

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**UL24 DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX 1 RÉGULE À LA BAISSSE  
L'EXPRESSION D'OLIGOADENYLATE SYNTHETASE-LIKE EN  
CONTEXTE D'INFECTION**

Par

Fernando Sánchez Quete

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

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Denis Girard  
INRS Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Jörg Hermann Fritz  
Département de Microbiologie et  
Immunologie  
Université McGill

Directeur de recherche

Angela Pearson  
INRS Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie



*“Thinking about HSV episomes is my way to realize that  
I am never technically alone. There is always a strong  
presence inside myself (my neurons) disposed to emerge”*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Angela Pearson pour son encadrement, son soutien et notamment de m'avoir proposé ce projet sur l'OASL. Votre confiance et attention prêtées sont énormément appréciées. Merci pour toutes les critiques et le savoir transmis qui enrichissent mon avenir scientifique. Au cours des deux dernières années, j'espère aussi d'avoir pris, au moins par « osmose », une grande partie de vos connaissances. Merci mille fois pour cela.

Je voudrais également remercier la fondation Armand-Frappier pour la bourse d'étude octroyée. Ce soutien a été indispensable pour mes études. Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire et autres collègues avec qui j'ai développé une amitié et partagé de moments inoubliables à l'institut et ailleurs ; leur aide et les échanges ont été bien souvent une source d'énergie et de motivation pour améliorer ma vie académique et personnelle.

Merci sincèrement à toute ma famille, spécialement à ma mère dont les prières adressées à l'univers ont fait toujours leur effet positive malgré la distance.

Finalement, je remercie le pouvoir des livres pouvant parfois changer la conception de notre monde. Parmi cet héritage indirect, aujourd'hui je fais ressortir ceux qui proviennent des professeurs Goethe (*Fausto*) et Hawking (*The Grand Design*), deux exemplaires qui nourrissent encore ma notion de science classique et moderne, respectivement.

## RÉSUMÉ

La réponse immunitaire innée contre le virus herpès simplex 1 (HSV-1) comprend, entre autres, la détection du génome viral par le senseur d'ADN cGAS. L'activation de cGAS mène à la production des interférons (IFNs) et l'expression en aval des *ISGs* (*IFN-stimulated genes*) qui déclenchent l'état antiviral. Cependant, le HSV-1 induit l'*ISG OASL* qui, dans le cas des infections par virus à ADN, a un effet proviral dû au fait que l'*OASL* bloque cGAS. Cette induction est suivie d'une régulation à la baisse à des temps tardifs de l'infection dont le mécanisme est inconnu. La protéine virale tardive *UL24* est impliquée dans l'évasion immunitaire et le succès de la réplication. Nous avons donc testé l'impact de celle-ci sur l'expression d'*OASL*. Nos résultats supportent un modèle où l'*OASL* est induite dès 5 heures post infection (hpi) et ensuite modulée à la baisse d'une manière *UL24*-dépendante à 12 hpi via *IRF3*. De plus, les niveaux des transcrits de l'*IFN-β* et des *ISGs* (*CXCL10* et *ISG54*) sont consistants avec ce modèle et l'effet d'*OASL* sur cGAS. Il ressort de cette étude en plus un rôle précoce d'*UL24* dans l'activation de *STAT1*. Nos résultats montrent une nouvelle fonction immunomodulatrice d'*UL24* dans l'infection par HSV-1.

**Mots clés :** Virus herpès simplex 1 ; *UL24* ; *OASL* ; *IRF3* ; *STAT1* ; *ISGs* ; interféron.



## ABSTRACT

The innate immune response against herpes simplex virus 1 (HSV-1) involves, among other things, viral genome recognition by the DNA sensor cGAS. Activation of cGAS induces interferon (IFN) production and downstream expression of *ISGs* (*IFN-stimulated genes*), which turn on antiviral defenses. Initially, HSV-1 promotes *OASL* expression, an ISG that has a proviral effect during infection with DNA viruses by inhibiting cGAS activity. However, *OASL* induction by HSV-1 then drops down late in infection through an unknown mechanism. The HSV-1 late protein UL24 is required for optimal viral replication, and contributes to immune evasion. Herein, we tested the role of UL24 in regulating *OASL* expression. Our results suggest that both early upregulation at 5 hour post infection (hpi), and the subsequent UL24-dependent downregulation of *OASL* expression at 12 hpi are consequences of the modulation of IRF3 activation. Moreover, mRNAs levels of the *IFN-β* and *ISGs* (*CXCL10* and *ISG54*) are consistent with this model and the impact of *OASL* on cGAS. In addition, we identified a new role for UL24 in the regulation of STAT1 phosphorylation at S727 early in infection. Our results demonstrate a new role for UL24 in the modulation of the innate immune response by HSV-1.

**Keywords:** Herpes simplex virus 1; UL24; *OASL*; IRF3; STAT1; *ISGs*; interferon.





# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1    LE VIRUS HERPES SIMPLEX 1 .....	1
1.1.1 <i>Impact sur la santé publique</i> .....	1
1.1.2 <i>Taxonomie</i> .....	2
1.1.3 <i>Structure de la particule virale</i> .....	4
1.1.4 <i>Structure du génome viral</i> .....	6
1.1.5 <i>Cycle de l'infection lytique</i> .....	6
1.1.6 <i>Cycle de l'infection latente</i> .....	13
1.2    LA PROTEINE TARDIVE UL24 DU HSV-1 .....	16
1.2.1 <i>Études d'UL24 décrites en contexte d'infection</i> .....	17
1.2.1 <i>Études d'UL24 décrites en contexte d'expression ectopique</i> .....	19
1.3    L'IMMUNITÉ INNÉE CONTRE LE HSV-1 .....	20
1.3.1 <i>Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires</i> .....	21
1.3.2 <i>La protéine cellulaire oligoadenylate synthetase-like (OASL)</i> .....	26
1.4    STRUCTURE DU PROJET : HYPOTHESE, OBJECTIFS ET APPROCHE METHODOLOGIQUE .....	28
<b>2 HERPES SIMPLEX VIRUS 1 UL24 IS REQUIRED FOR DOWNREGULATION OF OLIGOADENYLATE SYNTHETASE-LIKE EXPRESSION AT LATE TIMES IN INFECTION ..</b>	<b>31</b>
2.1    ABSTRACT.....	33
2.2    INTRODUCTION .....	34
2.3    METHODS.....	35
2.3.1 <i>Cells and viruses</i> .....	35
2.3.2 <i>RT-qPCR</i> .....	35
2.3.3 <i>Western Blotting</i> .....	36
2.3.4 <i>Statistical analysis</i> .....	36
2.4    RESULTS AND DISCUSSION .....	36
2.4.1 <i>Down-regulation of OASL expression during HSV-1 infection is dependent on UL24</i> .....	36
2.4.2 <i>UL24 affects IRF3 activation late in infection</i> .....	39

2.5	FUNDING INFORMATION .....	41
<b>3</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....</b>	<b>43</b>
3.1	REGULATION A LA BAISSSE D'OASL PAR UL24.....	43
3.2	UL24 REGULE DE FAÇON DIFFERENTIELLE L'ACTIVATION D'IRF3 ET STAT1 .....	46
<b>4</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>ANNEXE I : IMPACT DES DOMAINES D'HOMOLOGIE III ET IV D'UL24 SUR LES NIVEAUX DES TRANSCRITS D'OASL .....</b>	<b>65</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	TAXONS PRINCIPAUX DES HERPESVIRUS ET LEURS RELATIONS MAJEURES PHYLOGENETIQUES... 3	3
FIGURE 1.2	CRYO-MICROPHOTOGRAPHIE DU HSV-1 .....	4
FIGURE 1.3	PROTEINES PRINCIPALES DANS LA STRUCTURE DU VIRION DU HSV-1 .....	5
FIGURE 1.4	SCHEMA DU GENOME DU HSV-1 .....	6
FIGURE 1.5	SCHEMA DU CYCLE DE REPLICATION DU HSV-1.....	7
FIGURE 1.6	CASCADE D'EXPRESSION DES GENES VIRAUX DU HSV-1 .....	10
FIGURE 1.7	MATURATION ET SORTIE DU HSV-1 .....	12
FIGURE 1.8	REPRESENTATION DU LOCUS <i>LAT</i> DANS LE GENOME VIRAL .....	15
FIGURE 1.9	REPRESENTATION DU CADRE DE LECTURE D' <i>UL24</i> DANS LE GENOME VIRAL.....	16
FIGURE 1.10	FONCTIONS MAJEURES D' <i>UL24</i> DU HSV-1 .....	20
FIGURE 1.11	LES PRR ET LES PAMP DU HSV-1.....	22
FIGURE 1.12	LES COMPOSANTS MAJEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION cGAS-STING.....	26
FIGURE 1.13	ORGANISATION DES DOMAINES PROTEIQUES DANS LES MEMBRES DE LA FAMILLE OAS CHEZ L'HUMAIN .....	27
FIGURE 1.14	ROLES DIFFERENTIELS D'OASL DANS LES INFECTIONS VIRALES.....	28
FIGURE 1.15	REPRESENTATION DES MUTATIONS TESTEES ICI DANS LA PROTEINE <i>UL24</i> .....	30
FIGURE 2.1	REDUCTION OF OASL EXPRESSION AT LATE TIMES IN HSV-1 INFECTION IS <i>UL24</i> -DEPENDENT. ....	38
FIGURE 2.2	ABSENCE OF <i>UL24</i> AFFECTS IRF3 ACTIVATION LATE IN INFECTION, AND DELAYS STAT1 ACTIVATION .....	40
FIGURE 3.1	MODELE DE REGULATION D'OASL LORS DE L'INFECTION PAR HSV-1 .....	45
FIGURE 5.1	LE DOMAINE D'HOMOLOGIE III EST IMPORTANT POUR LA REGULATION D'OASL .....	65



