) were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Stable transfectant Jurkat cells overexpressing HA-Dok-1 or HA-Dok-2 (Boulay et al., 2005; Nemorin et al., 2001) were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, and 1 µg/ml Puromycin (Sigma). HFF-1 cells (obtained from ATCC) were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. HSV-1 strain 17 was originally provided by Donald M. Coen (Harvard Medical School). HSV-1 KOS37-derived mutants ΔUL46 (VP11/12 null), RUL46 (VP11/12 repaired), KOS37-UL46GFP, KOS37-UL46 GFP Y613F/Y624F, KOS37-UL46 GFP Y633F, KOS37-UL46 GFP Y657F were previously described (Strunk et al., 2016, 2013; Zahariadis et al., 2008). Virus was propagated and titrated on Vero cells as described previously (Lymberopoulos and Pearson, 2007).

2.2. Antibodies and reagents

Monoclonal Abs used include anti-hemagglutinin (anti-HA; 3F10 from Roche used for immunoprecipitation and HA-C5 from Medimabs used for detection by Western blotting) and anti-phosphotyrosine, 4G10 (Upstate Biotechnology). Polyclonal Abs used include anti-Dok-1 directed against Dok-1 C-terminal domain (produced by immunizing rabbits with a GST fusion protein bearing residues 260–482); anti-Dok-2 directed against the Dok-2 C-terminal domain (produced by immunizing rabbits with a GST fusion protein bearing residues 253–412, anti-Dok-2 C-ter); anti-Dok-2 (Tyr351) (Cell Signaling Technology); anti-HSV-1 R1 (Cohen et al., 1986); anti-phospho-p44/42 MAPK; and anti-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technology); anti-β-

actin (Cell Signaling Technology); anti-γ-tubulin (Sigma) and anti-GFP (ThermoFisher Scientific). Anti-Dok-2 Abs were biotinylated with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Infection of Jurkat cells

Jurkat cells were infected with HSV-1 in RPMI 1640 medium supplemented with 2% FBS for 1 h at a multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells were harvested at 12 h pi or at the indicated time. Indirect infection of Jurkat cells was performed by co-cultures of Jurkat cells with HSV-infected HFF-1. HFF-1 were first infected with HSV at MOI of 10 for 1 h in DMEM supplemented with 2% FBS. The virus inoculum was then removed from the HFF-1 cell monolayer, cells were washed twice and after 6 h of infection Jurkat cells were added to the culture for 16 h at a 20:1 ratio. Jurkat cells were then collected by gentle aspiration.

2.4. CD3 stimulation

Jurkat cells that were mock-infected or HSV-infected for 12 h were washed in RPMI 1640 and resuspended at 2.5×10^7 cells/ml in RPMI 1640. Cells were left unstimulated or were stimulated with anti-CD3 (UCHT1 at 1 µg/ml) at 37 °C for the time indicated. Cells were harvested and lysed as described below.

2.5. Immunoprecipitations and Western blotting

Cytoplasmic cell extracts were prepared at 4 °C by incubation in NP-40 lysis buffer for 30 min (1% Nonidet P-40 containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mM EGTA) in the presence of inhibitors of proteases and phosphatases (10 µg/ml leupeptin and aprotinin, 1 mM Pefabloc-sc, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, and 1 mM NaVO₄). To extract nuclear proteins RIPA lysis buffer (500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 50 mM Tris, pH 7.5) was used. Immunoprecipitations and immunoblotting were performed as previously described (Boulay et al., 2005). For Dok-2 immunoprecipitations, to avoid IgH detection we used biotinylated anti-Dok-2 (C-ter) Abs and streptavidin-biotinylated HRP complex to detect immunoreactive products.

2.6. Flow cytometry

Following infection, Jurkat cells were washed in FACS buffer (PBS 1X, 1% FBS, 0.05% sodium azide and 2 mM EDTA) and permeabilized (Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer, eBioscience). Cells were stained with polyclonal anti-HSV-1 (1/500, abcam) followed by secondary antibody Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (1/1500, Invitrogen). Data were acquired on BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) and analyzed by FlowJO software (Tree Star). Flow cytometry was carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier Cytometry Facility.

3. Results

3.1. HSV-1 induces the tyrosine phosphorylation of Dok-2 and the downmodulation of Dok-2 protein levels

We previously demonstrated that Dok proteins are substrates of Lck upon T cell activation (Nemorin and Duplay, 2000). We therefore investigated whether Dok-1 and Dok-2 are targets of HSV-1-induced Lck activity. As previously reported, patterns of tyrosine-phosphorylated proteins induced by direct and indirect HSV-1 infection were similar (Fig. 1A and Zahariadis et al., 2008). In uninfected cells, strong bands corresponding to phosphorylated proteins of ca. MW of 50–

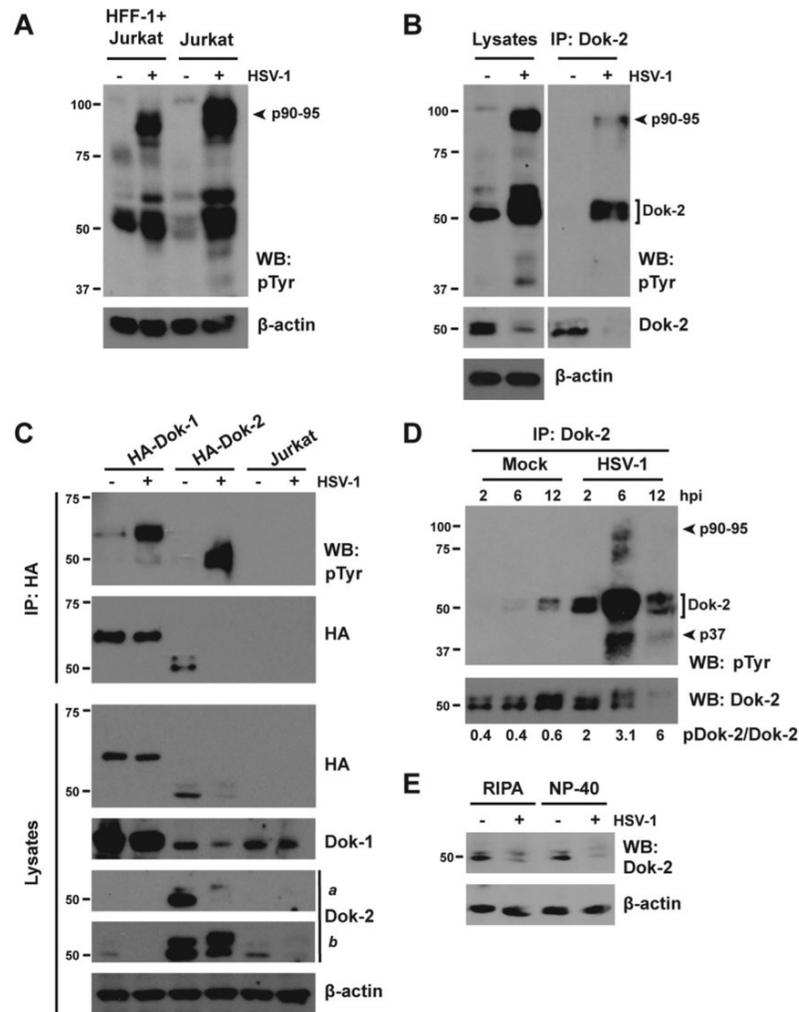


Fig. 1. HSV-1 infection induces Dok-2 phosphorylation and the downmodulation of Dok-2 expression. (A) For indirect infection Jurkat cells were incubated for 16 h with HFF-1 that had been either mock infected or infected with HSV-1 17 (HFF-1 + Jurkat). For direct infection Jurkat cells were mock infected or infected with HSV-1 17 for 6 h (Jurkat). Cell lysates were Western blotted with anti-phosphotyrosine (pTyr) and anti-β-actin mAbs. (B) Jurkat cells were mock infected or infected with HSV-1 17. At 10 h pi, the cell lysates were immunoprecipitated with anti-Dok-2 C-ter Abs (IP: Dok-2) and analyzed by Western blotting with anti-pTyr mAbs and then the membrane was stripped and re-probed with biotinylated anti-Dok-2 (C-ter) Abs (right). Cell lysates were Western blotted with anti-pTyr, anti-Dok-2 (Y531) and anti-β-actin Abs (left). The white line indicates where parts of the image were joined. (C) Jurkat cells overexpressing HA-tagged Dok-1 or Dok-2 (HA-Dok-1 and HA-Dok-2 respectively) and Jurkat cells (Jurkat) were mock infected or infected with HSV-1 17. At 10 h pi, the cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA mAbs (IP: HA) and Western blotted with anti-pTyr, and then the membrane was stripped and re-probed with anti-HA mAbs (top panel). Cell lysates were Western blotted with the indicated Abs (bottom panel). *a* and *b* indicate different blotting conditions for detection of Dok-2. In *a*, a shorter incubation time with a higher dilution of the primary anti-Dok-2 antibodies was used to prevent saturation of the Dok-2 signal in the Jurkat clones overexpressing HA-Dok-2. (D) Jurkat cells were mock infected or infected with HSV-1 17. At the indicated time pi, the cell lysates were immunoprecipitated with anti-Dok-2 C-ter Abs and analyzed by Western blotting with anti-pTyr mAbs and then the membrane was stripped and re-probed with anti-Dok-2 Abs. The fold changes in the ratio of phospho-Dok-2 to total Dok-2 (pDok-2/Dok-2) are indicated and were measured by spot densitometry. (E) Jurkat cells were mock infected or infected with HSV-1 17. At 10 h pi, cells were lysed with RIPA buffer (RIPA) or NP-40 buffer (NP-40) and were Western blotted with the indicated Abs. The positions of the bands showing marked changes in tyrosine phosphorylation upon HSV-1 infection are indicated on the right and those of molecular mass markers (in kDa) on the left. Western blotting, WB; immunoprecipitation, IP.

55 kDa in HFF plus Jurkat samples are only faintly visible in Jurkat alone samples. Since no phosphorylated bands are detected in HFF alone samples (data not shown), the phosphorylation of these proteins is likely induced by cell to cell contact. Thus, in order to avoid signaling events that might be induced by cell to cell contact or by exposure to cellular products from HSV-infected fibroblasts, all the experiments presented hereafter involved direct infection of Jurkat cells. As previously reported, we found that CD3-induced ERK1/2 activation

was inhibited in HSV-infected Jurkat cells compared to mock-infected cells (supplemental Fig. 1). In addition, at MOI of 10, 85–96% of Jurkat cells were infected with HSV-1 strain 17 or various KOS37 derivatives (supplemental Fig. 2). As described previously, HSV-infected T cells displayed prominent tyrosine-phosphorylated bands of ca. MW 50–62 and 90–95 kDa (Fig. 1A). The 90–95 kDa tyrosine phosphorylated band likely corresponds to VP11/12 (Zahariadis et al., 2008). The other bands have not been yet identified. In order to

investigate whether the 62 kDa and 56 kDa tyrosine phosphorylated proteins present in infected cells correspond to Dok-1 and Dok-2 respectively we performed immunoprecipitation experiments. Anti-Dok-2 immunoprecipitates were obtained from HSV-infected or mock-infected Jurkat cells, and were analyzed by anti-phosphotyrosine Western blotting (Fig. 1B). HSV-1 infection induced an increase in tyrosine phosphorylation of Dok-2. In addition, phosphorylated proteins of ca. MW 90–95 kDa co-precipitated with Dok-2 (Fig. 1B). A phosphorylated protein of ca. MW 37 kDa is also sometimes detectable in anti-Dok-2 immunoprecipitate (for example, Fig. 1D). Of note, the relative intensity of the phosphorylated p37 and p90-95 proteins that co-precipitated with Dok-2 varied from experiments to experiments. Unexpectedly, we observed a marked decrease in the levels of total Dok-2 protein in the immunoprecipitates from HSV-1-infected-Jurkat cell lysates despite the increase in the phosphorylated form of Dok-2 (Fig. 1B). Phosphorylation of Dok-1 upon HSV-1 infection was difficult to detect due to the low level of Dok-1 expression in Jurkat cells (data not shown). To circumvent this issue, we made use of previously described Jurkat clones that overexpressed HA-tagged Dok-1 or Dok-2 (Boulay et al., 2005; Nemorin et al., 2001). Anti-phosphotyrosine Western blotting on anti-HA immunoprecipitates confirmed that Dok-1 and Dok-2 are phosphorylated in HSV-1-infected Jurkat cells that overexpressed HA-tagged Dok-1 and HA-tagged Dok-2 respectively (Fig. 1C). In Jurkat cells overexpressing HA-Dok-2, levels of HA-Dok-2 were downmodulated upon HSV infection as detected by anti-HA Western blotting. In contrast, levels of HA-Dok-1 in Jurkat cells overexpressing HA-Dok-1 or levels of Dok-1 in Jurkat cells were comparable in mock- and HSV-infected cells (Fig. 1C). Of note in Jurkat cells overexpressing HA-Dok-2, the levels of Dok-1 are slightly reduced upon HSV-1 infection (Fig. 1C). Phosphorylation of Dok-2 was readily detectable at 2 h post-infection (pi) and peaked at 6 h pi (Fig. 1D). Following this time point there was a significant downregulation of Dok-2 expression such that at 12 h pi the level of Dok-2 expression was dramatically reduced. Despite this reduction, the level of Dok-2 phosphorylation at 12 h was superior to that at 6 h (see ratio of phosphoDok-2/total Dok-2, Fig. 1D). We detected a slight increase in total Dok-2 in mock-infected cells at 12 h pi, which likely reflects a small difference in loading, and which explains the increase in the signal for phosphorylated Dok-2 in this sample. In HSV-infected cells, diminished Dok-2 expression was not due to relocalization of Dok-2 into the nucleus because similar results were obtained when cell extracts were prepared with RIPA buffer containing high salt to disrupt and extract nuclear proteins instead of NP-40 lysis buffer (Fig. 1E). Together, these results demonstrate that HSV-1 infection induced the specific tyrosine phosphorylation of Dok-2 and Dok-1. Moreover, concomitantly, there is a downregulation of Dok-2 but not of Dok-1 protein expression.

3.2. VP11/12 is required for HSV-induced downmodulation of Dok-2 expression and Dok-2 phosphorylation

As mentioned above, VP11/12 is heavily phosphorylated upon HSV-1 infection of Jurkat cells. We could not confirm by Western blotting with anti-VP11/12 antibodies (Abs) on Dok-2 immunoprecipitates that the phosphorylated p90-95 Dok-binding protein corresponded to VP11/12 (Fig. 1B). However, Dok-associated VP11/12 might represent only a small fraction of the cellular pool of VP11/12 corresponding to the phospho-VP11/12 and thus making it difficult to detect. As part of our investigation into whether the p90-95 phosphoprotein associated with Dok-2 corresponds to VP11/12, we infected Jurkat cells with a VP11/12 null virus (Δ UL46) or a VP11/12 rescue virus (UL46-repaired virus, RUL46) and performed Dok-2 immunoprecipitations. The 90–95 kDa phosphoprotein that co-precipitated with Dok-2 upon infection of Jurkat cells with VP11/12-expressing HSV-1 disappeared in absence of VP11/12 (Fig. 2). Moreover, we found that HSV-1-driven induction of Dok-2 phosphorylation and its

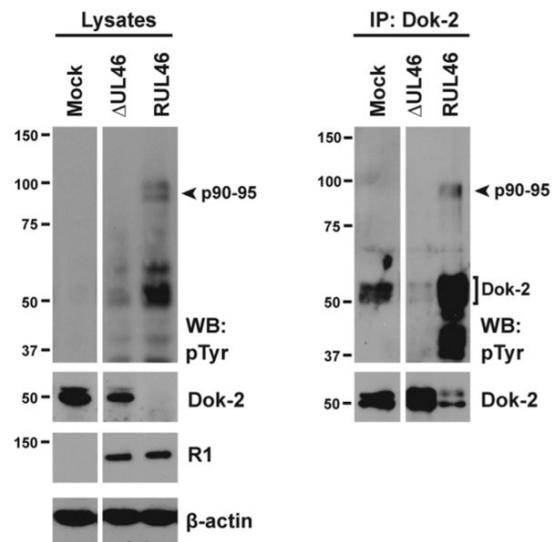


Fig. 2. VP11/12-dependent phosphorylation and degradation of Dok-2. Jurkat cells were mock infected or infected with a KOS37 UL46-null virus (Δ UL46), or a KOS37 UL46 repair virus (RUL46). At 12 h pi, cell lysates were prepared. Cell lysates were Western blotted with the indicated Abs (left panel). Cell extracts were immunoprecipitated with anti-Dok-2 Abs (C-ter) and analyzed by Western blotting with anti-pTyr mAbs, and then the membrane was stripped and re-probed with biotinylated anti-Dok-2 C-ter Abs (right panel). The white lines indicate where parts of the image were joined. The positions of Dok-2 and VP11/12 (p90-95) are indicated on the right and those of molecular mass markers (in kDa) on the left. Western blotting, WB; immunoprecipitation, IP.

association with a p90-95 phosphoprotein was also dependent on VP11/12 (Fig. 2). The absence of phosphorylation of Dok-2 and p90-95 is not surprising because VP11/12 is necessary for global induction of tyrosine phosphorylation since it is required for HSV-1-induced Lck activation (Fig. 2 and Wagner and Smiley, 2009). However, it is noteworthy that the level of Dok-2 phosphorylation was even slightly reduced in cells infected with VP11/12 null virus compared to that of mock-infected cells (Fig. 2). This finding indicates that even in absence of VP11/12, infection of Jurkat cells with HSV-1 modulates the activity of kinase or phosphatase and/or the accessibility to their substrates. Remarkably, the level of Dok-2 protein during infection for a VP11/12-null virus was similar to that of mock-infected cells (Fig. 2). Importantly, both viruses resulted in the accumulation of similar levels of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase (R1, Fig. 2), indicating, as previously reported, that VP11/12 did not modulate productive infection of Jurkat cells. Furthermore, since VP11/12 does not have a generalized effect on gene expression and HSV-1 infection leads to a generalized shutdown of host gene expression and of host protein synthesis (reviewed in Smiley, 2004) our results imply that VP11/12 downregulates Dok-2 post-translationally. Together, these results demonstrate that VP11/12 is required for HSV-induced degradation of Dok-2 but they do not allow one to conclude whether the p90-95 phosphoprotein that co-precipitated with Dok-2 in HSV-infected cells corresponds to VP11/12.

3.3. Dok-2 interacts with VP11/12

We took advantage of a previously derived strain of HSV-1 KOS37 that encodes C-terminally EGFP-tagged VP11/12 (UL46GFP) (Strunk et al., 2013) to carry out VP11/12-specific immunoprecipitations and Western blots. We performed GFP and Dok-2 immunoprecipitations with lysates of Jurkat cells infected with KOS37 VP11/12 null and

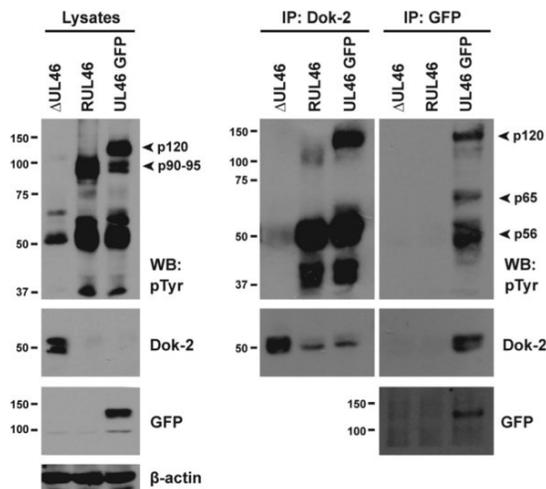


Fig. 3. Dok-2 interacts with phospho-VP11/12. Jurkat cells were mock infected or infected with a KOS37 VP11/12-null virus (Δ UL46), a KOS37 VP11/12 repair virus (RUL46) or a KOS37-derived virus expressing C-terminally GFP-tagged UL46 (UL46 GFP). At 10 h pi, the cell lysates were prepared. Cell lysates were Western blotted with the indicated Abs (left panel). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Dok-2 or anti-GFP Abs and analyzed by Western blotting with anti-pTyr mAbs (right panel). The membrane was stripped and re-probed with the indicated Abs. The white line indicates where parts of the image were joined. The positions of p120 (VP11/12GFP), p90-95 (VP11/12), p56 and p65 are indicated on the right and those of molecular mass markers (in kDa) on the left. Western blotting, WB; immunoprecipitation, IP.

repaired virus, and KOS37 virus expressing a GFP-tagged VP11/12. As previously reported, KOS37-UL46GFP infected Jurkat cells with similar efficiency as the corresponding wild type virus, VP11/12 null virus and rescue virus (data not shown and supplemental Fig. 2). In Jurkat cells infected with KOS37-UL46GFP, the p90-95 phospho-protein that co-precipitated with Dok-2 in Jurkat cells infected with KOS37-RUL46 was greatly diminished and replaced by a prominent band of ca. MW of 120 kDa that likely corresponds to phosphorylated VP11/12-GFP fusion protein (Fig. 3). The fainter bands migrating at ca. MW 90–95 kDa in the lysates and anti-GFP immunoprecipitates likely correspond to a degradation product of the VP11/12-GFP fusion protein. The amount of VP11/12 associated with Dok-2 was too low to be detectable by Western blotting with anti-GFP antibodies. However, we confirmed the Dok-2/VP11/12 association by performing a reciprocal co-immunoprecipitation using anti-GFP antibodies to precipitate VP11/12-GFP. Several phosphorylated proteins, including major bands of ca. MW of 65 kDa and 56 kDa, co-precipitated with VP11/12-GFP protein (Fig. 3). The phospho-p56 band that co-migrated with phospho-Dok-2 likely corresponds at least in part to phospho-Dok-2. Anti-Dok-2 Western blotting on anti-GFP immunoprecipitates confirmed that Dok-2 specifically co-precipitated with VP11/12-GFP in cells infected with KOS37-UL46GFP but not with the corresponding UL46 null or rescue virus (Fig. 3). Taken together, these data indicate that there is an interaction between VP11/12 and Dok-2 in HSV-infected Jurkat cells.

3.4. Downmodulation of Dok-2 expression requires VP11/12-mediated activation of SFKs

The VP11/12 tyrosine-based motifs at Y613 and Y624 both contribute to the interaction with and activation of Src Family Kinases (SFKs), including Lck (Strunk et al., 2016, 2013). In order to assess whether VP11/12-induced activation of SFKs was required for VP11/12-dependent degradation of Dok-2 and/or Dok-2/VP11/12

association, we compared the effects of KOS37-UL46GFP and KOS37-UL46GFPY613F/Y624F upon infection of Jurkat cells. Analysis of the whole cell lysates demonstrated that the WT and mutant UL46GFP viruses gave rise to equivalent levels of VP11/12 fusion protein and R1 expression (Fig. 4). Moreover, as previously reported, inactivation of the Y613 and Y624 motifs eliminated HSV-mediated enhanced tyrosine phosphorylation (Fig. 4). In Jurkat cells infected with KOS37-UL46GFPY613F/Y624F, Dok-2 was not degraded and not phosphorylated similar to what was observed in mock- or KOS37- Δ UL46-infected Jurkat cells (Figs. 3 and 4). Importantly, in KOS37-UL46GFPY613F/Y624F-infected cells the interaction of VP11/12 with Dok-2 was greatly reduced (Fig. 4) indicating that the amount of Dok-2 that co-precipitates with VP11/12 is influenced by the ability of VP11/12 to bind and activate SFKs. Together, these results indicate that VP11/12-induced SFKs activation is required for Dok phosphorylation and for Dok-2 binding to VP11/12.

3.5. SHC binding motif is required for Dok-2/VP11/12 interaction

The fact that VP11/12-induced SFK activation is required for VP11/12 phosphorylation and Dok-2/VP11/12 interaction suggest that tyrosine-based motif(s) are involved in the binding of Dok-2 to VP11/12. An indirect interaction of Dok-2 with LAT has been suggested to occur through Grb2/SHP-complex (Dong et al., 2006). Moreover, the sequence surrounding residue Y₆₅₇ (E₆₅₁EAENPLY₆₅₇) of VP11/12 which correspond to the SHC binding site represents a potential binding site for Dok-2 PTB domain (Songyang et al., 2001). We therefore tested whether VP11/12 tyrosine-based motifs corresponding to the SHC binding motif (NPLY₆₅₇) and the Grb2 binding motif (Y₆₃₃ENV) contribute to Dok-2/VP11/12 interaction once phosphorylated. Analysis by flow cytometry confirmed that WT and all the mutant UL46-GFP viruses used in this study infected Jurkat cells with the same efficiency (supplemental Fig. 2). Immunoprecipitations of GFP/VP11/12 and Dok-2 proteins were performed on mock-, KOS37-UL46GFP-, KOS37-UL46GFPY613F/Y624F-, KOS37-UL46GFPY633F-, or KOS37-UL46GFPY657F-infected cells. As described previously, VP11/12-GFP was phosphorylated when a VP11/12-GFP mutant deficient for Grb2 binding (KOS37-UL46GFPY633F) or SHC binding (KOS37-UL46GFPY657F) was used to infect Jurkat cells (Fig. 4A and C). Moreover, the phosphorylated p56 band that co-precipitated with UL46GFP was present when cells were infected with virus deficient for Grb2 and SHC binding (KOS37-UL46GFPY633F and KOS37-UL46GFPY657F, respectively; Fig. 4C). In contrast, the phospho-p65 band that co-precipitated with UL46GFP was quasi absent in immunoprecipitates from cells infected with the UL46GFP mutant deficient for Grb2 binding (Fig. 4C), although this may be due in part to the small reduction of the corresponding VP11/12 fusion protein. The identity of the phospho-p65 is unknown. Remarkably, in cells infected with VP11/12 mutant deficient for SHC binding, Dok-2 protein is not phosphorylated or degraded (Fig. 4B). In contrast, the VP11/12 mutant deficient for Grb2 binding retained the ability to induce Dok-2 phosphorylation and degradation (Fig. 4B). It should be noted that the phospho-p56 protein that co-precipitated with VP11/12GFP does not only correspond to phospho-Dok-2 since it was still present in the VP11/12GFP immunoprecipitate from KOS37-UL46GFPY657F-infected cells (Fig. 4C). We propose that the phospho-p56 protein that co-precipitated with VP11/12 in cells infected with virus deficient in SHC binding (KOS37-UL46GFPY657F) corresponds to the tyrosine kinase Lck. The absence of a phospho-p56 band in VP11/12GFP immunoprecipitate from cells infected with virus deficient in Lck binding (KOS37-UL46GFPY613F/Y624F) is in agreement with this hypothesis. Together these results indicate that the SHC binding motif of VP11/12 is required for Dok-2 binding, phosphorylation and degradation following HSV-1 infection.

