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

ROLE D'UL24 DANS LA FORMATION DE NOUVEAUX GENOMES VIRAUX LORS DE LA REPLICATION DU VIRUS HERPES SIMPLEX 1.

Par

FAYE Boury

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Jaramillo Maritza, PhD. INRS-Institut Armand-Frappier

Pelchat Martin, PhD. Département de biochimie, microbiologie et immunologie Université d'Ottawa

Directeur de recherche

Angela Pearson, PhD. INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de FAYE Boury, 2015.

REMERCIEMENTS

Je remercie ma superviseure Angela Pearson de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour réaliser cette maîtrise.

Je remercie aussi tous les membres de mon équipe à partir desquels j'ai beaucoup appris.

Je tiens à remercier également, tous les membres de ma famille à commencer par ma maman et mon papa qui ont fortement contribué en la personne motivée et déterminée que je suis aujourd'hui ainsi que mes frères, sœurs et neveux.

Je tiens enfin à réserver une mention spéciale à mon mari qui n'a pas cessé de me témoigner son soutien et de m'encourager dans mes efforts tout au long de cette formation.

RÉSUMÉ

Le virus herpès simplex 1 (VHS-1) est un agent pathogène qui infecte l'Homme en ciblant les cellules épithéliales des muqueuses menant à la formation de lésions vésiculaires. Par la suite, il infecte les neurones sensitifs où il établit la latence. Le génome du VHS-1 est constitué d'une molécule d'ADN double brin linéaire divisée en deux segments : la région unique longue et la région unique courte. L'existence de séquences répétées inversées de part et d'autre de ces segments, permet l'inversion de ces régions uniques par un mécanisme de recombinaison homologue. Ces évènements d'inversion conduisent à la formation de quatre isomères présents en quantités équimolaires lors de la réplication du VHS-1. Au cours de cette étape, des intermédiaires de réplication vont se former et auront la particularité de présenter des structures très ramifiées. La résolution de ces ramifications est alors facilitée par l'action de protéines à fonction nucléase. En effet, cette réplication virale se déroule selon un mode de cercles roulant qui vont produire de longs concatémères correspondant à plusieurs unités génomiques liées les unes aux autres. Un clivage spécifique de ces concatémères va permettre de libérer une unité génomique virale qui pourra ensuite être encapsidée pour former un nouveau virion.

Le gène *ul24* est très bien conservé à travers la famille des *Herpesviridae* et code pour une protéine à cinétique tardive. D'autre part, il a été identifié un motif putatif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK spécifique des membres de la superfamille des phosphodiestérases dans la partie N-terminale d'UL24. Par ailleurs, la littérature rapporte que cette superfamille renferme des recombinases (Kosinski *et al.,* 2005). Ainsi, il est proposé qu'UL24 favoriserait la production de nouveaux génomes viraux par un processus de recombinaison homologue lors de la réplication du VHS-1.

Afin de tester l'hypothèse qu'UL24 intervient dans la formation de monomères génomiques, des cellules Vero ont été infectées par les souches virales KOS (souche sauvage VHS-1), UL24X (déficiente en UL24) et UL24XRescue (virus reconstitué). Des résultats préliminaires de notre laboratoire ont montré qu'UL24 favorise la production de monomères d'ADN génomiques du VHS-1. Nous voulions déterminer si le motif d'endonucléase était important pour la production de monomères du génome viral en

۷

profitant du mutant vUL24-E99A/K101A. Etant donné que ce mutant possède une mutation de substitution au niveau du site catalytique d'un motif prédit d'endonucléase, la disposition d'un « Rescue » de ce mutant semble requise afin d'étudier si ce dernier pourrait permettre de rétablir ce phénotype et ainsi déterminer si ce motif spécifique joue un rôle déterminant dans cette production génomique virale. Une stratégie basée sur la réaction de polymérisation en chaîne a été développée pour le criblage du virus « Rescue ». Ainsi, des approches de recombinaison homologue ont été menées afin de produire un virus « Rescue » à partir du mutant E99A/K101A. Un clone vUL24X-E99A/K101ARescue a été purifié puis caractérisé. Ce virus a ensuite été utilisé pour infecter des cellules Vero, ce qui a permis de démontrer un rétablissement dans la quantité de monomères génomiques à des niveaux comparables à ceux de KOS.

Par la suite, un test de recombinaison a été effectué à partir de cellules infectées par KOS, UL24X et UL24XRescue. Ce test fait appel à l'usage d'une enzyme Spel spécifique pour cliver une seule fois chaque unité d'ADN génomique de concatémères viraux. Il en résulte la formation de fragments de 118, 152 et 186 kilobases présents à des ratios de 1:2:1 respectivement. Des résultats préliminaires ont permis d'observer une réduction dans la quantité d'un des isomères génomiques pour les cellules infectées par UL24X en comparaison à celles infectées par KOS ou UL24XRescue.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence un rôle du motif prédit d'endonucléase d'UL24 dans les mécanismes de synthèse de nouveaux génomes viraux, et suggèrent également un rôle de recombinase d'UL24 lors de la réplication du VHS-1.

vi

ABSTRACT

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a pathogenic agent that infects humans by targeting epithelial cells of the mucous membranes leading to the formation of vesicular lesions. Thereafter, it infects sensory neurons where it establishes latency. The genome of HSV-1 consists of a linear double stranded DNA molecule divided into two segments: a unique long region and a unique short region. The existence of inverted repeated sequences on both sides of these segments, allows the inversion of these unique regions by a mechanism of homologous recombination. These inversion events lead to the formation of four isomers present in equimolar amounts during the replication of the virus. During this stage, replication intermediates are formed which are characterized by highly branched structures. The resolution of these branches is then facilitated by the action of proteins possessing a nuclease activity. HSV-1 DNA replication is thought to occur via a rolling circle model which produces long concatemers corresponding to several genomic units linked as head-to-tail repeats. A specific cleavage of these concatemers releases a single viral genomic unit which can then be encapsidated to form a new virion.

The *ul24* gene is very well conserved throughout the *Herpesviridae* family and codes for a late protein. In addition, it has been shown to contain a PD (D/E) XK endonuclease motif, which is specific to the members of a phosphodiesterase superfamily. This motif is located in the N-terminal part of UL24. Interestingly, the literature reports that this superfamily contains recombinases (Kosinski *and Al,* 2005). Thus, we proposed that UL24 promotes the production of new viral genomes by a process of homologous recombination during HSV-1 replication.

In order to test the hypothesis that UL24 is involved in the formation of genomic monomers, Vero cells were infected with the viral strains KOS (wild type strain of HSV-1), UL24X (defective in UL24) and vUL24XRescue (reconstituted virus). Preliminary results from our laboratory suggested that UL24 supports the production of genomic monomers of HSV-1 DNA. We set out to determine whether the endonuclease motif of UL24 was important for the production of viral genomic monomers by using the vUL24-E99A/K101A viral mutant. Since this mutant contains substitutions the putative catalytic

vii

site of the predicted endonuclease motif, the availability of a "Rescue" of this mutant was necessary to test if this specific motif plays a role in the production of viral genomes. A strategy based on a polymerization chain reaction was developed to screen for the "Rescue" virus. A homologous recombination approach was used to produce a "Rescue" virus from the vE99A/K101A mutant. A purified vUL24X-E99A/K101ARescue clone was purified and characterized. It was then used to infect Vero cells, which showed that vUL24X-E99A/K101ARescue can restore the quantity of genomic monomers to levels comparable with those of KOS.

Thereafter, a recombination test was performed using cells infected with KOS, UL24X and vUL24XRescue. This test uses the Spel restriction enzyme, which specifically cleaves each genomic DNA unit once. Cleavage of the viral DNA concatemers results in the formation of 118, 152 and 186 kilobase fragments present at ratios of 1:2:1 respectively. Preliminary results showed a reduction in the quantity of one of the genomic isomers for the cells infected by UL24X in comparison with those infected by KOS or vUL24XRescue.

In conclusion, these results highlight a role for the UL24 endonuclease motif in the mechanisms of synthesis of new viral genomes, and also suggest a possible recombinase role for UL24 during the replication of the HSV-1.

TABLE DES MATIÈRES

1	Intro	oduction	1
	1.1	Virus herpès simplex 1 (VHS-1)	1
	1.1.	1 Structure du virion et de son génome	1
	1.1.	2 Modèle du cycle de réplication	3
	1.1.	3 Latence et réactivation	5
	1.1.	4 Pathogenèse	7
	1.1.	5 Traitements actuellement disponibles	9
	1.2	Réplication virale couplée à la recombinaison	11
	1.2.	1 Mode réplicatif (réplisome viral)	11
	1.2.	2 Production de 4 isomères génomiques par recombinaison	13
	1.3	Caractéristiques du gène <i>ul</i> 24	15
	1.3.	1 Orthologues du gène <i>ul24</i> au sein des <i>Herpesviridae</i>	15
	1.3.	2 Caractéristiques moléculaires et biochimiques	16
	1.3.	3 Cinétique d'expression et localisation cellulaire	17
	1.3.	4 Phénotype de mutants d'UL24 en culture cellulaire	17
	1.3.	5 Phénotype de mutants d'UL24 <i>in vivo</i>	18
	1.3.	6 Identification d'un motif putatif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK	19
	1.4	Exemples d'autres protéines à motif PD-(D/E)XK	19
	1.4.	1 Protéines bactériennes	20
	1.4.	2 Protéines phagiques	21
	1.4.	3 L'alcaline nucléase UL12 du VHS-1	22
2	Pro	blématique et objectifs	24
3	Mat	tériels et méthodes	25
	3.1	Lignée cellulaire et virus	25
	3.2	Analyse génomique virale	25

3.2.1	Test de production d'ADN viral et de recombinaison d'ADN viral25
3.2.2	Électrophorèse en champs pulsé (PFGE)26
3.2.3	Analyse de la production d'ADN viral par Southern blot
3.3 Gé	nération de virus rescue recombinants26
3.3.1	Plasmides
3.3.2	Transfection/ Infection27
3.3.3	Criblage des clones positifs par PCR27
3.3.4	Production des « headmaster », « master », « submaster » et « working stocks »
3.4 Ca	ractérisation des virus recombinants28
3.4.1	Analyse du phénotype de plage de lyse28
3.4.2	Analyse de la réplication virale28
4 Résulta	nts30
4.1 Pro	duction du virus E99A/K101ARescue Recombinant30
4.2 Titr	es viraux et phénotypes en culture cellulaire du virus E99A/K101ARescue32
4.3 Effe	et de vE99A/K101ARescue sur la production de monomères génomiques du VHS-
1	
4.4 Co	mparaison de KOS, UL24X et vUL24XRescue sur la recombinaison génomique37
5 Discus	sion42
6 Référer	nces46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du virion VHS-12
Figure 2 : Organisation génomique de l'ADN du VHS-1
Figure 3 : Cycle de réplication lytique du VHS-14
Figure 4: Neurotropisme du VHS-16
Figure 5 : Processus de synthèse de l'ADN viral au cours du cycle de réplication du VHS-110
Figure 6 : Modèle de réplication de l'ADN du VHS-112
Figure 7 : Isomères génomiques générés lors de la réplication de l'ADN du VHS-114
Figure 8 : Domaines d'homologie conservés de la protéine UL2416
Figure 9 : Phénotype des virus KOS et UL24X en culture cellulaire
Figure 10 : Séquences des amorces de criblage
Figure 11 : Optimisation des conditions de criblage
Figure 12 : Cinétique de réplication du virus E99AK101ARescue32
Figure 13 : Morphologie des plages de lyse
Figure 14 : Analyse génomique virale du VHS-1 sur gel d'électrophorèse en champ pulsé34
Figure 15 : Analyse génomique virale du VHS-1 par Southern blot
Figure 16 : Quantification de la production de monomères génomiques du VHS-136
Figure 17 : Produits de digestion de l'ADN réplicatif (A) et de l'ADN monomérique (B) du VHS- 1
Figure 18 : Analyse de la recombinaison génomique virale sur gel d'électrophorèse en champ pulsé
Figure 19 : Analyse de la recombinaison génomique virale par Southern blot40
Figure 20 : Quantification de l'expression des isomères génomiques du VHS-141

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EBV	Epstein-Barr Virus
gВ	Glycoprotéine B
gD	Glycoprotéine D
gH	Glycoprotéine H
gK	Glycoprotéine K
gL	Glycoprotéine L
HCMV	Human cytomegalovirus
HJs	Jonction de Holliday
HPV	Papillomavirus humain
HRR	DNA repair via homologous recombination
ICP	Infected cell protein
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo paire de bases
LAT	Latency associated transcripts
NCS	Newborn Calf Serum
NT	Nucléotides
Ori	Origine de réplication
PAS	Signal de polyadénylation
Pen	Pénicilline
Pfu	Unité formatrice de plage (« plaque forming unit »)
SEM	Skin, eye and mucous membrane
SSC	Saline Sodium Citrate
Strep	Streptomycine
TBE	Tris Borate EDTA
UV	Ultraviolets
VHS-1	Virus herpès simplex 1
WT	Wild-type
X-Ray	Rayonnements X

1 INTRODUCTION

1.1 Virus herpès simplex 1 (VHS-1)

1.1.1 Structure du virion et de son génome

D'après la classification internationale (ICTV), le VHS-1 correspond à l'espèce *Herpèsvirus humain de type 1*, il appartient au genre *Simplexvirus*, à la sous-famille des *Alphaherpèsvirinae*, à la famille des *Herpesviridae* et à l'ordre des *Herpesvirales* (Davison et al., 2009).

La particule virale de l'ensemble des herpèsvirus contient trois éléments de structure majeurs : une nucléocapside renfermant le génome, une enveloppe formée d'une bicouche lipidique et une région amorphe riche en protéines (située entre la capside et l'enveloppe) appelée le tégument (figure 1) (Whitley and Roizman, 2001; Grünewald et al., 2003).