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	LES HERPESVIRUS HUMAINS.....	4
TABLEAU 1.2	LES GLYCOPROTEINES ESSENTIELLES POUR L'ENTREE DU HSV-1 .....	8
TABLEAU 1.3	LES SENSEURS CELLULAIRES D'ADN CYTOPLASMIQUE .....	24

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

CDK1: *cyclin-dependent kinase 1*

cGAS: *cyclic GMP-AMP synthase*

CLR: récepteur de lectines type C

CoREST: *co-repressor for element 1 silencing transcription factor*

CVSC: *capsid vertex specific component*

DC: cellule dendritique

E: précoce

gB, gD, gH et gL: glycoprotéines B, D, H et L

HD: domaine d'homologie

HFF: *human foreskin fibroblasts*

hpi: heures post infection

HCF-1: *host cell factor 1*

HSV-1: virus herpès simplex 1

ICP: *infected cell protein*

ICTV: *international committee on taxonomy of viruses*

IE: immédiat précoce

IFN: interféron

IL-6: Interleukine 6

IR: séquence répétée interne

ISG: *interferon-stimulated genes*

L: tardif

LAT: *latency associated transcripts*

LSD1: *lysine-specific demethylase 1*

NF- $\kappa$ B: facteur nucléaire  $\kappa$ B

NTase: *nucleotidyltransferase*

OAS: *oligoadenylate synthetase*

OASL: *oligoadenylate synthetase-like*

Oct-1: *octamer binding protein 1*

ORF: cadre de lecture ouvert

PAMP: motifs moléculaires associés aux pathogènes

PM: membrane plasmique

PRR: récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

RC: *replication centers or compartments*

RHD: domaine d'homologie Rel

RLR: récepteurs de type RIG-I

STING: *stimulator of interferon genes*

TG: ganglion trigéminal

TK: *thymidine kinase*

TLR: récepteurs de type Toll

TR: séquences répétées terminales

TSS: sites d'initiation de la transcription

UBL: *domaine ubiquitin-like*

UL: *Unique Long*

US: *Unique Short*





# 1 INTRODUCTION

---

Les relations hôtes-pathogènes, en termes évolutifs, sont décrites dans la notion de « course aux armements ». Dans ce modèle, l'adaptation d'une espèce est suivie d'une contre-adaptation de l'autre comme résultat d'un processus coévolutif (Papkou *et al.*, 2016). Il y a plusieurs études rapportées à cet égard dans le domaine moléculaire de l'immunologie, par exemple, la production de cytokines lors d'une infection virale par la cellule versus l'inhibition des voies de signalisation de celles-ci par le virus (Dia C. Beachboard and Stacy M. Horner, 2016; Stempel, Chan and Brinkmann, 2019). Néanmoins, la phrase « course aux armements » est inappropriée car d'un côté, l'évolution n'existe pas à but précis et, d'un autre côté, la coévolution ne s'agit pas d'une accumulation constante des adaptations par les espèces dans ce processus. Ces clarifications sont mentionnées car le présent travail de recherche comprend des éléments qui supportent la course aux armements entre l'une des cellules hôtes du virus herpès simplex 1 (ci-après dénommé HSV-1) et ce dernier. Nous avons donc évité l'utilisation des expressions déterministes comme *avec le but*, *afin de*, et synonymes de ce genre dans la description et interprétation de nos résultats.

Dans ce document, nous présenterons, avec l'extension et les contenus pertinents, une révision du HSV-1 et la protéine virale UL24, suivi d'un aperçu spécifique de l'immunité innée contre le HSV-1 et de la protéine cellulaire *oligoadenylate synthetase-like* (OASL). Nous terminerons ce chapitre introductif avec une liaison entre ces deux facteurs, viral et cellulaire, pour énoncer notre hypothèse de travail.

## 1.1 Le virus herpès simplex 1

### 1.1.1 Impact sur la santé publique

Les virus herpès simplex provoquent des infections couramment nommées herpès. Le HSV-1 est très contagieux et se transmet principalement par contact des muqueuses orale/labiale. La plupart des infections sont asymptomatiques, mais elles peuvent provoquer des lésions vésiculaires et/ou des ulcères à l'intérieur ou autour de la bouche qui sont communément appelées « boutons de fièvre ». Le HSV-1 peut également être transmis par voie sexuelle (herpès génital) lors des rapports oraux-génitaux, quoique l'incidence de ce mode de transmission pour

HSV-1 est cependant moins fréquente en comparaison au HSV-2 qui se transmet presque exclusivement par voie sexuelle (Fatahzadeh and Schwartz, 2007).

L'infection par le HSV-1 est courante et endémique dans le monde entier. En effet, l'estimation de la prévalence mondiale est d'environ 67% dans la population de moins de 50 ans (Looker *et al.*, 2012). En plus, lorsqu'un individu contracte le virus, normalement pendant l'enfance, l'infection reste toute la vie de façon latente. L'infection latente est interrompue périodiquement par des épisodes de réactivation virale menant à la production de virus et la transmission de cet agent infectieux à de nouveaux hôtes (Roizman and Whitley, 2013).

D'ailleurs, les médicaments antiviraux contre le HSV-1, comme l'acyclovir, aident à combattre les symptômes, mais ne peuvent pas guérir l'infection. En matière de prévention, il n'existe actuellement aucun vaccin disponible mais plusieurs sont à l'étude, y compris des vaccins pour prévenir les complications herpétiques (Johnston, Gottlieb and Wald, 2016; Royer *et al.*, 2019). Parmi les complications sévères de l'infection par le HSV-1, on peut citer l'encéphalite, la kératite et notamment l'herpès néonatal qui survient dans environ 6 accouchements sur 100 000 au Canada (Kropp *et al.*, 2006; Kobty, 2015; Bradshaw and Venkatesan, 2016)

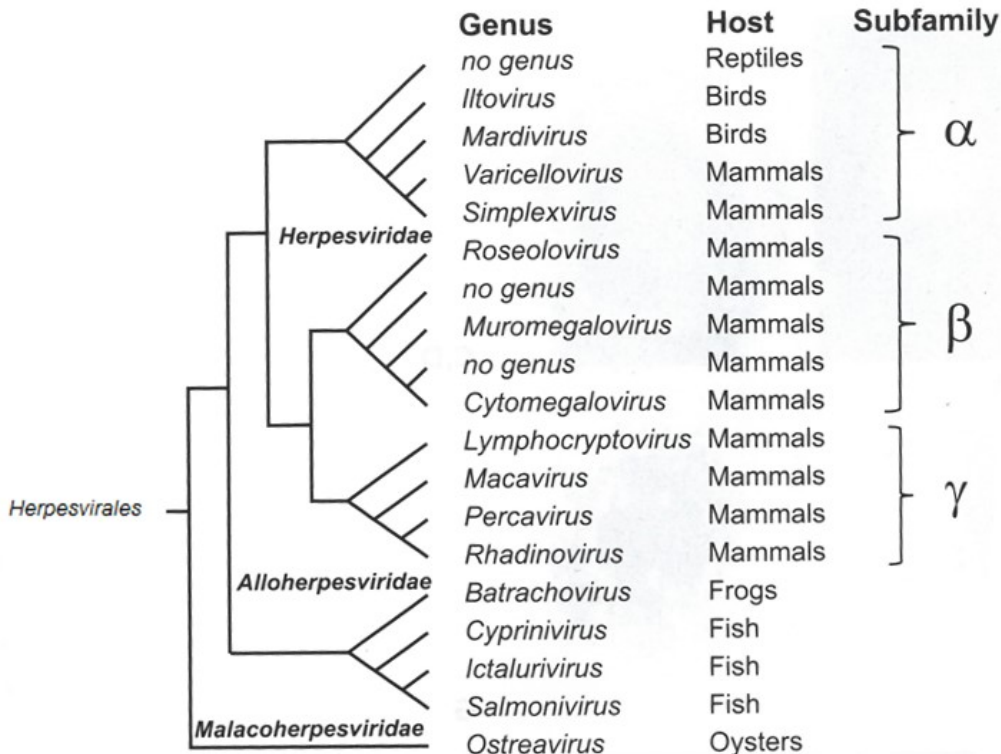
Les conditions précédemment mentionnées mettent en évidence que l'infection par le HSV-1 est encore une maladie qui se répercute physiquement et psycho socialement sur la population mondiale. Les systèmes de santé publique ont donc la responsabilité d'accélérer la recherche afin de prévenir et combattre les infections orales, génitales et néonatales à herpès simplex.

### **1.1.2 Taxonomie**

Conformément au dernier rapport du « International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) », les herpèsvirus forment l'ordre *Herpesvirales*, un taxon viral restreint au règne animal défini par la structure particulière des virions (voir ci-dessous, section 1.1.3). Dans cet ordre, la transcription autant que la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN, ci-après indifférencié du génome) viral et l'assemblage de la nucléocapside se réalisent dans le noyau. Une autre caractéristique partagée en commun, est la capacité d'établir une infection latente tout au long de la vie chez l'hôte et de mener à des réactivations virales périodiques qui favorisent la transmission du virus à de nouveaux hôtes.

L'ordre *Herpesvirales* est divisé en trois familles : les virus des animaux invertébrés (*Malacoherpesviridae*) et des vertébrés (*Alloherpesviridae* et *Herpesviridae*). La famille *Herpesviridae* est la plus étudiée et à la fois classifiée selon certaines propriétés biologiques dans

trois sous-familles : *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae*. Les genres *Simplexvirus* et *Varicellovirus* de la sous-famille *Alphaherpesvirinae*, tout comme les genres des sous-familles *Beta-* et *Gammaherpesvirinae* sont restreints à la classe animal *mammalia*, et par conséquent, tous les herpèsvirus humains sont distribués entre ces genres. Une image résumant la taxonomie des herpèsvirus est présentée à la figure 1.1 (Knipe and Howley, 2013).