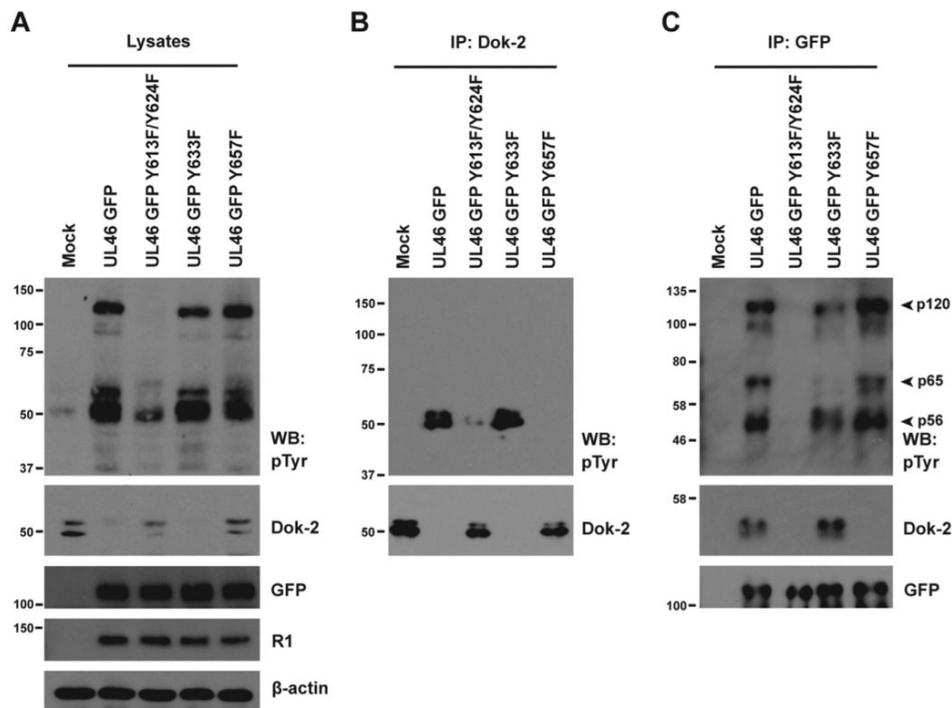


Fig. 4. Tyrosine phosphorylation and degradation of Dok-2 require VP11/12-mediated activation of SFKs and a phosphorylated SHC binding motif. Jurkat cells were mock infected or infected with the indicated virus (all viruses are KOS37-derived strains). At 10 h pi, the cell lysates were prepared. Cell lysates were Western blotted with the indicated Abs (A), and immunoprecipitated with anti-Dok-2 (B) or anti-GFP Abs (C) and analyzed by Western blotting with anti-pTyr mAbs. The membranes were then stripped and re-probed with the indicated Abs. The positions of p120 (VP11/12GFP), p56 and p65 are indicated on the right. and those of molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left. Western blotting, WB; immunoprecipitation, IP.

4. Discussion

In this report we show that upon HSV-1 infection Dok-2 is tyrosine phosphorylated and degraded. We propose that HSV-1-induced Dok-2 degradation and phosphorylation represent a novel mechanism of immune evasion, which evolved to specifically eliminate or inactivate HSV-1-specific T cells.

It seems paradoxical that HSV inhibits immune cell function and induces the degradation of an inhibitory adaptor such as Dok-2. We have previously shown that under normal signaling conditions Dok-2 but not Dok-1 protein levels are reduced following activation of effector cells and return to basal level in memory cells (Laroche-Lefebvre et al., 2016). The re-expression of Dok-2 is likely required to prevent harmful over-activation of the cells. Indeed, in absence of Dok proteins virus-specific CD8⁺ T cells are not maintained *in vivo* following infection with vaccinia virus (Laroche-Lefebvre et al., 2016) or HSV-1 (Lahmidi et al., 2017). Thus, the HSV-induced degradation of Dok-2, which prevents the re-expression step of Dok-2, removes a negative feedback regulatory loop, normally operative once antigen has been cleared and which turns off TCR signaling thus promoting quiescence of the cells.

We also demonstrated that HSV infection induces Dok-2 phosphorylation, which raises the question of the role of tyrosine phosphorylation in Dok function. The mechanism of Dok-mediated TCR signaling inhibition has not yet been fully elucidated. However, several molecular mechanisms have been proposed to explain how Dok proteins integrate negative feedback regulation of TCR signaling. Dok proteins might compete for the association of a positive regulator of TCR signaling as is the case for binding of the Dok PTB domain to the ITAM motif in CD3 ζ (Yasuda et al., 2007) and binding of the GRB2/SHIP-1/Dok

complex to LAT (Dong et al., 2006). Alternatively but not exclusively, Dok might mediate the membrane recruitment of negative regulators of TCR signaling such as RasGAP, Csk and SHIP-1 (Nemorin et al., 2001; Schoenborn et al., 2011). Binding of negative regulators requires the tyrosine phosphorylation of specific SH2-binding motifs located within the C-terminal region of Dok (Di Cristofano et al., 1998; Shah and Shokat, 2002; Songyang et al., 2001; Van Slyke et al., 2005; Zhao et al., 2006). In non-infected cells, Dok phosphorylation is detected early after TCR stimulation and returns to background levels after 30 min (Dong et al., 2006). In HSV-infected cells, we show in this study that phosphorylation of Dok-2 is not a transient event and rather is detected throughout the infection. Thus, phosphorylation of Dok-2 in infected cells likely attenuates incoming TCR signal thereby preventing activation of the cells. After 10 h of infection, although most of Dok-2 is degraded, the relative abundance of the phosphorylated form is dramatically increased. In conclusion, both HSV-induced phosphorylation and degradation of Dok-2 might be important *in vivo*, and be detrimental for activation and survival of virus-specific T cells.

We found that in HSV-infected cells Dok-2 interacts with the tegument protein VP11/12. Tegument proteins are released into the cytoplasm of the cell upon virus entry. There is evidence that VP11/12 localizes to the plasma membrane shortly following viral entry and/or at later stages prior to virion assembly (Murphy et al., 2008; Willard, 2002). We and others have previously demonstrated an inducible translocation of Dok proteins from the cytoplasm to the plasma membrane upon activation of immune receptors in lymphocytes (Dong et al., 2006; Nemorin et al., 2001). Both the PH and the PTB domains participate in the relocation of Dok to the membrane (Boulay et al., 2005; Yasuda et al., 2007; Zhao et al., 2001). We have

previously proposed that once at the membrane, Dok is phosphorylated by TCR-activated SFK such as Lck and Fyn (Nemorin and Duplay, 2000). What are the functional consequences of the interaction between VP11/12 and Dok-2? At least two potential signaling effects can be envisioned: altered sub-cellular localization of Dok-2 and/or phosphorylation of Dok-2. Our data are consistent with the idea that VP11/12-induced SFK activation is required for Dok phosphorylation. Indeed, in cells infected with VP11/12-deficient mutant or mutant for the SFK binding motifs VP11/12-Y613F/Y624F, two conditions where SFK activation is not induced, Dok is not phosphorylated. However, it is difficult to distinguish whether absence of Dok phosphorylation is directly or indirectly due to the absence of HSV-induced SFK activation. In addition, we demonstrated that the interaction of Dok-2 with VP11/12 is dependent on VP11/12 phosphorylation. What is the VP11/12 binding motif for Dok-2 association? Using a combinatorial peptide library approach, the consensus binding motif for the PTB domain of Dok-1 was defined as Y/MXXNXLPY (Songyang et al., 2001). The sequence surrounding residue Y₆₅₇ (Y₆₅₁EAENPLY₆₅₇) of VP11/12 represents a potential binding site for Dok PTB domain. The same NPLY motif found in CD200R has been shown to bind Dok-2 PTB domain with a tenfold higher affinity than Dok-1 (Mihirshahi et al., 2009; Songyang et al., 2001). The difference in binding affinity between Dok-1 and Dok-2 might explain why Dok-2 but not Dok-1 is found associated with VP11/12. Our results confirm that once phosphorylated the NPLY₆₅₇ motif represents a binding site for Dok-2. Remarkably, Dok-2 is not phosphorylated when the VP11/12 NPLY motif required for Dok-2 binding is inactivated, suggesting that binding of Dok-2 to VP11/12 is required to induce Dok-2 phosphorylation even when VP11/12-induced SFK activation is operative. In addition, we showed that HSV-1 infection induced Dok-1 phosphorylation but we were not able to demonstrate an interaction between VP11/12 and Dok-1. This suggests that the level of Dok-1 is too low to be detectable by Western blotting or that phosphorylation of Dok-1 involves other molecular mechanisms than those used by Dok-2. Future experimentation is needed to confirm that Dok-2 binds directly to VP11/12, and if so, whether additional viral or host proteins are present in the Dok-2/VP11/12 complex.

Is HSV-induced inhibition of TCR signaling dependent on Dok-2? The precise mechanism(s) by which HSV induces inhibition of TCR signaling in infected lymphocytes is not clear (reviewed in Jerome, 2008). VP11/12 is not required for at least some of the HSV-induced changes in TCR signaling (Zahariadis et al., 2008). In absence of VP11/12 we found that Dok-2 is not degraded or phosphorylated. Therefore, it seems unlikely that HSV-induced inhibition of TCR signaling is fully dependent on Dok proteins. However, as mentioned before, it is likely that Dok-2 regulates signaling pathways in vivo that contribute to altered lymphocyte function and/or survival.

The mechanism of HSV-induced Dok-2 degradation is unknown but is dependent on Dok phosphorylation. Previous studies have shown that tyrosine kinases such as p210bcr-abl, v-Src and BRK downregulate Dok-1 in a kinase activity-dependent manner and by an ubiquitin-proteasome-mediated mechanism (Janas and Van Aelst, 2011; Miah et al., 2014). By analogy, HSV-1 might destabilize Dok-2 by promoting its ubiquitination, and its degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. VP11/12 has been shown to be degraded in an ICP0-dependent proteasome-mediated manner during HSV-1 infection (Lin et al., 2013). Intriguingly, HSV-1 induced Dok-1 phosphorylation but not its degradation. The different cellular targeting of Dok-1 and Dok-2 upon HSV infection is consistent with our previously reported data on the specific degradation of Dok-2 in TCR-stimulated cells (Laroche-Lefebvre et al., 2016) and suggest that Dok-1 and Dok-2 do not have fully overlapping roles in regulating T cell responses. Further studies are required to determine whether the viral E3 ubiquitin ligase ICP0 is involved in the mechanism of Dok-2 degradation in HSV-infected cells.

In conclusion, we propose that in the course of HSV-infection of T

cells, Dok-2 is recruited to the membrane by VP11/12. Once at the membrane Dok-2 is phosphorylated by VP11/12-associated Lck. VP11/12/Dok-2 complex is likely associated with other yet unidentified downstream signaling components of pathways that will target Dok-2 for degradation. Further studies are required to elucidate the specific signaling events that are modulated by the VP11/12/Dok-2 complex. The VP11/12-mediated Dok-2 phosphorylation and degradation is likely to represent an essential step in the strategy developed by HSV to inactivate T cells and might reveal unknown mechanisms involved in TCR/CD28-mediated regulation of Dok proteins.

Acknowledgments

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research to P.D. (MOP-74445) and A.P. (MOP-82924).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.virol.2017.08.018.

References

- Aubert, M., Yoon, M., Sloan, D.D., Spear, P.G., Jerome, K.R., 2009. The virological synapse facilitates herpes simplex virus entry into T cells. *J. Virol.* 83 (12), 6171–6183.
- Banerjee, K., Biswas, P.S., Rouse, B.T., 2005. Elucidating the protective and pathologic T cell species in the virus-induced corneal immunoinflammatory condition herpetic stromal keratitis. *J. Leukoc. Biol.* 77 (1), 24–32.
- Boulay, I., Nemorin, J.G., Duplay, P., 2005. Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation. *J. Immunol.* 175 (7), 4483–4489.
- Cohen, E.A., Gaudreau, P., Brazeau, P., Langelier, Y., 1986. Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *J. Virol.* 60 (3), 1130–1133.
- Confer, D.L., Verrellotti, G.M., Kotasek, D., Goodman, J.L., Ochoa, A., Jacob, H.S., 1990. Herpes simplex virus-infected cells disarm killer lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (9), 3609–3613.
- Di Cristofano, A., Carpino, N., Dunant, N., Friedland, G., Kobayashi, R., Strife, A., et al., 1998. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 273 (9), 4827–4830.
- Dong, S., Corre, B., Foulon, E., Dufour, E., Veillette, A., Acuto, O., et al., 2006. T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203 (11), 2509–2518.
- Duplay, P., Thome, M., Herve, F., Acuto, O., 1994. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* 179 (4), 1163–1172.
- Han, J.Y., Sloan, D.D., Aubert, M., Miller, S.A., Dang, C.H., Jerome, K.R., 2007. Apoptosis and antigen receptor function in T and B cells following exposure to herpes simplex virus. *Virology* 359 (2), 253–263.
- Hill, A., Jugovic, P., York, L., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., et al., 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375 (6530), 411–415.
- Janas, J.A., Van Aelst, L., 2011. Oncogenic tyrosine kinases target Dok-1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation to promote cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 31 (13), 2552–2565.
- Jerome, K.R., 2008. Viral modulation of T-cell receptor signaling. *J. Virol.* 82 (9), 4194–4204.
- Khanna, K.M., Bonneau, R.H., Kinchington, P.R., Hendricks, R.L., 2003. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 18 (5), 593–603.
- Lahmidi, S., Yousefi, M., Dridi, S., Duplay, P., Pearson, A., 2017. Dok-1 and Dok-2 are required to maintain herpes simplex virus 1-specific CD8+ T cells in a murine model of ocular infection. *J. Virol.* 91 (15), e02297-16.
- Laroche-Lefebvre, C., Yousefi, M., Daudelin, J.F., Charpentier, T., Tarrab, E., Klinck, R., et al., 2016. Dok-1 and Dok-2 Regulate the Formation of Memory CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 197 (9), 3618–3627.
- Lin, A.E., Greco, T.M., Dohner, K., Sodeik, B., Cristea, I.M., 2013. A proteomic perspective of inbuilt viral protein regulation: pUL46 tegument protein is targeted for degradation by ICP0 during herpes simplex virus type 1 infection. *Mol. Cell. Proteom.* 12 (11), 3237–3252.
- Liu, T., Khanna, K.M., Chen, X., Fink, D.J., Hendricks, R.L., 2000. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J. Exp. Med.* 191 (9), 1459–1466.
- Lymberopoulos, M.H., Pearson, A., 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363 (2), 397–409.
- Manickan, E., Rouse, B.T., 1995. Roles of different T-cell subsets in control of herpes

- simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J. Virol.* 69 (12), 8178–8179.
- Miah, S., Goel, R.K., Dai, C., Kalra, N., Beaton-Brown, E., Bagu, E.T., et al., 2014. BRK targets Dok1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation to promote cell proliferation and migration. *PLoS One* 9 (2), e87684.
- Mihrshahi, R., Barclay, A.N., Brown, M.H., 2009. Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *J. Immunol.* 183 (8), 4879–4886.
- Murphy, M.A., Bucks, M.A., O'Regan, K.J., Courtney, R.J., 2008. The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids. *Virology* 376 (2), 279–289.
- Nemorin, J.G., Duplay, P., 2000. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275 (19), 14590–14597.
- Nemorin, J.G., Laporte, P., Berube, G., Duplay, P., 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166 (7), 4408–4415.
- Puttur, F.K., Fernandez, M.A., White, R., Roediger, B., Cunningham, A.L., Weninger, W., et al., 2010. Herpes simplex virus infects skin gamma delta T cells before Langerhans cells and impedes migration of infected Langerhans cells by inducing apoptosis and blocking E-cadherin downregulation. *J. Immunol.* 185 (1), 477–487.
- Raftery, M.J., Behrens, C.K., Muller, A., Krammer, P.H., Walczak, H., Schonrich, G., 1999. Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J. Exp. Med.* 190 (8), 1103–1114.
- Schoenborn, J.R., Tan, Y.X., Zhang, C., Shokat, K.M., Weiss, A., 2011. Feedback circuits monitor and adjust basal Lck-dependent events in T cell receptor signaling. *Sci. Signal.* 4 (190), ra59.
- Shah, K., Shokat, K.M., 2002. A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. *Chem. Biol.* 9 (1), 35–47.
- Sheridan, B.S., Cherpes, T.L., Urban, J., Kalinski, P., Hendricks, R.L., 2009. Reevaluating the CD8 T-cell response to herpes simplex virus type 1: involvement of CD8 T cells reactive to subdominant epitopes. *J. Virol.* 83 (5), 2237–2245.
- Sloan, D.D., Jerome, K.R., 2007. Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. *J. Virol.* 81 (22), 12504–12514.
- Sloan, D.D., Zahariadis, G., Posavad, C.M., Pate, N.T., Kussick, S.J., Jerome, K.R., 2003. CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J. Immunol.* 171 (12), 6733–6741.
- Sloan, D.D., Han, J.Y., Sandifer, T.K., Stewart, M., Hinz, A.J., Yoon, M., et al., 2006. Inhibition of TCR signaling by herpes simplex virus. *J. Immunol.* 176 (3), 1825–1833.
- Smiley, J.R., 2004. Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J. Virol.* 78 (3), 1063–1068.
- Songyang, Z., Yamanashi, Y., Liu, D., Baltimore, D., 2001. Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling. *J. Biol. Chem.* 276 (4), 2459–2465.
- St Leger, A.J., Peters, B., Sidney, J., Sette, A., Hendricks, R.L., 2011. Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 186 (7), 3927–3933.
- St Leger, A.J., Jeon, S., Hendricks, R.L., 2013. Broadening the repertoire of functional herpes simplex virus type 1-specific CD8+ T cells reduces viral reactivation from latency in sensory ganglia. *J. Immunol.* 191 (5), 2258–2265.
- Strunk, U., Saffran, H.A., Wu, F.W., Smiley, J.R., 2013. Role of herpes simplex virus VP11/12 tyrosine-based motifs in binding and activation of the Src family kinase Lck and recruitment of 85, Grb2, and Shc. *J. Virol.* 87 (20), 11276–11286.
- Strunk, U., Ramos, D.G., Saffran, H.A., Smiley, J.R., 2016. Role of Herpes simplex virus 1 VP11/12 tyrosine-based binding motifs for Src family kinases, p85, Grb2 and Shc in activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Virology* 498, 31–35.
- Van Slyke, P., Coll, M.L., Master, Z., Kim, H., Filmus, J., Dumont, D.J., 2005. Dok-R mediates attenuation of epidermal growth factor-dependent mitogen-activated protein kinase and Akt activation through processive recruitment of c-Src and Csk. *Mol. Cell. Biol.* 25 (9), 3831–3841.
- Wagner, M.J., Smiley, J.R., 2009. Herpes simplex virus requires VP11/12 to induce phosphorylation of the activation loop tyrosine (Y394) of the Src family kinase Lck in T lymphocytes. *J. Virol.* 83 (23), 12452–12461.
- Wagner, M.J., Smiley, J.R., 2011. Herpes simplex virus requires VP11/12 to activate Src family kinase-phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling. *J. Virol.* 85 (6), 2803–2812.
- Willard, M., 2002. Rapid directional translocations in virus replication. *J. Virol.* 76 (10), 5220–5232.
- Yang, Y., Wu, S., Wang, Y., Pan, S., Lan, B., Liu, Y., et al., 2015. The Us3 protein of herpes simplex virus 1 inhibits T Cell signaling by confining linker for activation of T cells (LAT) activation via TRAF6 protein. *J. Biol. Chem.* 290 (25), 15670–15678.
- Yasuda, T., Bundo, K., Hino, A., Honda, K., Inoue, A., Shirakata, M., et al., 2007. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunol.* 19 (4), 487–495.
- Zahariadis, G., Wagner, M.J., Doepker, R.C., Maciejko, J.M., Crider, C.M., Jerome, K.R., et al., 2008. Cell-type-specific tyrosine phosphorylation of the herpes simplex virus tegument protein VP11/12 encoded by gene UL46. *J. Virol.* 82 (13), 6098–6108.
- Zhao, M., Schmitz, A.A., Qin, Y., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Van Aelst, L., 2001. Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *J. Exp. Med.* 194 (3), 265–274.
- Zhao, M., Janas, J.A., Niki, M., Pandolfi, P.P., Van Aelst, L., 2006. Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26 (7), 2479–2489.

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

1 IMPORTANCE DES PROTÉINES DOK-1 ET DOK-2 LORS DE L'INFECTION PAR LE VHS-1 DANS UN MODÈLE MURIN D'INFECTION OCULAIRE

Dans la première étude, nous avons évalué le rôle de Dok-1 et Dok-2 dans la régulation de l'infection par le VHS-1 dans un modèle murin d'infection oculaire. Il convient de préciser que les souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 (DKO) utilisées dans nos expériences sont âgées entre six et douze semaines. Elles ne présentent donc pas de syndrome myéloprolifératif ou d'autres types de tumeurs qui se manifestent vers l'âge de douze mois (Berger *et al.*, 2010; Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). De plus, la déficience en Dok-1 et Dok-2 n'affecte pas l'homéostasie des lymphocytes T et B à cet âge dans les souris (Coppin *et al.*, 2016; Niki *et al.*, 2004). En accord avec les résultats précédents, nous avons observé un nombre similaire de cellules CD3⁺ dans la rate des souris DKO et des souris de type sauvage (WT). De plus, nous avons confirmé que le nombre total de lymphocytes T CD8⁺ dans la rate des souris DKO est également similaire aux souris WT (**Annexe 1**).

1.1 Dok-1 et Dok-2 sont nécessaires pour le maintien de la réponse T CD8⁺ spécifique au VHS-1

1.1.1 Rôle des Dok dans la formation des cellules T CD8⁺ mémoires

Dans notre étude, nous avons travaillé avec des souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 que nous avons infectées par le VHS-1 au niveau du site oculaire. Nous avons observé qu'en l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 était significativement réduit au pic de la réponse effectrice dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques drainant) et dans les sites de réplication du VHS-1 (cornée, et ganglions trigéminaux). Plus encore, la réduction du nombre des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 était plus prononcée durant la phase mémoire dans les souris DKO comparativement aux souris WT.

Dans notre modèle murin, la déficience en Dok-1 et Dok-2 affecte tout le compartiment hématopoïétique. Toutefois, une étude rapporte que suite à l'infection par le virus de la vaccine (VV-ova), le défaut de la formation de la réponse mémoire T CD8⁺ spécifique à l'épitope ova est intrinsèque aux cellules T (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). En effet, l'utilisation de transfert adoptif de cellules T CD8⁺ DKO ou de cellules T CD8⁺ WT a permis de mettre en évidence une diminution

significative au cours de la phase d'expansion, et plus sévère lors de la phase mémoire des cellules T CD8⁺ DKO comparativement aux cellules T CD8⁺ WT suite à l'infection par VV-ova (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Comme décrit précédemment, Dok-1 et Dok-2 semblent agir comme des « freins » pour prévenir une activation excessive des cellules T activées et de ce fait leur mort prématurée. Nous pouvons imaginer que dans notre modèle d'étude le même scénario se produit et qu'en l'absence des protéines Dok, l'hyperactivation des cellules T CD8⁺ empêche les cellules d'entrer en état de quiescence, et de ce fait elles meurent par apoptose. Toutefois, dans notre modèle d'étude, nous ne pouvons pas exclure d'autres hypothèses et que d'autres cellules immunitaires soient impliquées dans le maintien de la réponse mémoire contre le VHS-1. En effet, l'absence de Dok-1 et Dok-2 pourrait influencer la maturation, la fonctionnalité des CPA, l'environnement inflammatoire, l'aide des lymphocytes T CD4⁺ durant l'activation des lymphocytes T CD8⁺, etc... L'utilisation de transferts adoptifs de lymphocytes déficients en Dok-1 et Dok-2 avec un TCR spécifique à gB₄₉₈₋₅₀₅ serait alors nécessaire pour confirmer que le défaut de la formation de la réponse mémoire T CD8⁺ spécifique au VHS-1 est intrinsèque aux cellules T.

Nous avons observé que la déficience en Dok-1 et Dok-2 n'affecte pas la capacité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 à se différencier en précurseurs mémoires (MPEC). En effet, l'évaluation des marqueurs KLRG-1 et CD127 (récepteur chaîne α de l'IL-7) au sein de la population des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 présente dans la rate à 8 jours post-infection (8 jpi) nous a permis de confirmer que les proportions des MPEC et des cellules effectrices à court terme (SLEC) étaient similaires dans les souris DKO et les souris WT. Ainsi, la réduction sévère du nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 observée durant la phase mémoire dans les souris DKO n'est pas due à leur incapacité à se différencier en précurseurs mémoires. Nous avons également constaté que la déficience en Dok-1 et Dok-2 n'affecte pas la capacité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 à proliférer *in vivo*. Ainsi, la diminution du nombre de ces lymphocytes dans la rate est plutôt due à une réduction de leur survie qu'à l'altération de leur capacité proliférative.