La particule virale du VHS-1 comporte une capside à symétrie icosaédrale de 125 nm de diamètre pour une masse de 200 MDa. Cette capside est dotée d'une triangulation T égale à 16 et se compose de 162 capsomères (150 hexons et 12 pentons). Le patron de cette capside virale nécessite le recrutement de quatre types de protéines : VP5, VP26, VP19C et VP23 (Newcomb et al., 2000; Zhou et al., 2000; Bowman et al., 2003). D'autre part, le VHS-1 présente la particularité de contenir 3 types de capsides au sein du noyau de cellules infectées. En effet, il est possible de distinguer les capsides A, B et C. Les capsides A et B ne possèdent pas d'information génétique virale et sont, ainsi, défectifs à une nouvelle infection (Rixon, 1993; Homa and Brown, 1997) tandis que la capside C contient l'ADN viral et peut donc constituer une particule virale infectieuse. La capside virale du VHS-1 est entourée d'une bicouche lipidique nommée « enveloppe » serties de plusieurs glycoprotéines. Ces dernières ont la particularité de pouvoir former des hétérodimères menant à des structures oligomériques (Handler et al., 1996) tel que le complexe gH-gL. La glycoprotéine gB constitue la protéine de fusion du VHS-1 (Hannah et al., 2007). Enfin, la glycoprotéine gD a été identifiée comme jouant un rôle essentiel dans la fixation du virus à la cellule lors de l'infection et également lors de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Johnson and Ligas, 1988).



Figure 1 : **Structure du virion VHS-1**. Schéma représentant les différents composants constitutifs d'un virion du VHS-1 : le core contenant le génome viral, autour la capside, le tégument et l'enveloppe. (Modifiée à partir de (Watanabe, 2010))

Chez les herpèsvirus, des analyses structurales ont pu mettre en évidence que la voie de formation de la capside virale est semblable à celle de bactériophages à ADN tels que P22 et HK97 (Newcomb et al., 2001; Gan et al., 2006).

La particule infectieuse du VHS-1 renferme un génome constitué d'une molécule d'ADN double brin linéaire de 152 kpb composée de deux régions uniques : une unique longue (U_L) et une unique courte (U_S). Ces régions présentent à leurs extrémités, des séquences dites répétées et inversées (ab-UL-b'a'a'c'-US-ca) (figure 2). L'existence de ces séquences spécifiques permet l'inversion de ces régions uniques par un mécanisme de recombinaison homologue menant à la formation de 4 isomères lors de la réplication du VHS-1 (Bataille and Epstein, 1997a). La séquence « a » de ces régions répétées directes est en orientation inverse dans la jonction L/S et présente la propriété d'être fortement recombinogénique. En effet, des plasmides contenant des fragments d'ADN dérivant de régions variées du génome viral ont été construits. Puis, l'insertion de ces fragments dans le gène de la thymidine kinase leur permet d'inactiver la fonction de cette enzyme. Ces séquences d'ADN du VHS-1 ont ensuite été recombinées avec le génome viral. Puis, les recombinants ont été sélectionnés pour leur phénotype déficient en thymidine kinase. Les seuls fragments générant des inversions additionnelles du génome viral correspondent aux fragments recouvrant la jonction L-S à savoir des séquences répétées inversées permettant une recombinaison homologue (Mocarski et al., 1980).



Figure 2 : Organisation génomique de l'ADN du VHS-1. Schéma illustrant l'organisation du génome viral du VHS-1. Il existe deux régions uniques ; UL (longue) et US (courte), bordées de séquences terminales répétées formées des régions a, b et c ainsi que leurs homologues en orientation inverse a', b', et c'. Ces séquences spécifiques vont favoriser l'inversion des régions uniques (Modifiée à partir de (Taylor et al., 2002)).

1.1.2 Modèle du cycle de réplication

Suite à l'entrée du virus dans la cellule hôte (par fusion membranaire, endocytose pHdépendante ou endocytose pH-indépendante), la capside est libérée dans le cytoplasme puis acheminée vers le noyau. Le génome viral est ensuite libéré au niveau du pore nucléaire afin de rejoindre le nucléoplasme (Ojala et al., 2000). Dans le noyau, l'ADN viral se circularise grâce à l'ADN ligase IV cellulaire, puis débute la transcription des gènes viraux. Cette expression génique du VHS-1 se décompose selon 3 phases temporelles (Honess and Roizman, 1974). Tout d'abord, l'expression des gènes immédiats précoces codant des facteurs de régulation génique comme ICP0 et ICP4 : des transactivateurs majeurs de l'expression génique (Cai and Schaffer, 1992; Smith et al., 1993). Puis, l'expression des gènes précoces codant des facteurs importants pour la réplication. Enfin, l'expression des gènes tardifs codant entre autres pour des protéines structurales nécessaires à l'assemblage. Cette étape d'assemblage s'effectue dans le noyau, puis les nouvelles particules virales formées vont bourgeonner à partir de la membrane nucléaire interne et acquérir une enveloppe primaire dans l'espace entre les membranes nucléaires internes et externes. Concernant le processus de sortie du virion hors de la cellule hôte, la communauté scientifique reste partagée. En effet, deux voies ont été principalement proposées. La première voie suggère que le virus enveloppé se désenveloppe à partir de la membrane nucléaire externe, la particule virale se retrouve dans le cytoplasme puis acquiert son enveloppe finale suite au bourgeonnement à partir de l'appareil de Golgi (Mettenleiter et al., 2006). La seconde voie propose que les virions enveloppés à partir de la membrane nucléaire externe, sont transportés au sein de vésicules à travers le compartiment golgien afin d'être sécrétés hors de la cellule hôte (Campadelli-Fiume and Roizman, 2006; Johnson and Baines, 2011; Mettenleiter et al., 2013). La première voie ou modèle de l'enveloppement et du désenveloppement, correspond au modèle le plus accepté. Enfin, ces particules nouvellement produites seront libérées hors de la cellule par mécanisme d'exocytose, et seront compétentes pour une infection ultérieure des cellules avoisinantes (figure 3).



Figure 3: Cycle de réplication lytique du VHS-1. Schéma représentatif du cycle viral lytique. L'entrée du virus dans la cellule hôte permet la libération de l'ADN viral dans le noyau. L'expression des gènes viraux est initiée menant à la production des protéines IP (immédiats-précoces), P (précoces) puis T (tardives). Parallèlement, la réplication de l'ADN viral se déroule, puis suite à un clivage spécifique, il y aura naissance de plusieurs unités génomiques qui vont pourvoir intégrer des capsides encodées par les protéines T. Suite à cet assemblage, la néo-particule virale va rejoindre la membrane plasmique pour finalement être libérée par exocytose. (Figure extraite de la these doctorale de Luc Bertrand, 2012)

1.1.3 Latence et réactivation

Le VHS-1 est un virus neurotrope, ce qui lui confère la capacité d'infecter des cellules nerveuses comme les neurones sensitifs. Suite à l'infection primaire des cellules épithéliales, les nouveaux virions peuvent infecter les neurones sensitifs innervant la région de la primoinfection et rejoindre les corps neuronaux grâce aux terminaisons axonales via un transport rétrograde (Openshaw et al., 1978). Lors de l'infection de ces neurones, des études d'imagerie en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que les particules virales véhiculées via les terminaisons axonales correspondent à des capsides complètement enveloppées (Huang et al., 2011). Le virus va pouvoir, ensuite, entrer dans une étape de persistance sans aucune expression de gènes lytiques : il s'agit de la latence, une caractéristique uniquement propre à l'ordre des Herpesvirales (Davison et al., 2009). Durant cette période, seule une population de transcrits nommés LATs (Latency associated transcripts) seront exprimés (Wagner and Bloom, 1997). La transcription de ces gènes LATs va conduire à la production d'un transcrit primaire de 8.3 kb (« LAT mineur »), qui sera ensuite épissé pour donner deux introns stables de 2.0 et 1.5 kb (« LATs majeurs ») (Zabolotny et al., 1997). Une population de micro-ARN encodés par le VHS-1 sera également exprimée spécifiquement au cours de cette latence au niveau des ganglions sensoriels comme par exemple miR-H2, miR-H3 et miR-H4. Néanmoins, d'autres micro-ARN, tel que miR-H1, présenteront une expression plutôt au cours du cycle lytique de réplication du VHS-1 (revu par (Jurak et al., 2014)). Certains de ces micro-ARN présentent la capacité de réprimer l'expression de gènes lytiques. En effet, miR-H2 et miR-H6 répriment l'expression des protéines régulatrices ICPO et ICP4, respectivement (Umbach et al., 2008).

L'expression de gènes lytiques se caractérise par la formation du complexe VP16/HCF-1/Oct-1 capable de reconnaître une séquence spécifique TAATGARAT située dans la région promotrice des gènes immédiats-précoces ce qui active leur expression. Toutefois, ce complexe ne parvient pas à se former au sein de neurones sensitifs. En effet, le facteur HCF-1 se localise exclusivement dans le cytoplasme, tandis que dans les cellules épithéliales ce même facteur peut rejoindre le noyau (La Boissière et al., 1999). Les transcrits LATs participeraient aussi à la répression de l'expression des gènes lytiques (Chen et al., 1997; Garber et al., 1997).

À ce jour, le mécanisme précis des facteurs cellulaires dans le processus de réactivation de génomes latents reste encore énigmatique. Cependant, divers stimulis pouvant induire une réactivation ont été découverts chez l'humain comme par exemple la lumière UV, le stress

5

émotionnel, la fièvre, les lésions tissulaires et l'immunosuppression (revu par (Grinde, 2013)). En culture neuronale, d'autres inducteurs de la réactivation ont également été mis en évidence : la déprivation en NGF (Nerve Growth Factor) (Wilcox and Johnson, 1987, 1988; Wilcox et al., 1990), la capsaicine (Hunsperger and Wilcox, 2003), l'hyperthermie transitoire (Moriya et al., 1994) et le dexaméthasone (Halford et al., 1996). Au cours du processus de réactivation, un remodelage de la chromatine s'effectue afin de permettre l'expression de gènes lytiques et ainsi un retour vers un cycle de réplication productif (figure 4).



Figure 4: Neurotropisme du VHS-1. a) L'infection de cellules épithéliales se traduit par une réplication productive du VHS-1. Les nouveaux virions produits vont pouvoir infecter les neurones sensitifs situés à proximité de la zone de primo-infection, et ainsi atteindre le corps neuronal via un transport rétrograde. Le virus va entrer dans une phase particulière dite latence où seule une certaine population de transcrits sera exprimée. b) Suite à un stimulus, le virus retourne vers un cycle lytique de réplication avec génération de nouvelles particules virales qui suivront les terminaisons axonales par un transport antérograde afin de réinfecter les cellules épithéliales situées dans la région de la primo-infection. (*Figure adaptée extraite de (Knipe and Cliffe, 2008)*)

1.1.4 Pathogenèse

Le VHS-1 se transmet par contact direct de lésions infectées ou de fluides biologiques tels que la salive. Par ailleurs, cette infection provoque l'apparition d'un large spectre de manifestations cliniques.

Herpès labial (feu sauvage). La primo-infection au VHS-1 est généralement asymptomatique et le plus souvent contractée durant l'enfance. Dans le cas d'une symptomatologie, l'individu peut présenter de la fièvre, des maux de gorge, une haleine fétide, une anorexie, une adénopathie cervicale associée à un œdème muqueux. Des lésions vésiculaires et ulcéreuses douloureuses peuvent également se manifester au niveau de la muqueuse buccale, de la langue, des gencives et du pharynx (McMillan et al., 1993).

Panaris herpétique. Le mot panaris vient du latin et correspond à des inflammations aiguës des phalanges distales ou plus simplement des doigts. Chez l'enfant, le panaris herpétique est exclusivement dû au VHS-1 tandis que chez l'adulte, il peut se développer suite à l'infection par le VHS-1 ou le VHS-2. (Feder and Long, 1983; Gill et al., 1990). Ce type d'affection peut se caractériser par une douleur lancinante, un gonflement, et la formation de vésicules non purulentes. Les lésions typiques associées au panaris herpétique peuvent ressembler fortement à un felon ou à un paronychia bactérien. Le développement d'un panaris herpétique n'est pas critique car une résolution complète de la symptomatologie se produit au bout de trois semaines (Rubright and Shafritz, 2011). Le diagnostic peut se faire par culture virale ou par le test de Tzanck qui permet de détecter la présence de grandes cellules mutlinuclées à partir d'un frottis de vésicules ou d'une zone ulcéreuse de la peau du patient.

Infections oculaires. Lors de la primo-infection de la région oro-faciale, le VHS-1 est capable d'infecter les cellules épithéliales de la cornée puis les majeurs tissus de la cornée. La kératite épithéliale peut s'accompagner de douleur, de vision floue, de rougeur (Jones, 1958). Dans les pays développés, la kératite herpétique est la cause infectieuse principale de cécité au sein de la population (Simmons, 2002). Cette kératite se développe très rarement lors de la primo-infection mais plus souvent suite à une réactivation du virus latent au niveau de neurones du ganglion trigéminal. La forme stromale constitue la complication la plus sévère de la kératite. En effet, des épisodes de réactivation répétitifs peuvent conduire à des maladies chroniques inflammatoires dans le stroma cornéen. Lors de l'infection de l'épithélium cornéen, une angiogénèse pathologique se développe au niveau de la cornée et se caractérise par des vaisseaux beaucoup plus fragiles qui vont permettre la diffusion de cellules inflammatoires vers

7

les tissus et ainsi aboutir à des troubles de la vision voire la cécité. De plus, ces nouveaux vaisseaux ont également la propriété de bloquer le passage de la lumière et de la diffracter (Medawar, 1948; Billingham and Boswell, 1953).

Encéphalites herpétiques. L'encéphalite constitue la complication neurologique la plus sévère induite par le VHS. Environ 90% des encéphalites à herpès simplex sont dues au VHS-1. Les symptômes liés à l'encéphalite sont la fièvre, maux de tête, léthargie, irritabilité, confusion, déficit neurologique focal, aphasie et crises. L'encéphalite se produit suite à la réplication du VHS-1 associée à une inflammation du lobe temporal médian et de la surface orbitale du lobe frontal (Gilden et al., 2007). La plupart des patients présentant une encéphalite au VHS-1 meurent avant même l'administration d'acyclovir (Gilden et al., 2007). L'approche par PCR (Polymerase Chain Reaction) est la méthode de choix dans la détection sensible et spécifique de l'ADN du VHS-1 au niveau du LCR (liquide céphalo-rachidien) et ainsi une méthode efficace pour la détection d'une encéphalite herpétique (Baringer, 2008).