**Figure 1.1** Taxons principaux des herpèsvirus et leurs relations majeures phylogénétiques

L'image représente les patrons de ramification phylogénétique, pas les distances évolutives (modifiée de Knipe and Howley 2013).

Le groupe de herpèsvirus humains est composé de 9 virus, dont 3 *Alpha-*, 4 *Beta-* et 2 *Gammaherpesvirinae* (Tableau 1.1). Le HSV-1 appartient au genre *Simplexvirus* de la sous-famille *Alphaherpesvirinae* qui se distingue par son cycle reproductif court; la propagation rapide dans la culture cellulaire; la lyse des cellules hôtes primaires; et l'établissement d'une infection latente dans les neurones sensoriels.

### 1.1.3 Structure de la particule virale

Le HSV-1 est un virus sphérique d'un diamètre entre 150-200 nm dont la structure peut se décrire par 3 éléments : (1) une nucléocapside composée principalement de l'ADN viral contenu dans une capside en forme icosaédrique ; (2) un tégument qui entoure la nucléocapside ; et (3) une enveloppe bi-lipidique externe dérivée de la cellule hôte (Figure 1.2) (McElwee *et al.*, 2018).

Tableau 1.1 Les herpesvirus humains

Sous-famille	Genre	N°	Nom traditionnel	Abréviation en anglais
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	1	Le virus herpès simplex 1	HSV-1
		2	Le virus herpès simplex 2	HSV-2
	<i>Varicellovirus</i>	3	Le virus varicelle-zona	VZV
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	4	Cytomégalovirus	CMV
	<i>Roseolovirus</i>	5	L'herpèsvirus humain type 6-variante A	HHV-6A
		6	L'herpèsvirus humain type 6-variante B	HHV-6B
		7	L'herpèsvirus humain type 7	HHV-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	8	Le virus d'Epstein-Barr	EBV
	<i>Rhadinovirus</i>	9	L'herpèsvirus responsable du sarcome de Kaposi	KSHV

Liste de virus de la famille *Herpesviridae* selon la sous-famille et le genre dont l'hôte primaire est l'humain. Le numéro associé à chacun ne représente pas celui donné par le nom officiel étant qu'herpèsvirus humain (Information prise du site web de l'ICTV, 2011, lien : [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)).

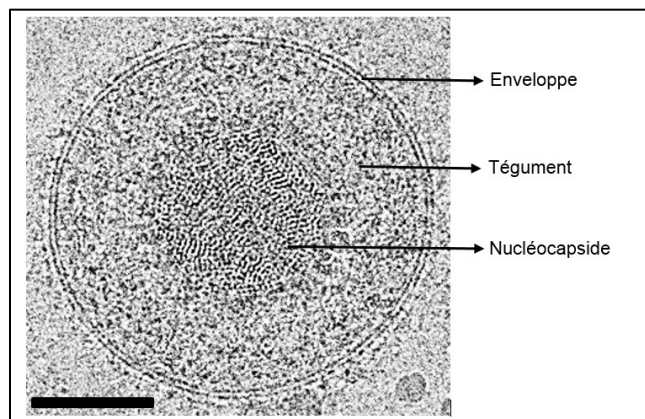
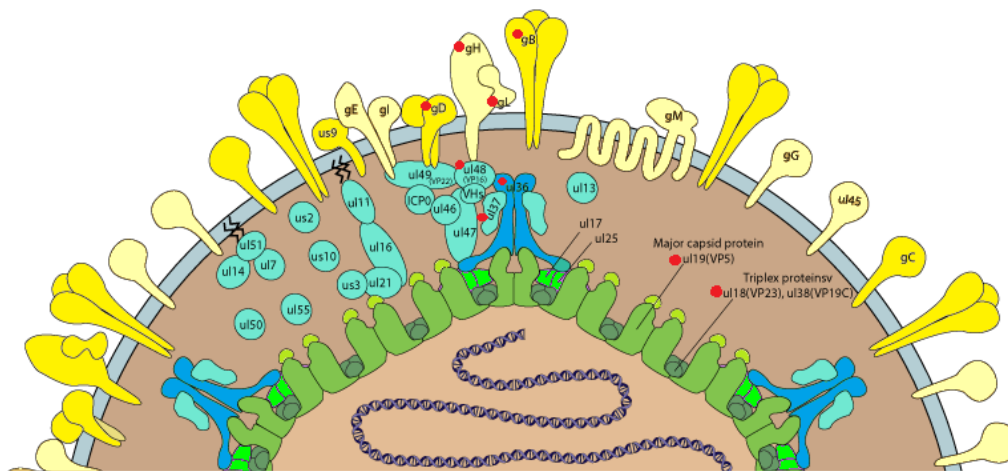


Figure 1.2 Cryo-microphotographie du HSV-1

Photographie d'une particule virale du HSV-1 prise par la cryo-microscopie électronique de transmission (Cryo-TEM). Les trois composants principaux du virus sont indiqués par des flèches. La barre d'échelle indique 50 nm (modifiée de McElwee *et al.* 2018)

La capside du HSV-1 est formée par 162 capsomères de la protéine majeure de la capside VP5 (*UL19*), dont 150 hexagones et 12 pentagones. Les hexagones et les pentagones sont joints par des trimères hétérogènes composés d'une copie de la protéine VP19C (*UL38*) et de deux copies de la protéine VP23 (*UL18*). La capside présente aussi un portail à son tour composé de la protéine UL6 qui permet l'emballage autant que la sortie de l'ADN viral. La surface de la capside est entourée par le tégument, qui occupe un espace qui s'étend jusqu'à l'enveloppe et est composé par au moins 23 protéines (Dai and Zhou, 2018). Parmi celles-ci, la protéine VP16 (*UL48*) est importante pour la transcription des gènes viraux, tandis que les protéines UL36 et UL37 jouent un rôle dans le transport de la capside et l'enveloppement de la particule virale. D'autres protéines du tégument sont impliquées dans l'évasion de la réponse immunitaire innée et dans de nombreuses fonctions qui favorisent la réplication virale, un sujet qui a été récemment révisé (Yang et al. 2019).

Étant donné que le HSV-1 est un virus enveloppé, la structure externe du virion présente une membrane bi-lipidique que le virus obtient lors de son transit vésiculaire lié au Golgi de la cellule hôte. Cette membrane contient, entre autres, les quatre glycoprotéines (gB, gD, gH et gL) qui sont essentielles et suffisantes en culture cellulaire pour le succès de l'entrée virale (Agelidis and Shukla, 2015; Dai and Zhou, 2018). Une image plus complète des protéines qui conforment ces compartiments du virus sont présentées à la figure 1.3.



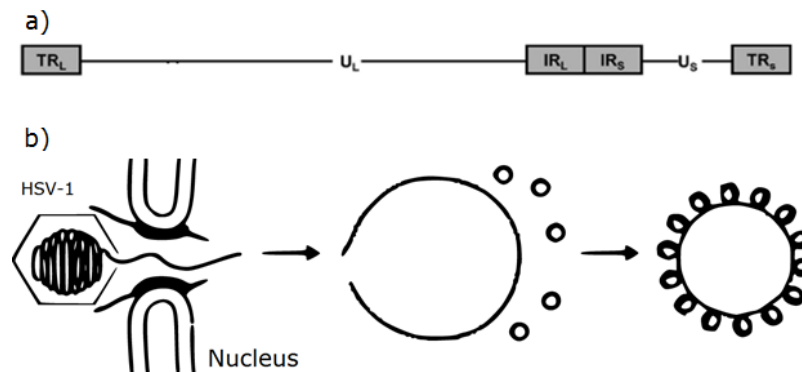
**Figure 1.3 Protéines principales dans la structure du virion du HSV-1**

Les protéines plus étudiées de la capside (en vert), le tégument (en bleu) et l'enveloppe (en jaune) sont représentées dans le virion du HSV-1. Les points rouges indiquent les protéines énoncées dans le texte (modifiée du site web <https://viralzone.expasy.org/5796>, 2019).

### 1.1.4 Structure du génome viral

Le génome viral du HSV-1 est composé d'ADN double brin linéaire formé de 152 kb. Son contenu élevé de GC d'environ 68% est en corrélation avec la présence de séquences codantes. En fait, au moins 85 protéines ont été rapportées jusqu'à présent, soit la protéine UL24.5 la dernière décrite (Dridi *et al.*, 2018).

Le génome du HSV-1 peut être considéré comme l'union entre un segment UL « *Unique Long* » et un segment US « *Unique Short* ». Ces segments uniques sont bordés par des séquences répétées terminales et internes (TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub> et IR<sub>S</sub>/TR<sub>S</sub> respectivement) (Figure 1.4a) (Dridi *et al.*, 2018). Malgré que le génome viral dans le virion n'est pas associé à des histones, il devient circulaire et chromatisé dès son relâchement dans le noyau, cela implique que tous les mécanismes de remodelage de la chromatine, y compris les modifications sur les histones, affectent autant que la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes viraux (Figure 1.4b) (Knipe and Cliffe, 2008).