La déficience en Dok-1 et Dok-2 touche davantage la différenciation finale et/ou la survie des cellules T_{EM} (CD44^{hi} CD62L⁻) que les cellules T_{CM} (CD44^{hi} CD62L⁺). En effet, le nombre de lymphocytes T_{EM} CD8⁺ gB-spécifiques est six fois moindre dans les souris DKO comparé aux souris WT, alors que le nombre de lymphocytes T_{CM} CD8⁺ gB-spécifiques est deux fois moindre dans les souris DKO durant la phase mémoire. La compréhension des mécanismes à l'origine de la réduction sélective des cellules T_{EM} dans les souris DKO est centrale, puisque leur présence

en grand nombre a été associée à une meilleure protection contre les pathologies induites par le VHS-1 chez l'homme (Srivastava *et al.*, 2017b). À ce stade de l'étude, il est difficile d'expliquer pourquoi la survie des T_{EM} est plus affectée que celle des T_{CM} en l'absence des protéines Dok ; des analyses supplémentaires sont nécessaires mais quelques éléments dans la littérature peuvent y contribuer. Le modèle selon lequel la force du signal du TCR est un facteur majeur dans la différenciation des cellules T, et que les T_{CM} sont générés par une stimulation sous-optimale du TCR comparé aux T_{EM} pourrait aider à la compréhension de nos résultats (Chang *et al.*, 2014; Daniels & Teixeira, 2015; Sallusto *et al.*, 2004). Les MPEC qui se sont différenciées en T_{EM} suite à une stimulation du TCR plus élevée pourraient ne pas être capables de rentrer en quiescence en l'absence de Dok-1 et Dok-2 et une majeure partie des T_{EM} serait supprimée pendant la phase de contraction. Les MPEC qui se sont différenciées en T_{CM} suite à une stimulation plus faible du TCR seraient alors moins affectées par l'absence de la boucle de rétro-inhibition exercée par Dok-1 et Dok-2. Un autre élément pourrait expliquer cette différence de survie entre les T_{EM} et les T_{CM}. En effet, bien que nous n'ayons pas évalué le facteur de transcription eomesodermin (Eomes), Laroche-Lefebvre *et al.* rapportent que les lymphocytes T CD8⁺ DKO effecteurs présentent une augmentation de l'expression de Eomes durant la phase de l'expansion. L'expression d'Eomes immédiatement après l'activation des lymphocytes T CD8⁺ ne conduit pas à une meilleure formation de la mémoire au sens large mais contribue plutôt à une formation efficace des T_{CM} (Paley *et al.*, 2013). D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la formation soit des T_{EM}, soit des T_{CM} comme inhibitor of DNA binding (ID)3 et ID2 (Yang *et al.*, 2011). Ainsi, il conviendrait d'évaluer si l'absence des protéines Dok dans le contexte de l'infection par le VHS-1 a un impact sur les facteurs de transcription comme Eomes, T-bet, et autres facteurs pro- et anti-apoptotiques au sein même des cellules T_{EM} et T_{CM} (Chang *et al.*, 2014).

1.1.2 Influence de Dok-1 et Dok-2 sur le répertoire des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1

Au cours de cette étude, nous avons suivi la réponse spécifique T CD8⁺ contre le peptide immunodominant de la glycoprotéine virale gB₄₉₈₋₅₀₅. D'autres épitopes viraux sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ : ils sont au nombre de dix-neuf dont onze dérivent de protéines à cinétique précoces et huit sont issus de protéines à cinétique tardive dans les souris C57BL/6 (St Leger *et al.*, 2011; Treat *et al.*, 2017). Il a été établi que 50% des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 reconnaissent gB₄₉₈₋₅₀₅ (gB-spécifiques) et 50% reconnaissent les épitopes subdominants (non-gB-spécifiques) avec une hiérarchie dans la reconnaissance similaire pour

les lymphocytes T CD8⁺ des ganglions trigéminaux (TG) et de la rate (St Leger *et al.*, 2011). La majorité des lymphocytes T CD8⁺ qui infiltrent et qui sont retenus dans les TG sont spécifiques au VHS-1, et le ratio de 1:1 (gB-spécifiques:non-gB-spécifiques) est maintenu durant la latence virale (Sheridan *et al.*, 2009; St Leger *et al.*, 2011). Nous avons observé qu'en moyenne 40% des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant les TG des souris WT étaient gB-spécifiques. Nos observations sont en accord avec la littérature et les variations minimales observées entre les différentes études peuvent être reliées au type de tétramère utilisé et à la technique de dissociation des TG (Treat *et al.*, 2017). Nous avons caractérisé les lymphocytes T CD8⁺ provenant de ces TG à l'aide d'un anticorps dirigé contre le CD103. Le CD103, la chaîne α du récepteur intégrine $\alpha\text{E}\beta\text{7}$ pour la cadhérine-E, permet aux lymphocytes T CD8⁺ d'être retenus dans les tissus. Nous avons observé qu'environ 60% des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques présents dans les TG des souris WT et DKO durant la phase mémoire expriment le CD103. Il s'agit de la première étude à évaluer le CD103 sur la population de T CD8⁺ gB-spécifiques présente dans les TG durant la phase de latence.

Nous avons observé qu'en l'absence de Dok-1 et Dok-2, seulement 26% des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le TG sont gB-spécifiques à 8 jpi contre 39.5 % pour les souris WT. Leur proportion diminue à 19% durant la latence virale dans les souris DKO contre 38% pour les souris WT. Compte tenu que les lymphocytes T CD8⁺ retenus dans les TG sont tous spécifiques au VHS-1, il convient alors de se demander quelle est la spécificité des lymphocytes T CD8⁺ restants ? Il est généralement admis que la phase de contraction affecte de la même manière les cellules T CD8⁺ reconnaissant les épitopes immunodominants et subdominants. Il serait alors intéressant de voir si les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant les épitopes subdominants sont aussi affectés par l'absence de Dok-1 et Dok-2 dans la rate et les TG. En effet, la stimulation antigénique varie en terme de « force de signal » dépendamment des épitopes reconnus par le TCR. Il est alors probable que la hiérarchie dans la reconnaissance des épitopes soit perturbée en l'absence des protéines Dok (Corse *et al.*, 2011). Il serait notamment intéressant d'évaluer si le ratio de 1:1, à savoir 50% des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques et non-gB-spécifiques est maintenu dans les TG pendant la phase de la latence virale dans les souris DKO (Sheridan *et al.*, 2009). On pourrait s'attendre à ce que l'amplitude de la réponse T CD8⁺ spécifique augmente pour un ou plusieurs autres épitopes subdominants connus du VHS-1. En effet, une récente étude démontre que l'infection oculaire des souris C57BL/6 avec le VHS-1 qui ne contient pas l'épitope immunodominant (gB₄₉₈₋₅₀₅) conduit à une infiltration similaire en terme de nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans les TG et le répertoire des épitopes reconnus habituellement par le TCR est largement maintenu mais toutefois modifié en terme de hiérarchie (Treat *et al.*, 2017).

En effet, les auteurs observent une réponse compensatoire avec l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant les épitopes subdominants (Treat *et al.*, 2017). Néanmoins, on ne peut pas exclure qu'en l'absence des protéines Dok le répertoire des TCR soit différent puisqu'il a été rapporté que la suppression de la séquence codante pour un peptide immunodominant peut conduire à l'apparition d'autres épitopes « cryptiques » (Holtappels *et al.*, 2008; Stock *et al.*, 2006).

1.1.3 Rôle des Dok dans les capacités effectrices des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques

Les protéines Dok ne semblent pas affecter les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques, car en l'absence des Dok ils conservent leurs capacités cytotoxiques et leurs capacités à produire de l'IFN- γ , et du TNF- α . L'évaluation des fonctions effectrices a été effectuée à partir des splénocytes issus des souris DKO et WT à 8 jpi que nous avons stimulés *ex vivo* avec le peptide gB₄₉₈₋₅₀₅. Nos résultats diffèrent des études précédentes dans lesquelles, suite à une infection par VV-ova, le pourcentage de cellules T CD8⁺ OT-I déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisant du granzyme B à 4 et 7 jpi ou de l'IFN- γ et du TNF- α à 7 jpi était supérieure à celui des cellules T CD8⁺ OT-I WT (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Cependant, l'augmentation des capacités effectrices en l'absence de Dok-1 et Dok-2 dépend du jour post-infection où les rates sont récoltées et des cytokines évaluées. Par exemple, à 4 et 35 jpi, le pourcentage des cellules T CD8⁺ OT-I déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisant de l'IFN- γ et du TNF- α est similaire à celui des cellules T CD8⁺ OT-I WT I déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisant seulement de l'IFN- γ est similaire à celui des cellules T CD8⁺ OT-I WT (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Aussi, que ce soit à 4, 7 ou 35 jpi, le pourcentage des cellules T CD8⁺ OT-I déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisant seulement de l'IFN- γ est similaire à celui des cellules T CD8⁺ OT-I WT (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). De plus, la stimulation du TCR *in vitro* d'une population polyclonale de lymphocytes T CD4⁺ issus de souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisent plus d'IL-2 et d'IFN- γ comparativement aux lymphocytes T CD4⁺ provenant de souris WT (Yasuda *et al.*, 2007). Nous ne pouvons pas exclure dans notre étude que les capacités effectrices ont pu être altérées de manière transitoire avant 8 jpi et des expériences supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact des Dok sur les capacités effectrices au cours de l'infection par le VHS-1.

1.1.4 Redondance de fonction des protéines Dok

Nous avons aussi déterminé que la simple déficience en Dok-1 ou en Dok-2 ne diminue pas le nombre de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans la rate à 8 jpi (**Annexe 2**). Nos résultats sont en accord avec des études précédentes qui montrent également une redondance de fonction pour Dok-1 et Dok-2. Par exemple, les souris simples knock-out ne développent pas de syndrome myéloprolifératif (Niki *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004), ni de défaut dans la maturation des cellules NK en périphérie (Celis-Gutierrez *et al.*, 2014) contrairement aux souris DKO. De plus, des lymphocytes T CD4⁺ issus de la rate de souris simples knock-out présentent une prolifération et une production en IL-2 relativement similaire aux lymphocytes T CD4⁺ des souris WT suite à la stimulation de leur TCR (Yasuda *et al.*, 2007). À l’opposé, les lymphocytes T CD4⁺ issus de la rate de souris DKO présentent une augmentation plus marquée de la prolifération et de la production en IL-2 comparativement aux lymphocytes T CD4⁺ des souris WT et simples knock-out (Yasuda *et al.*, 2007).

1.2 Dok-1 et Dok-2 ne sont pas essentielles dans le contrôle de la réplication du VHS-1 durant l’infection aiguë

Le contrôle de la réplication du VHS-1 sur le site oculaire implique différentes cellules de la réponse immunitaire innée et il a été décrit que les cellules NK, les macrophages et les monocytes inflammatoires sont parmi les cellules principalement impliquées dans la clairance virale dès les premiers jours suivant l’infection (Conrady *et al.*, 2013; Royer *et al.*, 2015), le rôle des neutrophiles étant encore débattu. Ces cellules restreignent la réplication du VHS-1 par l’intermédiaire du NO, du TNF- α et de l’IFN- γ . Puisque les protéines Dok-1 et Dok-2 sont également exprimées dans les cellules NK et les cellules d’origine myéloïde et qu’elles régulent soit négativement, soit positivement les voies de signalisation en aval de certains récepteurs (voir section 5.5.1 et 5.5.2 de l’introduction), nous nous attendions à ce qu’elles aient un impact dans la réplication virale sur le site oculaire. En particulier, une étude rapporte que la sécrétion en NO et en TNF- α a été réduite dans les macrophages provenant des souris DKO infectés par *Leishmania* et stimulés par l’IFN- γ (Alvarez de Celis *et al.*, 2015). Donc, la déficience en Dok-1 et Dok-2 aurait pu entraîner une clairance du VHS-1 moins efficace durant l’infection aiguë. Toutefois, nous avons observé que les titres viraux sont similaires sur le site oculaire pour les souris WT et DKO, et que la cinétique de la clairance virale est similaire, avec une clairance complète du virus à partir de 8 jpi coïncidant avec l’arrivée massive des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 (Lang & Nikolich-Zugich, 2005). Ces observations sont aussi compatibles

avec le fait que la déficience en Dok-1 et Dok-2 n'a pas altéré l'infiltration des monocytes inflammatoires, des monocytes/macrophages, des neutrophiles et des cellules T dans la cornée à 3 et 8 jpi. Par contre, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques recrutés sur le site oculaire à 8 jpi était réduit dans les souris DKO. Compte tenu que la déficience en Dok-1 et Dok-2 ne semble pas affecter les capacités fonctionnelles évaluées *ex vivo* des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques, nos résultats démontrent que les lymphocytes T CD8⁺ bien que moins nombreux étaient suffisants pour mener la clairance du virus. Par ailleurs, la réplication virale durant l'infection aiguë peut varier selon le fond génétique de la souris, avec des titres viraux plus élevés du VHS-1 sur le site périphérique de souris susceptibles comparé aux souris résistantes C57BL/6 (Kastrukoff *et al.*, 2010). Ici, nous avons observé que le contrôle de la réplication sur le site oculaire des souris susceptibles 129/Sv déficientes en Dok-1 et Dok-2 était similaire aux souris 129/Sv de type sauvage, soutenant davantage la notion que Dok-1 et Dok-2 ne sont pas nécessaires dans le contrôle de la réplication aiguë du VHS-1.

L'une des caractéristiques du VHS-1 est de se rendre dans le système nerveux périphérique suite à l'infection primaire des cellules épithéliales de la muqueuse. À 3 jpi, les titres viraux mesurés dans les TG des souris WT et DKO était du même ordre de grandeur. Toutefois, nous avons noté une réduction d'environ trois fois dans les titres viraux dans les TG des souris DKO. L'infiltration des monocytes/macrophages et des monocytes inflammatoires étaient similaires dans les TG des souris DKO comparé aux souris WT, cependant nous n'avons pas évalué l'impact de Dok-1 et Dok-2 sur leurs capacités effectrices. Aussi, nous ne pouvons pas exclure que des différences dans l'infiltration leucocytaire dans les TG s'opèrent plus tôt dans l'infection comme à 1 ou 2 jpi. De plus d'autres cellules exprimant Dok-1 et Dok-2, que nous n'avons pas évaluées, sont impliquées dans le contrôle de la réplication du VHS-1 dans les TG. En effet, les cellules NK et les cellules T TCR $\gamma\delta$ participent au contrôle de la réplication du VHS-1 dans les TG *via* la production de TNF- α , d'INF- γ et de granzyme B (Lucinda *et al.*, 2017; Sciammas *et al.*, 1997). Enfin, il conviendrait d'évaluer si le nombre réduit de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans les souris DKO suffit pour mener la clairance virale en analysant les titres viraux dans les TG au-delà de 3 jpi et ce jusqu'à 6 jpi où la réplication virale est encore détectable (Lang & Nikolich-Zugich, 2005).

Les symptômes cliniques induits par le VHS-1 ont été évalués à l'aveugle chaque jour dès l'apparition des premiers signes cliniques (4 jpi) jusqu'à la résolution de la maladie. Les manifestations cliniques de type inflammatoire apparaissent dans la région péri-oculaire et elles sont causées par la dissémination du virus des TG vers la peau durant la phase aiguë de

l'infection (Summers *et al.*, 2001). On peut alors observer la perte de poils, une inflammation sévère, des lésions sur la peau et la sévérité des symptômes dépend de la quantité de virus qui se dissémine lors de l'infection aiguë. La maladie a été évaluée par l'attribution de scores tenant compte des symptômes mentionnés ci-dessus et de leur sévérité. Nous avons observé que les souris DKO ont développé une maladie progressive avec une cinétique similaire à celle observée chez les souris WT. Nous avons toutefois noté une légère diminution de la sévérité des scores cliniques à 6 et 7 jpi. Bien que ces diminutions soient statistiquement significatives, les différences entre les scores cliniques des souris DKO et WT à 6 et 7 jpi étaient très faibles. De plus, comme mentionnée plus haut, l'infiltrat leucocytaire était similaire dans la cornée des souris DKO et WT, incluant les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. L'une des pathologies associées au VHS-1 est la kératite stromale herpétique et il aurait été intéressant d'évaluer l'implication des protéines Dok dans cette maladie en effectuant une analyse plus en profondeur de la cornée à l'aide d'un biomicroscope.

1.3 Implication de Dok-1 et Dok-2 dans le maintien de la latence du VHS-1

Nous avons poursuivi l'étude en analysant l'implication de Dok-1 et Dok-2 dans la réactivation virale, puisque nous avons observé une réduction du nombre des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans les TG des souris DKO lors de la phase mémoire, et que ces cellules sont importantes dans le maintien de la latence du VHS-1.

Les souris ne font pas de réactivation spontanée, comme ce qui se produit chez l'homme. Ainsi notre modèle murin est limité pour l'étude de la réactivation du VHS-1. La méthode que nous avons utilisée consiste à extraire les TG, une étape suffisante pour induire la réactivation du VHS-1, puis les mettre en culture sur un tapis de cellules épithéliales et d'observer chaque jour l'apparition d'un effet cytopathique sur les cellules épithéliales qui confirme la réactivation virale. L'observation de ces cultures de TG a été effectuée à l'aveugle sur une période de quinze jours mais tous les neurones infectés de manière latente subissent la réactivation du VHS-1 en culture dans les dix premiers jours (Decman *et al.*, 2005). L'extraction des TG a été effectuée suite à l'établissement de la latence virale (au-delà de 30 jpi) à partir des souris DKO et WT infectées à une dose élevée (5×10^5 pfu/œil) et à une faible dose (5×10^4 pfu/œil) infectieuse. À forte dose infectieuse, nous avons observé que la réactivation virale était détectée en moyenne 12 heures plus tôt dans les cultures de TG issus des souris DKO comparé aux cultures de TG issus des souris WT. Cette tendance est devenue significative à une faible dose infectieuse, où la réactivation du VHS-1 a été détectée 24 heures plus tôt pour les TG des souris DKO comparé

aux TG des souris WT. Plus encore, nous avons observé que le pourcentage de TG réactivé était significativement élevé à 2 et 3 jours post-explantation pour les souris DKO comparé aux TG issus des souris WT. Ces observations sont d'autant plus surprenantes car durant la phase aiguë, nous avons observé que les titres viraux étaient plus faibles dans les TG des souris DKO comparativement aux souris WT. De plus, nous avons détecté de l'ADN viral sur 8/13 TG de souris DKO contre 12/13 TG de souris WT durant la latence, ce qui est cohérent avec la diminution des titres viraux dans les TG DKO lors de l'infection aiguë. Ces observations suggèrent que l'on décèle moins d'ADN latent dans les TG des souris DKO. Or la charge virale présente dans les TG lors de latence a une incidence dans les réactivations récurrentes. Ainsi, on s'attendrait à moins de réactivations virales pour les TG DKO (Hoshino *et al.*, 2007; Sawtell, 1998; Thompson & Sawtell, 2000). Puisque nos résultats démontrent l'inverse, alors ceux-ci suggèrent que l'impact des Dok sur la réactivation virale passe par l'influence des Dok sur la population de lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG. Toutefois, il conviendrait de mener des analyses plus approfondies en investiguant par qPCR la charge virale présente dans les TG durant la latence en l'absence des protéines Dok. L'évaluation d'un gène viral comme *UL23* (Thymidine kinase), les transcrits LAT, et l'évaluation du nombre de copies d'ADN viral par neurones infectés nous permettrait de comprendre davantage la régulation de la réactivation du VHS-1 par les protéines Dok.

L'efficacité de la réactivation virale observée dans les cultures de TG issus des souris DKO semble résulter de la réduction du nombre de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques résidents dans les TG des souris DKO lors de la phase de la latence. En effet, nous avons démontré que cette population était nettement réduite dans les TG des souris DKO comparativement aux souris WT à forte dose infectieuse. Nous avons également observé à faible dose infectieuse une diminution des lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG des souris DKO comparativement aux souris WT, bien que cette diminution ne soit pas statistiquement significative puisque nous étions à la limite de détection de la technique utilisée. Par ailleurs, la diminution de la dose infectieuse réduit la population de lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG des souris WT et DKO. Cette observation concorde avec une étude précédente, qui décrit que la dose infectieuse utilisée influence la taille de la population de lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG (Hoshino *et al.*, 2007). En résumé, nos résultats montrent clairement que Dok-1 et Dok-2 contrôlent le nombre de lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG.

Il convient de se demander si la réduction des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques est impliquée dans l'accélération de la cinétique de la réactivation virale dans les cultures de TG

issues des souris DKO. Différents éléments dans la littérature soutiennent cette hypothèse. En effet, la déplétion des cellules T CD8⁺ dans des cultures de TG infectés de manière latente a conduit à une augmentation de la réactivation du VHS-1 (Hoshino *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2000b). À l'opposé, l'ajout de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 a permis de bloquer la réactivation du VHS-1 dans les cultures de TG *ex vivo* (Hoshino *et al.*, 2007; Khanna *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2000b). Plus encore, l'ajout de lymphocytes gB-spécifiques bloque la réactivation virale de manière dose-dépendante dans des cultures de TG *ex vivo* préalablement déplétées de leurs cellules T CD8⁺ endogènes (Khanna *et al.*, 2003). Des études récentes menées *in vivo* démontrent que l'augmentation du nombre et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD8⁺ T_{EM} et T_{RM} dans les TG infectés de manière latente protègent les souris contre les infections récurrentes lors la réactivation du VHS-1 (Khan *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2017a). Ainsi, dans notre étude, la diminution du nombre de lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques en l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2 permettrait d'expliquer l'augmentation du de la fréquence et de l'accélération de la cinétique de la réactivation virale. Des analyses supplémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si la régulation de la cinétique de la réactivation du VHS-1 par Dok-1 et Dok-2 est médiée exclusivement par les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques. Il serait alors intéressant d'effectuer des déplétions de cellules T CD8⁺ endogènes dans les cultures de TG WT et ajouter soit des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques WT ou déficients en Dok-1 et Dok-2 et évaluer leur capacité à protéger contre la réactivation virale. Cette analyse nous permettra d'évaluer si les lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques déficients en Dok-1 et Dok-2 conservent leurs capacités effectrices permettant le maintien de la latence du VHS-1. Outre les lymphocytes T CD8⁺, il conviendrait d'évaluer si Dok-1 et Dok-2 sont impliquées dans la régulation de la fonctionnalité et du nombre des cellules dendritiques CD8α⁺ dans les TG car il a été décrit qu'elles contribuent à la latence du VHS-1 (Mott *et al.*, 2014; Mott *et al.*, 2016).

La méthodologie que nous avons utilisée pour évaluer la réactivation virale dans nos expériences nécessite l'homogénéisation des TG. La rupture de l'association étroite entre les lymphocytes gB-spécifiques et les neurones infectés de manière latente pourrait être à l'origine de la réactivation du VHS-1 observée dans les cultures de TG *ex vivo*. Les lymphocytes gB-spécifiques bloquent la réactivation virale *via* leurs fonctions effectrices et les lymphocytes gB-spécifiques et non-gB-spécifiques présents dans les TG lors de la phase de latence virale affichent un phénotype T_{EM} (Khanna *et al.*, 2003; Sheridan *et al.*, 2009). Nous n'avons pas vérifié si les lymphocytes gB-spécifiques issus des TG lors de la latence sont fonctionnels en l'absence de Dok-1 et Dok-2. Par contre, puisque nous avons évalué que les protéines Dok ne semblent pas avoir d'impact sur la fonctionnalité des lymphocytes gB-spécifiques issus de la rate, on

pourrait penser que les lymphocytes gB-spécifiques présents dans les TG conservent leurs capacités effectrices. Une étude rapporte que le blocage de l'interaction de PD-1 avec son ligand PDL-1/B7H-1 conduit à l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques non fonctionnels au détriment des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans les TG durant la latence (Jeon *et al.*, 2013). De plus, l'expression élevée de PD-1 à la surface des lymphocytes non-gB-spécifiques a été associée à une réduction de leur fonctionnalité lors de la latence virale (Allen *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2013; St Leger *et al.*, 2013). Nous n'avons pas vu de différence dans l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes gB-spécifiques issus des TG des souris DKO et des souris WT lors de la latence virale. Ceci suggère que l'absence des protéines Dok ne change pas la capacité fonctionnelle des lymphocytes gB-spécifiques. De même, nous n'avons pas noté de différence dans l'expression de PD-1 à la surface de l'ensemble des lymphocytes non-gB-spécifiques issus des TG en l'absence de Dok-1 et Dok-2 (résultats non montrés). Il semblerait aussi que l'absence des protéines Dok ne change pas la capacité fonctionnelle des lymphocytes non-gB-spécifiques. Toutefois, nous n'avons pas pu évaluer l'expression de PD-1 à la surface de chaque population de lymphocytes spécifiques à un épitope subdominant donné. Comme nous avons observé qu'il reste 19% des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques dans les TG des souris DKO durant la latence virale, on pourrait prédire que le reste soit 81% sont des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques. Il conviendrait donc d'évaluer l'impact de Dok-1 et Dok-2 sur le nombre, la fréquence, la fonctionnalité et le phénotype des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour chaque épitope subdominant. Pourquoi l'évaluation de cette population est si importante ? Parce que dans certaines conditions, les lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques peuvent avoir un rôle dominant dans la protection contre la réactivation du VHS-1. En effet, il a été montré que l'augmentation du nombre des lymphocytes T CD8⁺ non-gB-spécifiques fonctionnels dans les TG suite au blocage du récepteur à IL-10 a conféré une meilleure protection contre la réactivation du VHS-1 dans des cultures de TG *ex vivo* (St Leger *et al.*, 2013). De plus, l'infection de souris avec le VHS-1 ne possédant pas l'épitope gB₄₉₈₋₅₀₅ a conduit à l'expansion des lymphocytes TCD8⁺ non-gB-spécifiques qui maintiennent leurs capacités fonctionnelles dans les TG durant la latence et confèrent une protection contre le VHS-1 (Treat *et al.*, 2017).