Herpès néonatal. L'infection du nouveau-né par le VHS-1 est rare mais dangereuse et peut entrainer des séguelles à long terme voire être fatale. La transmission d'une infection au VHS-1 peut être influencée par différents facteurs : le type d'infection maternelle, le type d'accouchement, la durée du travail, l'utilisation d'instruments en intrapartum. Les infections herpétiques du nouveau-né peuvent être classées selon trois types : infection par un VHS-1 disséminé, par un VHS-1 localisé dans le système nerveux central (SNC), et l'infection de la peau, des yeux et des muqueuses (SEM). Dans plus de 75% des cas, l'herpès néonatal a été contracté au cours de l'accouchement, d'une infection génitale généralement primaire et asymptomatique (Corey and Wald, 2009b). L'infection génitale maternelle par le virus herpès peut être de deux types : une infection génitale nouvellement acquise ou une infection génitale récurrente. Dans le premier cas, la mère ne possède pas d'anticorps spécifiques au VHS-1 ou -2, elle ne peut donc pas transmettre d'anticorps protecteurs à son enfant. Ainsi, en présence d'un tel profil sérologique, le risque de transmission du virus à l'enfant est nettement plus élevé (60%). Dans le second cas, la mère a produit auparavant une batterie d'anticorps capables de monter spécifiquement une réponse humorale efficace contre le virus, l'enfant pourra recevoir ces anticorps et se protéger face à une infection au VHS-1 (Allen and Robinson, 2014).

1.1.5 Traitements actuellement disponibles

L'acyclovir constitue le traitement privilégié concernant les infections aux VHS. En effet, cette molécule cible l'ADN polymérase virale afin de mener à l'inhibition de la synthèse d'ADN viral. L'acyclovir est un analogue guanosidique qui va subir une phosphorylaton initiale par la thymidine kinase (codée par le gène *ul23* du VHS-1) puis des phosphorylations additionnelles par des kinases cellulaires. Ces réactions vont aboutir à la triphosphorylation de cet analogue qui pourra ensuite être incorporé dans la molécule d'ADN naissante lors de la réplication virale et ainsi mener à l'arrêt définitif de la synthèse (revu par (James et al., 2015)).

Dans le traitement de l'herpès néonatal, l'administration d'acyclovir par voie intraveineuse permet de réduire de 30% la mortalité infantile lors d'une infection disséminée et de 6% celle d'enfants souffrant d'infection virale du SNC (Corey and Wald, 2009a). Des efforts sont notamment réalisés afin de réduire au maximum la transmission verticale de la mère infectée à son enfant. Des cas de résistance au traitement par acyclovir dans ces instances ont été rarement reportés.

À l'inverse des panaris résultant d'infections bactériennes comme par le *Staphylocoque doré*, l'incision est vivement déconseillée pour le traitement du panaris herpétique car cela favoriserait le risque de virémie (Sleth, 2008). Aucun traitement spécifique n'est préconisé car la résolution des symptômes s'opère généralement au bout de trois semaines (Rubright and Shafritz, 2011).

Concernant la kératite herpétique, des études chez la souris ont montré qu'une immunisation avec le virus HSV-2 dl5-29 (un virus mutant défectif pour la réplication), est capable de prévenir le développement d'une infection oculaire herpétique (van Lint et al., 2007). Chez l'humain, une étude limitée a été menée, mettant en évidence que l'administration d'un virus inactivé par la chaleur, permet de réduire le taux de récurrences responsables des maladies oculaires (Pivetti-Pezzi et al., 1999). D'autre part, la vascularisation de la cornée joue un rôle crucial dans la pathogenèse de la kératite herpétique stromale, ainsi limiter l'irrigation de ces vaisseaux contribuerait à réduire la sévérité de la maladie. En effet, un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nommé « Avastin » permet d'inhiber l'angiogenèse associée aux tumeurs chez l'humain (Ferrara, 2004). Par la suite, d'autres approches (protéines de fusion VEGF-R1, neutralisation de l'IL-17A) limitant la disponibilité du facteur VEGF ont été explorées dans une finalité commune de lutter contre l'aggravation de la kératite.

L'acyclovir a permis d'améliorer considérablement le traitement des patients infectés par le VHS-1. En effet, ce composé thérapeutique permet de lutter efficacement contre le développement de maladies lors des primo-infections mais également de réduire la fréquence des infections récurrentes. Cependant, face à la pression exercée par ces molécules thérapeutiques, le virus a tendance à évoluer dans la seule finalité de ne plus correspondre à la cible de ces inhibiteurs. Ainsi, des phénomènes de résistance à l'acyclovir émergent en particulier chez les sujets immunodéprimés considérés comme patients à hauts risques. De ce fait, de nouvelles pistes thérapeutiques sont envisagées comme la combinaison d'antiviraux mais notamment l'identification de nouvelles cibles antivirales comme par exemple le complexe hélicase-primase. Le prilelivir et l'amenamevir sont deux molécules ciblant ce complexe (James et al., 2015). Pritelivir a permis de réduire la charge virale dans un modèle murin d'infection oculaire au VHS-1 ainsi que chez le lapin. L'administration d'Amenamevir chez le cochon d'Inde est capable de ralentir en 24 heures la progression de la maladie après l'apparition des symptômes. Ces deux composants sont actuellement sous essais cliniques, et pourraient potentiellement être approuvés pour le traitement d'infections au VHS-1 (figure 5).



Figure 5 : Antiviraux ciblant la synthèse de l'ADN viral au cours du cycle de réplication du VHS-1. Une population de molécules antivirales développées ciblent des complexes importants de la machinerie de réplication comme le complexe ADN polymérase et le complexe hélicase-primase (Modifiée de (James et al., 2015)).

1.2 Réplication virale couplée à la recombinaison

1.2.1 Mode réplicatif (réplisome viral)

Suite à la circularisation du génome viral dans le noyau, le réplisome ou complexe de réplication va pouvoir se former afin d'initier la réplication de l'ADN du VHS-1. Ce complexe se compose de sept protéines hautement conservées (UL9/UL29 ; UL5/UL8/UL52 et UL30/UL42). Le génome viral du VHS-1 contient 3 origines de réplication différentes : 2 OriS et 1 OriL. Ces origines contiennent une région riche en résidus adénine et thymine, et sont bordées de sites de reconnaissance pour des « origin-binding » protéines (OBP) telle qu'UL9. Ces sites de reconnaissances sont classés en box I, box II ou box III (revu par (Weller and Coen, 2012)).

L'initiation de la synthèse d'ADN débute au niveau d'une de ces 3 origines de réplication. UL9 et ICP8 (UL29) vont ensuite désapparier la région riche en résidus adénine et thymine. Deux dimères d'UL9 vont se fixer sur les boîtes I et II. Puis, UL9 en synergie avec ICP8 va pouvoir induire la formation d'une tige-boucle OriS. Un changement conformationnel d'UL9 va s'opérer permettant la formation du complexe UL9-ICP8. Par la suite, le complexe hélicase/primase ou H/P (UL5/UL8/UL52) est recruté afin de faciliter le déroulement de la fourche puis la synthèse d'amorces ARN nécessaire pour l'initiation de la réplication ADN. Enfin, les 2 sous-unités du complexe polymérase (UL30 et UL42) vont intervenir au sein de cette fourche de réplication afin d'aboutir à la synthèse des brins d'ADN précoces et tardifs (figure 6) (revu par (Weller and Coen, 2012)).



Rolling-Circle Replication

Figure 6 : Modèle de réplication de l'ADN du VHS-1. 1) La protéine UL9 va se lier à une origine de réplication (OriL ou OriS) puis initier le désappariement de l'ADN double brin. 2) ICP8 va ensuite être recruté au niveau de l'ADN déroulé. 3) UL9 et ICP8 vont par la suite interagir et permettre le recrutement des cinq autres protéines du complexe de réplication au niveau de la fourche. 4) La synthèse de l'ADN démarre par un mécanisme de type théta pour finalement basculer vers un mode de réplication en cercle roulant 5). (Modifiée de (Taylor et al., 2002)).

Vers les années 1970-1980s, il a été proposé que le VHS-1 se réplique selon un mode unidirectionnel dit de cercle roulant. En effet, plusieurs observations ont mené à cette proposition : tout d'abord, les intermédiaires de réplication présentaient un haut poids moléculaire puis une digestion enzymatique de ces intermédiaires révélait une réduction dans la molarité des fragments terminaux génomiques tandis que la molarité des fragments de jonction L/S augmentait au cours de l'infection par le VHS-1. (Severini et al., 1994) (Bataille and Epstein, 1995).

Lors de la réplication de l'ADN, ces intermédiaires de réplication ont la particularité de présenter des structures hautement branchées (Severini et al., 1996). En effet, ceci est supporté par le fait que l'ADN réplicatif du VHS-1 a de la difficulté à entrer complètement dans le gel au cours de la migration électrophorétique; une partie de l'ADN reste concentrée au niveau du puits et qui correspond aux intermédiaires de structures complexes.

Des analyses moléculaires de l'ADN réplicatif intracellulaire ont permis de mettre en évidence la présence d'un arrangement concatémérique de l'ADN à travers l'approche de l'électrophorèse à champ pulsé ou « Pulse-Field Gel Electrophoresis » (PFGE). Cette technique est employée pour permettre la séparation de grandes molécules d'ADN (de plus de 50 kilobases) qui ne serait pas possible dans un gel d'agarose ordinaire. Le principe repose sur l'alternance du champ électrique au cours de la migration ce qui va permettre différentes rotations de la molécule d'ADN et ainsi faciliter le passage de cette molécule à travers les mailles du gel (Schwartz and Cantor, 1984).

Ainsi, le modèle communément accepté prédit une réplication initialement birectionnelle de type thêta avec amplification de molécules circulaires, suivie d'un basculement vers une réplication monodirectionnelle en cercle roulant qui aboutit à la formation de concatémères de génomes viraux. Le clivage de chaque unité génomique s'effectue de manière spécifique au niveau d'un signal nommé « pac » situé au sein de la séquence « a » (Tong and Stow, 2010).

1.2.2 Production de 4 isomères génomiques par recombinaison

La recombinaison homologue est une caractéristique particulière liée à la réplication de l'ADN du VHS-1. En effet, des évènements de recombinaison ont lieu entre les régions répétées inversées du génome viral qui vont aboutir à l'inversion des grandes (U_L) et petites (U_S) régions uniques. Il en résulte ainsi la formation d'isomères génomiques présents en quantité équimolaire lors de la réplication du VHS-1 (Bataille and Epstein, 1997b). Ces isomères sont présents au nombre de quatre (figure 7) ; « prototype » (P), « inverted long region » (IL), « inverted small region » (IS), et « inverted long and small regions » (ILS).



Figure 7 : Isomères génomiques générés lors de la réplication de l'ADN du VHS-1. La présence de séquences répétées inversées aux extrémités des régions uniques permet l'inversion de ces dernières par un mécanisme de recombinaison homologue. Il en résulte la production de 4 isomères différents présents en quantités équimolaires au cours de la réplication du VHS-1. (*Figure adaptée extraite de Taylor et al., 2002*).

La réplication de l'ADN du VHS-1 a la particularité de présenter des évènements de recombinaison. En effet, il a été montré que des mutants de recombinaison non capables de réaliser la recombinaison homologue, du fait de la délétion d'une partie de leurs répétitions inversées (à la jonction entre U_L et U_S), affichaient une plus faible efficacité de réplication que le virus sauvage correspondant, ainsi que l'absence d'infection aiguë *in vivo*. Ainsi, il a été suggéré que la capacité à réaliser de la recombinaison homologue est nécessaire pour obtenir une infection efficace *in vivo* (Mahiet et al., 2012).

D'autre part, de multiples coupures double-brins se produisent de manière aléatoire au sein du génome viral au cours de la réplication du VHS-1, ces coupures représentent d'excellents promoteurs pour les mécanismes de recombinaison homologue entre les régions inversées du VHS-1. De plus, la reconnaissance de plusieurs origines de réplication par le complexe UL9/UL29 permet le déroulement des processus d'inversions au cours de la réplication virale. La protéine UL29 renferme une activité de recombinase qui lui permet de promouvoir en synergie avec le complexe hélicase, l'échange de brin de l'ADN réplicatif (Makhov and Griffith, 2006). Finalement, la protéine UL12 possède, également, la caractéristique de pouvoir stimuler

la recombinaison par un mécanisme d'hybridation simple brin entre les concatémères (Schumacher et al., 2012).

Récemment, il a été mis en évidence que Rad51 et Rad52 sont aussi impliqués dans la recombinaison homologue de l'ADN réplicatif du VHS-1 (Tang et al., 2014).

1.3 Caractéristiques du gène ul24

1.3.1 Orthologues du gène *ul*24 au sein des *Herpesviridae*

À ce jour l'étude des membres de la famille des *Herpesviridae*, révèle que le gène *ul24* compte de nombreux orthologues, il s'agit donc d'un gène très bien conservé au cours du temps. Certains de ces orthologues sont discutés ci-dessous.

L'homologue du gène *ul24* chez le virus de l'herpès bovin (BHV) porte aussi le nom *ul24*. En comparant ces deux protéines, une identité de séquence proche de 38.1% a été mesurée. Chez le BHV, UL24 a la particularité de présenter un profil de transcription similaire à celui d'UL24 du VHS-1. Toutefois, la délétion d'UL24 (BHV) a peu d'effet sur la réplication virale *in vitro* (Whitbeck et al., 1994).

Chez le cytomegalovirus humain (HCMV), l'orthologue du gène *ul*24 correspond au gène *ul*76. Le génome du HCMV est composé d'une grande molécule d'ADN double brin de 240 kpb, riche en information génétique puisque plus de 750 cadres de lecture ouverts ont été identifiés (Stern-Ginossar et al., 2012) et il génère une grande diversité de micro ARNs lors de l'infection (Stark et al., 2012). De façon similaire à UL24, UL76 est une protéine dont la cinétique d'expression est tardive (Wang et al., 2004). L'expression d'UL76 résulte en la production de nombreuses coupures double brin ainsi que la phosphorylation du facteur γH2AX qui est un indicateur de l'activation du système de réponse d'altération du génome ADN (Siew et al., 2009). La protéine UL76 a donc la capacité d'activer la réponse cellulaire de dommage à l'ADN quand elle est exprimée hors contexte d'infection.

Le virus murin MHV68 constitue un modèle adéquat d'étude de l'infection et de la pathogenèse des gammaherpèsvirus. Bien que ce virus possède des gènes qui lui sont propres, d'autres gènes relativement bien conservés au sein des *Herpesviridae* ont été découverts comme par exemple l'ORF20 dont la région N-terminale présente une homologie avec celle de la protéine du gène *ul24*. Un rôle associé à la protéine ORF20, suite à son expression ectopique, serait

15

l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M suivie de l'apoptose cellulaire (Nascimento and Parkhouse, 2007). D'autre part, ce gène semble non essentiel à la réplication du virus MHV68 car un virus mutant déficient en ORF20 présente une cinétique de réplication identique à celle du virus sauvage (Nascimento et al., 2011).