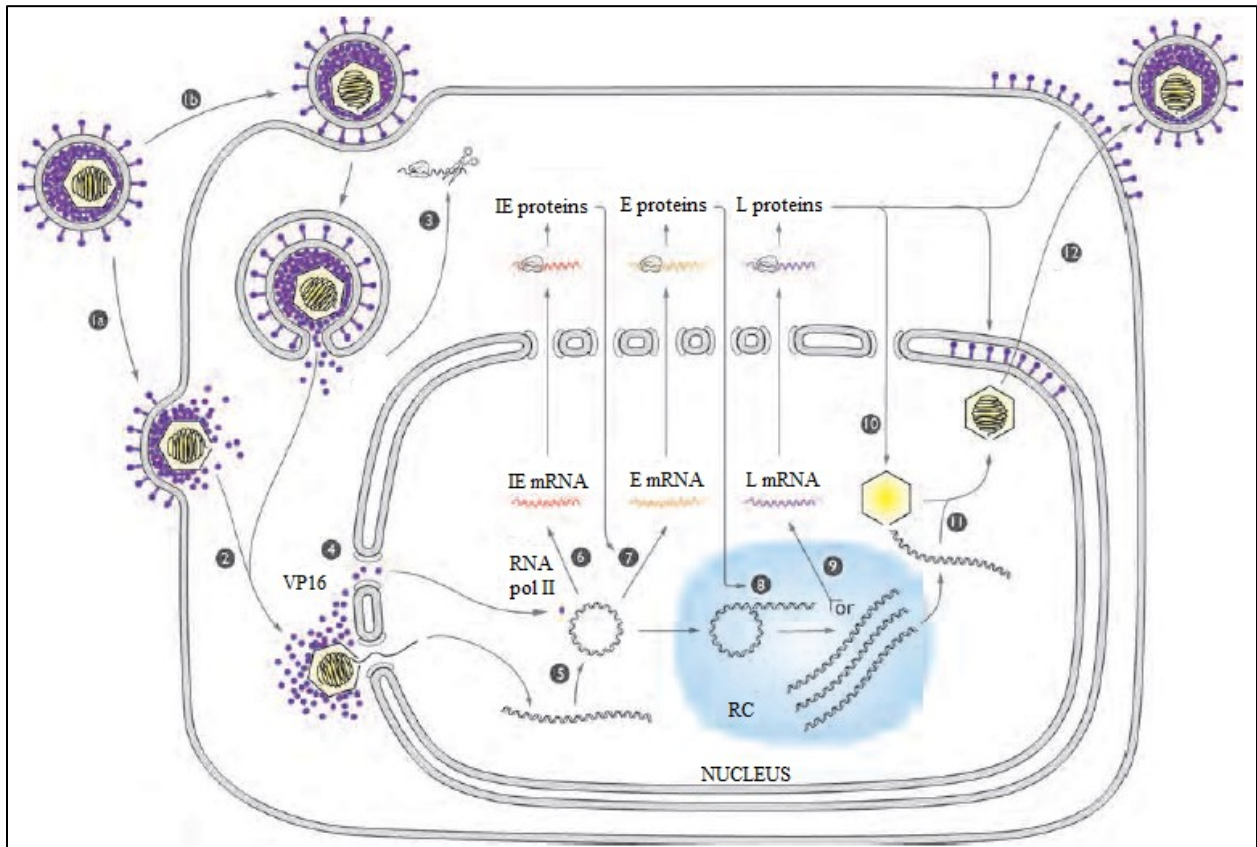
**Figure 1.4 Schéma du génome du HSV-1**

(a) Représentation linéaire du génome du HSV-1 indiquant l'organisation générale des segments uniques U<sub>L</sub> et U<sub>S</sub> bordés par les séquences répétées terminales (TR<sub>L</sub> et TR<sub>S</sub>) et les séquences répétées internes (IR<sub>L</sub> et IR<sub>S</sub>). (b) L'ADN viral est chromatisé suivant à l'introduction et circularisation dans le noyau (Knipe and Cliffe, 2008; Dridi *et al.*, 2018).

### 1.1.5 Cycle de l'infection lytique

Tous les membres de la famille *Herpesviridae* ont la capacité d'établir deux types d'infection avec les cellules hôtes : lytique et latente. Lors de la première rencontre avec le HSV-1, l'infection lytique a généralement lieu dans les cellules épithéliales de la muqueuse orale, tandis que l'infection latente a lieu dans les neurones sensoriels du nerf trijumeau. Néanmoins, il existe aussi une deuxième forme d'infection lytique à partir de la latence, communément connu sous le nom de réactivation qui est discutée plus loin dans la section 1.1.6.3.

Le cycle lytique lors d'une primo-infection par le HSV-1 peut être résumé dans les étapes suivantes : a) l'entrée du virus dans la cellule hôte ; b) le transport de la capside vers le noyau ; c) la transcription des gènes viraux immédiats précoces (ci-après IE) et précoces (ci-après E) ; d) la réplication de l'ADN viral ; e) la transcription des gènes viraux tardifs (ci-après L) ; f) L'assemblage de la nucléocapside ; et g) la sortie de la progéniture virale. La figure 1.5 récapitule toutes ces étapes dont le temps estimé est entre 18 et 20 heures dans des cellules permissives à l'infection.



**Figure 1.5 Schéma du cycle de réplication du HSV-1**

Le HSV-1 peut entrer dans la cellule hôte par fusion directe de son enveloppe avec la membrane plasmique (1a) ou par endocytose (1b). Une fois que la nucléocapside (entourée des protéines du tégment) est relâchée dans le cytoplasme, elle est transportée ensuite jusqu'au pore nucléaire (2). Certaines protéines du tégment ont un rôle à jouer dans le cytoplasme (3) ou bien dans le noyau (4). Dès que le génome est injecté à l'intérieur du noyau, il est circularisé et chromatisé (5). Ensuite, la transcription des gènes immédiats précoces (IE) par l'ARN polymérase II est induite grâce à la protéine tégmentaire VP16 (6). Les produits des gènes IE induisent la transcription des gènes précoces (E) (7) dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN viral (8) qui a lieu dans des compartiments bien définis nommés RC. Les protéines E et la synthèse d'ADN viral déclenche la transcription des gènes tardifs (L) (9). Les protéines L jouent ensuite un rôle dans l'assemblage de la capside (10) et l'encapsidation de l'ADN viral (11). La sortie des virions du noyau et leur transit par le cytoplasme conduit à la maturation et la libération de la progéniture virale par exocytose (12) (Modifiée de Knipe and Howley 2013).



### 1.1.5.1 L'entrée virale

Le succès de l'entrée implique la participation de plusieurs glycoprotéines virales et de leurs récepteurs cellulaires qui interagissent selon un procédé séquentiel (tableau 1.2). Ce processus peut se diviser dans 3 étapes : attachement, fixation et fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. L'attachement est une étape réversible qui se produit entre la gC et son ligand les héparines sulfates. La fonction de l'attachement est de rapprocher les membranes virale et cellulaire, ce qui favorise les autres étapes de l'entrée. Néanmoins, la gC n'est pas essentielle dans cette étape car en absence de celle-ci, la fonction d'attachement est relevée par gB (Agelidis and Shukla, 2015).

Tableau 1.2 Les glycoprotéines essentielles pour l'entrée du HSV-1

Glycoprotéine	Conservation taxonomique	Fonction	Récepteurs cellulaire de liaison
gD	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Reconnaissance du récepteur	<i>HVEM</i> , Nectines, les Héparines 3-O-sulfatées
gH/gL	<i>Herpesviridae</i>	Activateurs de la protéine gB	Intégrines
gB	<i>Herpesviridae</i>	Fusion	<i>PILR<math>\alpha</math></i> , <i>MAG</i> , <i>NMHC-II<math>s</math></i>

Conservation, fonction et récepteur cellulaire des quatre glycoprotéines indispensables pour l'entrée du HSV-1 : gD, gH, gL et gB (Modifié de Kawaguch, Mori, and Kimura 2018).

Dès que la gD se joint à son récepteur cellulaire, la particule virale est fixée à la surface cellulaire et le processus d'entrée devient maintenant irréversible. L'activation de gD facilite la conversion de gH/gL à leur forme capable d'interagir avec gB. Ce dernier est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire plasmique ou des endosomes dépendamment des récepteurs exprimés dans la cellule hôte. Par exemple, il a été démontré que l'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$ , favorisent l'entrée du virus par endocytose (Gianni *et al.*, 2013). De façon intéressante, ces intégrines fonctionnent comme récepteurs de l'hétérodimère gH/gL, ce qui supporte leur importance pour définir l'endroit à l'étape de fusion catalysée par gB.

### 1.1.5.2 Les protéines du tégument dans le cycle viral

Une fois que la nucléocapside entourée du tégument se retrouve dans le cytoplasme, elle est ensuite transportée au long des microtubules vers le noyau. Ce transport est essentiellement dû aux protéines du tégument UL36, UL37, US3 et de la protéine motrice cellulaire dynéine (Dohner *et al.*, 2002; Miranda-Saksena *et al.*, 2018). Ensuite, l'interaction entre la nucléocapside et le pore



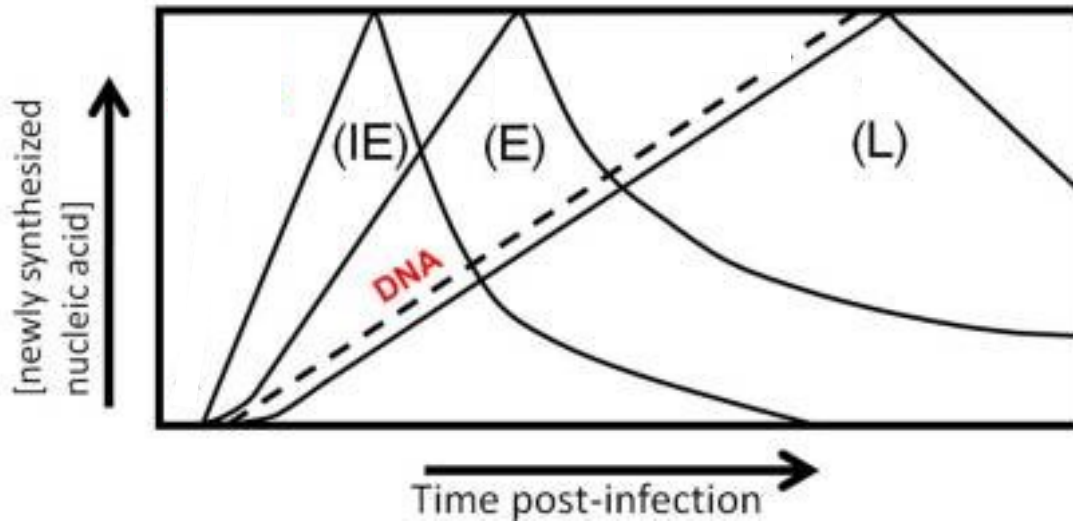
nucléaire implique la participation d'une autre protéine du tégument, UL36 (VP1/2), qui conduit finalement au relâchement de l'ADN viral dans le noyau (Abaitua *et al.*, 2012).