Enfin, travailler également avec un modèle murin où l'on pourrait induire la réactivation du VHS-1 *in vivo* serait un atout considérable pour étudier l'impact de Dok-1 et Dok-2 *in vivo* sur le maintien de la latence virale. L'un des modèles murin de réactivation du VHS-1 *in vivo* consiste à exposer les yeux des souris aux rayons UV-B suite à l'établissement de la latence (30 jpi), ce qui va induire la réactivation virale et une infection productive sur le site oculaire (BenMohamed *et al.*, 2016). Bien que cette méthode n'induisse pas la réactivation virale chez toutes les souris, il

serait intéressant d'examiner si l'absence des protéines Dok augmente l'incidence de la réactivation du VHS-1 par cette procédure.

En conclusion, nos résultats identifient Dok-1 et Dok-2 en tant que nouveaux régulateurs cellulaires dans l'infection par le VHS-1 qui sont importants pour promouvoir le maintien des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques. Jusqu'à présent, tout porte à croire que l'importance des protéines Dok dans la formation de la réponse mémoire est un mécanisme qui touche l'ensemble des pathogènes intracellulaires, puisque les résultats sont similaires pour les infections virales (VHS-1 et virus de la vaccine) et bactériennes (*Listeria monocytogenes*). Nos résultats identifient également que les protéines Dok favorisent le maintien de la latence du VHS-1 dans les TG. L'élucidation des mécanismes par lesquels les protéines Dok empêchent la réactivation du VHS-1 à partir de la latence pourrait fournir des informations sur les stratégies possibles pour bloquer la réactivation du VHS-1.

2 LES PROTÉINES DOK SONT CIBLÉES PAR LE VHS-1 LORS DE L'INFECTION DES CELLULES T

Dans la seconde étude, nous avons évalué la capacité du VHS-1 à cibler les protéines Dok-1 et Dok-2.

2.1 L'expression de la protéine Dok-2 est spécifiquement diminuée lors de l'infection des cellules T par le VHS-1

Nous avons découvert que l'infection des cellules T par le VHS-1 conduit à la diminution protéique de Dok-2.

Nous avons effectué une cinétique d'infection dans les cellules Jurkat et suite à l'immunoprécipitation (IP) de Dok-2. La diminution protéique de Dok-2 était évidente à 6 heures post-infection (hpi), et plus importante à 12 hpi. Outre Dok-2, les cellules T expriment également Dok-1. Nous avons observé que le VHS-1 induit la phosphorylation de Dok-1 mais pas sa diminution. Cependant, l'évaluation de Dok-1 dans des lysats de clones surexprimant HA-Dok-2 montre une légère diminution de Dok-1 en présence du VHS-1. Puisque Dok-1 et Dok-2 peuvent former des hétéro-oligomères (Boulay *et al.*, 2005) et que les niveaux de Dok-2 sont largement diminués par le VHS-1, il est probable que la diminution de Dok-1 observée est due à la perte de Dok-1 associée à Dok-2. De plus, nous avons également montré que la diminution de l'expression protéique de Dok-2 par le VHS-1 n'est pas due à la relocalisation de la protéine dans le noyau,

puisque la réduction de Dok-2 est encore observée dans les extraits cellulaires préparés avec un tampon permettant l'extraction des protéines nucléaires. Les résultats obtenus peuvent être biaisés du fait que nous avons utilisé des cellules tumorales pour les infections par le VHS-1. Toutefois, nous avons validé que le VHS-1 induit la diminution de l'expression de Dok-2 dans des cellules T primaires de souris où son expression est diminuée dès 6 hpi (**Annexe 3**).

Cela peut paraître paradoxal que le VHS-1 induit l'élimination d'une protéine adaptatrice assurant une fonction d'inhibition. Or, dans l'étude précédente nous démontrons clairement qu'en l'absence des protéines Dok les cellules T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 ne sont pas maintenues *in vivo*, et cet effet est également rapporté suite à l'infection *in vivo* par le virus de la vaccine (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Ainsi, l'absence des protéines Dok assurant une fonction d'inhibition a été associée à un effet délétère sur la survie des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1. Par ailleurs, une diminution sélective de la quantité protéique de Dok-2 mais pas de Dok-1 a été observée suite à la stimulation antigénique des cellules T CD8⁺ effectrices, et la quantité protéique de Dok-2 retourne à l'état basal dans les cellules T CD8⁺ mémoires (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Comme discuté auparavant, le retour de l'expression à l'état basal de Dok-2 est probablement nécessaire pour prévenir l'activation excessive des cellules T et maintenir leur survie. Ainsi, le VHS-1 induit la diminution de la protéine Dok-2 pour probablement empêcher la quiescence des cellules T et leur survie.

2.2 Les protéines Dok sont phosphorylées lors de l'infection des cellules T par le VHS-1

Contrairement à la diminution sélective de la protéine Dok-2, nous avons également découvert que l'infection des cellules T par le VHS-1 induit la phosphorylation de Dok-2 et Dok-1.

La phosphorylation des résidus tyrosines de Dok-2 était clairement détectable à 2 hpi. Elle a atteint un pic à 6 hpi et est restée hautement phosphorylée à 12 hpi compte tenu de la réduction significative de son expression à cette période dans les cellules Jurkat. Nous avons également mis en évidence la phosphorylation de Dok-1 dans des clones Jurkat surexprimant Dok-1. La phosphorylation des résidus tyrosines des protéines Dok est impliquée dans la régulation négative des cellules T (Mashima *et al.*, 2009). Les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la signalisation du TCR médiée par les protéines Dok ne sont pas totalement connus. Toutefois, il a été proposé que les protéines Dok pourraient entrer en compétition avec la kinase ZAP-70 lors

de la signalisation du TCR (Yasuda *et al.*, 2007). Le domaine PTB des protéines Dok en se liant aux motifs ITAMs phosphorylés du CD3 ζ empêcherait l'association de ZAP-70 aux motifs ITAMs et l'activation de la signalisation TCR en aval de ZAP-70. Un autre mécanisme proposé pour l'inhibition de la signalisation du TCR serait la formation du complexe SHIP-1/Grb2/Dok-2 qui se lie à la protéine adaptatrice LAT (Dong *et al.*, 2006). Enfin, le dernier mécanisme impliquerait la capacité des protéines Dok à recruter à la membrane plasmique des régulateurs négatifs de la signalisation du TCR comme RasGAP, SHIP-1 et Csk (Nemorin *et al.*, 2001; Schoenborn *et al.*, 2011). La phosphorylation des résidus tyrosines spécifiques situées dans la partie C-ter des protéines Dok est nécessaire pour la liaison aux domaines SH2 des régulateurs négatifs. La phosphorylation des protéines Dok suite à la stimulation du TCR est un événement transitoire dans les cellules T non-infectées. Elle est détectée dans les 20 secondes suivant l'activation du TCR et elle retourne à l'état basal après 20-30 minutes (Dong *et al.*, 2006). Par contre, suite à l'infection des cellules T par le VHS-1, nous avons vu que Dok-2 est phosphorylée tout au long de l'infection, même après 10-12h, alors qu'une grande partie de la quantité de Dok-2 est diminuée. Ainsi, la phosphorylation de Dok-2 et Dok-1 dans les cellules T infectées pourrait être une stratégie utilisée par le VHS-1 pour atténuer le signal provenant du TCR, empêchant alors l'activation des cellules T.

2.3 VP11/12 est nécessaire pour la phosphorylation et la régulation à la baisse de l'expression de la protéine Dok-2

Nous avons aussi montré que la phosphorylation de Dok-2 était clairement diminuée en l'absence de VP11/12. Cette observation n'était pas surprenante, car VP11/12 est requise pour la phosphorylation des SFK et que ces dernières phosphorylent les protéines Dok. Par contre, le niveau de phosphorylation de Dok-2 dans les cellules T infectées avec le virus déficient en VP11/12 (Δ UL46) était encore plus faible que dans les cellules T non infectées. Cette observation indique que même en l'absence de VP11/12, le VHS-1 module l'activité de phosphatase ou de kinase et/ou l'accessibilité à leurs substrats dans les cellules Jurkat. VP11/12 est aussi nécessaire à la diminution de Dok-2, puisque le niveau d'expression de Dok-2 dans les Jurkat infectées avec le virus Δ UL46 était comparable à celui observé dans les cellules non infectées. Ces différences observées entre le virus de type sauvage (RUL46) et Δ UL46 ne sont pas dues à une incapacité du virus à se répliquer, puisqu'ils présentent une expression similaire de la sous-unité large de la ribonucléotide réductase virale R1 évaluée par western blot, et un pourcentage similaire de cellules infectées évalué par cytométrie. Ainsi, l'ensemble de ces observations

démontrent que VP11/12 est requise pour la phosphorylation et pour la diminution de l'expression de Dok-2 lors de l'infection des cellules T par le VHS-1.

2.4 VP11/12 interagit avec Dok-2

Nous n'avions pas pu identifier la phosphoprotéine de 90-95 kDa qui co-précipite avec Dok-2 comme étant VP11/12 par immunomarquage. Par contre, l'utilisation d'un virus exprimant la protéine VP11/12 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP) a permis de mettre en évidence que Dok-2 co-précipite avec VP11/12-GFP. Nos nombreuses tentatives pour identifier VP11/12 par immunomarquage anti-GFP suite à une IP-Dok-2 à partir de lysats de cellules T Jurkat infectées avec KOS37-UL46 GFP ont échoué. Ces échecs suggèrent alors que la proportion de VP11/12 associée avec Dok-2 était trop faible pour pouvoir être détectée par cette technique. Toutefois, l'évaluation de la phosphorylation des tyrosines suite à l'IP Dok-2 montre bien que la phosphoprotéine de 90-95 kDa qui co-précipite avec Dok-2 est remplacée par une phosphoprotéine de 120 kDa qui correspond probablement à la somme des poids moléculaires de VP11/12 (environ 90 kDa) et de la GFP (24 kDa).

En plus de Dok-2, VP11/12 interagit avec des phosphoprotéines de 65 kDa et 56 kDa. La faible bande phosphorylée à 95 kDa que l'on voit également dans les lysats de cellules T infectées par le virus KOS37-UL46 GFP pourrait correspondre à des produits de dégradation de la protéine de fusion VP11/12 GFP. La phosphoprotéine de 56 kDa correspond au moins en partie à la protéine Dok-2 phosphorylée mais probablement aussi à la kinase Lck. Différents éléments soutiennent cette hypothèse. En effet, cette phosphoprotéine de 56 kDa est toujours présente même lorsque l'on utilise un virus portant une mutation dans VP11/12 (KOS-37 UL46 GFP Y657F) abolissant son interaction avec Dok-2. Le deuxième élément découle d'une étude précédente qui rapporte que VP11/12 interagit avec Lck et que le virus KOS-37 UL46 GFP Y657F retient la capacité de lier Lck (Strunk *et al.*, 2013). Enfin, nous avons observé que cette phosphoprotéine de 56 kDa est absente lorsque l'on utilise un virus portant une mutation dans VP11/12 abolissant son interaction avec Lck. La phosphoprotéine de 65 kDa pourrait correspondre à Shc puisque VP11/12 est aussi capable d'interagir avec cette protéine (Strunk *et al.*, 2013). Toutefois cette phosphoprotéine de 65 kDa est toujours présente lorsqu'on utilise un virus portant une mutation dans VP11/12 abolissant son interaction avec Shc, alors elle pourrait également correspondre à une ou plusieurs autres protéines. Dok-1 semble être un bon candidat. Elle pourrait se lier directement à VP11/12 ou par l'intermédiaire de Dok-2 en formant des hétéro-oligodimères avec Dok-2. Néanmoins, des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour

identifier les phosphoprotéines de 56 kDa et de 65 kDa. Par ailleurs, il a été montré que VP11/12 interagit avec la sous-unité p85 de la PI3K et Grb2 dans les cellules Jurkat (Strunk *et al.*, 2013). De plus, Dok-2 interagit avec une phosphoprotéine de 37 kDa que nous n'avons pas encore identifiée. Ainsi, VP11/12 et Dok-2 font partie d'un complexe multiprotéique où tous les éléments n'ont pas encore été identifiés. Ces différents éléments pourraient être identifiés par spectrométrie de masse puis confirmés par immunomarquage.

VP11/12, comme toutes les protéines virales du tégument, sont relâchées dans le cytoplasme suite à l'entrée de la particule virale dans la cellule. Nous avons vu que Dok-2 est phosphorylée dès 2 hpi et que VP11/12 est nécessaire à sa phosphorylation. Ce serait alors VP11/12 apportée par la particule virale qui serait responsable de la phosphorylation de Dok-2 et non VP11/12 *de novo* synthétisée, bien qu'elle pourrait participer à l'amplification de la phosphorylation dans des heures plus tardives de l'infection. Nous ne pouvons pas exclure que Dok-2 soit phosphorylée dans des temps plus précoces dans l'infection puisque le VHS-1 entre dans la cellule dans les trente premières minutes et cela reste à déterminer (Fuller *et al.*, 1989; Sodeik *et al.*, 1997). Nous avons observé que l'infection des cellules T avec un virus déficient en VP11/12 ou un virus portant des mutations dans la partie C-ter de VP11/12 abolissant sa liaison aux SFKs (KOS-37 UL46 GFP Y613F/Y624F) n'induit pas la phosphorylation de la protéine Dok-2. Ainsi, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de Dok-2 nécessite l'activation des SFKs qui est induite par VP11/12. VP11/12 se localise à la membrane plasmique suite à l'entrée de la particule virale ou à des étapes plus tardives de l'infection précédant l'assemblage des virions néo-synthétisés (Murphy *et al.*, 2008; Willard, 2002). VP11/12 pourrait donc recruter Dok-2 à la membrane plasmique suite à l'entrée de la particule virale dans les cellules T. L'interaction de VP11/12 avec Dok-2 et avec Lck permettrait probablement un rapprochement de Dok-2 et Lck, et la phosphorylation de Dok-2 par Lck. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que la phosphorylation de Dok-2 soit réalisée par des kinases Lck n'interagissant pas avec VP11/12.

Nous avons également montré que l'interaction de Dok-2 avec VP11/12 est dépendante de la phosphorylation de VP11/12. Nos résultats suggèrent que Dok-2 se lie à un motif contenant une ou plusieurs tyrosines phosphorylées dans la séquence de VP11/12. Une étude suggère que l'interaction de Dok-2 avec LAT se produit *via* le complexe Grb2/SHIP (Dong *et al.*, 2006). Puisque VP11/12 s'associe avec Grb2 (Strunk *et al.*, 2013), nous avons testé la possibilité que Dok-2 interagisse avec VP11/12 *via* Grb2 ou alors que le motif reconnu par Grb2 soit également reconnu par Dok-2. Pour cela, nous avons infecté les Jurkat avec un virus portant une mutation dans le motif Y₆₃₃ENV situé dans la partie C-ter de VP11/12 abolissant sa liaison avec Grb2 (KOS-37

UL46 GFP Y633F). Ce virus a conservé son habilité à phosphoryler et à diminuer l'expression de Dok-2, et surtout à maintenir l'interaction entre Dok-2 et VP11/12-GFP. Nous avons donc déduit que le motif Y₆₃₃ENV n'est pas requis pour l'interaction entre Dok-2 et VP11/12. Une autre possibilité découle d'une étude précédente qui rapporte, par l'utilisation d'une méthode combinatoire basée sur une librairie de peptides, que le domaine PTB de Dok-1 reconnaît de manière préférentielle une tyrosine phosphorylée contenue dans un motif consensus Y/MXXNXLPY (Songyang *et al.*, 2001). Nous avons alors testé si la tyrosine Y₆₅₇ contenue dans le motif ₆₅₁EAENPLY₆₅₇ situé dans la partie C-ter de VP11/12 représente le site de liaison de la protéine Dok-2. Nous n'avons plus observé la phosphorylation ni la diminution de l'expression de Dok-2 suite à l'IP-Dok-2 à partir des lysats de cellules T infectées avec un virus portant une mutation dans le motif NPLY₆₅₇ de VP11/12 abolissant sa liaison avec Shc (KOS-37 UL46 GFP Y657F). De plus, nous n'avons plus observé la co-précipitation de Dok-2 avec VP11/12-GFP suite à l'infection des cellules T avec KOS-37 UL46 GFP Y657F. Ainsi, nos résultats mettent en évidence que le motif NPLY₆₅₇ de liaison à la protéine Shc de VP11/12 est nécessaire pour la liaison à Dok-2, sa phosphorylation et sa diminution suite à l'infection des cellules T par le VHS-1. Bien que le virus déficient pour la liaison à Shc conserve la capacité à activer les SFKs, cela ne suffit pas pour assurer la phosphorylation de Dok-2. Ainsi cette observation soutient davantage le modèle proposé plus haut, où l'interaction de VP11/12 avec Dok-2 permet le rapprochement de Dok-2 aux SFKs qui à leur tour pourraient phosphoryler Dok-2. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'interaction entre Dok-2 et VP11/12 soit indirecte et s'effectue par l'intermédiaire de la protéine Shc ou d'autres protéines virales ou cellulaires.

2.5 Rôle spécifique de Dok-1 et de Dok-2 au cours de l'infection des cellules T par le VHS-1

Nous avons mis en évidence que le VHS-1 induit la phosphorylation de Dok-1. Cependant, nous n'avons pas été capables de montrer une interaction entre VP11/12 et Dok-1. Il est possible que le niveau d'expression de Dok-1 soit trop faible pour être détecté par immunomarquage ou alors que la phosphorylation de Dok-1 implique d'autres mécanismes moléculaires que ceux utilisés par Dok-2. De plus, une étude rapporte que le motif NPLY situé dans le récepteur CD200 lie le domaine PTB de Dok-2 avec une affinité dix fois plus élevée que celui de Dok-1 (Mihirshahi *et al.*, 2009; Songyang *et al.*, 2001). Plus encore, nous avons observé une diminution de l'expression de Dok-2 et non de Dok-1 suite à l'infection des cellules T par le VHS-1. Nos résultats sont cohérents avec des observations précédentes où une diminution spécifique de l'expression

de Dok-2 a lieu en réponse à la stimulation du TCR (Laroche-Lefebvre *et al.*, 2016). Cette différence de régulation entre Dok-1 et Dok-2 a aussi été rapportée dans d'autres études. Par exemple, dans les macrophages, seule la protéine Dok-1 est dégradée suite à la stimulation avec le LPS (Shinohara *et al.*, 2005) et seule l'expression de Dok-2 est augmentée en réponse à la cytokine M-CSF (Suzu *et al.*, 2000). Dans les plaquettes, seule la protéine Dok-2 est phosphorylée suite à la stimulation avec le collagène, et la cinétique de phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 est différente en réponse à la thrombine (Hughan & Watson, 2007). De plus, seule Dok-1 est exprimée dans les lymphocytes B (Yasuda *et al.*, 2007). L'ensemble de ces rapports évoquent que ces protéines étroitement apparentées possèdent certainement des fonctions distinctes.

2.6 Implication des Dok dans la modulation de la signalisation en aval du TCR par le VHS-1

De nombreuses études rapportent la capacité du VHS-1 à inhiber les fonctions effectrices des CTL, à savoir leur capacité à libérer des granules cytolytiques et à synthétiser des cytokines (Aubert *et al.*, 2006; Confer *et al.*, 1990; Jerome *et al.*, 2001; Posavad *et al.*, 1993; Posavad *et al.*, 1994; Posavad & Rosenthal, 1992; Sloan *et al.*, 2003). Cette inhibition des fonctions effectrices des cellules T passe par la capacité du VHS-1 à inhiber la signalisation du TCR comme la phosphorylation de LAT, et de ERK1/2 (Sloan *et al.*, 2006; Sloan & Jerome, 2007; Yang *et al.*, 2015). Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition ne sont pas encore clairement élucidés. Il est possible que la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines Dok induite par le VHS-1 soit impliquée dans les processus d'inhibition des cellules T. Cependant, en l'absence de VP11/12, nous avons démontré que Dok-2 n'est pas phosphorylée. De plus, une étude rapporte qu'en l'absence de VP11/12, le VHS-1 conserve sa capacité à inhiber la signalisation du TCR, du moins à inhiber la phosphorylation de ERK1/2 (Zahariadis *et al.*, 2008). Par conséquent, il semble peu probable que l'inhibition de la signalisation du TCR induite par le VHS-1 dépende entièrement de Dok-2. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que Dok-1 soit impliquée dans l'inhibition de la signalisation du TCR par le VHS-1. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour caractériser les déterminants viraux et/ou cellulaires à l'origine de la phosphorylation des Dok et les voies de signalisation influencées en aval du TCR lors de l'infection des cellules T par le VHS-1.

L'implication de Dok-1 et Dok-2 dans différentes voies de signalisation induites par le VHS-1 serait intéressante à investiguer dans les cellules T. En effet, VP11/12 induit l'activation

de p85 PI3K et Akt dans les cellules T en l'absence de l'engagement du TCR (Wagner & Smiley, 2011). VP11/12 forme un complexe avec Lck, Grb2 et p85 PI3K qui est nécessaire à l'activation de Akt (Strunk *et al.*, 2016). À priori, VP11/12 comportant une mutation dans le motif NPLY₆₅₇ conserve sa capacité à phosphoryler Akt lors de l'infection des cellules fibroblastes avec le virus KOS-37 UL46 GFP Y657F (Strunk *et al.*, 2016). Or, nous avons montré dans notre étude que le motif NPLY₆₅₇ est important pour la phosphorylation et la diminution de l'expression de Dok-2 lors de l'infection des cellules T par le VHS-1. Ainsi, il serait peu probable que la phosphorylation et/ou la diminution de la protéine Dok-2 soit impliquée dans l'activation de PI3K/AKT dans les cellules T.

Enfin, il conviendrait d'investiguer l'implication du complexe VP11/12/Dok-2 dans les voies de signalisation en aval du TCR dans des cellules T primaires. L'utilisation de cellules Jurkat pour révéler les fonctions du complexe VP11/12/Dok-2 a ses limites ou contraintes. En effet, les Jurkat ont perdu l'expression de SHIP et PTEN (Abraham & Weiss, 2004; Freeburn *et al.*, 2002). Or ces phosphatases sont importantes dans la génération des phosphoinositides et de ce fait dans le recrutement et la phosphorylation des protéines Dok. De plus, SHIP participerait *via* le complexe SHIP/Dok-2/Grb2 à l'inhibition de l'activation de la signalisation du TCR en se liant à LAT (Dong *et al.*, 2006). Nous disposons d'un outil qui permettrait d'éclaircir davantage la relevance de la modulation de l'activation des Dok par le VHS-1 dans les voies de signalisation *via* l'utilisation de cellules T primaires déficientes en Dok-1 et/ou Dok-2.

2.7 Mécanismes possibles à l'origine de la diminution de l'expression de Dok-2

Nous avons vu que la diminution de l'expression de Dok-2 est dépendante de sa phosphorylation. Des études précédentes rapportent que l'activité des tyrosines kinases telles que p210bcr-abl, v-Src, et Brk (Breast tumor Kinase) régule à la baisse l'expression de Dok-1 (Janas & Van Aelst, 2011; Miah *et al.*, 2014) *via* la voie ubiquitine/protéasome (Janas & Van Aelst, 2011; Miah *et al.*, 2014). De la même façon, le VHS-1 pourrait affecter la stabilité de Dok-2 en favorisant sa phosphorylation puis son ubiquitination et sa dégradation *via* la voie ubiquitine-protéasome. La protéine virale ICP0 possède une activité E3 ubiquitine ligase. Elle est impliquée dans la dégradation de nombreuses protéines cellulaires, comme la sous-unité p50 de NF- κ B, MyD88 ou encore le senseur à ADN IFI16 dans le but de contrecarrer l'immunité innée (Lanfranca *et al.*, 2014). Il a aussi été montré que VP11/12 est partiellement dégradée par ICP0 d'une manière dépendante du protéasome au cours de l'infection par le VHS-1 (Lin *et al.*, 2004). Il

conviendrait alors de déterminer si ICP0 est impliquée dans le mécanisme de dégradation de Dok-2 lors de l'infection des cellules T. Nous disposons au laboratoire d'un virus déficient en ICP0. Nous pourrions évaluer si, en l'absence d'ICP0, l'expression de Dok-2 est restaurée lors de l'infection des Jurkat.

2.8 Modèle proposé

Nous proposons que dans le cadre de l'infection des cellules T par le VHS-1, Dok-2 est recrutée à la membrane par VP11/12. Une fois à la membrane, Dok-2 est phosphorylée par Lck associée à VP11/12 (**Figure 4.1**). Le complexe VP11/12/Dok-2 est probablement associé à d'autres éléments non identifiés qui cibleraient Dok-2 pour sa dégradation. D'autres études sont nécessaires pour élucider les voies de signalisation spécifiques qui sont modulées par le complexe VP11/12/Dok-2. La phosphorylation et la dégradation de Dok-2 médiée par VP11/12 représentent probablement des étapes essentielles dans la stratégie développée par le VHS-1 pour inactiver les cellules T et pourraient révéler des mécanismes inconnus impliqués dans la régulation des protéines Dok médiée par TCR/CD28.