L'ORF37 de l'herpèsvirus équin (EHV-1) code pour le gène *ul*24 l'homologue du gène *ul*24 du VHS-1. Cette protéine apparaît nécessaire dans la neuropathogenèse du EHV-1 chez la souris (Kasem et al., 2010). En effet, la capacité d'un virus délété de cette protéine à se répliquer dans des cellules neuronales de souris est significativement réduite. Ainsi, UL24 (EHV-1) tient un rôle important dans la réplication d'EHV-1 dans les cellules neuronales, dont le mécanisme précis d'action reste à définir.

1.3.2 Caractéristiques moléculaires et biochimiques

UL24 est une protéine du VHS-1 dont la cinétique d'expression est tardive. Cette protéine est composée de 269 acides aminés et a un poids moléculaire de 29.5 kDa (Pearson and Coen, 2002).

Le gène *ul24* est relativement bien conservé au sein des *Herpesvirales* notamment au niveau des virus infectant des hôtes comme les mammifères, les oiseaux, les reptiles. La protéine UL24 se divise en deux segments : une partie N-terminale et une partie C-terminale. Des analyses bioinformatiques ont permis de mettre en évidence la présence de cinq domaines d'homologie (Jacobson et al., 1989) (figure 8). Certains résidus de ces domaines d'homologie, ont été révélés importants pour une réplication efficace du virus en culture cellulaire (Bertrand et al., 2010).

En effet, des mutations de substitution effectuées sur des résidus des domaines II et III tels que l'acide glutamique en position 99 et la lysine en position 101, se manifestent par un défaut de réplication similaire au mutant UL24X qui n'exprime pas la protéine UL24 (Bertrand et al., 2010).



Figure 8 : Domaines d'homologie conservés de la protéine UL24. Le grand rectangle noir schématise la protéine UL24 complète. Les boîtes noires représentent les cinq domaines d'homologie numérotés en chiffres romains. *Figure adaptée de (Bertrand et al., 2010).*

1.3.3 Cinétique d'expression et localisation cellulaire

La traduction du cadre de lecture ouverte d'UL24 résulte en la production de six transcrits différents (Cook and Coen, 1996) ; trois transcrits longs et trois transcrits courts. Ces transcrits sont générés à partir de trois sites d'initiation distincts ainsi que deux sites de polyadénylation, soit le « signal de polyadénylation » (PAS) d'*ul24* soit le PAS d'*ul26*. Les transcrits courts ont la particularité d'être exprimés à une cinétique précoce tandis que les transcrits longs seraient exprimés à une cinétique tardive (Cook and Coen, 1996). Des travaux ont suggéré que la population de transcrits courts est faiblement traduite lors de l'infection virale (Pearson et al., 2004) menant à la proposition que l'expression d'UL24 correspond à celle des transcrits longs.

Des études de fractionnement cellulaire ont permis de constater qu'UL24 se retrouve essentiellement dans le noyau mais également dans le cytoplasme (Pearson and Coen, 2002). En effet, des observations en microscopie confocale ont détecté la présence d'UL24 dans le nucléole et le reste du noyau à partir de 9 heures post-infection puis UL24 finit par se localiser surtout dans le pourtour du noyau (Lymberopoulos and Pearson, 2007). Ceci suggère que cette localisation péri-nucléaire d'UL24 pourrait être importante dans les étapes tardives du cycle de réplication du VHS-1.

1.3.4 Phénotype de mutants d'UL24 en culture cellulaire

L'infection de cellules Vero par un virus mutant n'exprimant pas la protéine UL24 (UL24X) se traduit par l'observation d'un phénotype de plages syncytiales ce qui correspond à la fusion de plusieurs cellules infectées qui deviennent des cellules multinuclées. Cette observation est plus prononcée lorsque les cellules cibles sont incubées à 39°C (figure 9). Un phénotype de plages syncytiales est également observé suite à des mutations réalisées sur d'autres gènes codés par le VHS-1 tels que *ul20* et les glycoprotéines gB et gK (Ruyechan et al., 1979; Baines et al., 1991; Hutchinson and Johnson, 1995). D'autre part, le virus mutant UL24X présente également une réduction significative de la réplication du VHS-1 en culture de cellules Vero (Jacobson, et al., 1989). UL24 est également impliqué dans les modifications au nucléole lors de l'infection par le VHS-1. En effet, UL24 est important pour la dispersion de la nucléoline et de B23 (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011). Enfin, l'absence d'UL24 induit une réduction dans le ratio de capsides cytoplasmiques/nucléaires (Lymberopoulos et al., 2011).



Figure 9 : Phénotype des virus KOS et UL24X en culture cellulaire. L'analyse de la morphologie des plages au microscope électronique, a été réalisée 2 jours post-infection de cellules Vero incubées à 34, 37 ou 39°C. Figure extraite de (Bertrand et al., 2010).

1.3.5 Phénotype de mutants d'UL24 in vivo

Dans un modèle murin d'infection oculaire, la réplication du virus mutant UL24X dans la cornée est réduite d'approximativement un log décimal en comparaison à celle du virus sauvage KOS. Cette différence a été mesurée au niveau de larmes de souris de souche CD-1. L'analyse des ganglions trigéminaux indique une réduction drastique (moins de 4 log décimal) de la réplication du virus UL24X par rapport à celle du virus KOS. Cette tendance est également observée au niveau de la réactivation ex vivo suite à l'entrée en latence avec une réduction d'au moins 80% (Jacobson et al., 1998). D'autre part, il est noté une diminution des signes cliniques de la maladie (inflammation, lésions, perte de poils, ataxie) au niveau de souris infectées par un virus muté pour le gène *ul24* (Leiva-Torres et al., 2010).

1.3.6 Identification d'un motif putatif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK

La comparaison de profils de séquence par la méthode Meta-BASIC (http://basic.bioinfo.pl), a permis de révéler que le gène *ul24* code un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK spécifique d'une grande superfamille d'endonucléases (Knizewski et al., 2006).

L'étude de virus portant des mutations au niveau de résidus de ce motif tels que E99A/K101A, a permis de constater que ce mutant présente un phénotype de plages syncytiales à 39°C tout comme le mutant G121A qui contient une mutation de substitution en dehors du motif d'endonucléase. Par contre, le virus mutant E99A/K101A se réplique à des titres nettement plus faibles que ceux d'un virus mutant G121A (Bertrand et al., 2010). Il est également à noter que E99A/K101A correspond à une mutation au niveau du site catalytique du motif putatif d'endonucléase d'UL24. Ainsi, ce motif spécifique confèrerait un rôle critique d'UL24 dans la réplication de l'ADN du VHS-1.

1.4 Exemples d'autres protéines à motif PD-(D/E)XK

Les protéines phosphodiestérases PD-(D/E)XK appartiennent une superfamille très large (21900 protéines, 121 groupes de familles) et très diverse sur le plan fonctionnel. En effet, les membres de cette superfamille tiennent des fonctions importantes dans la réplication, la restriction de l'ADN, la réparation ADN, l'excision de transposon, la recombinaison d'ADN, la résolution de jonction de Holliday (HJs), la terminaison par la Pol II, la liaison ADN et l'épissage d'introns d'ARN de transfert. Il s'agit essentiellement de protéines à fonction nucléase. L'avènement de la modélisation structure crystal par rayonnements X a permis de réaliser que la plupart des résolvases de HJs correspondent à la superfamille de nucléases ou intégrases à motif PD-(D/E)XK (Whitby, 2007). Lorsque ces protéines présentent des dysfonctions, des affections assez sévères peuvent se manifester comme par exemple l'anémie de Fanconi ou le Xeroderma pigmentosum (revu par (Steczkiewicz et al., 2012)).

Le centre catalytique de la plupart des enzymes de restriction de cette superfamille se situe au niveau du motif PD-(D/E)XK. Ce site catalytique va permettre la liaison de deux groupements carboxylates à des ions métalliques tels que le magnésium Mg²⁺ puis le clivage de ponts phosphodiesters d'un substrat ADN, généralement de courtes séquences palindromiques (Pingoud and Jeltsch, 2001).

1.4.1 Protéines bactériennes

La protéine CoiA est codée par la souche *Streptococcus pneumoniae*. Son expression est transitoire car elle débute 10 min après l'initiation de l'état de compétence pour disparaître au bout de 30 minutes. Elle a donc la particularité d'être induite lors de la compétence de *S.pneumoniae*. Cet état de compétence permet à la bactérie d'établir des transferts d'ADN. Elle est également nécessaire pour un processus de transformation bactérienne efficace. En effet, il est suggéré que cette protéine, jouerait un rôle important suite à l'internalisation d'ADN, notamment dans les processus de maturation et de recombinaison de l'ADN (Desai and Morrison, 2006). D'autre part, des études bioinformatiques, ont permis de révéler la présence d'un motif PD-(D/E)XK au sein de la protéine CoiA. La fonction de ce motif d'endonucléase n'est pas clairement définie ; cependant, il est proposé que cette séquence spécifique permettrait à CoiA, de dégrader un brin de l'ADN double brin puis l'autre brin restant serait incorporé dans la cellule compétente (Kosinski et al., 2005).

La souche *Pyrococcus abyssi* encode le gène *pab1046* dont le rôle fonctionnel n'a pas encore été élucidé. Le domaine C-terminal de PAB1046 partagerait une forte homologie de structure avec l'endonucléase I du bactériophage T7. L'analyse génomique indique que le gène *pab1046* est associé à un cluster de gènes appartenant à une superfamille d'hélicases à ARN ou à ADN. Cette proximité avec de tels gènes, suggèrent que PAB1046 pourrait être impliqué dans des mécanismes de réparation ou de recombinaison de l'ADN (Kosinski et al., 2005).

Le gène *rmuC* correspond à un loci situé sur le chromosome d'*Escherichia coli*. RmuC et ses partenaires (RmuA et RmuB) sont connus pour être impliqués dans la prévention de réarrangements génétiques. RmuC serait d'ailleurs impliqué dans la recombinaison ADN. En effet, il est proposé que RmuC serait une protéine structurale qui protègerait l'ADN contre l'action de nucléases ou serait elle-même impliquée dans le clivage d'ADN au niveau de régions riches en structure secondaire. L'analyse d'alignements de séquence, a permis de constater que la protéine RmuC contient la signature du motif PD-(D/E)XK spécifique de la superfamille d'endonucléases de type II. De plus, RmuC présente une structure secondaire qui suggère fortement qu'il s'agit d'une nucléase dont le rôle serait de cliver les structures ADN qui émergent au cours de la recombinaison des courtes régions répétées inversées. Ainsi, RmuC contribuerait à limiter les évènements d'inversion de ces séquences internes spécifiques (Kosinski et al., 2005).

1.4.2 Protéines phagiques

Le bactériophage T4 constitue un modèle classique d'étude de la recombinaison homologue. Le phage T4 utilise le mécanisme de recombinaison homologue pour trois raisons : pour amplifier la fréquence d'échange de matériel génétique, pour les processus de réparation de l'ADN et pour l'initiation de la réplication ADN (revu par (Liu and Morrical, 2010)). L'échange de brin d'ADN est particulièrement important afin de garantir une haute fidélité de réparation des cassures d'ADN double brins et ainsi assurer une stabilité du génome. L'endonucléase VII du phage T4 possède la signature du motif spécifique PD-(D/E)XK et permet de résoudre les formes branchées de l'ADN viral préalable à son encapsidation dans les têtes phagiques préformées (Mizuuchi et al., 1982; Kemper et al., 1984).

La protéine gp4 est encodée par le bactériophage T4 et est importante pour les étapes finales des processus d'assemblage de la tête, elle est également prédite être importante pour l'assemblage de la tête et des fibres médié par l'ADN. Une analyse consensus a confirmé la présence du motif PD-(D/E)XK qui affiche une structure secondaire comparable à l'endonucléase I de T7. Le gène gp4 est localisé dans un cluster de gènes important dans la formation de particules phagiques infectieuses. Il est suggéré que ce motif pourrait donner à gp4 un rôle dans le clivage de l'ADN lors de l'attachement de la tête aux fibres (Kosinski et al., 2005).

L'endonucléase I est une protéine de 149 acides aminés, encodée par le gène 3 du bactériophage T7. Il s'agit d'une nucléase dimérique spécifique des jonctions Holliday à quatre voies. L'endonucléase I du phage T7 appartient à la famille de nucléase PD-(D/E)XK. Elle est impliquée dans la recombinaison génétique au cours de l'infection virale et est importante pour la résolution d'intermédiaires branchés lors de la réplication de l'ADN. Cette endonucléase est connue pour lier et cliver les jonctions ADN dites de Holliday. Ces jonctions ont la propriété d'émerger au cours de la recombinaison génétique homologue. La résolution des intermédiaires de réplication a lieu suite à l'introduction de coupures au niveau des jonctions Holliday. Des travaux ont montré que l'endonucléase I est nécessaire pour la résolution d'intermédiaires branchés I est nécessaire pour la résolution d'intermédiaires branchés I est nécessaire pour la résolution d'intermédiaires branchés grâce à un clivage endonucléasique (Müller et al., 1990).

Le phage PSA est un phage tempéré isolé à partir de la bactérie *Listeria monocytogenes*. Ce phage encode une protéine dite gp51. L'analyse génomique indique que gp51 et ses homologues seraient souvent associés à des hélicases et des primases. Des analyses de séquences ont identifié une version orthodoxe du motif catalytique de type (P/S/C)D-EXK. La

21

présence de ce motif au sein de cette protéine gp51, suggère que gp51 pourrait posséder une fonction de recombinase dans la réplication de l'ADN. En effet, il est proposé que gp51 et ses homologues seraient impliqués dans la résolution d'intermédiaires branchés de phage ADN lors de la réplication couplée à la recombinaison, de façon similaire à l'endonucléase I du phage T7 (Kosinski et al., 2005).

1.4.3 L'alcaline nucléase UL12 du VHS-1

Le VHS-1 encode une protéine UL12 ou alcaline nucléase qui est une phosphoprotéine de 85 kDa possèdant une activité 5'-3' exonucléase et endonucléase. Cette protéine de 626 acides aminés est caractérisée d' « alcaline » car cette nucléase a la particularité de fonctionner à un pH optimum élevé. La séquence en acides aminés de cette protéine est relativement bien conservée chez tous les herpèsvirus et toutes les sous-familles des Herpesviridae (revu par (Goldstein and Weller, 1998)). En effet, deux résidus hautement conservés ont été étudiés en particulier; la glycine en position 336 et la sérine en position 338. Lorsque des substitutions pour l'alanine sont effectuées sur ces deux résidus au sein d'un système baculovirus, les activités exo- et endonucléase deviennent abolies (Goldstein and Weller, 1998), suggérant la grande importance de ces résidus dans les activités nucléasiques d'UL12. De plus, ces activités nucléases sembleraient nécessaires pour une réplication virale efficace in vitro. En effet, dans une culture cellulaire d'un virus mutant déficient en UL12, la transfection par un plasmide exprimant la protéine sauvage UL12 permet d'aboutir à une bonne complémentation du virus mutant en UL12 qui affiche une bonne croissance. Tandis que la transfection par un vecteur exprimant des mutations au niveau des résidus glycine (336) et sérine (338) de UL12, ne parvient pas à complémenter la déficience en UL12 du virus mutant qui développe une très faible réplication (Goldstein and Weller, 1998).