En outre, les protéines tégumentaires ont des rôles précoces à jouer dans le succès du cycle viral lytique lesquels convergent sur un effet : promouvoir la réplication virale. Au niveau du cytosol, on note parmi celles-ci l'endonucléase virale vhs (*UL41*) qui dégrade principalement les acides ribonucléiques (ARN) de la cellule hôte de façon spécifique et, par conséquent, affecte aussi leur stabilité (Burgess and Mohr, 2018). Cette régulation va favoriser le fait que la machinerie de traduction cellulaire soit priorisée pour les transcrits viraux. Au niveau nucléaire, la protéine tégumentaire VP16 et ses partenaires cellulaires *host cell factor 1* (HCF-1) et *octamer binding protein 1* (Oct-1) forment un complexe protéique qui fonctionne comme un transactivateur pour l'induction des gènes IE (Wysocka and Herr, 2003).

Pour promouvoir la réplication virale, certaines protéines du tégument jouent aussi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée (Yang *et al.* 2019). Parmi celles-ci figurent les protéines bien documentées ICP0 (*RL2*) et US3. La protéine multifonctionnelle ICP0 possède un domaine E3-ubiquitine ligase par lequel elle induit la dégradation, entre autres, de l'adaptateur MyD88 du TLR2 ; la protéine p50 de la voie NF- $\kappa$ B ; et le senseur d'ADN IFI16. La kinase US3, pour sa part, régule à la baisse la polyubiquitination de TRAF6 de la voie de signalisation par TLR2, et à la hausse la phosphorylation de p65 et du facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3), deux facteurs impliqués dans les voies NF- $\kappa$ B et de l'interféron de type (IFN) I, respectivement.

### **1.1.5.3 La transcription des gènes viraux**

Le HSV-1 appartient au groupe des virus à ADN double brin dont la transcription génétique et la réplication du génome viral, tel que mentionné auparavant, ont lieu dans le noyau. L'expression des gènes viraux se fait séquentiellement selon trois classes cinétiques : IE, E et L. Les produits des gènes IE déclenchent l'expression des autres deux classes de gènes. Les produits des gènes E sont responsables dans la réplication de l'ADN viral et la plupart des gènes L codent pour des protéines structurales (Figure 1.6).



**Figure 1.6 Cascade d'expression des gènes viraux du HSV-1**

Représentation de la synthèse des acides nucléiques (ADN ou ARNm) au long de l'infection par HSV-1. Les trois vagues d'expression des gènes viraux (IE, E et L) sont indiquées en lignes continues, tandis que la réplication de l'ADN viral est indiquée en ligne pointillée (Modifiée d'Amen and Griffiths, 2011).

Tel que discuté, le complexe VP16/HCF-1/Oct-1 cible la région promotrice des gènes IE et c'est par le domaine d'activation de VP16 qu'il y a un recrutement de la *lysine-specific demethylase 1* (LSD1) via son partenaire *co-repressor for element 1 silencing transcription factor* (CoREST). Par la suite, on note un changement de la chromatine, permettant l'entrée des facteurs de transcription basaux, tels que TBP, TFIIB et TFIID, qui sont nécessaires pour l'initiation de la synthèse des ARNm IE par l'ARN polymérase II (Roizman and Zhou, 2015).

Les six produits des gènes IE, dont cinq appartiennent au groupe d'*Infected Cell Proteins* (ICPs), régulent la transcription de toutes les classes de gènes viraux, y compris aussi la classe IE. Parmi celles-ci la protéine ICP0 joue un rôle majeur dans la progression du cycle lytique. En effet, l'expression *de novo* d'ICP0, mène au recrutement additionnel du facteur CLOCK dans la région promotrice IE, ce qui améliore l'expression des autres ICPs (4, 22, 27 et 47) (Roizman and Zhou, 2015). Une autre conséquence de l'expression d'ICP0 est l'inactivation de CoREST qui est notée comme une étape importante pour la transition vers l'expression des gènes E. Les protéines E, comme ICP8, participent dans la réplication de l'ADN viral (discutée dans la section ci-après 1.1.5.4) et sont requises pour l'expression maximale des gènes L. Finalement, les produits des gènes L sont impliqués, entre autres, dans la morphogénèse des particules virales.

#### 1.1.5.4 La réplication de l'ADN viral

La transcription des gènes viraux et la réplication du génome viral ont lieu dans des compartiments spécialisés qui portent le même nom de que ce dernier, couramment appelés *Replication Centers or Compartments* (RC). En plus des protéines cellulaires et virales impliquées dans le remodelage de la chromatine, ce processus requière l'expression préalable des gènes viraux IE et E, en particulier d'*UL9*, *ICP8*, *UL5*, *UL8*, *UL52*, *UL30* et *UL42* qui participent directement dans l'initiation et la synthèse de l'ADN viral et dont les produits géniques sont décrits ci-après.

Dans l'étape initiale, *UL9* et *ICP8* sont recrutés à une des origines de réplication (*OriL* ou *OriS*) pour permettre l'ouverture du site d'initiation. Ensuite, le complexe hélicase-primase composé d'*UL5*, *UL8* et *UL52* est aussi recruté et procède au déroulement du double brin de l'ADN et la synthèse d'amorces pour le brin indirect. L'ADN polymérase composé d'*UL30* et *UL42* peut ensuite synthétiser le brin complémentaire de l'ADN guide, puis l'activité exonucléase 3'-5' et la réparation par excision de bases contribuent à la fidélité du processus de réplication. Les premières rondes de réplication effectuées sur un modèle « thêta » sont suivies par un changement vers le mode « cercle roulant » qui est indépendant du site d'origine du fait qu'*UL9* n'est pas requis. Cette dernière forme de réplication produit de longs concatémères de génomes viraux « tête-à-queue » qui sont clivés dans monomères pendant l'encapsidation de l'ADN viral par le complexe terminase composé d'*UL15*, *UL28* et *UL33* (Weller and Coen, 2012).

#### 1.1.5.5 Biogenèse de la nucléocapside

Cette étape du cycle viral dans le noyau comprend l'assemblage de la capsid et l'insertion dans celle-ci du génome viral. Ces deux processus ont besoin principalement de l'expression préalable des gènes L et de la réplication du génome viral.

La formation de la capsid est un auto-assemblage dirigé par les interactions protéine-protéine entre *VP5*, *VP19C* et *VP23* (voir la section 1.1.3) en collaboration avec la protéine d'échafaudage *VP22a*. Le recrutement de la protéine *UL6* qui compose le portail par lequel le génome est inséré se fait également à cette étape. Le processus d'insertion du génome par le complexe terminase provoque la dégradation de *VP22a* et l'incorporation du CVSC « *Capsid Vertex Specific Component* » composé d'*UL17* et *UL25* (Figure 1.3) qui s'ajoute aux vertex de la capsid afin de stabiliser sa structure icosaédrique (Heming, Conway and Homa, 2017).

### 1.1.5.6 La sortie

L'étape final du cycle viral est la sortie qui comprend l'exportation de la nucléocapside du noyau jusqu'à l'exocytose d'une particule virale mature vers le milieu extracellulaire ou directement à une autre cellule (Bello-Morales and López-Guerrero, 2018). Au cours de ce circuit, la nucléocapside acquiert son tégment et enveloppe. Dans le noyau, le modèle de relargage accepté est un enveloppement initial (primaire) à la membrane nucléaire interne, puis la fusion de cette enveloppe naïve avec la membrane nucléaire externe (Owen, Crump and Graham, 2015).

Une fois dans le cytoplasme, la nucléocapside est tout de suite entourée par les protéines du tégment interne, notamment par VP1/2 qui est capable d'interagir directement avec la capsid. D'autres protéines tégmentaires internes sont recrutées en cascade, tandis que les externes sont acquises au long de la progression de la maturation de virus. C'est précisément au niveau du golgi qui s'insère le reste du tégment, et où a lieu l'enveloppement définitif (secondaire) (Owen, Crump and Graham, 2015). Il a été démontré que la quantité de CVSC sur la nucléocapside est un moyen d'envelopper préférentiellement les capsides contenant un génome viral (revue dans Roller and Baines 2017). La vésicule qui contient la particule virale enveloppée est transportée jusqu'à la périphérie de la cellule pour relâcher son contenu suite à la fusion avec la membrane plasmique. La figure 1.7 résume les étapes de la sortie virale.