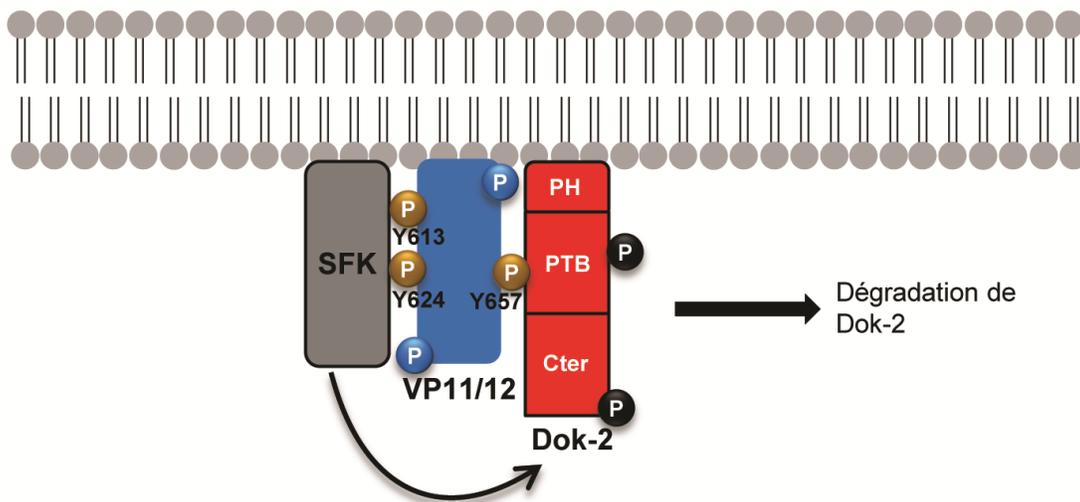


Figure 4.1 : L'interaction de VP11/12 avec Dok-2 conduit à la phosphorylation et à la dégradation de Dok-2.

Suite à l'infection des cellules T par le VHS-1, VP11/12 localisée à la membrane plasmique active les SFK et interagit avec Lck *via* ses résidus tyrosines phosphorylés en position 613 et 624 représentés en brun. VP11/12 recrute Dok-2 à la membrane plasmique et interagit avec Dok-2 *via* son résidu tyrosine phosphorylé en position 657 représenté en brun. Lck va alors phosphoryler Dok-2 sur différents résidus tyrosines en position non déterminée (P représentés en noirs). L'interaction de Dok-2 avec VP11/12 et la phosphorylation de Dok-2 induit par VP11/12 conduit à la dégradation de Dok-2. Les P en bleu représentent des résidus tyrosines phosphorylés connus et impliqués dans l'interaction avec p85 PI3K (Y519) et Grb2 (Y633). P représente la phosphorylation d'une tyrosine ; PH, domaine pleckstrin homology ; PTB, domaine phosphotyrosine-binding ; Cter, domaine carboxyterminal.

CONCLUSIONS

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but d'élucider le rôle des protéines Dok-1 et Dok-2 dans l'infection par le VHS-1. Nous avons démontré que Dok-1 et Dok-2 modulent positivement la réponse T CD8⁺ dirigée contre le VHS-1 dans un modèle murin d'infection oculaire. Dok-1 et Dok-2 promeuvent le maintien des lymphocytes T CD8⁺ gB-spécifiques lors de l'infection par le VHS-1 et le maintien de la latence du VHS-1 dans les TG. Nos travaux ont permis de mettre en évidence que les protéines Dok sont des régulateurs cellulaires importants dans la formation de la réponse mémoire lors d'une infection virale. Nous proposons que les protéines Dok-1 et Dok-2 agissent comme des « freins » qui permettent aux cellules T CD8⁺ de retourner à l'état de quiescence et de survivre. Nous avons également montré que le VHS-1 cible les protéines Dok lors de l'infection des cellules T. Le VHS-1 induit la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 et la dégradation sélective de Dok-2. La phosphorylation des Dok et la dégradation de Dok-2 induites par le VHS-1 pourraient être cruciales *in vivo*, et porter préjudice à l'activation et à la survie des cellules T spécifiques au virus. Nous proposons que la capacité du VHS-1 à cibler les protéines Dok constitue un mécanisme d'évasion immunitaire. Le VHS-1 pourrait infecter les cellules T dans les ganglions nerveux sensitifs où il est décrit que les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 forment des contacts étroits avec les neurones infectés par le VHS-1 (Khanna *et al.*, 2003; Verjans *et al.*, 2007). Cette possibilité pourrait être testée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps dirigés contre le VHS-1 ou à l'aide d'un virus exprimant une protéine fluorescente, un outil que nous disposons au laboratoire (Rochette *et al.*, 2014).

Nous avons aussi démontré que la phosphorylation et la dégradation de Dok-2 nécessitent la protéine virale VP11/12 encodée par le gène UL46. UL46 est un gène conservé à travers les alphaherpesvirus mais il ne semble pas l'être à travers les beta-, et les gammaherpesvirus (Kelly *et al.*, 2009). Plus encore, les motifs impliqués dans l'interaction avec les SFK ou Shc/Dok-2 sont conservés seulement chez le VHS-1 et le VHS-2 et des membres étroitement liés au genre Simplexvirus (Strunk *et al.*, 2013). La capacité à moduler l'activité et l'expression de Dok-2 *via* VP11/12 serait alors exclusive au VHS-1 et au VHS-2, qui sont des virus majoritairement neurotropes et qui établissent leur latence dans les ganglions nerveux. En perspective, il serait intéressant d'évaluer l'impact de VP11/12 *in vivo* sur la réponse immune anti-VHS-1 au cours de l'infection et sur la réactivation virale. Différents aspects pourront être investigués. Tout d'abord, il conviendrait de confirmer, par cytométrie en flux, l'impact de VP11/12 sur la phosphorylation et l'expression des Dok dans les cellules T suite à l'infection aiguë des souris par un virus déficient en VP11/12 ou le virus de type sauvage. Nous privilégierons l'analyse des cellules T provenant des TG car l'infection de ces cellules y serait plus favorable lors des contacts étroits établis entre les cellules T spécifiques au VHS-1 et les neurones infectés. On

pourrait s'attendre, en évaluant strictement la population de cellules T infectées par le VHS-1, que la phosphorylation des Dok, évaluée par un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées, soit diminuée et que le niveau d'expression des Dok, évalué par un anticorps dirigé contre la partie C-ter, soit augmenté en l'absence de VP11/12. Puis, il serait intéressant d'évaluer si la phosphorylation et la dégradation des Dok induite par VP11/12 constitue un mécanisme d'évasion *in vivo* par l'utilisation du virus déficient en VP11/12 ou le virus mutant incapable de maintenir l'interaction entre VP11/12 et Dok-2 (KOS-37 UL46 GFP Y657F). Pour cela, puisque la phosphorylation des Dok est associée à la régulation négative du TCR (Mashima *et al.*, 2009), nous pourrions évaluer l'impact de VP11/12 sur les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1, plus particulièrement ceux présents dans les TG durant la phase aiguë. On pourrait s'attendre à un effet sur les fonctions effectrices en l'absence de VP11/12. De plus, puisque l'absence des Dok a été associée à une diminution de la réponse T CD8⁺ spécifique au VHS-1 durant la phase aiguë et à un défaut de la formation de la réponse mémoire (Lahmidi *et al.*, 2017), on pourrait s'attendre à une augmentation des lymphocytes spécifiques au VHS-1 notamment dans les TG en l'absence de VP11/12. Enfin, il conviendrait d'évaluer l'impact de VP11/12 durant la latence et sur la réactivation du VHS-1. Durant la latence, on ne s'attendrait pas à ce que VP11/12, une protéine à cinétique tardive, soit exprimée. Toutefois, l'infection latente est dynamique. En effet, des périodes dites "d'animation" se produisent durant lesquelles les gènes lytiques sont exprimés qui n'aboutissent pas nécessairement à une réactivation virale complète avec la production de particules virales (Cliffe & Wilson, 2017). Ainsi, il est possible que VP11/12 soit exprimée durant l'infection latente. Nous pourrions donc tester l'impact de VP11/12 sur les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG durant la période de latence. Enfin, il conviendrait d'évaluer l'impact de VP11/12 sur la réactivation virale induite *in vivo* par l'exposition des yeux des souris aux rayons UV-B suite à l'établissement de la latence (BenMohamed *et al.*, 2016). Puisque, nous avons observé une augmentation de la réactivation virale *ex vivo* en l'absence des Dok, on s'attendrait à une diminution de la fréquence de réactivation du VHS-1 en l'absence de VP11/12.

Une grande partie de la population mondiale est infectée par le VHS-1. La conception d'un traitement thérapeutique efficace permettrait de réduire la propagation du VHS-1 et la récurrence des réactivations virales qui peuvent aboutir à des pathologies sévères. Actuellement, les essais cliniques de vaccins développés contre le VHS-1 ont tous échoués chez l'homme (Chentoufi *et al.*, 2012; Dudek & Knipe, 2011; Sandgren *et al.*, 2016). Ainsi, la compréhension des mécanismes impliquant Dok-1 et Dok-2 dans la formation/survie des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 serait un atout majeur pour le développement de thérapies préventives contre la réactivation du

VHS-1. En effet, différentes études suggèrent que les stratégies visant à augmenter la population de lymphocytes T CD8⁺ résidents dans les TG pourraient inhiber la réactivation du VHS-1 réduisant potentiellement la fréquence des pathologies récurrentes. L'augmentation du nombre et des capacités effectrices des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs mémoires spécifiques au VHS-1 dans les TG lors de la latence a été associée à une réduction de la maladie herpétique récurrente dans un modèle murin de réactivation (Khan *et al.*, 2017). Nos travaux ont montré que l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2 affecte davantage la survie des T_{EM} que les T_{CM}. L'élucidation des mécanismes impliquant Dok-1 et Dok-2 dans la survie des T_{EM} semble être prometteuse pour le développement d'immunothérapies efficaces contre le VHS-1.

RÉFÉRENCES

- Abraham RT & Weiss A (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4(4):301-308.
- Abramson J & Pecht I (2002) Clustering the mast cell function-associated antigen (MAFA) leads to tyrosine phosphorylation of p62Dok and SHIP and affects RBL-2H3 cell cycle. *Immunol. Lett.* 82(1-2):23-28.
- Abramson J, Rozenblum G & Pecht I (2003) Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor. *Eur. J. Immunol.* 33(1):85-91.
- Acuto O, Di Bartolo V & Michel F (2008) Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 8(9):699-712.
- Addison C, Rixon FJ, Palfreyman JW, O'Hara M & Preston VG (1984) Characterisation of a herpes simplex virus type 1 mutant which has a temperature-sensitive defect in penetration of cells and assembly of capsids. *Virology* 138(2):246-259.
- Addison C, Rixon FJ & Preston VG (1990) Herpes simplex virus type 1 UL28 gene product is important for the formation of mature capsids. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 10):2377-2384.
- Ahn K, Meyer TH, Uebel S, Sempe P, Djaballah H, Yang Y, Peterson PA, Fruh K & Tampe R (1996) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J.* 15(13):3247-3255.
- Akhova O, Bainbridge M & Misra V (2005) The neuronal host cell factor-binding protein Zhangfei inhibits herpes simplex virus replication. *J. Virol.* 79(23):14708-14718.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- al-Kobaisi MF, Rixon FJ, McDougall I & Preston VG (1991) The herpes simplex virus UL33 gene product is required for the assembly of full capsids. *Virology* 180(1):380-388.
- Allen SJ, Hamrah P, Gate D, Mott KR, Mantopoulos D, Zheng L, Town T, Jones C, von Andrian UH, Freeman GJ, Sharpe AH, BenMohamed L, Ahmed R, Wechsler SL & Ghiasi H (2011) The role of LAT in increased CD8+ T cell exhaustion in trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 85(9):4184-4197.
- Almerigogna F, Fassio F, Giudizi MG, Biagiotti R, Manuelli C, Chiappini E, Galli L, Romagnani S & De Martino M (2011) Natural killer cell deficiencies in a consecutive series of children with herpetic encephalitis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24(1):231-238.
- Alvarez de Celis H, Gomez CP, Descoteaux A & Duplay P (2015) Dok proteins are recruited to the phagosome and degraded in a GP63-dependent manner during *Leishmania major* infection. *Microbes Infect* 17(4):285-294.
- Amelio AL, Giordani NV, Kubat NJ, O'Neil J E & Bloom DC (2006) Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant. *J. Virol.* 80(4):2063-2068.

- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P & Becker JC (2006) Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126(1):32-41.
- Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM & Lokensgard JR (2005) Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J. Immunol.* 175(7):4189-4193.
- Arrunategui-Correa V, Dutt J & Foster CS (1994) The role of B lymphocytes in experimental herpes simplex viral retinitis. *Scand. J. Immunol.* 40(3):299-307.
- Arrunategui-Correa V, Dutt JE & Foster CS (1997) Analysis of T cell receptor V beta gene expression in B cell deficient mice after experimental herpes simplex virus keratitis. *Acta Virol.* 41(3):145-152.
- Aubert M, Krantz EM & Jerome KR (2006) Herpes simplex virus genes Us3, Us5, and Us12 differentially regulate cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity. *Viral Immunol.* 19(3):391-408.
- Aubert M, Yoon M, Sloan DD, Spear PG & Jerome KR (2009) The virological synapse facilitates herpes simplex virus entry into T cells. *J. Virol.* 83(12):6171-6183.
- Baines JD, Poon AP, Rovnak J & Roizman B (1994) The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J. Virol.* 68(12):8118-8124.
- Banerjee K, Biswas PS, Kumaraguru U, Schoenberger SP & Rouse BT (2004) Protective and pathological roles of virus-specific and bystander CD8⁺ T cells in herpetic stromal keratitis. *J. Immunol.* 173(12):7575-7583.
- Banerjee K & Rouse BT (2007) Immunopathological aspects of HSV infection. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R & Yamanishi K (Édit.) Cambridge University Press
- Copyright (c) Cambridge University Press 2007., Cambridge.
- Bauer D, Mrzyk S, van Rooijen N, Steuhl KP & Heiligenhaus A (2000) Macrophage-depletion influences the course of murine HSV-1 keratitis. *Curr. Eye Res.* 20(1):45-53.
- Beland JL, Sobel RA, Adler H, Del-Pan NC & Rimm IJ (1999) B cell-deficient mice have increased susceptibility to HSV-1 encephalomyelitis and mortality. *J. Neuroimmunol.* 94(1-2):122-126.
- BenMohamed L, Osorio N, Khan AA, Srivastava R, Huang L, Krochmal JJ, Garcia JM, Simpson JL & Wechsler SL (2016) Prior Corneal Scarification and Injection of Immune Serum are Not Required Before Ocular HSV-1 Infection for UV-B-Induced Virus Reactivation and Recurrent Herpetic Corneal Disease in Latently Infected Mice. *Curr. Eye Res.* 41(6):747-756.
- Berg KL, Siminovitch KA & Stanley ER (1999) SHP-1 regulation of p62(DOK) tyrosine phosphorylation in macrophages. *J. Biol. Chem.* 274(50):35855-35865.

- Berger AH, Niki M, Morotti A, Taylor BS, Socci ND, Viale A, Brennan C, Szoke J, Motoi N, Rothman PB, Teruya-Feldstein J, Gerald WL, Ladanyi M & Pandolfi PP (2010) Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat. Genet.* 42(3):216-223.
- Berra A, Rodriguez A, Heiligenhaus A, Pazos B, Van Rooijen N & Foster CS (1994) The role of macrophages in the pathogenesis of HSV-1 induced chorioretinitis in BALB/c mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35(7):2990-2998.
- Besin G, Yousefi M, Saba I, Klinck R, Pandolfi PP & Duplay P (2012) Dok-1 overexpression promotes development of gammadelta natural killer T cells. *Eur. J. Immunol.* 10.1002/eji.201242421.
- Biron CA, Byron KS & Sullivan JL (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320(26):1731-1735.
- Blank C & Mackensen A (2007) Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol. Immunother.* 56(5):739-745.
- Bloom DC (2004) HSV LAT and neuronal survival. *Int. Rev. Immunol.* 23(1-2):187-198.
- Bloom DC, Hill JM, Devi-Rao G, Wagner EK, Feldman LT & Stevens JG (1996) A 348-base-pair region in the latency-associated transcript facilitates herpes simplex virus type 1 reactivation. *J. Virol.* 70(4):2449-2459.
- Boehm U, Klamp T, Groot M & Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-795.
- Bonneau RH & Jennings SR (1989) Modulation of acute and latent herpes simplex virus infection in C57BL/6 mice by adoptive transfer of immune lymphocytes with cytolytic activity. *J. Virol.* 63(3):1480-1484.
- Bonneau RH, Salvucci LA, Johnson DC & Tevethia SS (1993) Epitope specificity of H-2Kb-restricted, HSV-1-, and HSV-2-cross-reactive cytotoxic T lymphocyte clones. *Virology* 195(1):62-70.
- Bosnjak L, Jones CA, Abendroth A & Cunningham AL (2005a) Dendritic cell biology in herpesvirus infections. *Viral Immunol.* 18(3):419-433.
- Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Koelle DM, Boadle RA, Jones CA & Cunningham AL (2005b) Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J. Immunol.* 174(4):2220-2227.
- Boulay I, Nemorin JG & Duplay P (2005) Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation. *J. Immunol.* 175(7):4483-4489.
- Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ & Hendricks RL (2002) Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43(7):2264-2271.
- Bryant-Hudson KM & Carr DJ (2012) PD-L1-expressing dendritic cells contribute to viral resistance during acute HSV-1 infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2012:924619.

- Caignard G, Leiva-Torres GA, Leney-Greene M, Charbonneau B, Dumaine A, Fodil-Cornu N, Pyzik M, Cingolani P, Schwartzentruber J, Dupaul-Chicoine J, Guo H, Saleh M, Veillette A, Lathrop M, Blanchette M, Majewski J, Pearson A & Vidal SM (2013) Genome-wide mouse mutagenesis reveals CD45-mediated T cell function as critical in protective immunity to HSV-1. *PLoS Pathog.* 9(9):e1003637.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ & Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17(11 Reviews):1395-1413.
- Cantin E, Tanamachi B & Openshaw H (1999a) Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J. Virol.* 73(4):3418-3423.
- Cantin E, Tanamachi B, Openshaw H, Mann J & Clarke K (1999b) Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. *Journal of virology* 73(6):5196-5200.
- Cantin EM, Hinton DR, Chen J & Openshaw H (1995) Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 69(8):4898-4905.
- Carpenter D, Hsiang C, Jiang X, Osorio N, BenMohamed L, Jones C & Wechsler SL (2015) The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) protects cells against cold-shock-induced apoptosis by maintaining phosphorylation of protein kinase B (AKT). *J. Neurovirol.* 21(5):568-575.
- Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B & Clarkson B (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88(2):197-204.
- Carr DJ, Veress LA, Noisakran S & Campbell IL (1998) Astrocyte-targeted expression of IFN-alpha1 protects mice from acute ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J. Immunol.* 161(9):4859-4865.
- Cartier A, Broberg E, Komai T, Henriksson M & Masucci MG (2003) The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ.* 10(12):1320-1328.
- Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Senechal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Heron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L & Casanova JL (2006) Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314(5797):308-312.
- Celis-Gutierrez J, Boyron M, Walzer T, Pandolfi PP, Jonjic S, Olive D, Dalod M, Vivier E & Nunes JA (2014) Dok1 and Dok2 proteins regulate natural killer cell development and function. *EMBO J.* 33(17):1928-1940.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL & Brenner MB (1994) Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372(6502):190-193.
- Chang JT, Wherry EJ & Goldrath AW (2014) Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 15(12):1104-1115.

- Chen H & Hendricks RL (1998) B7 costimulatory requirements of T cells at an inflammatory site. *J. Immunol.* 160(10):5045-5052.
- Chen SH, Garber DA, Schaffer PA, Knipe DM & Coen DM (2000) Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation. *Virology* 278(1):207-216.
- Chen SH, Kramer MF, Schaffer PA & Coen DM (1997) A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 71(8):5878-5884.
- Chen W, Khilko S, Fecondo J, Margulies DH & McCluskey J (1994) Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. *J. Exp. Med.* 180(4):1471-1483.
- Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW & Bennink JR (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193(11):1319-1326.
- Chen W, Tang Q & Hendricks RL (1996) Ex vivo model of leukocyte migration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J. Leukoc. Biol.* 60(2):167-173.
- Cheng G, Zhong J, Chung J & Chisari FV (2007) Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(21):9035-9040.
- Cheng H, Tumpey TM, Staats HF, van Rooijen N, Oakes JE & Lausch RN (2000) Role of macrophages in restricting herpes simplex virus type 1 growth after ocular infection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(6):1402-1409.
- Chentoufi AA, Kritzer E, Yu DM, Nesburn AB & Benmohamed L (2012) Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. *Clin. Dev. Immunol.* 2012:187585.
- Chew T, Taylor KE & Mossman KL (2009) Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses* 1(3):979-1002.
- Chiu YH, Macmillan JB & Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138(3):576-591.
- Chmielarczyk W, Engler H, Ernst R, Opitz U & Kirchner H (1985) Injection of anti-thy-1.2 serum breaks genetic resistance of mice against herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 5):1087-1094.
- Chretien F, Belec L, Hilton DA, Flament-Saillour M, Guillon F, Wingertsmann L, Baudrimont M, de Truchis P, Keohane C, Vital C, Love S & Gray F (1996) Herpes simplex virus type 1 encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22(5):394-404.
- Christensen JE, de Lemos C, Moos T, Christensen JP & Thomsen AR (2006) CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J. Immunol.* 176(7):4235-4243.

- Christensen JE, Nansen A, Moos T, Lu B, Gerard C, Christensen JP & Thomsen AR (2004) Efficient T-cell surveillance of the CNS requires expression of the CXC chemokine receptor 3. *J. Neurosci.* 24(20):4849-4858.
- Chu DH, Morita CT & Weiss A (1998) The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165:167-180.
- Chucair-Elliott AJ, Gurung HR, Carr MM & Carr DJJ (2017) Colony stimulating factor-1 receptor expressing cells infiltrating the cornea control corneal nerve degeneration in response to HSV-1 infection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58(11):4670-4682.
- Chuluunbaatar U, Roller R & Mohr I (2012) Suppression of extracellular signal-regulated kinase activity in herpes simplex virus 1-infected cells by the Us3 protein kinase. *J. Virol.* 86(15):7771-7776.
- Cliffe AR & Wilson AC (2017) Restarting Lytic Gene Transcription at the Onset of Herpes Simplex Virus Reactivation. *J. Virol.* 91(2).
- Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE & Aversa G (1995) A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376(6537):260-263.
- Confer DL, Vercellotti GM, Kotasek D, Goodman JL, Ochoa A & Jacob HS (1990) Herpes simplex virus-infected cells disarm killer lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(9):3609-3613.
- Cong F, Yuan B & Goff SP (1999) Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol. Cell. Biol.* 19(12):8314-8325.
- Conley AJ, Knipe DM, Jones PC & Roizman B (1981) Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J. Virol.* 37(1):191-206.
- Conrady CD, Jones H, Zheng M & Carr DJ (2011) A Functional Type I Interferon Pathway Drives Resistance to Cornea Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Recruitment of Leukocytes. *J Biomed Res* 25(2):111-119.
- Conrady CD, Zheng M, Fitzgerald KA, Liu C & Carr DJ (2012) Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal Immunol.* 5(2):173-183.
- Conrady CD, Zheng M, Mandal NA, van Rooijen N & Carr DJ (2013) IFN-alpha-driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. *Mucosal Immunol.* 6(1):45-55.
- Cook WJ, Kramer MF, Walker RM, Burwell TJ, Holman HA, Coen DM & Knipe DM (2004) Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex virus 1 infection. *Virol J.* 1:5.
- Coppin E, De Grandis M, Pandolfi PP, Arcangeli ML, Aurrand-Lions M & Nunes JA (2016) Dok1 and Dok2 Proteins Regulate Cell Cycle in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *J. Immunol.* 196(10):4110-4121.

- Corse E, Gottschalk RA & Allison JP (2011) Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *The Journal of Immunology* 186(9):5039-5045.
- Croen KD, Ostrove JM, Dragovic LJ, Smialek JE & Straus SE (1987) Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization. *N. Engl. J. Med.* 317(23):1427-1432.
- Crowder RJ, Enomoto H, Yang M, Johnson EM, Jr. & Milbrandt J (2004) Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 279(40):42072-42081.
- Daniels MA & Teixeira E (2015) TCR signaling in T cell memory. *Front. Immunol.* 6:617.
- Dasgupta G & BenMohamed L (2011) Of mice and not humans: how reliable are animal models for evaluation of herpes CD8(+)-T cell-epitopes-based immunotherapeutic vaccine candidates? *Vaccine* 29(35):5824-5836.
- Davey GM, Wojtasiak M, Proietto AI, Carbone FR, Heath WR & Bedoui S (2010) Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *J. Immunol.* 184(5):2243-2246.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ & Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154(1):171-177.
- DeClue JE, Vass WC, Johnson MR, Stacey DW & Lowy DR (1993) Functional role of GTPase-activating protein in cell transformation by pp60v-src. *Mol. Cell. Biol.* 13(11):6799-6809.
- Decman V, Kinchington PR, Harvey SA & Hendricks RL (2005) Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J. Virol.* 79(16):10339-10347.
- Deiss LP & Frenkel N (1986) Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J. Virol.* 57(3):933-941.
- Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P & Michiels T (2006) Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(20):7835-7840.
- DeLuca NA & Schaffer PA (1985) Activation of immediate-early, early, and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol. Cell. Biol.* 5(8):1997-2008.
- Derfuss T, Arbusow V, Strupp M, Brandt T & Theil D (2009) The presence of lytic HSV-1 transcripts and clonally expanded T cells with a memory effector phenotype in human sensory ganglia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1164:300-304.
- Derfuss T, Segerer S, Herberger S, Sinicina I, Hufner K, Ebelt K, Knaus HG, Steiner I, Meinel E, Dornmair K, Arbusow V, Strupp M, Brandt T & Theil D (2007) Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia. *Brain Pathol.* 17(4):389-398.
- Deschamps T & Kalamvoki M (2017) Evasion of the STING DNA sensing pathway by the VP11/12 of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 10.1128/jvi.00535-17.