En présence de virus recombinants n'exprimant pas UL12, il est observé une réduction drastique des titres viraux en culture cellulaire d'un facteur de 100 à 1000. Ceci permet de proposer qu'UL12 tiendrait un rôle important dans la réplication virale du VHS-1 (Weller et al., 1990a).

En contexte d'infection, lorsque UL12 est mutée, il a été montré une réduction de la synthèse et de la maturation de l'ADN viral (Weller et al., 1990a). De plus, l'absence de cette alcaline nucléase, génère des intermédiaires de réplication présentant une structure beaucoup plus complexe avec une augmentation des structures branchées. (Porter and Stow, 2004b). Ainsi, UL12 se révèlerait très importante pour la résolution des intermédiaires de réplication préalable

22

à l'empaquetage de l'ADN. Ce mécanisme de résolution semble utiliser le processus de recombinaison (Schumacher et al., 2012). De plus, le motif spécifique PD-(D/E)XK est également retrouvé dans cette protéine UL12 du VHS-1 (Bujnicki and Rychlewski, 2001).

Aucune similarité n'a été identifiée entre les séquences des gènes *ul*24 et *ul*12 mis à part la signature du motif PD-(D/E)XK. Néanmoins, il a été proposé que ces deux protéines UL24 et UL12 pourraient potentiellement exercer des activités redondantes (Knizewski et al., 2006) et donc de façon similaire, induire un clivage nucléotidique du génome viral lors de la réplication de l'ADN.

2 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Des résultats préliminaires au sein de notre équipe ont permis d'observer que la production de monomères génomiques viraux est nettement réduite lorsque des cellules Vero sont infectées par un virus déficient en UL24. Ainsi, il a été proposé qu'UL24 favorise la production de monomères d'ADN génomique du VHS-1. Cependant, le mécanisme précis par lequel UL24 agirait n'a pas encore été résolu.

La présence d'un motif putatif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK spécifique des membres de la superfamille des phosphodiestérases au sein d'UL24 suggère un rôle endonucléasique de cette dernière. En effet, tout comme UL12, la protéine UL24 pourrait participer dans la résolution d'intermédiaires branchés en agissant comme une recombinase dont le clivage de l'ADN réplicatif permet de promouvoir l'avènement d'inversions génomiques.

Ainsi, nous supposons que l'interaction d'UL24 avec l'ADN viral favoriserait la génération de nouveaux génomes viraux par un processus de recombinaison homologue lors de la réplication du VHS-1.

Afin de tester cette hypothèse, notre projet vise deux objectifs ; tout d'abord, de déterminer l'importance du motif putatif d'endonucléase d'UL24 dans la production de génomes viraux, puis dans une seconde partie, d'étudier le rôle d'UL24 dans la recombinaison génomique lors de la réplication du VHS-1.

L'étude d'un mutant vUL24-E99A/K101A permettrait de déterminer si le motif d'endonucléase est impliqué dans cette fonction qui possède une mutation de substitution au niveau du site catalytique d'un motif prédit d'endonucléase. La disposition d'un « Rescue » de ce mutant serait requise afin de déterminer avec certitude si ce dernier pourrait permettre de rétablir ce phénotype et ainsi déterminer si ce motif spécifique joue un rôle déterminant dans cette production génomique virale. Ainsi, des approches de recombinaison homologue seront menées afin de produire un virus « Rescue » à partir du mutant vE99A/K101A. Par la suite, le virus de type sauvage (KOS), le mutant vE99A/K101A et le virus rescue seront testés pour déterminer l'impact sur la production de génomes monomériques. Finalement, un test de recombinaison sera effectué à partir de cellules infectées par KOS, UL24X et UL24XRescue. Ce test fera appel à l'usage d'une enzyme Spel spécifique pour cliver une seule fois chaque unité d'ADN génomique de concatémères viraux. Enfin, des analyses seront effectuées suite à une électrophorèse en champs pulsé suivie d'un Southern blot. Les différents isomères seront identifiés par la taille des fragments générés.

3 MATERIELS ET METHODES

3.1 Lignée cellulaire et virus

Des cellules rénales de singe vert d'Afrique dites *Vero* ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Invitrogen) tel que décrit auparavant (Lymberopoulos and Pearson, 2007). La souche KOS du VHS-1 correspond à une souche sauvage. Le virus UL24X est une souche n'exprimant pas la protéine UL24 (Jacobson et al., 1998). Les virus vUL24-E99A/K101A et vUL24-G121A contiennent des mutations ponctuelles au sein du gène *ul24* (Bertrand et al., 2010).

3.2 Analyse génomique virale

3.2.1 Test de production d'ADN viral et de recombinaison d'ADN viral

Des cellules Vero (1,5x10⁶) ont été ensemencées dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre puis ces boîtes ont été placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ durant toute une nuit. Le lendemain, ces cellules ont été infectées par les virus KOS, UL24X, UL24XRescue, vE99A/K101A ou vE99A/K101ARescue à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 pendant une heure. Suite à cette infection, les cellules ont été lavées deux fois au Phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen) puis une fois avec du milieu (DMEM, NCS 5%, Strep/Pen) pour finalement déposer dans chaque boite 4 ml de milieu (DMEM, NCS 5%, Strep/Pen). Ces boîtes ont ensuite été incubées à 37°C (5% CO₂). La récolte cellulaire est effectuée 24 heures post-infection à l'aide de grattoirs, puis la suspension cellulaire est transférée dans un tube adéquat pour une centrifugation à 2000 rpm de 5 minutes à 4°C (Sorvall Legend RT). Le culot cellulaire est ensuite lavé deux fois avec une solution de PBS puis resuspendu dans une solution tiède de Low Melting Point (LMP) agarose à 1% pour finalement être déposé dans un moule spécifique. Après deux heures de solidification à 4°C, les blocs d'agarose sont correctement formés. Les blocs sont ensuite transférés dans des tubes eppendorfs adéquats pour la suite des traitements. Les blocs d'agarose permettent de réduire les cassures des longs morceaux d'ADN. Pour le test de production des monomères d'ADN viral, les blocs sont traités à la Protéinase K (400 2g) pendant 24 heures à 37°C puis lavés cing fois au Tris-EDTA pour 5 minutes puis conservés à 4°C. Pour le test de recombinaison, les blocs sont tout d'abord traités à la Protéinase K comme précédemment. Ensuite, une partie des blocs traités à la protéinase K est incubée avec l'enzyme de restriction Spe I (60 unités) durant toute une nuit à 4°C puis 6

heures à 37°C. Ces blocs sont également lavés cinq fois au Tris-EDTA pour 5 minutes puis conservés à 4°C.

3.2.2 Électrophorèse en champs pulsé (PFGE)

Le dépôt des blocs traités à la Protéinase K seule ou à la Protéinase K puis ensuite à l'enzyme Spe I, est réalisé dans les puits d'un gel agarose 1.2 % (1.5 g de poudre agarose Seakem dans 125 mL de TBE 0.5X) qui est ensuite soumis à une électrophorèse en champs pulsé de 6V/cm durant 29h57min à 14°C. L'appareil utilisé est le CHEF Mapper System de Biorad. A l'issue de cette migration, le gel est récupéré puis coloré au bromure d'éthidium durant 30 minutes puis une photo est prise.

3.2.3 Analyse de la production d'ADN viral par Southern blot

Suite à l'électrophorèse en champ pulsé, le gel est incubé dans une solution de dénaturation (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) et plaçé sur une plaque agitatrice pendant 30 minutes à température pièce. Un montage pour le transfert par capillarité des molécules d'ADN du gel sur une membrane nylon (chargée positivement) a été réalisé dans un tampon de transfert 10X SSC. Le transfert a été effectué à température ambiante durant toute une nuit. La membrane est ensuite récupérée puis traitée aux rayons ultraviolets avant d'être hybridée avec 20 II d'une sonde BamHI-Q[³² P] spécifique du génome du VHS-1. Cette sonde a été produite à partir du fragment BamHI de pAG5 à l'aide du kit « High Prime DNA Labelling Kit » de Roche. L'analyse est ensuite faite à l'aide du phosphorimager Typhoon. Une quantification est également réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant TL.

3.3 Génération de virus rescue recombinants

3.3.1 Plasmides

Le plasmide pAG5 (Griffiths and Coen, 2003) et les virus vE99A/K101A et vG121A (Bertrand et al, J Virol 84 :109-118) ont été utilisés dans le cadre de la construction des virus rescue recombinants. Le plasmide pAG5 contient un fragment nommé BamHI contenant les séquences complètes des gènes *ul22*, *ul23* et *ul24*. La digestion par l'enzyme BamHI permet de libérer ce fragment.

3.3.2 Transfection/ Infection

Le vecteur pAG5 a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI puis 500 ng ont été cotransfectés avec 1 \square g d'ADN viral de vE99A/K101A. Ces co-transfections ont été réalisées en duplicat dans un milieu de culture DMEM + NCS 5% additionné d'un agent de transfection la Lipofectamine® (ratio Lipofectamine® : ADN viral est de 6 pour 1). Cet agent est maintenu dans le milieu de culture pendant 5 heures à 37°C (5% CO₂). A 3 jours post-transfection, environ 80% des cellules présentent une morphologie arrondie et sont donc récoltées. Ces produits de transfection ont été soumis à trois cycles de gel/dégel, puis à une sonication (durée 30 secondes, 0.5 sec ON/0.5 sec OFF, amplitude 50%) afin de permettre une lyse efficace des cellules transfectées. Ce lysat a ensuite été utilisé pour infecter des cellules Vero ensemencées dans des plaques de 96 puits à des dilutions de 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷.

3.3.3 Criblage des clones positifs par PCR

Au cours du troisième jour post-infection, les plaques de 96 puits ont été analysées au microscope optique afin de déterminer le nombre de plages de lyse observées dans chaque puits. Les puits dans lesquels des plages de lyse ont été observées, ont été ensuite récoltés puis un aliquot a été prélevé pour un traitement préalable par un tampon de lyse pour PCR (10% Thermopol Buffer, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X-100, Protéinase K (20mg/ml)). La lyse des cellules infectées a été obtenue après incubation à 55°C pendant 2 heures puis à 95°C pour 20 minutes. Les échantillons de chaque puits ont été testés d'abord dans une réaction PCR utilisant l'amorce sauvage E99A/K101A WT puis dans une seconde réaction PCR avec l'amorce mutagène E99A/K101A Mut (Integrated DNA Technologies). Une amorce « reverse primer » commune aux deux formes (mutée et sauvage) a été utilisée. L'analyse des produits de réaction PCR a été réalisée suite à l'exposition aux ultraviolets d'un gel d'agarose 1% (contenant du bromure d'éthidium) soumis à une électrophorèse de 85 volts. Plusieurs rondes de purifications sont effectuées jusqu'à obtenir des plages de lyse isolées. L'objectif final est d'obtenir une plaque ou l'on retrouve moins de 12 plages (toutes positives).

3.3.4 Production des « headmaster », « master », « submaster » et « working stocks »

L'identification de clones positifs a permis de passer à l'étape de production de stocks viraux. Le puits à partir duquel le clone a été criblé positif a été transféré dans un tube cryogénique afin de constituer le headmaster stock. Un aliquot de 40 II de ce stock a été utilisé pour infecter 1,5x10⁷ cellules Vero d'un flasque T175 afin de produire le master stock. Puis, $3x10^5$ cellules Vero ensemencées dans une plaque de 12 puits ont permis de titrer le master stock, qui a ensuite servi à infecter 1,5.10⁷ cellules Vero à une MOI de 0,01. Suite à trois jours d'incubation à 37°C (5% CO₂), les cellules infectées ont été récoltées puis lysées par trois cycles de gel/dégel et une sonication (durée 30 secondes, 0.5 sec ON/0.5 sec OFF, amplitude 50%). Ce lysat a ensuite été centrifugé à 2000 rpm pour 5 minutes à 4°C, puis le surnageant a été aliquoté à raison de 100 🛛 par tube pour constituer le submaster stock. Suite au titrage du submaster stock, une infection de 1,5.10⁷ cellules Vero à une MOI de 0,01 a été réalisée suivie d'une récolte et lyse cellulaires trois jours post-infection afin d'obtenir le working stock (selon la même méthodologie que pour le master stock).

3.4 Caractérisation des virus recombinants

3.4.1 Analyse du phénotype de plage de lyse

Cette analyse permet de vérifier que les virus recombinants rescue produits ont retrouvé un phénotype de plage de lyse de type sauvage. Des cellules Vero ont été ensemençées dans des plaques de 6 puits à raison de 8,0x10⁵ cellules par puits dans un milieu DMEM + NCS 5%. Le lendemain, des dilutions décimales ont été réalisées dans un volume final de 3 mL de façon à obtenir des plages de lyse bien isolées: de 10⁻⁶ à 10⁻⁸ pour les virus KOS et vE99A/K101ARescue et de 10⁻⁵ à10⁻⁷ pour E99A/K101A. Les plaques ensemençées la veille, ont ensuite été infectées avec 500 ^{III}L de chaque dilution en duplicata. La période d'infection s'est étendue à une heure avec des étapes d'agitation toutes les 15 minutes. Puis, une solution de méthylcellulose 2% a été ajoutée dans chaque puits puis complétée par une solution de fixation (75% méthanol, 25% acide acétique) au bout de deux jours. Ces plaques ont ensuite été lavées au PBS puis observées au microscope à contraste de phase.

3.4.2 Analyse de la réplication virale

Afin d'analyser la réplication virale, des cellules Vero ont été ensemencées dans des tubes de culture à raison de $2,5x10^5$ cellules par tube. Un milieu DMEM + NCS 5% a été utilisé pour cultiver ces cellules. Ces tubes ont ensuite été incubés à 37° C (5% CO₂) pour toute une nuit. Le lendemain, l'inoculum viral a été préparé dans 500 \mathbb{Z} L de milieu DMEM + NCS 2% puis l'infection de ces cellules a été réalisée durant une heure à 37° C (5% CO₂) pour une multiplicité d'infection de 5 dans un volume final de 2 mL. La cinétique de réplication a été suivie à 6, 12,

18 et 24 heures post-infection. Enfin, un titrage de cette cinétique a été mesuré dans une plaque de 12 puits pré-ensemençée de $3x10^5$ cellules Vero par puits.