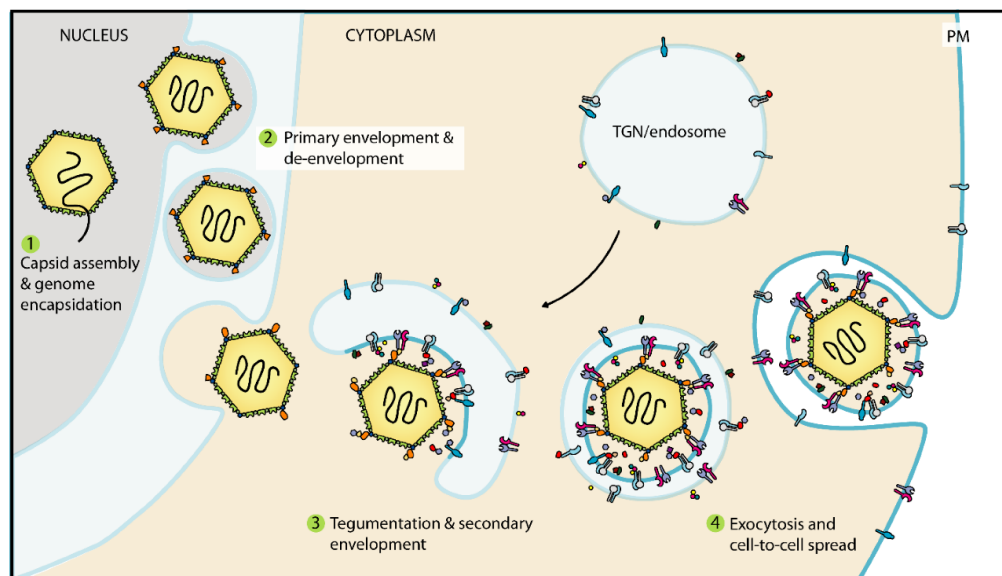


Figure 1.7 Maturation et sortie du HSV-1

Suite à l'encapsidation du génome (1), la nucléocapside interagit avec la membrane nucléaire interne (enveloppement primaire). Le bourgeonnement dans l'espace perinucléaire est suivi par la fusion de cette enveloppe avec la membrane nucléaire externe (2). Ensuite la nucléocapside complète son tégument et est enveloppée (enveloppement secondaire) grâce aux vésicules dérivées des endosomes ou le réseau *trans* du golgi (TGN) (3). (4) La particule virale contenue dans une vésicule est relâchée par exocytose suite à la fusion avec la membrane plasmique (PM) (Tirée d'Owen, Crump, and Graham 2015).

### **1.1.6 Cycle de l'infection latente**

Suite à l'infection dans les cellules épithéliales, le HSV-1 infecte les terminaisons axonales des neurones sensoriels qui forment le nerf trijumeau. Le virus est ensuite transporté jusqu'au noyau de façon rétrograde, c'est-à-dire, des terminaisons axonales vers les corps cellulaires des neurones regroupés dans le ganglion trigéminal (TG). Le HSV-1 établit la latence dans le noyau de ces neurones infectés où l'on retrouve le génome en forme d'épisome qui permet à tout moment sa réactivation et l'entrée dans un cycle lytique. Les virions produits par la réactivation sont transportés de façon antérograde (des corps neuronaux vers les axones), pouvant provoquer une infection proche du site original de l'infection (Kennedy *et al.*, 2015; Thellman and Triezenberg, 2017). Cela a pour conséquence la persistance du virus chez l'individu infecté et la transmission de celui-ci à de nouveaux hôtes, pérennisant ainsi son maintien dans la population humaine.

#### **1.1.6.1 Établissement de la latence**

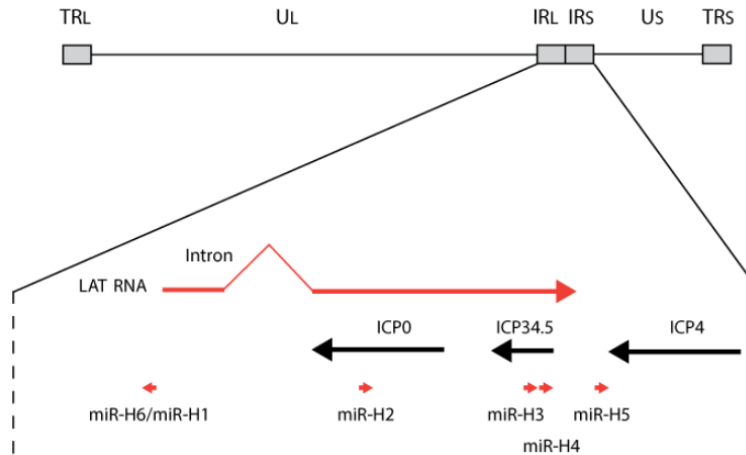
Contrairement à l'infection lytique, l'infection latente se distingue par la forte expression du gène *latency associated transcripts (LAT)* et l'absence d'expression de la majorité des gènes lytiques. Le démarrage de ce programme alternatif d'expression génique est expliqué par le modèle de gradient de la protéine VP16 (Hafezi *et al.*, 2012). Selon ce modèle, suite à l'entrée du virus au niveau des terminaisons nerveuses, le transport rétrograde de VP16 n'est pas assez rapide le long des axones. En conséquence, il y a une faible concentration de VP16 dans les noyaux des neurones infectés. De plus, il a été démontré qu'Oct-1 n'est pas exprimée dans les neurones différenciés, au contraire d'Oct-2 qui fonctionne comme un répresseur dans le promoteur des gènes IE (Lillycrop *et al.*, 1991; Lakin *et al.*, 1995). Il en résulte que le complexe VP16/HCF-1/Oct-1 ne se forme pas, affectant l'expression des gènes IE. Ces résultats suggèrent que l'absence de VP16 dans le noyau des neurones est déterminante pour l'induction de la latence, ce qui favorise un génome viral chromatisé sous une forme répressive.

De plus, des études pendant la latence montrent qu'il y a une expression périodique des gènes lytiques dans les neurones malgré le contrôle épigénétique sur le génome viral (Maillet *et al.*, 2006; Russell and Tschärke, 2016). Dès que la réponse immunitaire est activée, la réplication du virus dans le TG est arrêtée et les génomes viraux dans celui-ci ne sont retrouvés que sous forme latente (Khanna *et al.*, 2004). Ce phénomène d'expression des gènes lytiques représenterait alors des tentatives de réactivation contrôlées par le système immunitaire. La régulation différentielle de réponse immunitaire innée entre les cellules épithéliales et les neurones est donc un autre modèle par lequel le virus pourrait établir l'infection latente.

#### **1.1.6.2 Maintenance de la latence : le gène *LAT***

Durant la latence, le génome viral est majoritairement associé avec des histones portant des marques répressives de la transcription, telles que H3K27me3 et H3K9me2/3, qui sont fixées au cours de l'infection (Cliffe, Coen and Knipe, 2013). Néanmoins, les histones associées à la région *LAT* portant des marques qui favorisent la transcription, telles que H3K9ac et H3K14ac (Kubat *et al.*, 2004; Cliffe, Garber and Knipe, 2009).

Un ARN de 8,5 kb résulte de la transcription du locus *LAT* qui est épissé de manière alternative pour générer un segment intronique de 2 kb ou 1,5 kb (*LAT* majeur). Ces produits confèrent une résistance à l'apoptose promue par la réponse immunitaire adaptative (Phelan, Barrozo and Bloom, 2017). Le segment exonique de 6,5 kb ou 7 kb (*LAT* mineur) est dégradé rapidement, conduisant à la formation de plusieurs microARN dénommés miR-H1, H2, H3, H4, H5, H6 et H7 (Figure 1.8). On note parmi les cibles de ces microARN, les transcrits des gènes IE comme *ICP0* (miR-H2) et *ICP4* (miR-H5) et des gènes L comme *ICP34.5* (miR-H3 et -H4). En plus, il a été rapporté une expression constitutive du microARN cellulaire miR-138 dans les neurones qui ciblent aussi les transcrits du gène *ICP0* (Pan *et al.*, 2014). Plusieurs microARN cellulaires sont régulés (induits ou réprimés) lors de l'infection par HSV-1 ayant un effet proviral ou antiviral, ce qui montre que la régulation post-transcriptionnelle se fait autant par le virus que par la cellule infectée (Brdovčak, Zubković and Jurak, 2018). En résumé, le gène *LAT* réprime l'expression des gènes viraux lytiques et favorise la survie des neurones infectés.



**Figure 1.8 Représentation du locus *LAT* dans le génome viral**

Le locus *LAT* est localisé dans les séquences répétées IRL et IRS. Ce locus exprime un ARN *LAT* primaire de 8,5 kb (flèche en haut rouge). Du transcrit primaire, des segments intronique (en rouge clair) et exonique (en rouge foncé) sont produits par épissage. Ce dernier est dégradé pour donner plusieurs microARN (miR) (petites flèches en bas rouges) qui vont cibler des gènes viraux (flèches en noir) (Modifiée du site web <https://viralzone.expasy.org/5756>, 2019).

D'ailleurs, plusieurs rapports supportent aussi que la maintenance de la latence implique la participation de la réponse immunitaire adaptative, notamment des cellules T CD8+, qui surveillent activement le site de l'infection latente et contrôlent la réactivation virale (Khanna *et al.*, 2004; Khanna, Lepisto and Hendricks, 2004; Egan *et al.*, 2013)

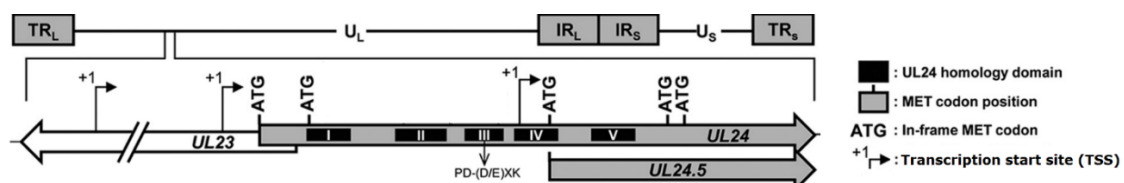
### 1.1.6.3 Réactivation à partir de l'état de latence

Plusieurs facteurs externes, tel que le stress psychologique, des rayons UV, entre autres, sont reconnus pour être des causes qui déclenchent la réactivation du HSV-1, ce qui mène à la réapparition d'un cycle viral lytique (Thellman and Triezenberg, 2017). À différence du premier contact, ce cycle lytique à partir de la latence se distingue au début par deux aspects différents : l'absence des protéines du tégument et une première phase d'expression des gènes lytiques (IE, E et L) dont la cinétique n'est pas de manière séquentielle et ordonnée. En termes moléculaires, l'induction de la réactivation est déclenchée par des signalisations neuronales, par exemple, la voie *cJun N-terminal Kinase*, qui vont induire des marqueurs permissifs sur les histones associés aux promoteurs des gènes lytiques, provoquant leur expression (Nicoll, Proenca and Efstathiou, 2012; Cliffe *et al.*, 2015). En même temps, il y aura une augmentation des marqueurs répressifs sur le gène *LAT* (Du, Zhou and Roizman, 2011). Dès la synthèse de VP16, la protéine démarre une deuxième phase d'expression qui est similaire au cycle lytique lors d'une primo infection (Kim *et al.*, 2012). En résumé, la réactivation comprend un changement de la chromatine qui est suivi

par deux phases d'expression des gènes lytiques, indépendante et dépendante de la protéine VP16.