- Deshmane SL & Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63(2):943-947.
- Deshpande S, Zheng M, Lee S, Banerjee K, Gangappa S, Kumaraguru U & Rouse BT (2001) Bystander activation involving T lymphocytes in herpetic stromal keratitis. *J. Immunol.* 167(5):2902-2910.
- Deshpande SP, Zheng M, Daheshia M & Rouse BT (2000) Pathogenesis of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions in B-cell-deficient mice. *J. Virol.* 74(8):3517-3524.
- Di Cristofano A, Carpino N, Dunant N, Friedland G, Kobayashi R, Strife A, Wisniewski D, Clarkson B, Pandolfi PP & Resh MD (1998) Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 273(9):4827-4830.
- Di Cristofano A, Niki M, Zhao M, Karnell FG, Clarkson B, Pear WS, Van Aelst L & Pandolfi PP (2001) p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J. Exp. Med.* 194(3):275-284.
- Dohner K & Sodeik B (2005) The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285:67-108.
- Dong S, Corre B, Foulon E, Dufour E, Veillette A, Acuto O & Michel F (2006) T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203(11):2509-2518.
- Doymaz MZ & Rouse BT (1992) Herpetic stromal keratitis: an immunopathologic disease mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33(7):2165-2173.
- Du T, Zhou G & Roizman B (2013) Modulation of reactivation of latent herpes simplex virus 1 in ganglionic organ cultures by p300/CBP and STAT3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(28):E2621-2628.
- Dudek TE & Knipe DM (2011) Vaccine and new antiviral strategies against herpes simplex virus. *Alphaherpesviruses: Molecular Virology* :317.
- Dunant NM, Wisniewski D, Strife A, Clarkson B & Resh MD (2000) The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells. *Cell. Signal.* 12(5):317-326.
- Dyson H, Shimeld C, Hill TJ, Blyth WA & Easty DL (1987) Spread of herpes simplex virus within ocular nerves of the mouse: demonstration of viral antigen in whole mounts of eye tissue. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 12):2989-2995.
- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ & Stone JC (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280(5366):1082-1086.
- Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Bottorff DA, Hooton J, Blumberg PM, Barry M, Bleakley RC, Ostergaard HL & Stone JC (2000) RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95(10):3199-3203.

- Efstathiou S & Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res.* 111(2):108-119.
- Egan KP, Wu S, Wigdahl B & Jennings SR (2013) Immunological control of herpes simplex virus infections. *J. Neurovirol.* 19(4):328-345.
- Eing BR, Kuhn JE & Braun RW (1989) Neutralizing activity of antibodies against the major herpes simplex virus type 1 glycoproteins. *J. Med. Virol.* 27(1):59-65.
- Ellermann-Eriksen S (2005) Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology* 2:59.
- Ellis C, Moran M, McCormick F & Pawson T (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343(6256):377-381.
- Ellison AR, Yang L, Voytek C & Margolis TP (2000) Establishment of latent herpes simplex virus type 1 infection in resistant, sensitive, and immunodeficient mouse strains. *Virology* 268(1):17-28.
- Esaki S, Goshima F, Katsumi S, Watanabe D, Ozaki N, Murakami S & Nishiyama Y (2010) Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Arch. Virol.* 155(8):1235-1245.
- Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D & Lieberman J (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112(5):659-672.
- Farooq AV & Shukla D (2012) Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv. Ophthalmol.* 57(5):448-462.
- Fatahzadeh M & Schwartz RA (2007) Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 57(5):737-763; quiz 764-736.
- Favre C, Gerard A, Clauzier E, Pontarotti P, Olive D & Nunes JA (2003) DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun.* 4(1):40-45.
- Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P & Margolis TP (2002) Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(2):978-983.
- Fodor PA, Levin MJ, Weinberg A, Sandberg E, Sylman J & Tyler KL (1998) Atypical herpes simplex virus encephalitis diagnosed by PCR amplification of viral DNA from CSF. *Neurology* 51(2):554-559.
- Forman-Kay JD & Pawson T (1999) Diversity in protein recognition by PTB domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(6):690-695.
- Frank GM, Buela KA, Maker DM, Harvey SA & Hendricks RL (2012) Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection within the cornea. *J. Immunol.* 188(3):1350-1359.

- Frank GM, Lepisto AJ, Freeman ML, Sheridan BS, Cherpes TL & Hendricks RL (2010) Early CD4(+) T cell help prevents partial CD8(+) T cell exhaustion and promotes maintenance of Herpes Simplex Virus 1 latency. *J. Immunol.* 184(1):277-286.
- Freeburn RW, Wright KL, Burgess SJ, Astoul E, Cantrell DA & Ward SG (2002) Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J. Immunol.* 169(10):5441-5450.
- Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH & Hendricks RL (2007) Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *J. Immunol.* 179(1):322-328.
- Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Seidel CA & Cines DB (1984) Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309(5969):633-635.
- Fruh K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R, Peterson PA & Yang Y (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375(6530):415-418.
- Fuller AO, Santos RE & Spear PG (1989) Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J. Virol.* 63(8):3435-3443.
- Garber DA, Beverley SM & Coen DM (1993) Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1):459-462.
- Garber DA, Schaffer PA & Knipe DM (1997) A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 71(8):5885-5893.
- Gaur U & Aggarwal BB (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 66(8):1403-1408.
- Gebhardt T, Mueller SN, Heath WR & Carbone FR (2013) Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells. *Trends Immunol.* 34(1):27-32.
- Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR & Carbone FR (2009) Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* 10(5):524-530.
- 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.
- Gerard A, Favre C, Garcon F, Nemorin JG, Duplay P, Pastor S, Collette Y, Olive D & Nunes JA (2004) Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene* 23(8):1594-1598.
- Gesser RM, Valyi-Nagy T & Fraser NW (1994) Restricted herpes simplex virus type 1 gene expression within sensory neurons in the absence of functional B and T lymphocytes. *Virology* 200(2):791-795.

- Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB & Wechsler SL (2000a) Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved in protection against HSV-1 induced corneal scarring. *Br. J. Ophthalmol.* 84(4):408-412.
- Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB & Wechsler SL (2000b) The role of natural killer cells in protection of mice against death and corneal scarring following ocular HSV-1 infection. *Antiviral Res.* 45(1):33-45.
- Ghiasi H, Perng G, Nesburn AB & Wechsler SL (1999) Either a CD4(+) or CD8(+) T cell function is sufficient for clearance of infectious virus from trigeminal ganglia and establishment of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Microb. Pathog.* 27(6):387-394.
- Ghiasi H, Wechsler SL, Kaiwar R, Nesburn AB & Hofman FM (1995) Local expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-2 correlates with protection against corneal scarring after ocular challenge of vaccinated mice with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 69(1):334-340.
- Gilfillan AM & Rivera J (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol. Rev.* 228(1):149-169.
- Gobeil PA & Leib DA (2012) Herpes simplex virus gamma34.5 interferes with autophagosome maturation and antigen presentation in dendritic cells. *MBio* 3(5):e00267-00212.
- Granzow H, Klupp BG & Mettenleiter TC (2005) Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J. Virol.* 79(5):3200-3205.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K & Birchmeier W (2001) Novel p62^{dok} family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell Biol.* 154(2):345-354.
- Grunewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W & Steven AC (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302(5649):1396-1398.
- Gugasyan R, Quilici C, I ST, Grail D, Verhagen AM, Roberts A, Kitamura T, Dunn AR & Lock P (2002) Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. *J. Cell Biol.* 158(1):115-125.
- Guidotti LG & Chisari FV (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 19:65-91.
- Guittard G, Gerard A, Dupuis-Coronas S, Tronchere H, Mortier E, Favre C, Olive D, Zimmermann P, Payrastre B & Nunes JA (2009) Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. *J. Immunol.* 182(7):3974-3978.
- Guittard G, Pontarotti P, Granjeaud S, Rodrigues M, Abi-Rached L & Nunes JA (2018) Evolutionary and expression analyses reveal a pattern of ancient duplications and functional specializations in the diversification of the Downstream of Kinase (DOK) genes. *Dev. Comp. Immunol.* 84:193-198.
- Guo Y, Audry M, Ciancanelli M, Alsina L, Azevedo J, Herman M, Anguiano E, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Pauwels E, Philippe PB, Perez de Diego R, Cardon A, Vogt G, Picard C, Andrianirina ZZ, Rozenberg F, Lebon P, Plancoulaine S, Tardieu M, Valerie D, Jouanguy

- E, Chaussabel D, Geissmann F, Abel L, Casanova JL & Zhang SY (2011) Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J. Exp. Med.* 208(10):2083-2098.
- Haarr L & Skulstad S (1994) The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. Review article. *APMIS* 102(5):321-346.
- Halford WP, Gebhardt BM & Carr DJ (1996) Persistent cytokine expression in trigeminal ganglion latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Immunol.* 157(8):3542-3549.
- Halford WP, Maender JL & Gebhardt BM (2005) Re-evaluating the role of natural killer cells in innate resistance to herpes simplex virus type 1. *Viol J.* 2:56.
- Halford WP, Veress LA, Gebhardt BM & Carr DJ (1997) Innate and acquired immunity to herpes simplex virus type 1. *Virology* 236(2):328-337.
- Hamrah P, Liu Y, Zhang Q & Dana MR (2003) The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(2):581-589.
- Hamrah P, Zhang Q, Liu Y & Dana MR (2002) Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43(3):639-646.
- Hamza MA, Higgins DM, Feldman LT & Ruyechan WT (2007) The latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 promotes survival and stimulates axonal regeneration in sympathetic and trigeminal neurons. *J. Neurovirol.* 13(1):56-66.
- Harriague J, Debre P, Bismuth G & Hubert P (2000) Priming of CD2-induced p62Dok tyrosine phosphorylation by CD3 in Jurkat T cells. *Eur. J. Immunol.* 30(11):3319-3328.
- Harvat BL, Seth P & Jetten AM (1997) The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. *Oncogene* 14(17):2111-2122.
- Heine JW, Honess RW, Cassai E & Roizman B (1974) Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J. Virol.* 14(3):640-651.
- Held K, Eiglmeier I, Himmelein S, Sinicina I, Brandt T, Theil D, Dornmair K & Derfuss T (2012) Clonal expansions of CD8(+) T cells in latently HSV-1-infected human trigeminal ganglia. *J. Neurovirol.* 18(1):62-68.
- Henderson G, Peng W, Jin L, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL & Jones C (2002) Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J. Neurovirol.* 8 Suppl 2:103-111.
- Hendricks RL, Janowicz M & Tumpey TM (1992) Critical role of corneal Langerhans cells in the CD4- but not CD8-mediated immunopathology in herpes simplex virus-1-infected mouse corneas. *J. Immunol.* 148(8):2522-2529.
- Herbst-Kralovetz M & Pyles R (2006) Toll-like receptors, innate immunity and HSV pathogenesis. *Herpes* 13(2):37-41.
- Herman M, Ciancanelli M, Ou YH, Lorenzo L, Klaudel-Dreszler M, Pauwels E, Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Abhyankar A, Israelsson E, Guo Y, Cardon A, Rozenberg F, Lebon P, Tardieu M, Heropolitanska-Pliszka E, Chaussabel D, White MA, Abel L, Zhang SY &

- Casanova JL (2012) Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *J. Exp. Med.* 209(9):1567-1582.
- Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H & Johnson D (1995) Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375(6530):411-415.
- Himmelein S, Lindemann A, Sinicina I, Strupp M, Brandt T & Hufner K (2015) Latent herpes simplex virus 1 infection does not induce apoptosis in human trigeminal Ganglia. *J. Virol.* 89(10):5747-5750.
- Himmelein S, St Leger AJ, Knickelbein JE, Rowe A, Freeman ML & Hendricks RL (2011) Circulating herpes simplex type 1 (HSV-1)-specific CD8+ T cells do not access HSV-1 latently infected trigeminal ganglia. *Herpesviridae* 2(1):5.
- Hiragun T, Peng Z & Beaven MA (2005) Dexamethasone up-regulates the inhibitory adaptor protein Dok-1 and suppresses downstream activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol. Pharmacol.* 67(3):598-603.
- Holtappels R, Simon CO, Munks MW, Thomas D, Deegen P, Kuhnappel B, Daubner T, Emde SF, Podlech J, Grzimek NK, Oehrlein-Karpi SA, Hill AB & Reddehase MJ (2008) Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J. Virol.* 82(12):5781-5796.
- Honess RW & Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14(1):8-19.
- Honma M, Higuchi O, Shirakata M, Yasuda T, Shibuya H, Iemura S, Natsume T & Yamanashi Y (2006) Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. *Genes Cells* 11(2):143-151.
- Hook LM, Lubinski JM, Jiang M, Pangburn MK & Friedman HM (2006) Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin M antibody. *J. Virol.* 80(8):4038-4046.
- Hor JL, Heath WR & Mueller SN (2017) Neutrophils are dispensable in the modulation of T cell immunity against cutaneous HSV-1 infection. *Sci. Rep.* 7:41091.
- Hoshino Y, Pesnicak L, Cohen JI & Straus SE (2007) Rates of reactivation of latent herpes simplex virus from mouse trigeminal ganglia ex vivo correlate directly with viral load and inversely with number of infiltrating CD8+ T cells. *J. Virol.* 81(15):8157-8164.
- Hosooka T, Noguchi T, Kotani K, Nakamura T, Sakaue H, Inoue H, Ogawa W, Tobimatsu K, Takazawa K, Sakai M, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yasuda T, Lazar MA, Yamanashi Y & Kasuga M (2008) Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation. *Nat. Med.* 14(2):188-193.
- Hu K, Harris DL, Yamaguchi T, von Andrian UH & Hamrah P (2015) A Dual Role for Corneal Dendritic Cells in Herpes Simplex Keratitis: Local Suppression of Corneal Damage and Promotion of Systemic Viral Dissemination. *PLoS One* 10(9):e0137123.
- Hufner K, Derfuss T, Herberger S, Sunami K, Russell S, Sinicina I, Arbusow V, Strupp M, Brandt T & Theil D (2006) Latency of alpha-herpes viruses is accompanied by a chronic

- inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65(10):1022-1030.
- Hughan SC & Watson SP (2007) Differential regulation of adapter proteins Dok2 and Dok1 in platelets, leading to an association of Dok2 with integrin alphaIIb beta3. *J. Thromb. Haemost.* 5(2):387-394.
- Iannello A, Debbeche O, El Arabi R, Samarani S, Hamel D, Rozenberg F, Heveker N & Ahmad A (2011) Herpes simplex virus type 1-induced FasL expression in human monocytic cells and its implications for cell death, viral replication, and immune evasion. *Viral Immunol.* 24(1):11-26.
- Imai T, Koyanagi N, Ogawa R, Shindo K, Suenaga T, Sato A, Arai J, Kato A, Kiyono H, Arase H & Kawaguchi Y (2013) Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8+ T cells. *PLoS One* 8(8):e72050.
- Inoue A, Yasuda T, Yamamoto T & Yamanashi Y (2007) Dok-1 is a positive regulator of IL-4 signalling and IgE response. *J. Biochem.* 142(2):257-263.
- Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R & Tschopp J (1995) Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 181(5):1917-1922.
- Isakov N & Altman A (2002) Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 20:761-794.
- Jameson SC & Masopust D (2009) Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31(6):859-871.
- Janas JA & Van Aelst L (2011) Oncogenic tyrosine kinases target Dok-1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation to promote cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 31(13):2552-2565.
- Jeon S, St Leger AJ, Cherpes TL, Sheridan BS & Hendricks RL (2013) PD-L1/B7-H1 regulates the survival but not the function of CD8+ T cells in herpes simplex virus type 1 latently infected trigeminal ganglia. *J. Immunol.* 190(12):6277-6286.
- Jerome KR (2008) Viral modulation of T-cell receptor signaling. *J. Virol.* 82(9):4194-4204.
- Jerome KR, Chen Z, Lang R, Torres MR, Hofmeister J, Smith S, Fox R, Froelich CJ & Corey L (2001) HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J. Immunol.* 167(7):3928-3935.
- Jerome KR, Tait JF, Koelle DM & Corey L (1998) Herpes simplex virus type 1 renders infected cells resistant to cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J. Virol.* 72(1):436-441.
- Jiang X, Chentoufi AA, Hsiang C, Carpenter D, Osorio N, BenMohamed L, Fraser NW, Jones C & Wechsler SL (2011) The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can protect neuron-derived C1300 and Neuro2A cells from granzyme B-induced apoptosis and CD8 T-cell killing. *J. Virol.* 85(5):2325-2332.

- Jin H, Ma Y, Prabhakar BS, Feng Z, Valyi-Nagy T, Yan Z, Verpooten D, Zhang C, Cao Y & He B (2009) The gamma 1 34.5 protein of herpes simplex virus 1 is required to interfere with dendritic cell maturation during productive infection. *J. Virol.* 83(10):4984-4994.
- Jin H, Yan Z, Ma Y, Cao Y & He B (2011) A herpesvirus virulence factor inhibits dendritic cell maturation through protein phosphatase 1 and Ikappa B kinase. *J. Virol.* 85(7):3397-3407.
- Jin X, Qin Q, Chen W & Qu J (2007) Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea. *Cornea* 26(7):847-852.
- Joly E, Mucke L & Oldstone MB (1991) Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 253(5025):1283-1285.
- Jones C (2003) Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1):79-95.
- Jones CA, Fernandez M, Herc K, Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Boadle RA & Cunningham A (2003) Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro. *J. Virol.* 77(20):11139-11149.
- Jones N & Dumont DJ (1999) Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr. Biol.* 9(18):1057-1060.
- Jurak I, Kramer MF, Mellor JC, van Lint AL, Roth FP, Knipe DM & Coen DM (2010) Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2. *J. Virol.* 84(9):4659-4672.
- Kaech SM & Cui W (2012) Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12(11):749-761.
- Kassim SH, Rajasagi NK, Ritz BW, Pruett SB, Gardner EM, Chervenak R & Jennings SR (2009) Dendritic cells are required for optimal activation of natural killer functions following primary infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83(7):3175-3186.
- Kassim SH, Rajasagi NK, Zhao X, Chervenak R & Jennings SR (2006) In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. *J. Virol.* 80(8):3985-3993.
- Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Carbone FR & Scalzo AA (2015) A NK complex-linked locus restricts the spread of herpes simplex virus type 1 in the brains of C57BL/6 mice. *Immunol. Cell Biol.* 93(10):877-884.
- Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Smyth MJ, Jones CM, Clarke SR & Carbone FR (2010) Redundancy in the immune system restricts the spread of HSV-1 in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 mice. *Virology* 400(2):248-258.
- Kato K, Daikoku T, Goshima F, Kume H, Yamaki K & Nishiyama Y (2000) Synthesis, subcellular localization and VP16 interaction of the herpes simplex virus type 2 UL46 gene product. *Arch. Virol.* 145(10):2149-2162.
- Kaufman HE, Azcuy AM, Varnell ED, Sloop GD, Thompson HW & Hill JM (2005) HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(1):241-247.
- Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2009) Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 145(2):173-186.

- Kent JR, Zeng PY, Atanasiu D, Gardner J, Fraser NW & Berger SL (2004) During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J. Virol.* 78(18):10178-10186.
- Kepley CL, Taghavi S, Mackay G, Zhu D, Morel PA, Zhang K, Ryan JJ, Satin LS, Zhang M, Pandolfi PP & Saxon A (2004) Co-aggregation of FcγRIIb with FcεRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J. Biol. Chem.* 279(34):35139-35149.
- Khan AA, Srivastava R, Chentoufi AA, Kritzer E, Chilukuri S, Garg S, Yu DC, Vahed H, Huang L, Syed SA, Furness JN, Tran TT, Anthony NB, McLaren CE, Sidney J, Sette A, Noelle RJ & BenMohamed L (2017) Bolstering the Number and Function of HSV-1-Specific CD8⁺ Effector Memory T Cells and Tissue-Resident Memory T Cells in Latently Infected Trigeminal Ganglia Reduces Recurrent Ocular Herpes Infection and Disease. *J. Immunol.* 199(1):186-203.
- Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR & Hendricks RL (2003) Herpes simplex virus-specific memory CD8⁺ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 18(5):593-603.
- Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V & Hendricks RL (2004) Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr. Opin. Immunol.* 16(4):463-469.
- Kimberlin D (2004) Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 11 Suppl 2:65a-76a.
- Klasen S, Pages F, Peyron JF, Cantrell DA & Olive D (1998) Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein. *Int. Immunol.* 10(4):481-489.
- Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR & Hendricks RL (2008) Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8⁺ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322(5899):268-271.
- Knickelbein JE, Watkins SC, McMenamin PG & Hendricks RL (2009) Stratification of Antigen-presenting Cells within the Normal Cornea. *Ophthalmol. Eye Dis.* 1:45-54.
- Knipe DM & Cliffe A (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(3):211-221.
- Knipe DM, Howley PM & Fields BN (2013) *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Sixth edition. 2 volumes (xx, 2456, I-2482 pages) p
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ & Hendricks RL (1999) Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J. Immunol.* 162(5):2895-2905.
- Kojima Y, Kawasaki-Koyanagi A, Sueyoshi N, Kanai A, Yagita H & Okumura K (2002) Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(2):328-336.
- Kotturi MF, Scott I, Wolfe T, Peters B, Sidney J, Cheroutre H, von Herrath MG, Buchmeier MJ, Grey H & Sette A (2008) Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the

- degree of epitope diversity shape CD8⁺ T cell immunodominance. *J. Immunol.* 181(3):2124-2133.
- Kramer MF & Coen DM (1995) Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 69(3):1389-1399.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S & Colonna M (2004) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103(4):1433-1437.
- Kubat NJ, Amelio AL, Giordani NV & Bloom DC (2004a) The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. *J. Virol.* 78(22):12508-12518.
- Kubat NJ, Tran RK, McAnany P & Bloom DC (2004b) Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.* 78(3):1139-1149.
- Kurt-Jones EA, Belko J, Yu C, Newburger PE, Wang J, Chan M, Knipe DM & Finberg RW (2005) The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates. *J. Infect. Dis.* 191(5):746-748.
- Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM & Finberg RW (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(5):1315-1320.
- Kwong AD, Kruper JA & Frenkel N (1988) Herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* 62(3):912-921.
- LaBoissiere S & O'Hare P (2000) Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells. *J. Virol.* 74(1):99-109.
- Lahmidi S, Yousefi M, Dridi S, Duplay P & Pearson A (2017) Dok-1 and Dok-2 are required to maintain herpes simplex virus 1-specific CD8⁺ T cells in a murine model of ocular infection. *J. Virol.* 10.1128/jvi.02297-16.
- Lamberti C & Weller SK (1998) The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J. Virol.* 72(3):2463-2473.
- Lanfranca MP, Mostafa HH & Davido DJ (2014) HSV-1 ICP0: An E3 Ubiquitin Ligase That Counteracts Host Intrinsic and Innate Immunity. *Cells* 3(2):438-454.
- Lang A & Nikolich-Zugich J (2005) Development and migration of protective CD8⁺ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *J. Immunol.* 174(5):2919-2925.
- 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. *J. Virol.* 72(7):6119-6130.

- Laroche-Lefebvre C, Yousefi M, Daudelin JF, Charpentier T, Tarrab E, Klinck R, Lamarre A, Labrecque N, Stager S & Duplay P (2016) Dok-1 and Dok-2 Regulate the Formation of Memory CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 197(9):3618-3627.
- Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries RK, Pawson T & Veillette A (2001) Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat. Immunol.* 2(8):681-690.
- Lee S, Huang H, Niu Y, Tommasino M, Lenoir G & Sylla BS (2007) Dok1 expression and mutation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Lett.* 245(1-2):44-50.
- Lee S, Roy F, Galmarini CM, Accardi R, Michelon J, Viller A, Cros E, Dumontet C & Sylla BS (2004) Frameshift mutation in the Dok1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 23(13):2287-2297.
- Lemaster S & Roizman B (1980) Herpes simplex virus phosphoproteins. II. Characterization of the virion protein kinase and of the polypeptides phosphorylated in the virion. *J. Virol.* 35(3):798-811.
- Lemay S, Davidson D, Latour S & Veillette A (2000) Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20(8):2743-2754.
- Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(2):99-111.
- Lemmon MA & Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350 Pt 1:1-18.
- Leoni V, Gianni T, Salvioli S & Campadelli-Fiume G (2012) Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *J. Virol.* 86(12):6555-6562.
- Liang X, Wisniewski D, Strife A, Shivakrupa, Clarkson B & Resh MD (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-Kit signaling. *J. Biol. Chem.* 277(16):13732-13738.
- Liesegang TJ (1999) Classification of herpes simplex virus keratitis and anterior uveitis. *Cornea* 18(2):127-143.
- Lim HK, Seppanen M, Hautala T, Ciancanelli MJ, Itan Y, Lafaille FG, Dell W, Lorenzo L, Byun M, Pauwels E, Ronnelid Y, Cai X, Boucherit S, Jouanguy E, Paetau A, Lebon P, Rozenberg F, Tardieu M, Abel L, Yildiran A, Vergison A, Roivainen R, Etzioni A, Tienari PJ, Casanova JL & Zhang SY (2014) TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology* 83(21):1888-1897.
- Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, Dias MF, das Gracas Almeida Silva M, Bela SR, do Valle Antonelli LR, Arantes RM, Gazzinelli RT, Bafica A, Kroon EG & Campos MA (2010) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *Am. J. Pathol.* 177(5):2433-2445.
- Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD & Mossman KL (2004) The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* 78(4):1675-1684.