4 **RESULTATS**

4.1 Production du virus E99A/K101ARescue Recombinant

Afin de pouvoir cribler les clones viraux ayant recombiné avec la séquence sauvage d'UL24, des amorces ont été construites dans cette visée (figure 10). Avant de procéder aux premiers criblages, des optimisations ont été effectuées dans le but de déterminer les conditions permettant de distinguer les clones ayant recombiné de ceux qui ne l'ont pas réalisé. Ceci a constitué un réel défi puisque ces deux amorces diffèrent sur seulement trois nucléotides; le paramètre crucial a donc été la température d'hybridation. Pour déterminer la température optimale, des réactions de PCR ont été réalisées utilisant un gradient de température de 50 à 60°C (Eppendorf Mastercycler EP S). Ainsi, pour l'amorce hybridant avec la séquence mutée du site catalytique du motif putatif d'endonucléase d'*ul24*, la température d'hybridation optimale était de 59.7°C. Concernant l'amorce hybridant spécifiquement avec la séquence sauvage d'*ul24*, cette température était de 51.0°C. Les fragments amplifiés ont une taille d'environ 375 paires de bases (figure 11).

E99A/K101A Forward Primer		Tm
lutated Top Primer : 5' T GTC ATC ATA GCA CTA GC 3'	18 NT	52°C
/T Top Primer : 5' T TGT GTC ATC ATA GAA CTA AA 3'	21 NT	54°C

Reverse Primer		Tm
WT Bottom Primer : 5' AGA GTG TGA CCT TTT CGG 3'	18 NT	54°C

Figure 10 : **Séquences des amorces de criblage.** L'amorce contenant des mutations de substitution pour l'alanine **A** en position 99 et 101 (codant respectivement pour l'acide glutamique **E** et la lysine **K**), est capable d'hybrider avec la séquence du site catalytique du virus mutant E99A/K101A. L'amorce contenant la séquence originelle codant pour l'acide glutamique et la lysine en position 99 et 101 respectivement, est capable d'hybrider avec la séquence sauvage du motif putatif d'endonucléase. L'amorce dite « reverse » est commune aux deux types d'amorces précoces. L'abréviation Tm désigne la température moyenne d'hybridation estimée pour chacune des amorces. L'abréviation NT représente le nombre de nucléotides contenue dans l'amorce. Ces deux amorces vont permettre de distinguer les clones viraux ayant recombiné avec la séquence sauvage du gène *ul*24 en générant des fragments de 375 paires de base.



В



Figure 11 : Optimisation des conditions de criblage avec les amorces E99A/K101A Mut (A) et E99AK101A WT (B). Afin d'optimiser les conditions permettant d'amplifier de façon distincte des fragments du gène *ul*24 des virus recombinants des non recombinants, un gradient de températures d'hybridation ont été testées pour les deux types d'amorces (Figure 10). Les virus contrôles testés sont les virus KOS, vE99A/K101A et vG121A. L = 100pb DNA Ladder (NEB), 1 = KOS, 2 = vE99A/K101A, 3 = G121A.

4.2 Titres viraux et phénotypes en culture cellulaire du virus E99A/K101ARescue.

Suite à l'isolation d'un clone pur E99A/K101ARescue à l'issue de plusieurs rondes de criblage, des approches de caractérisation de ce virus ont été menées afin d'étudier en culture cellulaire sa cinétique de réplication (figure 12) mais également d'observer son phénotype de plage de lyse (figure13).



Figure 12 : Cinétique de réplication du virus vE99A/K101ARescue. Un titrage des différents virus a été effectué sur une culture de cellules Vero à différents temps post-infection pour une MOI de 5, puis reportés sur ce graphique. Les résultats indiqués correspondent à une expérience faite en duplicat. Les barres d'erreur représentent la variabilité des données mesurées.

Une évaluation de la cinétique des titres viraux produits au cours d'une ronde de réplication, a été effectuée pour les virus KOS, vE99A/K101A et vE99A/K101ARescue. Les titres ont été évalués par comptage de plages de lyse sur une culture de cellules Vero à trois jours postinfection. Le graphique permet de mettre en évidence que le virus vE99A/K101ARescue se réplique de façon plus efficace que le virus mutant vE99A/K101A avec des titres avoisinant 1,0x10⁷ pfu/mL de façon similaire à ceux de KOS (figure 12). Une analyse de la morphologie des plages de lyse a également été réalisée sur culture de cellules Vero puis observée au microscope à contraste de phase au bout de deux jours postinfection. Les clichés obtenus permettent de constater une disparition de plages syncytiales à 37°C et 39°C pour le virus vE99A/K101ARescue contrairement au mutant vE99A/K101A. Puis, il est notamment observé que les plages de lyse formées par vE99A/K101ARescue ont une morphologie similaire à ceux du virus KOS (figure 13). Ainsi, la caractérisation de ce virus vE99A/K101ARescue permet d'observer un phénotype proche de celui du virus sauvage KOS.



Figure 13 : Morphologie des plages de lyse. Le phénotype des plages a été évalué en culture de cellules Vero au bout des deux jours suivant l'infection par les différents virus aux températures indiquées en degrés celsius (°C).

4.3 Effet de vE99A/K101ARescue sur la production de monomères génomiques du VHS-1.

Suite à l'obtention d'un clone pur d'un virus rescue pour la mutation UL24-E99A/K101A et présentant des caractéristiques similaires à celles du virus sauvage, un test de production de monomères a été réalisé à partir de cellules Vero infectées puis récoltées à 24 heures post-infection.



Figure 14 : Analyse génomique virale du VHS-1 sur gel d'électrophorèse en champ pulsé. Des cellules Vero ont été mock-infectées ou infectées par les virus KOS, UL24X, vUL24XRescue, vE99A/K101A ou vE99A/K101ARescue. Ces cellules ont ensuite été récoltées à 24 heures post-infection. L'ADN cellulaire et les différents ADN viraux présents dans les cellules ont été séparés sur gel d'agarose 1.2% grâce à une électrophorèse en champ pulsé. Suite à la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium puis une photo a été prise sous rayons ultraviolets. La position des marqueurs est indiquée à gauche de l'image. La position des différentes formes de l'ADN est indiquée à droite de l'image. L'astérisque indique une bande correspondant à une déchirure mécanique de l'ADN cellulaire.

Les cellules infectées par les virus KOS, vUL24XRescue présentent une certaine production de monomères génomiques (152 kb) tandis que pour les virus UL24X et E99AK101A une forte réduction de cette production est observée. Il est possible de remarquer que vE99AK101ARescue permet de rétablir la formation de ces monomères de façon similaire à KOS et vUL24XRescue (figure 14). Il est également noté, la présence d'ADN de haut poids moléculaire resté piégé au niveau des puits. Afin d'avoir une meilleure appréciation de la production génomique virale, ce gel d'électrophorèse a ensuite été transféré sur membrane nylon chargée positivement puis hybridée avec une sonde radioactive spécifique à un fragment BamHI de l'ADN du VHS-1.





L'hybridation de la membrane avec la sonde BamHIQ[2-³²P]dCTP permet de détecter l'ADN génomique viral qui s'illustre par deux types de marquage. En effet, un marquage est observé au niveau des puits des cellules infectées renfermant des intermédiaires de réplication à fortes structures secondaires et qui n'ont pas pu être résolus lors de la migration. Le traitement à la protéinase K permet d'avoir accès également à l'ADN viral encapsidé. Ainsi, les monomères de 152 kpb clivés à partir de ces intermédiaires complexes de réplication (encapsidés ou non) sont également marqués.

Lorsque les cellules sont infectées par le virus mutant UL24X, une réduction de la production génomique virale en forme de monomères est notée en comparaison aux cellules infectées par KOS et vUL24XRescue puis le ratio d'ADN monomérique à l'ADN des puits semble être réduite dans le cas du mutant UL24X. De la même façon, dans le cas du mutant vE99A/K101A une réduction bien visible de cette production est observée et qui est ensuite rétablie en présence du virus vE99A/K101ARescue (figure 15).



Figure 16 : Quantification de la production de monomères génomiques du VHS-1. En abscisse, les différents virus étudiés sont représentés. En ordonnée, les valeurs numériques correspondent aux valeurs de l'intensité des bandes observées sur le Southern blot radioactif. Expérience réalisée une seule fois

Le logiciel ImageQuantTL a permis de réaliser une quantification de l'intensité des bandes marquées sur la membrane radioactive et qui correspondent aux monomères génomiques du VHS-1. On retrouve une réduction de l'expression des monomères de 60% et 80% pour UL24X et vE99AK101A respectivement, associée à un rétablissement en présence des virus KOS, vUL24XRescue et vE99AK101ARescue (figure 16).

4.4 Comparaison de KOS, UL24X et vUL24XRescue sur la recombinaison génomique

Ayant observé un effet du site catalytique relatif au motif putatif d'endonucléase d'UL24X, dans la synthèse de nouveaux génomes viraux, il demeurait intéressant de savoir si UL24 pourrait posséder des fonctions de recombinase lors de la réplication de l'ADN du VHS-1. Ainsi, un test de recombinaison a été employé dans lequel une enzyme dite Spel (spécifique pour cliver une seule fois chaque unité génomique virale) permet d'évaluer la distribution des différents isomères génomiques lors de la réplication du VHS-1. La littérature rapporte que cette distribution est recombinaison-dépendante ; un virus recombinant du VHS-1 a été construit pour lequel la séquence « a » a été délétée de la jonction L-S, l'absence de cette séquence n'a pas affecté la production des différents isomères lors de la réplication virale. Ainsi, il a pu être mis en évidence que l'isomérisation du génome viral ne fait pas appel à une recombinaison séquence-spécifique mais repose plutôt sur la présence d'homologies de séquences (comme par exemple les séquences « a », « b » ou « c ») et donc sur une recombinaison homologue dite généralisée (Martin and Weber, 1996).

Le traitement protéinase K permet de révéler les monomères génomiques avec une réduction bien visible en présence du virus UL24X tandis que pour les virus KOS et vE99A/K101ARescue, ce traitement permet d'observer les bandes de 152 kb relatives aux monomères, plus intenses. Le clivage enzymatique par Spel, dévoile un profil de différentes bandes spécifiques des fragments issus de la digestion de l'ADN concatémérique et de l'ADN monomérique (figures 17, 18).



В

Α



Figure 17 : Produits de digestion de l'ADN réplicatif (A) et de l'ADN monomérique (B) du VHS-1. (A) Le clivage de l'ADN réplicatif par l'enzyme Spe I permet de donner naissance à 4 fragments de tailles différentes selon l'orientation de la grande région unique : deux fragments de 152 kpb, un fragment de 118 kpb et un fragment de 186 kpb. Lorsque l'orientation de l'U_L de deux monomères consécutifs sont dans le même sens, le clivage par Spe I génère des fragments de 152 kpb, il existe donc deux possibilités ; les deux U_L consécutifs sont dirigés vers la droite ou vers la gauche. (B) Lorsque Spe I clive l'ADN monomérique, il y a production de quatre fragments différents en fonction de l'orientation de U_L : des fragments de 107, 81, 71 et 45 kpb.



Figure 18 : Analyse de la recombinaison génomique virale sur gel d'électrophorèse à champs pulsé. Des cellules Vero ont été mock-infectées ou infectées avec KOS, UL24X ou vUL24XRescue à une MOI de 5, puis récoltées à 24 heures post-infection. Un traitement protéinase K a été effectué suivi ou non d'une digestion par l'enzyme Spel. Expérience réalisée une fois.

Le gel a ensuite été transféré sur une membrane comme lors du test de production de monomères génomiques puis hybridée avec la sonde BamHIQ[2-³²P]dCTP (figure 19). Cette sonde détecte uniquement trois des quatre populations d'isomères produites lors de la réplication virale ; à savoir les deux populations d'isomères de 152 et la population de 186 kpb. L'isomère de 118 kpb n'est donc pas détectable avec cette sonde. Les autres bandes visualisées correspondent au clivage de l'ADN monomérique par Spe I.



Figure 19 : Analyse de la recombinaison génomique virale par Southern-Blot. La sonde spécifique va marquer l'ADN viral resté piégé au niveau des puits mais également les ADN concatémérique et monomérique. Le traitement à la protéinase K permet de digérer les protéines des capsides virales contenant les monomères génomiques viraux issus du clivage des intermédiaires de réplication. L'enzyme Spel contribue à libérer les fragments issus du clivage de l'ADN concatémérique et de l'ADN monomérique. La taille des fragments marqués sont indiquées par les flèches. Expérience réalisée une fois.

Lorsqu'on traite à la protéinase K, l'infection des cellules Vero par UL24X permet d'observer une réduction dans la quantité de monomères en comparaison à KOS et UL24XRescue (figure 19). La digestion par Spel permet de remarquer que l'intensité des bandes de 152 kpb est relativement identique lorsqu'on compare KOS et UL24XRescue. L'observation pertinente à noter, est l'augmentation de l'expression de l'isomère de 186 kpb lorsque les cellules sont infectées par UL24X puis la réduction de la bande de 152 kpb.



Figure 20 : Quantification de l'expression des isomères génomiques du VHS-1. En abscisse, les différents virus étudiés sont représentés. En ordonnée, les valeurs numériques correspondent aux valeurs de l'intensité des bandes observées sur le Southern-blot radioactif.

L'analyse de la quantification par phosphorimager permet de constater une production de l'isomère de 152 kpb, 4 à 5 fois supérieure à celle de l'isomère 186 kpb en présence des virus KOS et UL24XRescue respectivement. Toutefois, l'infection par UL24X révèle une réduction de 36% de l'expression de cet isomère de 152 kpb en comparaison à celle de KOS, associée à une augmentation de 50% dans la production de l'isomère de 186 kpb (figure 20).