## 1.2 La protéine tardive UL24 du HSV-1

*UL24* code pour une protéine de 269 acides aminés, la protéine UL24, qui est détectée au maximum à 12 hpi. La protéine UL24 est reconnue comme une protéine multifonctionnelle qui cible autant le noyau que le cytoplasme (Pearson and Coen, 2002; Lymberopoulos and Pearson, 2007). Le gène *UL24* est conservé chez tous les membres de la famille *Herpesviridae*, ce qui suggère une sélection positive en termes évolutifs dans ce groupe taxonomique et, par conséquent, un rôle important dans l'infection (Jacobson, Martin and Coen, 1989). Situé dans le segment UL du génome de HSV-1, le gène *UL24* chevauche partiellement le gène E *TK* (*UL23*) sur leurs extrémités 5' (Jacobson, Martin and Coen, 1989; Bo, Cook and Wobbe, 1996). Récemment, il a été aussi rapporté que la présence du gène *UL24.5* chevauche complètement celle du gène *UL24* vers l'extrémité 3' de ce dernier (Dridi *et al.*, 2018). Le locus *UL24* contient deux éléments *cis*-régulateurs (boîtes TATA) et deux sites d'initiation de la transcription (TSS) notés en amont du cadre de lecture ouvert (ORF) du gène *UL24*. Un troisième TSS se situe dans la séquence de l'ORF d'*UL24*, ce qui est notamment utilisé pour le gène *UL24.5*. De plus, plusieurs codons d'initiation de la traduction (codons ATG) potentiels sont notés aussi au long du locus (Kibler *et al.*, 1991; Cook and Coen, 1996; Dridi *et al.*, 2018) (Figure 1.9). Ces particularités, dans l'ensemble, montrent la complexité du locus *UL24* et sa capacité de produire plusieurs produits géniques.



**Figure 1.9 Représentation du cadre de lecture d'*UL24* dans le génome viral**

Le gène *UL24* est localisé dans le segment unique UL du génome de HSV-1. Il chevauche avec les gènes *UL24.5* et *UL23* sur ses extrémités 3' et 5' respectivement. Le gène comprend trois sites d'initiation de la transcription, dont 2 sont en amont du cadre de lecture ouvert (ORF) et 1 dans la séquence de ce cadre. Cinq codons ATG et domaines d'homologie (I-V) sont distribués au long de l'ORF d'*UL24*, dont le troisième (III) domaine d'homologie qui contient une séquence endonucléase (PD-(D/E)XK). (modifiée de Dridi *et al.*, 2018).

La protéine UL24 contient cinq domaines d'homologie (HDs) qui sont des séquences d'acides aminés très conservés entre les orthologues d'*UL24* (Jacobson, Martin and Coen, 1989). En plus,



une séquence endonucléase (PD-(D/E)XK) se situe dans l'HD-III dont l'activité enzymatique reste encore à vérifier (Knizewski *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Études d'UL24 décrites en contexte d'infection

Plusieurs lignées cellulaires sont susceptibles à l'infection par HSV-1 (Karasneh and Shukla, 2011). Néanmoins, la plupart des études d'UL24 ont été faites sur les lignées épithéliales (Vero et HeLa), les fibroblastes (HFF) et les neurones qui sont les types de cellules principales ciblés dans une infection chez l'humain (Moore, 1984; Smiley, Hoxie and Friedman, 1985; Kramer and Enquist, 2013). En ce qui concerne les modèles *in vivo*, l'infection oculaire par HSV-1 chez la souris est un modèle largement utilisé pour l'étude de son cycle lytique dans les cellules épithéliales de la cornée et son cycle latent dans les neurones du TG.

Des résultats tirés sur les modèles ci-dessus montrent que le virus qui n'exprime pas la protéine UL24 est moins capable de se répliquer dans les cellules épithéliales de la cornée et les cellules neuronales du TG. *In vivo*, la réduction du titre viral est plus sévère dans les neurones, entre autres, à cause d'un faible nombre de cellules infectées (Jacobson *et al.*, 1998; Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Rochette *et al.*, 2015). L'absence d'UL24 est aussi associée avec une réduction dans la sévérité des manifestations cliniques (Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Rochette *et al.*, 2015). Intéressamment, ces découvertes ont été aussi rapportées pour le mutant en UL24 ayant de substitutions dans la séquence endonucléase dans le HD-III, ce qui montre l'importance de celle-ci dans les fonctions de la protéine (Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010).

La réactivation spontanée du HSV-1 est très rare avec des modèles *in vivo* (Thellman and Triezenberg, 2017). Encore une fois, les études d'UL24 et son impact sur la réactivation ont été faites notamment sur un modèle *ex vivo*. Brièvement, ce modèle consiste à prélever les TG et mettre ceux-ci en contact direct avec une monocouche de cellules épithéliales en culture afin de voir les effets cytolytiques du virus dès que la réactivation a été un succès. Consistant avec la défaillance de réplication dans les neurones, en absence d'UL24 le pourcentage de TG avec une réussite de réactivation est réduite même jusqu'à 90 % (Jacobson *et al.*, 1998; Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010). L'impact d'UL24 sur l'infection productive et la réactivation du virus dans les neurones, convergent vers l'idée que la protéine est impliquée dans le succès du cycle latente et par conséquent dans la pathogénèse virale dont le mécanisme reste encore inconnu. Néanmoins, quelques pistes du mécanisme commencent à émerger au fur et à mesure que les rôles de la protéine, détaillés ci-après, sont rapportés.

Dans le noyau, des expériences *in vitro* démontrent que la protéine UL24 est importante pour la dispersion de deux protéines cellulaires du nucléole : la nucléoline et la B23 (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos *et al.*, 2011). Encore une fois, la séquence endonucléase d'UL24 est importante pour ce phénotype de dispersion (Bertrand *et al.*, 2010; Lymberopoulos *et al.*, 2011). Étant donné que la nucléoline est essentielle pour la sortie du HSV-1 (Sagou, Uema and Kawaguchi, 2010), la dispersion de celle-ci semble donc favoriser cette étape du cycle viral. En effet, la quantité de capsides dans le noyau versus le cytoplasme est plus élevée dans les infections avec le virus mutant en UL24 (Lymberopoulos *et al.*, 2011). En d'autres termes, en absence d'UL24 les capsides virales tendent à être retenues dans le noyau.

Les protéines du nucléole, nucléoline et B23, ont en commun plusieurs fonctions, par exemple, elles sont impliquées dans la biogénèse des ribosomes, le remodelage de la chromatine et la réparation de l'ADN (Box *et al.*, 2016; Scott and Oeffinger, 2016; Jia *et al.*, 2017). Consistant avec les effets qui pourraient entraîner la dispersion de celles-ci, il a été publié qu'UL24 affecte l'expression des gènes viraux IE et E (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'impact d'UL24 sur la structure et l'organisation du nucléole pourrait avoir un lien direct avec la régulation à la baisse de l'expression génique virale. L'importance biologique de cet impact revient sur l'axe de favoriser le cycle latent du virus.

Dans cytoplasme, l'absence d'UL24 provoque une modification dans la distribution et la localisation des glycoprotéines virales (Ben Abdeljelil, Rochette and Pearson, 2013). Il semble que cet effet explique le phénotype des plaques syncytiales qui est une caractéristique de l'infection par des virus mutants en UL24 (Jacobson *et al.*, 1998). Dans ce scénario, la distribution particulière des glycoprotéines permettrait alors la fusion des membranes cellulaires entre les cellules infectées donnant lieu à la formation du syncytium.

Un autre rôle rapporté dans le cytoplasme par UL24, est l'interaction entre celle-ci et le facteur nucléaire  $\kappa\beta$  ou mieux connu comme NF- $\kappa\beta$  (Xu *et al.*, 2017). Dans cette étude, à partir du produit de lyse des cellules infectées avec la souche sauvage KOS du HSV-1, il a été mis en évidence qu'UL24 co-immunoprécipite avec le dimère p50/p65 de NF- $\kappa\beta$ . Puis, la combinaison entre des approches d'infection et de transfection, a confirmé que cette interaction est aussi via le domaine d'homologie Rel (RHD) présente dans les monomères p50 et p65. Néanmoins, il n'est pas encore testé si l'interaction entre UL24 et p50/p65 est perdue lors de l'infection avec des virus mutants en UL24. Par contre, dans un modèle d'infection par HSV-1 suivi de la transfection d'ADN exogène, il y a une réduction moins sévère de l'expression de l'IFN bêta (IFN- $\beta$ ) et l'interleukine six (IL-6) en absence d'UL24. Ensemble, ces résultats suggèrent qu'UL24 inhibe le facteur NF-

$\kappa\beta$  de la même façon que son répresseur naturel I $\kappa$ B $\alpha$ , c'est-à-dire, via l'interaction avec les domaines RHD de p50/p65, un aspect qui a été confirmé et étudié plus au profondeur par expression ectopique d'UL24 (Xu *et al.*, 2017).