- Liu MT, Chen BP, Oertel P, Buchmeier MJ, Armstrong D, Hamilton TA & Lane TE (2000a) The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J. Immunol.* 165(5):2327-2330.
- Liu N, Liu X, Li X, Duan K, Deng Y, Yu X & Peng Q (2016) DOK3 Degradation is Required for the Development of LPS-induced ARDS in Mice. *Curr. Gene Ther.* 16(4):256-262.
- Liu T, Khanna KM, Carriere BN & Hendricks RL (2001) Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. *J. Virol.* 75(22):11178-11184.
- Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ & Hendricks RL (2000b) CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J. Exp. Med.* 191(9):1459-1466.
- Liu T, Tang Q & Hendricks RL (1996) Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J. Virol.* 70(1):264-271.
- Lock P, Casagrande F & Dunn AR (1999) Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck. *J. Biol. Chem.* 274(32):22775-22784.
- Lokensgard JR, Hu S, Sheng W, vanOijen M, Cox D, Cheeran MC & Peterson PK (2001) Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J. Neurovirol.* 7(3):208-219.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-8618.
- Lubinski JM, Jiang M, Hook L, Chang Y, Sarver C, Mastellos D, Lambris JD, Cohen GH, Eisenberg RJ & Friedman HM (2002) Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J. Virol.* 76(18):9232-9241.
- Lubinski JM, Lazear HM, Awasthi S, Wang F & Friedman HM (2011) The herpes simplex virus 1 IgG fc receptor blocks antibody-mediated complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *J. Virol.* 85(7):3239-3249.
- Lucinda N, Figueiredo MM, Pessoa NL, Santos BS, Lima GK, Freitas AM, Machado AM, Kroon EG, Antonelli LR & Campos MA (2017) Dendritic cells, macrophages, NK and CD8+ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virol J.* 14(1):37.
- Maillet S, Naas T, Crepin S, Roque-Afonso AM, Lafay F, Efstathiou S & Labetoulle M (2006) Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. *J. Virol.* 80(18):9310-9321.
- Martelli MP, Boomer J, Bu M & Bierer BE (2001) T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L. *J. Biol. Chem.* 276(49):45654-45661.
- Mashima R, Arimura S, Kajikawa S, Oda H, Nakae S & Yamanashi Y (2013) Dok adaptors play anti-inflammatory roles in pulmonary homeostasis. *Genes Cells* 18(1):56-65.
- Mashima R, Hishida Y, Tezuka T & Yamanashi Y (2009) The roles of Dok family adaptors in immunoreceptor signaling. *Immunol. Rev.* 232(1):273-285.

- Mashima R, Honda K, Yang Y, Morita Y, Inoue A, Arimura S, Nishina H, Ema H, Nakauchi H, Seed B, Oda H & Yamanashi Y (2010) Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab. Invest.* 90(9):1357-1364.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL & Lefrancois L (2001) Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291(5512):2413-2417.
- Master Z, Tran J, Bishnoi A, Chen SH, Ebos JM, Van Slyke P, Kerbel RS & Dumont DJ (2003) Dok-R binds c-Abl and regulates Abl kinase activity and mediates cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 278(32):30170-30179.
- McKnight JL, Pellett PE, Jenkins FJ & Roizman B (1987) Characterization and nucleotide sequence of two herpes simplex virus 1 genes whose products modulate alpha-trans-inducing factor-dependent activation of alpha genes. *J. Virol.* 61(4):992-1001.
- McNab AR, Desai P, Person S, Roof LL, Thomsen DR, Newcomb WW, Brown JC & Homa FL (1998) The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J. Virol.* 72(2):1060-1070.
- McNearney TA, Odell C, Holers VM, Spear PG & Atkinson JP (1987) Herpes simplex virus glycoproteins gC-1 and gC-2 bind to the third component of complement and provide protection against complement-mediated neutralization of viral infectivity. *J. Exp. Med.* 166(5):1525-1535.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH & Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16(10):2794-2804.
- Melchjorsen J (2012) Sensing herpes: more than toll. *Rev. Med. Virol.* 22(2):106-121.
- Melchjorsen J, Rintahaka J, Soby S, Horan KA, Poltajainen A, Ostergaard L, Paludan SR & Matikainen S (2010) Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways. *J. Virol.* 84(21):11350-11358.
- Melroe GT, DeLuca NA & Knipe DM (2004) Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J. Virol.* 78(16):8411-8420.
- Melroe GT, Silva L, Schaffer PA & Knipe DM (2007) Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology* 360(2):305-321.
- Menachery VD, Pasiaka TJ & Leib DA (2010) Interferon regulatory factor 3-dependent pathways are critical for control of herpes simplex virus type 1 central nervous system infection. *J. Virol.* 84(19):9685-9694.
- Mercier PL, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Ghani K, Tetu B, Bairati I & Bachvarov D (2011) Characterization of DOK1, a candidate tumor suppressor gene, in epithelial ovarian cancer. *Mol. Oncol.* 5(5):438-453.
- Mercurio AM, Schwarting GA & Robbins PW (1984) Glycolipids of the mouse peritoneal macrophage. Alterations in amount and surface exposure of specific glycolipid species occur in response to inflammation and tumoricidal activation. *J. Exp. Med.* 160(4):1114-1125.

- Mester JC & Rouse BT (1991) The mouse model and understanding immunity to herpes simplex virus. *Rev. Infect. Dis.* 13 Suppl 11:S935-945.
- Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM & Froelich CJ (2003) Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J. Cell Biol.* 160(6):875-885.
- Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76(4):1537-1547.
- Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106(2):167-180.
- Miah S, Goel RK, Dai C, Kalra N, Beaton-Brown E, Bagu ET, Bonham K & Lukong KE (2014) BRK targets Dok1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation to promote cell proliferation and migration. *PLoS One* 9(2):e87684.
- Michel F, Attal-Bonnefoy G, Mangino G, Mise-Omata S & Acuto O (2001) CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 15(6):935-945.
- Mihrshahi R, Barclay AN & Brown MH (2009) Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *J. Immunol.* 183(8):4879-4886.
- Minagawa H, Sakuma S, Mohri S, Mori R & Watanabe T (1988) Herpes simplex virus type 1 infection in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Arch. Virol.* 103(1-2):73-82.
- Minami M, Kita M, Yan XQ, Yamamoto T, Iida T, Sekikawa K, Iwakura Y & Imanishi J (2002) Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 22(6):671-676.
- Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2):240-273, Table of Contents.
- Molesworth-Kenyon SJ, Popham N, Milam A, Oakes JE & Lausch RN (2012) Resident Corneal Cells Communicate with Neutrophils Leading to the Production of IP-10 during the Primary Inflammatory Response to HSV-1 Infection. *Int J Inflamm* 2012:810359.
- 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.
- Mori R, Tasaki T, Kimura G & Takeya K (1967) Depression of acquired resistance against herpes simplex virus infection in neonatally thymectomized mice. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 21(3):459-462.
- Morrison LA (2004) The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol.* 12(8):353-356.
- Moser JM, Gibbs J, Jensen PE & Lukacher AE (2002) CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat. Immunol.* 3(2):189-195.
- Mossman KL & Ashkar AA (2005) Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol.* 18(2):267-281.
- Mott K, Brick DJ, van Rooijen N & Ghiasi H (2007) Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(12):5605-5615.

- Mott KR, Allen SJ, Zandian M, Konda B, Sharifi BG, Jones C, Wechsler SL, Town T & Ghiasi H (2014) CD8alpha dendritic cells drive establishment of HSV-1 latency. *PLoS One* 9(4):e93444.
- Mott KR, Gate D, Matundan HH, Ghiasi YN, Town T & Ghiasi H (2016) CD8+ T cells play a bystander role in HSV-1 latently infected mice. *J. Virol.* 10.1128/jvi.00255-16.
- Mott KR & Ghiasi H (2008) Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(12):1859-1867.
- Mott KR, Underhill D, Wechsler SL & Ghiasi H (2008) Lymphoid-related CD11c+ CD8alpha+ dendritic cells are involved in enhancing herpes simplex virus type 1 latency. *J. Virol.* 82(20):9870-9879.
- Mueller SN & Ahmed R (2009) High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(21):8623-8628.
- Murphy MA, Bucks MA, O'Regan KJ & Courtney RJ (2008) The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids. *Virology* 376(2):279-289.
- Mustelin T & Tasken K (2003) Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* 371(Pt 1):15-27.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME & Dixit VM (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85(6):817-827.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS & Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273(5):2926-2930.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3):355-365.
- Nagata S & Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267(5203):1449-1456.
- Nahmias AJ, Hirsch MS, Kramer JH & Murphy FA (1969) Effect of antithymocyte serum on herpesvirus hominis (type 1) infection in adult mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132(2):696-698.
- Nash AA, Jayasuriya A, Phelan J, Cobbold SP, Waldmann H & Prospero T (1987) Different roles for L3T4+ and Lyt 2+ T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 3):825-833.
- Nel AE (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109(5):758-770.
- Nelms K, Snow AJ & Noben-Trauth K (1998a) Dok1 encoding p62(dok) maps to mouse chromosome 6 and human chromosome 2 in a region of translocation in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 53(2):243-245.
- Nelms K, Snow AL, Hu-Li J & Paul WE (1998b) FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* 9(1):13-24.

- Nemorin JG & Duplay P (2000) Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275(19):14590-14597.
- Nemorin JG, Laporte P, Berube G & Duplay P (2001) p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166(7):4408-4415.
- Neumann DM, Bhattacharjee PS, Giordani NV, Bloom DC & Hill JM (2007a) In vivo changes in the patterns of chromatin structure associated with the latent herpes simplex virus type 1 genome in mouse trigeminal ganglia can be detected at early times after butyrate treatment. *J. Virol.* 81(23):13248-13253.
- Neumann DM, Bhattacharjee PS & Hill JM (2007b) Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. *J. Virol.* 81(11):6106-6110.
- Ng CH, Xu S & Lam KP (2007) Dok-3 plays a nonredundant role in negative regulation of B-cell activation. *Blood* 110(1):259-266.
- Niemialtowski MG & Rouse BT (1992a) Phenotypic and functional studies on ocular T cells during herpetic infections of the eye. *J. Immunol.* 148(6):1864-1870.
- Niemialtowski MG & Rouse BT (1992b) Predominance of Th1 cells in ocular tissues during herpetic stromal keratitis. *J. Immunol.* 149(9):3035-3039.
- Niki M, Di Cristofano A, Zhao M, Honda H, Hirai H, Van Aelst L, Cordon-Cardo C & Pandolfi PP (2004) Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J. Exp. Med.* 200(12):1689-1695.
- Noguchi T, Matozaki T, Inagaki K, Tsuda M, Fukunaga K, Kitamura Y, Kitamura T, Shii K, Yamanashi Y & Kasuga M (1999) Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *EMBO J.* 18(7):1748-1760.
- Novak N & Peng WM (2005) Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 142(3):405-410.
- Obar JJ, Khanna KM & Lefrancois L (2008) Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28(6):859-869.
- Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP & Broxmeyer HE (2005) Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105(2):474-480.
- Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O & Yamanashi Y (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312(5781):1802-1805.
- Oppong E, Flink N & Cato AC (2013) Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380(1-2):119-126.
- Ott VL, Tamir I, Niki M, Pandolfi PP & Cambier JC (2002) Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. *J. Immunol.* 168(9):4430-4439.

- Paladino P & Mossman KL (2009) Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* 29(9):599-607.
- Paley MA, Gordon SM, Bikoff EK, Robertson EJ, Wherry EJ & Reiner SL (2013) Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 93(2):307-315.
- Pan D, Flores O, Umbach JL, Pesola JM, Bentley P, Rosato PC, Leib DA, Cullen BR & Coen DM (2014) A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency. *Cell Host Microbe* 15(4):446-456.
- Patel AH & MacLean JB (1995) The product of the UL6 gene of herpes simplex virus type 1 is associated with virus capsids. *Virology* 206(1):465-478.
- Paul WE (2013) *Fundamental immunology*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA etc., 7th. XVIII, 1283 p. p
- Peng Q, O'Loughlin JL & Humphrey MB (2012) DOK3 negatively regulates LPS responses and endotoxin tolerance. *PLoS One* 7(6):e39967.
- Pereira RA & Simmons A (1999) Cell surface expression of H2 antigens on primary sensory neurons in response to acute but not latent herpes simplex virus infection in vivo. *J. Virol.* 73(8):6484-6489.
- Pereira RA, Simon MM & Simmons A (2000) Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J. Virol.* 74(2):1029-1032.
- Peri P, Mattila RK, Kantola H, Broberg E, Karttunen HS, Waris M, Vuorinen T & Hukkanen V (2008) Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Virol J.* 5:140.
- Perng GC, Ghiasi H, Slanina SM, Nesburn AB & Wechsler SL (1996) The spontaneous reactivation function of the herpes simplex virus type 1 LAT gene resides completely within the first 1.5 kilobases of the 8.3-kilobase primary transcript. *J. Virol.* 70(2):976-984.
- Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, Slanina SM, Hofman FM, Ghiasi H, Nesburn AB & Wechsler SL (2000) Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 287(5457):1500-1503.
- Piguet V & Sattentau Q (2004) Dangerous liaisons at the virological synapse. *J. Clin. Invest.* 114(5):605-610.
- Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC & Green DR (2001) Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 276(15):12060-12067.
- Poon AP & Roizman B (1993) Characterization of a temperature-sensitive mutant of the UL15 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 67(8):4497-4503.
- Posavad CM, Newton JJ & Rosenthal KL (1993) Inhibition of human CTL-mediated lysis by fibroblasts infected with herpes simplex virus. *J. Immunol.* 151(9):4865-4873.

- Posavad CM, Newton JJ & Rosenthal KL (1994) Infection and inhibition of human cytotoxic T lymphocytes by herpes simplex virus. *J. Virol.* 68(6):4072-4074.
- Posavad CM & Rosenthal KL (1992) Herpes simplex virus-infected human fibroblasts are resistant to and inhibit cytotoxic T-lymphocyte activity. *J. Virol.* 66(11):6264-6272.
- Rager-Zisman B, Quan PC, Rosner M, Moller JR & Bloom BR (1987) Role of NK cells in protection of mice against herpes simplex virus-1 infection. *J. Immunol.* 138(3):884-888.
- Rajasagi NK, Kassim SH, Kollias CM, Zhao X, Chervenak R & Jennings SR (2009) CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83(10):5256-5268.
- Rao A, Luo C & Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:707-747.
- Rebecchi MJ & Scarlata S (1998) Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:503-528.
- Reich NC (2002) Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. *J. Interferon Cytokine Res.* 22(1):103-109.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM & Katz DR (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev. Med. Virol.* 17(3):205-215.
- Retamal-Díaz AR, Tognarelli E, Kalergis AM, Bueno SM & González PA (2016) Immune evasion by herpes simplex viruses. *Herpesviridae*, InTech.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70:281-312.
- Rickles RJ, Botfield MC, Weng Z, Taylor JA, Green OM, Brugge JS & Zoller MJ (1994) Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J.* 13(23):5598-5604.
- Rider DA, Havenith CE, de Ridder R, Schuurman J, Favre C, Cooper JC, Walker S, Baadsgaard O, Marschner S, vandeWinkel JG, Cambier J, Parren PW & Alexander DR (2007) A human CD4 monoclonal antibody for the treatment of T-cell lymphoma combines inhibition of T-cell signaling by a dual mechanism with potent Fc-dependent effector activity. *Cancer Res.* 67(20):9945-9953.
- Robson JD, Davidson D & Veillette A (2004) Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. *Mol. Cell. Biol.* 24(6):2332-2343.
- Rochette PA, Laliberte M, Bertrand-Grenier A, Houle MA, Blache MC, Legare F & Pearson A (2014) Visualization of mouse neuronal ganglia infected by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) using multimodal non-linear optical microscopy. *PLoS One* 9(8):e105103.
- Roizman B & Roane PR, Jr. (1964) THE MULTIPLICATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS. II. THE RELATION BETWEEN PROTEIN SYNTHESIS AND THE DUPLICATION OF VIRAL DNA IN INFECTED HEP-2 CELLS. *Virology* 22:262-269.
- Roizman B & Zhou G (2015) The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry. *Virology* 479-480:562-567.

- Royer DJ, Zheng M, Conrady CD & Carr DJ (2015) Granulocytes in Ocular HSV-1 Infection: Opposing Roles of Mast Cells and Neutrophils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56(6):3763-3775.
- Russell RG, Nasisse MP, Larsen HS & Rouse BT (1984) Role of T-lymphocytes in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25(8):938-944.
- Sacks WR, Greene CC, Aschman DP & Schaffer PA (1985) Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J. Virol.* 55(3):796-805.
- Sainz B, Jr. & Halford WP (2002) Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 76(22):11541-11550.
- Saito T & Yamasaki S (2003) Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol. Rev.* 192(1):143-160.
- Sallusto F, Geginat J & Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22:745-763.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M & Lanzavecchia A (1999) *Nature* 401(6754):708-712.
- Salmon B & Baines JD (1998) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging: association of multiple forms of U(L)15-encoded proteins with B capsids requires at least the U(L)6, U(L)17, and U(L)28 genes. *J. Virol.* 72(4):3045-3050.
- Salmon B, Cunningham C, Davison AJ, Harris WJ & Baines JD (1998) The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J. Virol.* 72(5):3779-3788.
- Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Jr. & Ashwell JD (2005) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* 6(4):390-395.
- Samaniego LA, Webb AL & DeLuca NA (1995) Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. *J. Virol.* 69(9):5705-5715.
- Samelson LE (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 20:371-394.
- Sandgren KJ, Bertram K & Cunningham AL (2016) Understanding natural herpes simplex virus immunity to inform next-generation vaccine design. *Clin Transl Immunology* 5(7):e94.
- Sarangi PP, Kim B, Kurt-Jones E & Rouse BT (2007) Innate recognition network driving herpes simplex virus-induced corneal immunopathology: role of the toll pathway in early inflammatory events in stromal keratitis. *J. Virol.* 81(20):11128-11138.
- Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, Bickham KL, Lerner H, Goldstein M, Sykes M, Kato T & Farber DL (2013) Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38(1):187-197.
- Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R & Jardetzky TS (2017) The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Curr. Opin. Virol.* 24:97-104.
- Sattler M, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Winkler T, Algate PA, Rohrschneider LR & Griffin JD (1999) BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-

- 5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 19(11):7473-7480.
- Saulnier A, Vaissiere T, Yue J, Siouda M, Malfroy M, Accardi R, Creveaux M, Sebastian S, Shahzad N, Gheit T, Hussain I, Torrente M, Maffini FA, Calabrese L, Chiesa F, Cuenin C, Shukla R, Fathallah I, Matos E, Daudt A, Koifman S, Wunsch-Filho V, Menezes AM, Curado MP, Zaridze D, Boffetta P, Brennan P, Tommasino M, Herceg Z & Sylla BS (2012) Inactivation of the putative suppressor gene DOK1 by promoter hypermethylation in primary human cancers. *Int. J. Cancer* 130(11):2484-2494.
- Sawtell NM (1998) The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J. Virol.* 72(8):6888-6892.
- Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G & Terhorst C (1998) The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395(6701):462-469.
- Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V & Masopust D (2013) Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.* 14(5):509-513.
- Schepis D, D'Amato M, Studahl M, Bergstrom T, Karre K & Berg L (2009) Herpes simplex virus infection downmodulates NKG2D ligand expression. *Scand. J. Immunol.* 69(5):429-436.
- Schoenborn JR, Tan YX, Zhang C, Shokat KM & Weiss A (2011) Feedback circuits monitor and adjust basal Lck-dependent events in T cell receptor signaling. *Sci Signal* 4(190):ra59.
- Schuler G (1984) The dendritic, Thy-1-positive cell of murine epidermis: a new epidermal cell type of bone marrow origin. *J. Invest. Dermatol.* 83(2):81-82.
- Schulze-Luehrmann J & Ghosh S (2006) Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 25(5):701-715.
- Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL & Bluestone JA (1997) T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J. Exp. Med.* 185(11):1969-1975.
- Sergerie Y, Rivest S & Boivin G (2007) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J. Infect. Dis.* 196(6):853-860.
- Sheridan BS, Cherpes TL, Urban J, Kalinski P & Hendricks RL (2009) Reevaluating the CD8 T-cell response to herpes simplex virus type 1: involvement of CD8 T cells reactive to subdominant epitopes. *J. Virol.* 83(5):2237-2245.
- Sheridan BS, Khanna KM, Frank GM & Hendricks RL (2006) Latent virus influences the generation and maintenance of CD8+ T cell memory. *J. Immunol.* 177(12):8356-8364.
- Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD & Spear PG (1992) Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116(5):1273-1281.
- Shimeld C, Whiteland JL, Nicholls SM, Grinfeld E, Easty DL, Gao H & Hill TJ (1995) Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. *J. Neuroimmunol.* 61(1):7-16.

- Shimeld C, Whiteland JL, Williams NA, Easty DL & Hill TJ (1997) Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 12):3317-3325.
- Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, Nagai Y, Yasuda T, Suzuki H, Horai R, Iwakura Y, Yamamoto T, Karasuyama H, Miyake K & Yamanashi Y (2005) Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J. Exp. Med.* 201(3):333-339.
- Shinohara H, Yasuda T & Yamanashi Y (2004) Dok-1 tyrosine residues at 336 and 340 are essential for the negative regulation of Ras-Erk signalling, but dispensable for rasGAP-binding. *Genes Cells* 9(6):601-607.
- 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.
- Silver S & Roizman B (1985) gamma 2-Thymidine kinase chimeras are identically transcribed but regulated a gamma 2 genes in herpes simplex virus genomes and as beta genes in cell genomes. *Mol. Cell. Biol.* 5(3):518-528.
- Simmons A & Tschärke DC (1992) Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J. Exp. Med.* 175(5):1337-1344.
- Slifka MK, Pagarigan RR & Whitton JL (2000) NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J. Immunol.* 164(4):2009-2015.
- Sloan DD, Han JY, Sandifer TK, Stewart M, Hinz AJ, Yoon M, Johnson DC, Spear PG & Jerome KR (2006) Inhibition of TCR signaling by herpes simplex virus. *J. Immunol.* 176(3):1825-1833.
- Sloan DD & Jerome KR (2007) Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. *J. Virol.* 81(22):12504-12514.
- Sloan DD, Zahariadis G, Posavad CM, Pate NT, Kussick SJ & Jerome KR (2003) CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J. Immunol.* 171(12):6733-6741.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA & Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619.
- Smith A, Wang J, Cheng CM, Zhou J, Weickert CS & Bondy CA (2004a) High-level expression of Dok-1 in neurons of the primate prefrontal cortex and hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 75(2):218-224.
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR & Belz GT (2004b) Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* 5(11):1143-1148.
- Sodeik B, Ebersold MW & Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136(5):1007-1021.
- Songyang Z, Yamanashi Y, Liu D & Baltimore D (2001) Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling. *J. Biol. Chem.* 276(4):2459-2465.

- Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.* 6(5):401-410.
- Spear PG & Roizman B (1972) Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J. Virol.* 9(1):143-159.
- Spivack JG & Fraser NW (1988) Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection. *J. Virol.* 62(5):1479-1485.
- Sprecher E & Becker Y (1986) Skin Langerhans cells play an essential role in the defense against HSV-1 infection. *Arch. Virol.* 91(3-4):341-349.
- Spruance SL, Evans TG, McKeough MB, Thai L, Araneo BA, Daynes RA, Mishkin EM & Abramovitz AS (1995a) Th1/Th2-like immunity and resistance to herpes simplex labialis. *Antiviral Res.* 28(1):39-55.
- Spruance SL, Kriesel JD, Evans TG & McKeough MB (1995b) Susceptibility to herpes labialis following multiple experimental exposures to ultraviolet radiation. *Antiviral Res.* 28(1):57-67.
- Srivastava R, Khan AA, Chilukuri S, Syed SA, Tran TT, Furness J, Bahraoui E & BenMohamed L (2017a) CXCL10/CXCR3-Dependent Mobilization of Herpes Simplex Virus-Specific CD8(+) TEM and CD8(+) TRM Cells within Infected Tissues Allows Efficient Protection against Recurrent Herpesvirus Infection and Disease. *J. Virol.* 91(14).
- Srivastava R, Khan AA, Garg S, Syed SA, Furness JN, Vahed H, Pham T, Yu HT, Nesburn AB & BenMohamed L (2017b) Human Asymptomatic Epitopes Identified from the Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP13/14 (UL47) Preferentially Recall Polyfunctional Effector Memory CD44high CD62Llow CD8+ TEM Cells and Protect Humanized HLA-A*02:01 Transgenic Mice against Ocular Herpesvirus Infection. *J. Virol.* 91(2).
- St Leger AJ & Hendricks RL (2011) CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *J. Neurovirol.* 17(6):528-534.
- St Leger AJ, Jeon S & Hendricks RL (2013) Broadening the repertoire of functional herpes simplex virus type 1-specific CD8+ T cells reduces viral reactivation from latency in sensory ganglia. *J. Immunol.* 191(5):2258-2265.
- St Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A & Hendricks RL (2011) Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 186(7):3927-3933.
- Stam K, Heisterkamp N, Reynolds FH, Jr. & Groffen J (1987) Evidence that the pHL gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 7(5):1955-1960.
- Steiner I, Spivack JG, Deshmane SL, Ace CI, Preston CM & Fraser NW (1990) A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia. *J. Virol.* 64(4):1630-1638.
- Stern S, Tanaka M & Herr W (1989) The Oct-1 homeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 341(6243):624-630.