5 DISCUSSION

Des résultats préliminaires obtenus au sein de notre laboratoire, ont permis d'observer une réduction dans la quantité de monomères lorsque des cellules Vero sont infectées par UL24X. D'autre part, ce profil de réduction a également été noté pour un virus muté au niveau du site catalytique du motif putatif d'endonucléase d'UL24 nommé vE99A/K101A. Il s'agit d'un mutant pour leguel, des mutations de substitution pour l'alanine ont été réalisées au niveau des résidus acide glutamique et lysine en position 99 et 101 respectivement. Ainsi, l'objectif de notre étude était de déterminer l'importance du motif prédit d'endonucléase dans la production de génomes viraux puis d'étudier le rôle d'UL24 dans la recombinaison génomique lors de la réplication du VHS-1. Dans cette visée, nous avons donc réussi à isoler un clone viral rescue du mutant vE99A/K101A à travers une approche de recombinaison homologue et plusieurs séries de criblages spécifiques par PCR que nous avons développées. Une évaluation de la cinétique de réplication et du phénotype en culture cellulaire, a permis de constater que ce virus rescue présente des caractéristiques phénotypiques proches de celles du virus KOS. En effet, le test de production de monomères génomiques a révélé que le rescue vE99A/K101A permet de restaurer la quantité de monomères en comparaison avec le virus mutant vE99A/K101A. Ceci soutient notre hypothèse selon laquelle le motif d'endonucléase d'UL24 tient un rôle déterminant dans la synthèse de nouveaux génomes viraux et ainsi que ses résidus E99 et K101 sembleraient donc importants pour une réplication efficace du virus VHS-1 en contexte d'infection. Toutefois, le mécanisme précis par lequel UL24 serait impliqué dans cette production génomique virale reste à être déterminé. Tel que mentionné dans l'introduction, UL24 et UL12 pourraient agir en synergie afin d'induire le clivage de l'ADN réplicatif lors de la réplication de l'ADN du VHS-1. De plus, nous supposons qu'UL24 utiliserait un processus de recombinaison homologue dans la production de monomères génomigues du VHS-1 lors de la réplication de l'ADN. Ainsi, dans une seconde partie, un test de recombinaison a été réalisé puis a révélé une distribution non équimolaire des isomères génomiques en présence du virus UL24X avec une augmentation de l'isomère 186. Cette observation n'a été reportée qu'une seule fois, ainsi ce résultat demeure préliminaire et nécessite donc d'être reproduite ultérieurement. La littérature rapporte que le mécanisme de recombinaison chez les herpèsvirus n'est pas clairement compris. Cependant, il s'agit d'un mécanisme couplé à la réplication virale, pouvant impliquer des facteurs cellulaires (Thiry et al., 2005).

Plusieurs éléments mettent en évidence que le génome viral du VHS-1 est synthétisé selon un mode de cercle roulant (Bataille and Epstein, 1994), ceci aboutit à la production de concatémères qui seront clivés en unités génomiques. Le clivage s'effectue au niveau d'un signal d'encapsidation présent dans la séquence « a » qui est localisé entre les régions U_L et U_S (Tong and Stow, 2010). Ces clivages vont ainsi générer des coupures doubles brins qui représentent d'importantes sources d'évènements de recombinaison.

Ces coupures permettent d'initier des évènements de recombinaison mais également d'activer les processus de réponses liées aux dommages à l'ADN. En effet, la réplication ADN de nombreux virus déclenche une réponse dite de dommage à l'ADN, ceci s'explique par le fait que les intermédiaires de réplication sont détectés par la cellule hôte comme de l'ADN endommagé. Par exemple, lors de l'infection par le VHS-1, il a été observé l'induction de la signalisation ataxia telangiectasia_mutated (ATM) qui est une voie activée en réponse à une altération de l'ADN (Shirata et al., 2005). Néanmoins, certains virus ne manquent pas de prendre avantage de ce système de protection et de le détourner afin de garantir plusieurs aspects de leur réplication. Par exemple, il a été mis en évidence que des facteurs cellulaires de réparation par recombinaison homologue (HRR) tels que Rad51 et Rad52 participent à la recombinaison homologue du génome viral du VHS-1. De plus, il a également été montré qu'ICP8 et UL12 du VHS-1, interagissent avec des composants de la machinerie de réparation d'ADN de la cellule hôte (Taylor and Knipe, 2004; Balasubramanian et al., 2010). Par ailleurs, lors de la réponse cellulaire de dommage à l'ADN, des facteurs de réparation utilisant la recombinaison homologue sont recrutés au niveau du site de synthèse du génome viral du virus Epstein-Barr (EBV). Ces facteurs de réparation se composent de la protéine de réplication A (RPA), Rad51, Rad52 et du complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). Il a ainsi été démontré, par des approches de PCR et d'immunoprécipitation, que ces facteurs sont recrutés puis chargés au niveau des nouveaux génomes viraux synthétisés dans les compartiments de réplication. Ces recrutements pourraient permettre de contribuer au maintien de l'intégrité du génome viral et de contrecarrer les dommages à l'ADN potentiellement létales (Kudoh et al., 2009). Les protéines E1 et E7 du papillomavirus (HPV) sont également d'excellents inducteurs de la voie ATM suite à l'infection de cellules épithéliales ; cette activation lui permet de répliquer de manière efficace son génome de façon végétative (Sakakibara et al., 2013). L'infection par le HCMV a également démontré que certains composants viraux tels que les protéines pUL35 et pUL27 sont capables d'interagir avec les molécules cellulaires liées aux réponses aux dommages à l'ADN (Xiaofei and Kowalik, 2014). Ces différentes observations stimulent

43

l'hypothèse selon laquelle UL24 pourrait interagir avec des facteurs cellulaires appartenant au système de réparation de dommages à l'ADN, afin de favoriser la recombinaison du génome viral lors de la réplication du VHS-1. Il serait donc intéressant d'employer, par exemple, des approches de co-immunoprécipitation ou de double hybride afin de tester l'interaction d'UL24 avec différentes protéines spécifiques de la réponse aux dommages à l'ADN.

Au cours de la réplication virale, les génomes viraux se recombinent à haute fréquence donnant naissance ainsi, à un réseau fortement ramifié. Il est donc nécessaire de disposer d'un mécanisme capable de résoudre de telles structures avant l'encapsidation de l'ADN. Le motif prédit d'endonucléase localisé au sein de la partie N-terminale de la protéine UL24 a été identifié par des analyses bioinformatiques et porte la signature PD-(D/E)XK caractéristique de la superfamille d'endonucléases (Knizewski et al., 2006). Nos résultats ont permis d'observer que le site catalytique de ce motif putatif joue un rôle important dans la production de monomères génomiques du VHS-1. En effet, chez un mutant vE99A/K101A, une réduction drastique de 80% de la quantité de monomères a été évaluée en comparaison à celle de cellules infectées par le virus sauvage KOS ainsi qu'une réduction de 66% par rapport à des cellules infectées par le virus vE99A/K101ARescue. L'alcaline nucléase encodée par le gène ul12 du VHS-1 possède également un motif de type PD-(D/E)XK. Cette protéine UL12 est connue pour interagir avec ICP8, d'autre part des essais biochimiques, ont démontré qu'UL12 et ICP8 peuvent médier, in vitro, l'échange de brins d'ADN viral (Reuven et al., 2003). En effet, il a été proposé qu'UL12 en coopération avec ICP8, tiennent une fonction de recombinase qui est similaire à celle de la recombinase Red du bactériophage 22 (revu par (Weller and Sawitzke, 2014)). Finalement, cette alcaline nucléase est connue pour être impliquée dans la résolution de structures branchées des formes intermédiaires de réplication précédant l'encapsidation (revu par (Weller and Sawitzke, 2014)). En effet, des cellules infectées par un virus muté au niveau d'UL12 présentent une réduction dans la synthèse d'ADN viral et dans le bourgeonnement nucléaire des capsides néoformées, il est aussi noté la formation de capsides aberrantes et de virions défectueux dans leur caractère infectieux (Porter and Stow, 2004a). L'absence de cette alcaline nucléase chez un virus recombinant, génère des intermédiaires de réplication présentant une structure beaucoup plus complexe avec une augmentation des structures branchées (Martinez et al., 1996). Ces observations suggèrent ainsi, un rôle d'UL12 dans la résolution des intermédiaires de recombinaison précédant l'empaquetage de l'ADN. Cette résolution influe fortement sur la qualité d'encapsidation de l'ADN, sur la stabilité des capsides formées, sur la sortie du noyau et sur le potentiel infectieux des virions libérés par

exocytose (Weller et al., 1990b; Shao et al., 1993; Martinez et al., 2002; Porter and Stow, 2004a). Des virus recombinants n'exprimant plus UL12, présentent une croissance en culture cellulaire réduite de 100 à 10000 fois, et notamment une réduction d'environ 1000 fois de la neurovirulence suite à une inoculation intracérébrale chez des souris (Fujii et al., 2014). Ainsi, UL12 joue un rôle critique dans la réplication du VHS-1 in vitro et dans la virulence in vivo. Lors du test de production de monomères, nous avons constaté que pour le mutant vE99A/K101A, une plus grande quantité d'ADN est maintenue au niveau du puits du gel suite à la migration électrophorétique. Ceci peut se traduire par le fait que les intermédiaires de réplication n'ont pas pu être résolus par clivage en l'absence d'UL24. Ainsi, ceci suggère qu'UL24 en particulier le site catalytique de son motif prédit d'endonucléase, pourrait lui permettre d'adopter une fonction de recombinase de façon similaire à UL12. Il est également possible qu'UL24 interagisse avec UL12 puis d'autres facteurs afin d'assurer cette fonction.

En conclusion, notre étude a permis d'observer un effet d'UL24 dans la production de nouveaux génomes viraux lors de la réplication du VHS-1, et d'identifier le site catalytique d'un motif prédit d'endonucléase comme étant le domaine critique. Nous avons également constaté un impact d'UL24 au niveau de la distribution des isomères lors de la recombinaison génomique virale, toutefois cette observation requiert d'être reproduite. Les mécanismes précis impliqués, restent également à être déterminés au cours d'expériences futures. Récemment, il a été mis en évidence qu'UL12 est régulée par phosphorylation de résidus tyrosine (Fujii et al., 2014). Ainsi, il serait intéressant d'explorer l'existence d'une régulation par phosphorylation de tyrosine au sein de la protéine UL24 afin de déterminer si de telles modifications post-traductionnelles peuvent impacter grandement la fonction d'UL24 au cours de la réplication virale du VHS-1.

6 REFERENCES

Allen, U.D., and Robinson, J.L. (2014) Prevention and management of neonatal herpes simplex virus infections. *Paediatr Child Health* **19**: 201-212.

Baines, J.D., Ward, P.L., Campadelli-Fiume, G., and Roizman, B. (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**: 6414-6424.

Balasubramanian, N., Bai, P., Buchek, G., Korza, G., and Weller, S.K. (2010) Physical Interaction between the Herpes Simplex Virus Type 1 Exonuclease, UL12, and the DNA Double-Strand Break-Sensing MRN Complex. *J Virol* **84**: 12504-12514.

Baringer, J.R. (2008) Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin* 26: 657-674, viii.

Bataille, D., and Epstein, A. (1994) Herpes Simplex Virus Replicative Concatemers Contain L Components in Inverted Orientation. *Virology* **203**: 384-388.

Bataille, D., and Epstein, A.L. (1995) Herpes simplex virus type 1 replication and recombination. *Biochimie* **77**: 787-795.

Bataille, D., and Epstein, A.L. (1997a) Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J Virol* **71**: 7736-7743.

Bataille, D., and Epstein, A.L. (1997b) Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J Virol* **71**: 7736-7743.

Bertrand, L., Leiva-Torres, G.A., Hyjazie, H., and Pearson, A. (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* **84**: 109-118.

Billingham, R.E., and Boswell, T. (1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **141**: 392-406.

Bowman, B.R., Baker, M.L., Rixon, F.J., Chiu, W., and Quiocho, F.A. (2003) Structure of the herpesvirus major capsid protein. *The EMBO Journal* **22**: 757-765.

Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L. (2001) The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis. *Virus Genes* **22**: 219-230.

Cai, W., and Schaffer, P.A. (1992) Herpes simplex virus type 1 ICPO regulates expression of immediateearly, early, and late genes in productively infected cells. *J Virol* **66**: 2904-2915.

Campadelli-Fiume, G., and Roizman, B. (2006) The Egress of Herpesviruses from Cells: the Unanswered Questions. *J Virol* **80**: 6716-6719.

Chen, S.H., Kramer, M.F., Schaffer, P.A., and Coen, D.M. (1997) A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **71**: 5878-5884.

Cook, W.J., and Coen, D.M. (1996) Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 UL24 mRNA expression via differential polyadenylation. *Virology* **218**: 204-213.

Corey, L., and Wald, A. (2009a) Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* **361**: 1376-1385.

Corey, L., and Wald, A. (2009b) Maternal and Neonatal Herpes Simplex Virus Infections. *New Engl J Med* **361**: 1376-1385.

Davison, A., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G., McGeoch, D., Minson, A. et al. (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**: 171-177.

Desai, B.V., and Morrison, D.A. (2006) An Unstable Competence-Induced Protein, CoiA, Promotes Processing of Donor DNA after Uptake during Genetic Transformation in Streptococcus pneumoniae. *J Bacteriol* **188**: 5177-5186.

Feder, H.M., Jr., and Long, S.S. (1983) Herpetic whitlow. Epidemiology, clinical characteristics, diagnosis, and treatment. *Am J Dis Child* **137**: 861-863.

Ferrara, N. (2004) Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* **25**: 581-611.

Fujii, H., Kato, A., Mugitani, M., Kashima, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H. et al. (2014) The UL12 protein of herpes simplex virus 1 is regulated by tyrosine phosphorylation. *J Virol* **88**: 10624-10634.

Gan, L., Speir, J.A., Conway, J.F., Lander, G., Cheng, N., Firek, B.A. et al. (2006) Capsid Conformational Sampling in HK97 Maturation Visualized by X-Ray Crystallography and Cryo-EM. *Structure* **14**: 1655-1665.

Garber, D.A., Schaffer, P.A., and Knipe, D.M. (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**: 5885-5893.

Gilden, D.H., Mahalingam, R., Cohrs, R.J., and Tyler, K.L. (2007) Herpesvirus infections of the nervous system. *Nat Clin Pract Neuro* **3**: 82-94.

Gill, M.J., Arlette, J., and Buchan, K.A. (1990) Herpes simplex virus infection of the hand. *J Am Acad Dermatol* **22**: 111-116.

Goldstein, J.N., and Weller, S.K. (1998) The Exonuclease Activity of HSV-1 UL12 Is Required forin VivoFunction. *Virology* **244**: 442-457.

Griffiths, A., and Coen, D.M. (2003) High-Frequency Phenotypic Reversion and Pathogenicity of an Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Mutant. *J Virol* **77**: 2282-2286.

Grinde, B. (2013) Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol* **5**.

Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C. (2003) Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* **302**: 1396-1398.

Halford, W.P., Gebhardt, B.M., and Carr, D.J. (1996) Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol* **70**: 5051-5060.

Handler, C.G., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H. (1996) Oligomeric structure of glycoproteins in herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**: 6067-6070.

Hannah, B.P., Heldwein, E.E., Bender, F.C., Cohen, G.H., and Eisenberg, R.J. (2007) Mutational Evidence of Internal Fusion Loops in Herpes Simplex Virus Glycoprotein B. *J Virol* **81**: 4858-4865.

Homa, F.L., and Brown, J.C. (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**: 107-122.

Honess, R.W., and Roizman, B. (1974) Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *J Virol* **14**: 8-19.

Huang, J., Lazear, H.M., and Friedman, H.M. (2011) Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus. *Virology* **409**: 12-16.

Hunsperger, E.A., and Wilcox, C.L. (2003) Capsaicin-induced reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in sensory neurons in culture. *J Gen Virol* **84**: 1071-1078.

Hutchinson, L., and Johnson, D.C. (1995) Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J Virol* **69**: 5401-5413.

Jacobson, J.G., Martin, S.L., and Coen, D.M. (1989) A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J Virol* **63**: 1839-1843.

Jacobson, J.G., Chen, S.H., Cook, W.J., Kramer, M.F., and Coen, D.M. (1998) Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* **242**: 161-169.

James, S.H., Larson, K.B., Acosta, E.P., and Prichard, M.N. (2015) Helicase-Primase as a Target of New Therapies for Herpes Simplex Virus Infections. *Clin Pharmacol Ther* **97**: 66-78.

Johnson, D.C., and Ligas, M.W. (1988) Herpes simplex viruses lacking glycoprotein D are unable to inhibit virus penetration: quantitative evidence for virus-specific cell surface receptors. *J Virol* **62**: 4605-4612.

Johnson, D.C., and Baines, J.D. (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Micro* **9**: 382-394.

Jones, B.R. (1958) The clinical features of viral keratitis and a concept of their pathogenesis. *Proc R Soc Med* **51**: 917-924.

Jurak, I., Hackenberg, M., Kim, J.Y., Pesola, J.M., Everett, R.D., Preston, C.M. et al. (2014) Expression of Herpes Simplex Virus 1 MicroRNAs in Cell Culture Models of Quiescent and Latent Infection. *J Virol* **88**: 2337-2339.

Kasem, S., Yu, M.H.H., Yamada, S., Kodaira, A., Matsumura, T., Tsujimura, K. et al. (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* **400**: 259-270.

Kemper, B., Jensch, F., Depka-Prondzynski, M.v., Fritz, H.-J., Borgmeyer, U., and Mizuuchi, K. (1984) Resolution of Holliday Structures by Endonuclease VII As Observed in Interactions with Cruciform DNA. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **49**: 815-825.

Knipe, D.M., and Cliffe, A. (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* **6**: 211-221.

Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N.V., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2006) Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *J Virol* **80**: 2575-2577.

Kosinski, J., Feder, M., and Bujnicki, J. (2005) The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function. *BMC Bioinformatics* **6**: 172.

Kudoh, A., Iwahori, S., Sato, Y., Nakayama, S., Isomura, H., Murata, T., and Tsurumi, T. (2009) Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol* **83**: 6641-6651.

La Boissière, S., Hughes, T., and O'Hare, P. (1999) HCF-dependent nuclear import of VP16. *The EMBO Journal* **18**: 480-489.

Leiva-Torres, G.A., Rochette, P.A., and 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.

Liu, J., and Morrical, S. (2010) Assembly and dynamics of the bacteriophage T4 homologous recombination machinery. *Virol J* **7**: 357.

Lymberopoulos, M.H., and Pearson, A. (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**: 397-409.

Lymberopoulos, M.H., Bourget, A., Ben Abdeljelil, N., and Pearson, A. (2011) Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* **412**: 341-348.

Mahiet, C., Ergani, A., Huot, N., Alende, N., Azough, A., Salvaire, F. et al. (2012) Structural Variability of the Herpes Simplex Virus 1 Genome In Vitro and In Vivo. *J Virol* **86**: 8592-8601.

Makhov, A.M., and Griffith, J.D. (2006) Visualization of the annealing of complementary single-stranded DNA catalyzed by the herpes simplex virus type 1 ICP8 SSB/recombinase. *J Mol Biol* **355**: 911-922.

Martin, D.W., and Weber, P.C. (1996) The a sequence is dispensable for isomerization of the herpes simplex virus type 1 genome. *J Virol* **70**: 8801-8812.

Martinez, R., Goldstein, J.N., and Weller, S.K. (2002) The product of the UL12.5 gene of herpes simplex virus type 1 is not essential for lytic viral growth and is not specifically associated with capsids. *Virology* **298**: 248-257.

Martinez, R., Sarisky, R.T., Weber, P.C., and Weller, S.K. (1996) Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J Virol* **70**: 2075-2085. McMillan, J.A., Weiner, L.B., Higgins, A.M., and Lamparella, V.J. (1993) Pharyngitis associated with herpes simplex virus in college students. *Pediatr Infect Dis J* **12**: 280-284.

Medawar, P.B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* **29**: 58-69.

Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., and Granzow, H. (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**: 423-429.

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

Mizuuchi, K., Kemper, B., Hays, J., and Weisberg, R.A. (1982) T4 endonuclease VII cleaves holliday structures. *Cell* **29**: 357-365.

Mocarski, E.S., Post, L.E., and Roizman, B. (1980) Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: Insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell* **22**: 243-255.

Moriya, A., Yoshiki, A., Kita, M., Fushiki, S., and Imanishi, J. (1994) Heat shock-induced reactivation of herpes simplex virus type 1 in latently infected mouse trigeminal ganglion cells in dissociated culture. *Arch Virol* **135**: 419-425.

Müller, B., Jones, C., and West, S.C. (1990) T7 endonuclease I resolves Holliday junctions formed in vitro by RecA protein. *Nucleic Acids Res* **18**: 5633-5636.

Nascimento, R., and Parkhouse, R.M. (2007) Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J Gen Virol* **88**: 1446-1453.

Nascimento, R., Costa, H., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2011) MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Arch Virol* **156**: 375-386.

Newcomb, W.W., Juhas, R.M., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Burch, A.D., Weller, S.K., and Brown, J.C. (2001) The UL6 Gene Product Forms the Portal for Entry of DNA into the Herpes Simplex Virus Capsid. *J Virol* **75**: 10923-10932.

Newcomb, W.W., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Sheaffer, A.K., Tenney, D.J. et al. (2000) Isolation of Herpes Simplex Virus Procapsids from Cells Infected with a Protease-Deficient Mutant Virus. *J Virol* **74**: 1663-1673.

Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., and Helenius, A. (2000) Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol Cell Biol* **20**: 4922-4931.

Openshaw, H., Stampalia, L., and Asher, L.S. (1978) Retrograde axoplasmic transport of herpes simplex virus. *Trans Am Neurol Assoc* **103**: 238-239.

Pearson, A., and Coen, D.M. (2002) Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **76**: 10821-10828.

Pearson, A., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2004) ICP27 selectively regulates the cytoplasmic localization of a subset of viral transcripts in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* **78**: 23-32.

Pingoud, A., and Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**: 3705-3727.

Pivetti-Pezzi, P., Accorinti, M., Maria Colabelli-Gisoldi, R.A., Pirraglia, M.P., and Sirianni, M.C. (1999) Herpes Simplex Virus Vaccine in Recurrent Herpetic Ocular Infection. *Cornea* **18**: 47-51.

Porter, I.M., and Stow, N.D. (2004a) Replication, recombination and packaging of amplicon DNA in cells infected with the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12. *J Gen Virol* **85**: 3501-3510.

Porter, I.M., and Stow, N.D. (2004b) Replication, recombination and packaging of amplicon DNA in cells infected with the herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease null mutant ambUL12. *J Gen Virol* **85**: 3501-3510.

Reuven, N.B., Staire, A.E., Myers, R.S., and Weller, S.K. (2003) The Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease and Single-Stranded DNA Binding Protein Mediate Strand Exchange In Vitro. *J Virol* **77**: 7425-7433.

Rixon, F.J. (1993) Structure and assembly of herpesviruses. Semin Virol 4: 135-144.

Rubright, J.H., and Shafritz, A.B. (2011) The herpetic whitlow. *J Hand Surg Am* **36**: 340-342.

Ruyechan, W.T., Morse, L.S., Knipe, D.M., and Roizman, B. (1979) Molecular Genetics of Herpes Simplex Virus II. Mapping of the Major Viral Glycoproteins and of the Genetic Loci Specifying the Social Behavior of Infected Cells. *J Virol* **29**: 677-697.

Sakakibara, N., Chen, D., and McBride, A.A. (2013) Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathog* **9**: e1003321.

Schumacher, A.J., Mohni, K.N., Kan, Y., Hendrickson, E.A., Stark, J.M., and Weller, S.K. (2012) The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog* **8**: e1002862.

Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.

Severini, A., Scraba, D.G., and Tyrrell, D.L. (1996) Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**: 3169-3175.

Severini, A., Morgan, A.R., Tovell, D.R., and Tyrrell, D.L.J. (1994) Study of the Structure of Replicative Intermediates of HSV-1 DNA by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Virology* **200**: 428-435.

Shao, L., Rapp, L.M., and Weller, S.K. (1993) Herpes simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus. *Virology* **196**: 146-162.

Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kiyono, T. et al. (2005) Activation of Ataxia Telangiectasia-mutated DNA Damage Checkpoint Signal Transduction Elicited by Herpes Simplex Virus Infection. *J Biol Chem* **280**: 30336-30341.

Siew, V.-K., Duh, C.-Y., and Wang, S.-K. (2009) Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *J Biomed Sci* **16**: 107.

Simmons, A. (2002) Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**: S71-77.

Sleth, J.C. (2008) [Herpetic whitlow: a forgotten occupational hazard]. *Ann Fr Anesth Reanim* 27: 350-351.

Smith, C.A., Bates, P., Rivera-Gonzalez, R., Gu, B., and DeLuca, N.A. (1993) ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J Virol* **67**: 4676-4687.

Stark, T.J., Arnold, J.D., Spector, D.H., and Yeo, G.W. (2012) High-Resolution Profiling and Analysis of Viral and Host Small RNAs during Human Cytomegalovirus Infection. *J Virol* **86**: 226-235.

Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Knizewski, L., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2012) Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily. *Nucleic Acids Res* **40**: 7016-7045.

Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T.K., Hein, M.Y., Huang, S.-X. et al. (2012) Decoding Human Cytomegalovirus. *Science* **338**: 1088-1093.

Tang, K.W., Norberg, P., Holmudden, M., Elias, P., and Liljeqvist, J.A. (2014) Rad51 and rad52 are involved in homologous recombination of replicating herpes simplex virus DNA. *PLoS One* **9**: e111584.

Taylor, T.J., and Knipe, D.M. (2004) Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments: Association of Cellular DNA Replication, Repair, Recombination, and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8. *J Virol* **78**: 5856-5866.

Taylor, T.J., Brockman, M.A., McNamee, E.E., and Knipe, D.M. (2002) Herpes simplex virus. *Front Biosci* **7**: d752-764.

Thiry, E., Meurens, F., Muylkens, B., McVoy, M., Gogev, S., Thiry, J. et al. (2005) Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol* **15**: 89-103.

Tong, L., and Stow, N.D. (2010) Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Packaging Signal Mutations in the Context of the Viral Genome. *J Virol* **84**: 321-329.

Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M., and Cullen, B.R. (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**: 780-783.

van Lint, A.L., Torres-Lopez, E., and Knipe, D.M. (2007) Immunization with a Replication-Defective Herpes Simplex Virus 2 Mutant Reduces Herpes Simplex Virus 1 Infection and Prevents Ocular Disease. *Virology* **368**: 227-231.

Wagner, E.K., and Bloom, D.C. (1997) Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev* **10**: 419-443.

Wang, S.-K., Duh, C.-Y., and Wu, C.-W. (2004) Human Cytomegalovirus UL76 Encodes a Novel Virion-Associated Protein That Is Able To Inhibit Viral Replication. *J Virol* **78**: 9750-9762.

Watanabe, D. (2010) Medical application of herpes simplex virus. *J Dermatol Sci* 57: 75-82.

Weller, S.K., and Coen, D.M. (2012) Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.

Weller, S.K., and Sawitzke, J.A. (2014) Recombination Promoted by DNA Viruses: Phage λ to Herpes Simplex Virus. *Annu Rev Microbiol* **68**: 237-258.

Weller, S.K., Seghatoleslami, M.R., Shao, L., Rowse, D., and Carmichael, E.P. (1990a) The Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease is Not Essential for Viral DNA Synthesis: Isolation and Characterization of a lacZ Insertion Mutant. *J Gen Virol* **71**: 2941-2952.

Weller, S.K., Seghatoleslami, M.R., Shao, L., Rowse, D., and Carmichael, E.P. (1990b) The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is not essential for viral DNA synthesis: isolation and characterization of a lacZ insertion mutant. *J Gen Virol* **71** (**Pt 12**): 2941-2952.

Whitbeck, J.C., Lawrence, W.C., and Bello, L.J. (1994) Characterization of the Bovine Herpesvirus 1 Homolog of the Herpes Simplex Virus 1 UL24 Open Reading Frame. *Virology* **200**: 263-270.

Whitby, M. (2007) Holliday junction resolution. In *Molecular Genetics of Recombination*. Aguilera, A., and Rothstein, R. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 169-199.

Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001) Herpes simplex virus infections. *The Lancet* **357**: 1513-1518.

Wilcox, C., Smith, R., Freed, C., and Johnson, E. (1990) Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience* **10**: 1268-1275.

Wilcox, C.L., and Johnson, E.M. (1987) Nerve growth factor deprivation results in the reactivation of latent herpes simplex virus in vitro. *J Virol* **61**: 2311-2315.

Wilcox, C.L., and Johnson, E.M. (1988) Characterization of nerve growth factor-dependent herpes simplex virus latency in neurons in vitro. *J Virol* **62**: 393-399.

Xiaofei, E., and Kowalik, T.F. (2014) The DNA damage response induced by infection with human cytomegalovirus and other viruses. *Viruses* **6**: 2155-2185.

Zabolotny, J.M., Krummenacher, C., and Fraser, N.W. (1997) The herpes simplex virus type 1 2.0-kilobase latency-associated transcript is a stable intron which branches at a guanosine. *J Virol* **71**: 4199-4208.

Zhou, Z.H., Dougherty, M., Jakana, J., He, J., Rixon, F.J., and Chiu, W. (2000) Seeing the Herpesvirus Capsid at 8.5 Å. *Science* **288**: 877-880.