- Stock AT, Jones CM, Heath WR & Carbone FR (2006) CTL response compensation for the loss of an immunodominant class I-restricted HSV-1 determinant. *Immunol. Cell Biol.* 84(6):543-550.
- Stork B, Neumann K, Goldbeck I, Alers S, Kahne T, Naumann M, Engelke M & Wienands J (2007) Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca²⁺ signaling in B cells. *EMBO J.* 26(4):1140-1149.
- Stroop WG & Schaefer DC (1987) Herpes simplex virus, type 1 invasion of the rabbit and mouse nervous systems revealed by in situ hybridization. *Acta Neuropathol.* 74(2):124-132.
- Strunk U, Ramos DG, Saffran HA & Smiley JR (2016) Role of Herpes simplex virus 1 VP11/12 tyrosine-based binding motifs for Src family kinases, p85, Grb2 and Shc in activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Virology* 498:31-35.
- Strunk U, Saffran HA, Wu FW & Smiley JR (2013) Role of herpes simplex virus VP11/12 tyrosine-based motifs in binding and activation of the Src family kinase Lck and recruitment of p85, Grb2, and Shc. *J. Virol.* 87(20):11276-11286.
- Stumpf TH, Case R, Shimeld C, Easty DL & Hill TJ (2002) Primary herpes simplex virus type 1 infection of the eye triggers similar immune responses in the cornea and the skin of the eyelids. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 7):1579-1590.
- Su C, Zhan G & Zheng C (2016) Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virol J.* 13:38.
- Summers BC, Margolis TP & Leib DA (2001) Herpes simplex virus type 1 corneal infection results in periocular disease by zosteriform spread. *J. Virol.* 75(11):5069-5075.
- Sun L, Wu J, Du F, Chen X & Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339(6121):786-791.
- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL & Littman DR (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404(6776):402-407.
- Suttles J, Schwarting GA & Stout RD (1986) Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo GM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 136(5):1586-1591.
- Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U & Rouse BT (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J. Immunol.* 172(7):4123-4132.
- Suvas S, Azkur AK & Rouse BT (2006) Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells in the latently infected trigeminal ganglia. *J. Immunol.* 176(3):1703-1711.
- Suzu S, Tanaka-Douzono M, Nomaguchi K, Yamada M, Hayasawa H, Kimura F & Motoyoshi K (2000) p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. *EMBO J.* 19(19):5114-5122.

- Sylla BS, Murphy K, Cahir-McFarland E, Lane WS, Mosialos G & Kieff E (2000) The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SH2D1A associates with p62dok (Dok1) and activates NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(13):7470-7475.
- Szczubiałka K, Pyrc K & Nowakowska M (2016) In search for effective and definitive treatment of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infections. *RSC Advances* 6(2):1058-1075.
- Taharaguchi S, Yoshino S, Amagai K & Ono E (2003) The latency-associated transcript promoter of pseudorabies virus directs neuron-specific expression in trigeminal ganglia of transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 8):2015-2022.
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y & Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448(7152):501-505.
- Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daeron M & Cambier JC (2000) The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* 12(3):347-358.
- Tan SV, Guiloff RJ, Scaravilli F, Klapper PE, Cleator GM & Gazzard BG (1993) Herpes simplex type 1 encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Neurol.* 34(4):619-622.
- Taus NS & Baines JD (1998) Herpes simplex virus 1 DNA cleavage/packaging: the UL28 gene encodes a minor component of B capsids. *Virology* 252(2):443-449.
- Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinel E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V & Brandt T (2003) Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am. J. Pathol.* 163(6):2179-2184.
- Thomas J, Gangappa S, Kanangat S & Rouse BT (1997) On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. *J. Immunol.* 158(3):1383-1391.
- Thompson RL & Sawtell NM (1997) The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J. Virol.* 71(7):5432-5440.
- Thompson RL & Sawtell NM (2000) Replication of herpes simplex virus type 1 within trigeminal ganglia is required for high frequency but not high viral genome copy number latency. *J. Virol.* 74(2):965-974.
- Tomazin R, Hill AB, Jugovic P, York I, van Endert P, Ploegh HL, Andrews DW & Johnson DC (1996) Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J.* 15(13):3256-3266.
- Trapani JA (2001) Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* 2(12):Reviews3014.
- Treat BR, Bidula SM, Ramachandran S, St Leger AJ, Hendricks RL & Kinchington PR (2017) Influence of an immunodominant herpes simplex virus type 1 CD8+ T cell epitope on the target hierarchy and function of subdominant CD8+ T cells. *PLoS Pathog.* 13(12):e1006732.

- Trizeenberg SJ, Kingsbury RC & McKnight SL (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2(6):718-729.
- Tumpey TM, Chen SH, Oakes JE & Lausch RN (1996) Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J. Virol.* 70(2):898-904.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM & Cullen BR (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR & Bowie AG (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11(11):997-1004.
- Valyi-Nagy T, Deshmane SL, Raengsakulrach B, Nicosia M, Gesser RM, Wysocka M, Dillner A & Fraser NW (1992) Herpes simplex virus type 1 mutant strain in1814 establishes a unique, slowly progressing infection in SCID mice. *J. Virol.* 66(12):7336-7345.
- van Dijk TB, van Den Akker E, Amelsvoort MP, Mano H, Lowenberg B & von Lindern M (2000) Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* 96(10):3406-3413.
- van Leeuwen JE & Samelson LE (1999) T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 11(3):242-248.
- van Lint A, Ayers M, Brooks AG, Coles RM, Heath WR & Carbone FR (2004) Herpes simplex virus-specific CD8⁺ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *J. Immunol.* 172(1):392-397.
- van Lint AL, Kleinert L, Clarke SR, Stock A, Heath WR & Carbone FR (2005) Latent infection with herpes simplex virus is associated with ongoing CD8⁺ T-cell stimulation by parenchymal cells within sensory ganglia. *J. Virol.* 79(23):14843-14851.
- van Velzen M, Jing L, Osterhaus AD, Sette A, Koelle DM & Verjans GM (2013) Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog.* 9(8):e1003547.
- Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, Langerak AW, Kinchington PR & Osterhaus AD (2007) Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(9):3496-3501.
- Vitiello A, Yuan L, Chesnut RW, Sidney J, Southwood S, Farness P, Jackson MR, Peterson PA & Sette A (1996) Immunodominance analysis of CTL responses to influenza PR8 virus reveals two new dominant and subdominant Kb-restricted epitopes. *J. Immunol.* 157(12):5555-5562.

- Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 79(15):9566-9571.
- Vollstedt S, Arnold S, Schwerdel C, Franchini M, Alber G, Di Santo JP, Ackermann M & Suter M (2004) Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 78(8):3846-3850.
- Voskoboinik I, Whisstock JC & Trapani JA (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15(6):388-400.
- Wagner EK, Devi-Rao G, Feldman LT, Dobson AT, Zhang YF, Flanagan WM & Stevens JG (1988a) Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. *J. Virol.* 62(4):1194-1202.
- Wagner EK, Flanagan WM, Devi-Rao G, Zhang YF, Hill JM, Anderson KP & Stevens JG (1988b) The herpes simplex virus latency-associated transcript is spliced during the latent phase of infection. *J. Virol.* 62(12):4577-4585.
- Wagner MJ & Smiley JR (2009) Herpes simplex virus requires VP11/12 to induce phosphorylation of the activation loop tyrosine (Y394) of the Src family kinase Lck in T lymphocytes. *J. Virol.* 83(23):12452-12461.
- Wagner MJ & Smiley JR (2011) Herpes simplex virus requires VP11/12 to activate Src family kinase-phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling. *J. Virol.* 85(6):2803-2812.
- Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G & Bevan MJ (2012) The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J. Immunol.* 189(7):3462-3471.
- Wallace ME, Bryden M, Cose SC, Coles RM, Schumacher TN, Brooks A & Carbone FR (2000) Junctional biases in the naive TCR repertoire control the CTL response to an immunodominant determinant of HSV-1. *Immunity* 12(5):547-556.
- Wallace ME, Keating R, Heath WR & Carbone FR (1999) The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J. Virol.* 73(9):7619-7626.
- Wang H, Kadlec TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS & Weiss A (2010) ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(5):a002279.
- Wang HM, Sheu MM, Stulting RD & Kaplan HJ (1989) Immunohistochemical evaluation of murine HSV-1 keratouveitis. *Curr. Eye Res.* 8(1):37-46.
- Wang K, Ni L, Wang S & Zheng C (2014) Herpes simplex virus 1 protein kinase US3 hyperphosphorylates p65/RelA and dampens NF-kappaB activation. *J. Virol.* 88(14):7941-7951.
- Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM & Knipe DM (2005) Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(44):16055-16059.

- Wang S, Wang K, Lin R & Zheng C (2013) Herpes simplex virus 1 serine/threonine kinase US3 hyperphosphorylates IRF3 and inhibits beta interferon production. *J. Virol.* 87(23):12814-12827.
- Wang X, Patenode C & Roizman B (2011) US3 protein kinase of HSV-1 cycles between the cytoplasm and nucleus and interacts with programmed cell death protein 4 (PDCD4) to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(35):14632-14636.
- Waterhouse NJ, Sedelies KA, Sutton VR, Pinkoski MJ, Thia KY, Johnstone R, Bird PI, Green DR & Trapani JA (2006a) Functional dissociation of DeltaPsim and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 13(4):607-618.
- Waterhouse NJ, Sedelies KA & Trapani JA (2006b) Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* 84(1):72-78.
- Webre JM, Hill JM, Nolan NM, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, Hsia V, Neumann DM, Foster TP, Lukiw WJ & Thompson HW (2012) Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:612316.
- Weiss A (1993) T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73(2):209-212.
- Weiss A & Littman DR (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76(2):263-274.
- Weller SK & Coen DM (2012) Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(9):a013011.
- Wherry EJ (2011) T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12(6):492-499.
- Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R & Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77(8):4911-4927.
- Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL & Ahmed R (2007) Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27(4):670-684.
- Whitley RJ (1991) Herpes simplex virus infections of the central nervous system. Encephalitis and neonatal herpes. *Drugs* 42(3):406-427.
- Whitley RJ, Kimberlin DW & Roizman B (1998) Herpes simplex viruses. *Clin. Infect. Dis.* 26(3):541-553; quiz 554-545.
- Wick MJ, Dong LQ, Hu D, Langlais P & Liu F (2001) Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. *J. Biol. Chem.* 276(46):42843-42850.
- Widener RW & Whitley RJ (2014) Herpes simplex virus. *Handb. Clin. Neurol.* 123:251-263.
- Willard M (2002) Rapid directional translocations in virus replication. *J. Virol.* 76(10):5220-5232.

- Williams MA & Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 25:171-192.
- Wiltrout RH, Santoni A, Peterson ES, Knott DC, Overton WR, Herberman RB & Holden HT (1985) Reactivity of anti-asialo GM1 serum with tumoricidal and non-tumoricidal mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 37(5):597-614.
- Wisniewski D, Strife A, Wojciechowicz D, Lambek C & Clarkson B (1994) A 62-kilodalton tyrosine phosphoprotein constitutively present in primary chronic phase chronic myelogenous leukemia enriched lineage negative blast populations. *Leukemia* 8(4):688-693.
- Wohlleber D, Kashkar H, Gartner K, Frings MK, Odenthal M, Hegenbarth S, Borner C, Arnold B, Hammerling G, Nieswandt B, van Rooijen N, Limmer A, Cederbrant K, Heikenwalder M, Pasparakis M, Protzer U, Dienes HP, Kurts C, Kronke M & Knolle PA (2012) TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep* 2(3):478-487.
- Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, Bedoui S, Job ER, Whitney PG, Brooks AG & Reading PC (2010a) Gr-1+ cells, but not neutrophils, limit virus replication and lesion development following flank infection of mice with herpes simplex virus type-1. *Virology* 407(1):143-151.
- Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, Londrigan SL, Bedoui S, Brooks AG & Reading PC (2010b) Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 9):2158-2166.
- Wotton KR, Weierud FK, Dietrich S & Lewis KE (2008) Comparative genomics of Lbx loci reveals conservation of identical Lbx ohnologs in bony vertebrates. *BMC Evol. Biol.* 8:171.
- Wuest T, Austin BA, Uematsu S, Thapa M, Akira S & Carr DJ (2006) Intact TLR 9 and type I interferon signaling pathways are required to augment HSV-1 induced corneal CXCL9 and CXCL10. *J. Neuroimmunol.* 179(1-2):46-52.
- Wuest TR & Carr DJ (2008) Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *J. Immunol.* 181(11):7985-7993.
- Wysocka J & Herr W (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem. Sci.* 28(6):294-304.
- Xaus J, Cardo M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J & Celada A (1999) Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 11(1):103-113.
- Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li JP, Malmstrom A, Shukla D & Liu J (2002) Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* 277(40):37912-37919.
- Xie JJ, Liang JQ, Diao LH, Altman A & Li Y (2013) TNFR-associated factor 6 regulates TCR signaling via interaction with and modification of LAT adapter. *J. Immunol.* 190(8):4027-4036.

- Xing J, Ni L, Wang S, Wang K, Lin R & Zheng C (2013) Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF-kappaB activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP. *J. Virol.* 87(17):9788-9801.
- Xing J, Wang S, Lin R, Mossman KL & Zheng C (2012) Herpes simplex virus 1 tegument protein US11 downmodulates the RLR signaling pathway via direct interaction with RIG-I and MDA-5. *J. Virol.* 86(7):3528-3540.
- Xu F, Lee FK, Morrow RA, Sternberg MR, Luther KE, Dubin G & Markowitz LE (2007) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 in children in the United States. *J. Pediatr.* 151(4):374-377.
- Xu H, Su C, Pearson A, Mody CH & Zheng C (2017) Herpes Simplex Virus 1 UL24 Abrogates the DNA Sensing Signal Pathway by Inhibiting NF-kappaB Activation. *J. Virol.* 91(7).
- Yamanashi Y & Baltimore D (1997) Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88(2):205-211.
- Yamanashi Y, Tamura T, Kanamori T, Yamane H, Nariuchi H, Yamamoto T & Baltimore D (2000) Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev.* 14(1):11-16.
- Yan XT, Tumpey TM, Kunkel SL, Oakes JE & Lausch RN (1998) Role of MIP-2 in neutrophil migration and tissue injury in the herpes simplex virus-1-infected cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39(10):1854-1862.
- Yang CY, Best JA, Knell J, Yang E, Sheridan AD, Jesionek AK, Li HS, Rivera RR, Lind KC, D'Cruz LM, Watowich SS, Murre C & Goldrath AW (2011) The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat. Immunol.* 12(12):1221-1229.
- Yang WC, Ghiotto M, Barbarat B & Olive D (1999) The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *J. Biol. Chem.* 274(2):607-617.
- Yang Y, Wu S, Wang Y, Pan S, Lan B, Liu Y, Zhang L, Leng Q, Chen D, Zhang C, He B & Cao Y (2015) The Us3 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Inhibits T Cell Signaling by Confining Linker for Activation of T Cells (LAT) Activation via TRAF6 Protein. *J. Biol. Chem.* 290(25):15670-15678.
- Yasuda T, Bundo K, Hino A, Honda K, Inoue A, Shirakata M, Osawa M, Tamura T, Nariuchi H, Oda H, Yamamoto T & Yamanashi Y (2007) Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunol.* 19(4):487-495.
- Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T & Yamanashi Y (2004) Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.* 200(12):1681-1687.
- York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL & Johnson DC (1994) A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* 77(4):525-535.

- Yoshida A, Koide Y, Uchijima M & Yoshida TO (1994) IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198(3):857-861.
- Yoshida K, Yamashita Y, Miyazato A, Ohya K, Kitanaka A, Ikeda U, Shimada K, Yamanaka T, Ozawa K & Mano H (2000) Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. *J. Biol. Chem.* 275(32):24945-24952.
- Yu D & Weller SK (1998) Herpes simplex virus type 1 cleavage and packaging proteins UL15 and UL28 are associated with B but not C capsids during packaging. *J. Virol.* 72(9):7428-7439.
- Zahariadis G, Wagner MJ, Doepker RC, Maciejko JM, Crider CM, Jerome KR & Smiley JR (2008) Cell-type-specific tyrosine phosphorylation of the herpes simplex virus tegument protein VP11/12 encoded by gene UL46. *J. Virol.* 82(13):6098-6108.
- Zhang J, Liu H & Wei B (2017) Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *J Zhejiang Univ Sci B* 18(4):277-288.
- Zhang J, Wang K, Wang S & Zheng C (2013a) Herpes simplex virus 1 E3 ubiquitin ligase ICP0 protein inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation by interacting with p65/RelA and p50/NF-kappaB1. *J. Virol.* 87(23):12935-12948.
- Zhang S & Phillips JH (2006) Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J. Leukoc. Biol.* 79(2):363-368.
- Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, Perez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Abel L & Casanova JL (2013b) TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr. Opin. Immunol.* 25(1):19-33.
- Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Heron B, Vallee L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L & Casanova JL (2007) TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317(5844):1522-1527.
- Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP & Samelson LE (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92(1):83-92.
- Zhang Y & McKnight JL (1993) Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J. Virol.* 67(3):1482-1492.
- Zhang Y, Sirko DA & McKnight JL (1991) Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *J. Virol.* 65(2):829-841.
- Zhang Y, Yan Z, Farooq A, Liu X, Lu C, Zhou MM & He C (2004) Molecular basis of distinct interactions between Dok1 PTB domain and tyrosine-phosphorylated EGF receptor. *J. Mol. Biol.* 343(4):1147-1155.
- Zhao M, Schmitz AA, Qin Y, Di Cristofano A, Pandolfi PP & Van Aelst L (2001) Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for

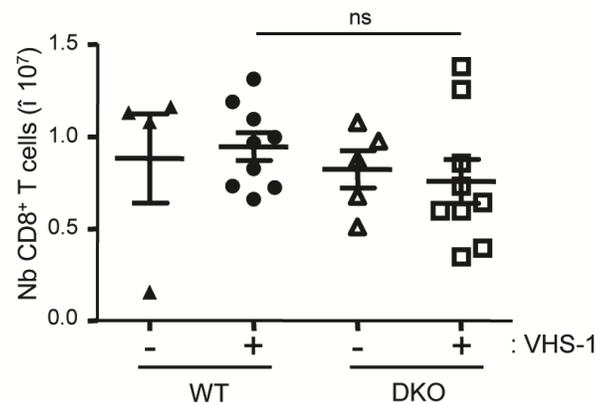
its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *J. Exp. Med.* 194(3):265-274.

Zisman B, Hirsch MS & Allison AC (1970) Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of herpes virus infection of young adult mice. *J. Immunol.* 104(5):1155-1159.

Zolini GP, Lima GK, Lucinda N, Silva MA, Dias MF, Pessoa NL, Coura BP, Cartelle CT, Arantes RM, Kroon EG & Campos MA (2014) Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *J. Neuroinflammation* 11:20.

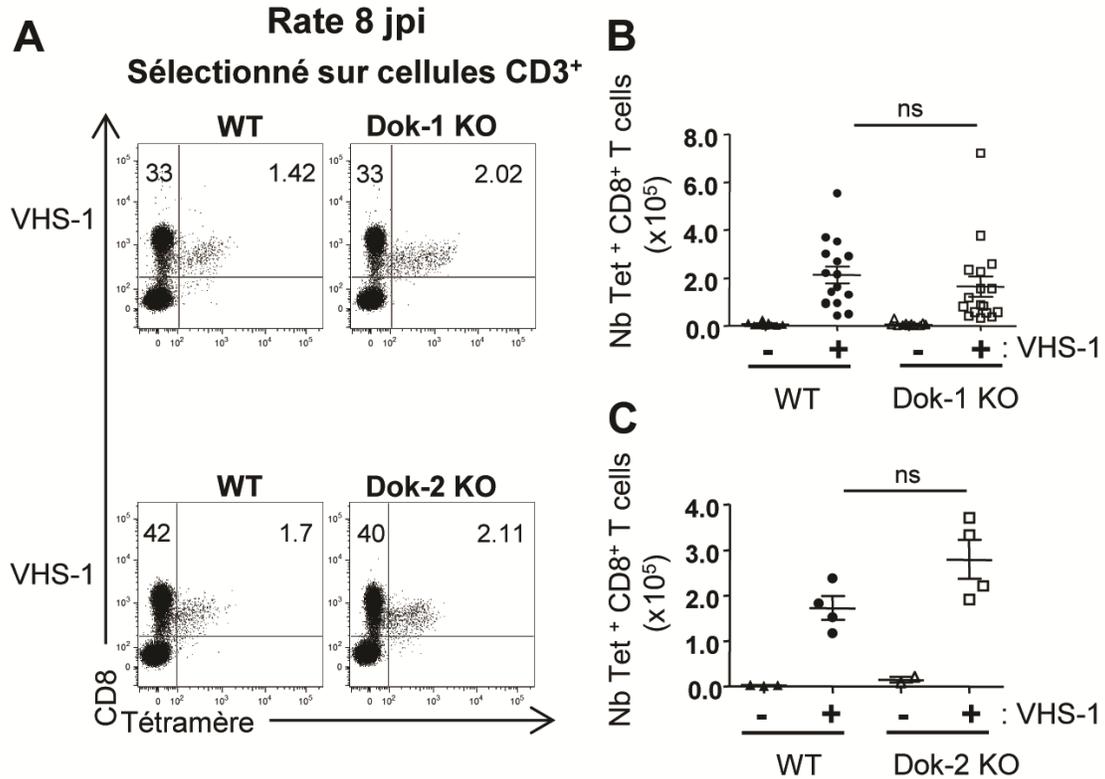
ANNEXES

Annexe 1 : L'absence de Dok-1 et Dok-2 n'affecte pas le nombre de cellules T CD8⁺ dans la rate.



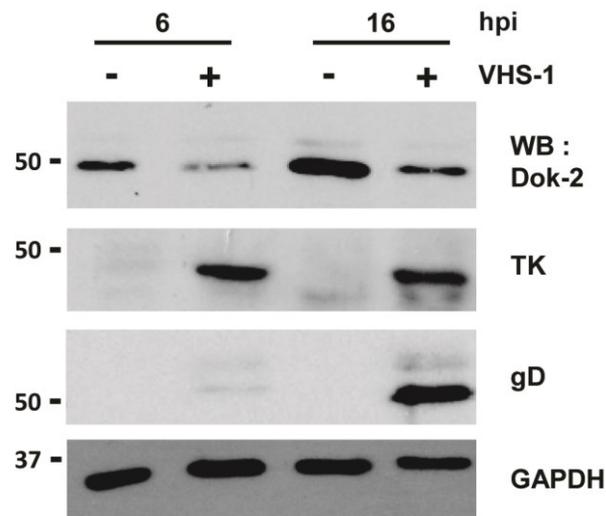
Les souris WT et DKO ont été infectées par le VHS-1 ou non. À 8 jours post-infection, la rate a été récoltée, dissociée puis marquée avec un anticorps anti-CD3 et un anti-CD8. Le graphique montre le nombre absolu (Nb) de cellules T CD8⁺ dans la rate. Les résultats sont issus de quatre expériences indépendantes où chaque symbole représente une souris individuelle. La barre horizontale indique la moyenne (+/- SEM). Analyse statistique utilisant le test-t non paramétrique.

Annexe 2 : L'absence de Dok-1 ou l'absence de Dok-2 n'inhibe pas la réponse T CD8⁺ spécifique au VHS-1.



Les souris WT, Dok-1 KO et Dok-2 KO ont été infectées à VHS-1 ou non. À 8 jours post-infection (jpi), la rate a été récoltée, dissociée puis marquée avec un anticorps anti-CD3, un anti-CD8 et les tétramères H2K^b-gB₄₉₈₋₅₀₅ afin de quantifier les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gB₄₉₈₋₅₀₅. **(A)** "Dot-plot" représentatifs des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gB sélectionnés sur la population de cellules CD3⁺. **(B)** Nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gB (Nb Tet⁺ CD8⁺ T cells) dans les souris Dok-1 KO et WT. Les résultats sont issus de cinq expériences indépendantes où chaque symbole représente une souris individuelle. **(C)** Nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à gB dans les souris Dok-2 KO et WT. Les données présentées proviennent de quatre souris par condition sauf pour les souris WT et Dok-2 KO non infectées. La barre horizontale indique la moyenne (+/- SEM). Analyse statistique utilisant le test-t non paramétrique.

Annexe 3 : Diminution de l'expression de la protéine Dok-2 dans les cellules T primaires de souris.



Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ ont été isolés et purifiés à partir de la rate de souris C57BL/6, puis ils ont été infectés ou non par le VHS-1 17 à une MOI (multiplicity of infection) de 50. Aux temps indiqués, les lysats cellulaires ont été immunomarqués avec un anticorps anti-Dok-2 (C-ter), un anti-TK (protéine virale à cinétique précoce), un anti-gD (glycoprotéine virale à cinétique tardive), ou un anti-GAPDH. Poids moléculaires indiqués à gauche en kDa. Heures post-infection, hpi ; western blotting, WB.

LISTE DE PUBLICATIONS

Herpes simplex virus 1 infection of T cells causes VP11/12-dependent phosphorylation and degradation of the cellular protein Dok-2

Lahmidi S., Strunk U., Smiley JR., Pearson A., Duplay P. (2017) *Virology*. doi : 10.1016/j.virol.2017.08.018

Dok-1 and Dok-2 are required to maintain herpes simplex virus 1-specific CD8⁺ T cells in a murine model of ocular infection

Lahmidi S., Yousefi M., Dridi S., Duplay P., Pearson A. (2017) *Journal of Virology*. doi : 10.1128/JVI.02297-16

Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of trigeminal ganglia.

Rochette PA., Bourget A., Sanabria-Solano C., Lahmidi S., Lavallée GO., Pearson A. (2015) *Journal of General Virology*. doi : 10.1099/vir.0.000189