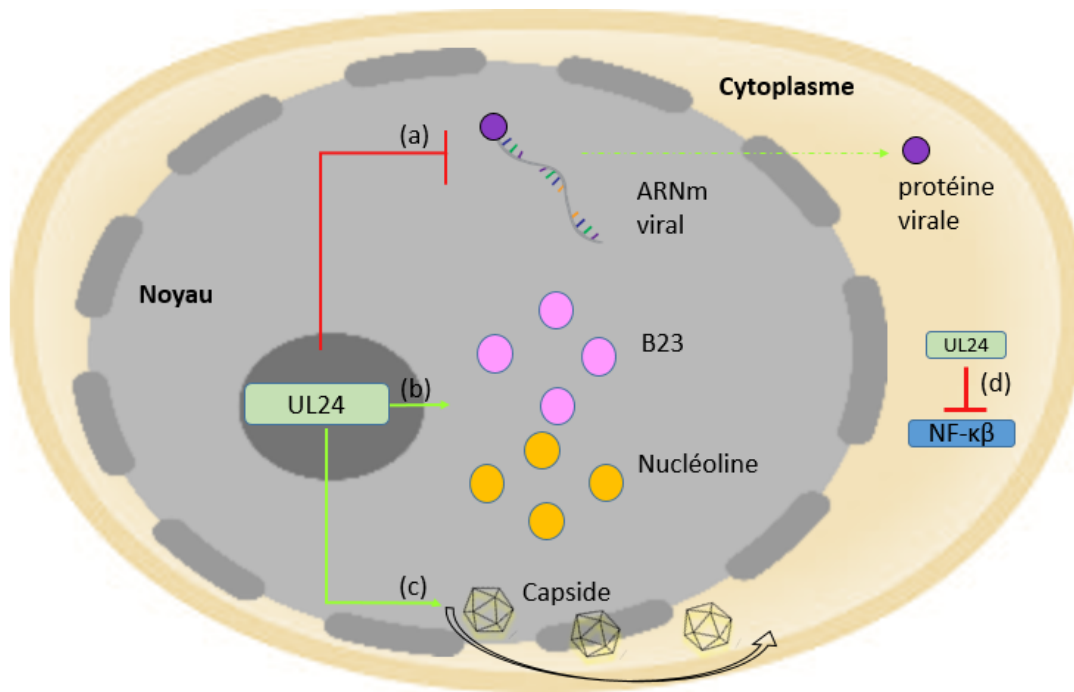
### 1.2.1 Études d'UL24 décrites en contexte d'expression ectopique

Toutes les études d'expression ectopique d'UL24 du HSV-1 ont été faites dans des modèles *in vitro* sous les approches expérimentales de transfection et transduction. Dans des cellules transfectées avec des constructions qui expriment des formes mutées d'UL24, il a été confirmé et validé que la séquence de localisation nucléolaire est dans les premiers 60 aa de la protéine (région N-terminale). Cette séquence et les HDs sont indispensables pour la dispersion des protéines nucléolaires, la nucléoline et la B23, y compris la mutation de l'HD-III dans la séquence endonucléase (Bertrand and Pearson, 2008; Bertrand *et al.*, 2010; Lymberopoulos *et al.*, 2011). De même, il a été validé la régulation à la baisse de l'expression des gènes viraux par UL24 ; un phénomène qui est dose-dépendant dans cette approche de transfection (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). Il a aussi été rapporté que la protéine UL24 inhibe la production des cytokines IFN- $\beta$  et IL-6 par le blocage générale de la reconnaissance d'ADN exogène, et spécifiquement par la voie cGAS-STING (détaillée à la section 1.3.1.3) (Xu *et al.*, 2017). En étudiant cette voie de signalisation, il a été confirmé que c'est la voie de NF-  $\kappa\beta$  qui est bloquée par UL24, plus spécifiquement au niveau de la translocation du dimère p50/p65.

D'ailleurs, l'expression par transduction lentivirale d'UL24 a souligné une nouvelle fonction de celle-ci dans l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M et l'induction de l'apoptose par inhibition de la cdc2 ou mieux connue comme CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*). Essentiellement, UL24 induit la phosphorylation de CDK1 sur la tyrosine 15, une modification post-traductionnelle d'inactivation qui bloque la formation du complexe cyclin B-CDK1 qui est important pour la transition de G2 vers la mitose ou phase M (Nascimento, Dias and Parkhouse, 2009). Cette observation reste encore à être validée dans un contexte d'infection.

En résumé, UL24 est important pour le succès de la réplication du HSV-1 dans les cellules épithéliales et les neurones, pour provoquer la pathologie herpétique, et pour la réactivation à partir de la latence. Le changement nucléolaire dépendant d'UL24 est probablement un aspect déclencheur qui favorise les étapes du cycle viral dès l'expression des gènes L se produit, tels que la sortie des nucléocapsides du noyau et l'inhibition des gènes IE et E pour favoriser l'établissement de la latence. En plus, le premier lien entre UL24 et l'évasion de la réponse

immunitaire via l'inhibition de NF- $\kappa$ B, supporte encore plus sa définition comme un gène impliqué dans la pathogénèse. Une représentation de ces fonctions est présentée à la figure 1.10.



**Figure 1.10 Fonctions majeures d'UL24 du HSV-1**

La protéine UL24 (en vert) se localise, entre autres, dans le noyau. Certaines fonctions d'inhibition (lignes en rouge) ont été rapportées comme la régulation à la baisse de l'expression des gènes viraux (a) et l'empêchement de la translocation vers le noyau de NF- $\kappa$ B (d). En revanche, parmi les fonctions d'induction (lignes en vert), UL24 est essentielle pour la dispersion des protéines du nucléole (b), à savoir la nucléoline (en jaune) et la B23 (en rose). Elle favorise également la sortie des capsides du noyau vers le cytoplasme (c).

### 1.3 L'immunité innée contre le HSV-1

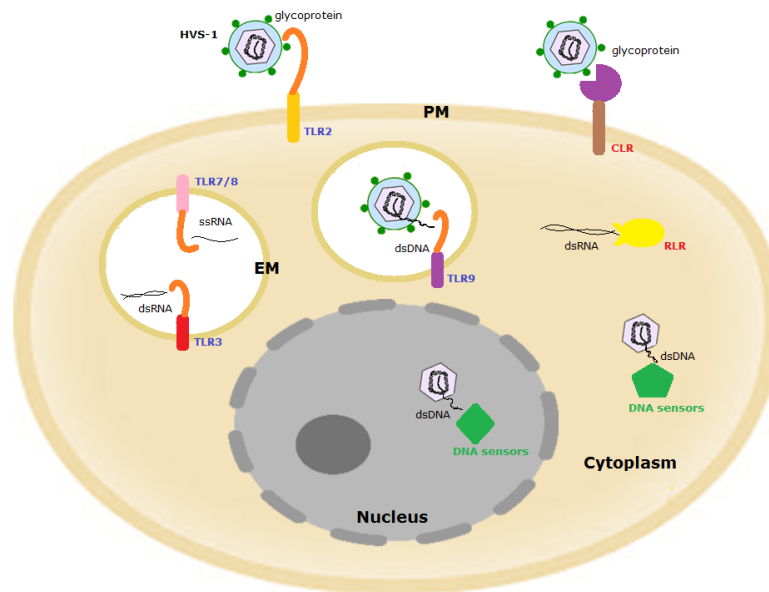
L'immunité innée est couramment présentée comme l'ensemble des barrières physiques, chimiques, et cellulaires qui jouent des rôles dans la maintenance de l'homéostasie chez l'hôte (Punt *et al.*, 2018). Les premières sortes de barrières sont créées par ou à partir des cellules épithéliales, par exemple, la couche cornée de la peau (barrière physique) et la production de la plupart des peptides antimicrobiens (barrière chimique) sur les muqueuses respectivement. Ces aspects de l'immunité innée contre l'infection par HSV-1 ne seront pas traités ici, néanmoins, il est important de mentionner que son ensemble, spécialement les protéines du système du complément et les peptides antimicrobiens épithéliales, ont un rôle à jouer dans la première phase de la réponse immunitaire (Lavrov *et al.*, 2006; Hans and Madaan Hans, 2014).

Dès que le HSV-1 traverse les barrières physiques et chimiques, le virus infecte par la suite principalement les cellules épithéliales des muqueuses orale-faciale. En tant que barrière cellulaire, ces cellules épithéliales en collaboration avec les cellules dendritiques (DCs) locales comme les cellules de Langerhans et les DCs de la peau (*dermal DCs*), vont réagir à l'infection représentant une deuxième phase de la réponse immunitaire (Kobelt, Lechmann and Steinkasserer, 2003). Cette phase comprend aussi la réaction intrinsèque à l'infection des autres cellules cibles comme les fibroblastes de la peau et des neurones sensitifs qui innervent les muqueuses, ce qui divise spatialement la réponse entre une zone superficielle et une zone interne autour des neurones infectés (Bystricka and Russ, 2005; Ouwendijk *et al.*, 2013). La troisième phase de la réponse immunitaire est caractérisée par le recrutement au site d'infection des cellules effectrices comme les macrophages et les cellules *natural killer*. L'activité antivirale, de tout l'ensemble des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée, aide à l'élimination du virus et à rétablir l'intégrité des tissus endommagés (Lavrov *et al.*, 2006).

### **1.3.1 Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires**

Les phases mentionnées ci-dessus ne se produisent pas forcément de manière séquentielle, spécialement dans le cas d'une réactivation virale par HSV-1. Néanmoins, étant donné la notion d'innée, les aspects de reconnaissance du virus via les récepteurs s'appliquent, à quelques exceptions près, à toutes les cellules qu'elles soient épithéliales, fibroblastiques ou neuronales.

Parmi les récepteurs d'une cellule, les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), comme leur nom l'indique, sont capables d'identifier des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou aux dangers (DAMP). Tel que mentionné, les cellules phagocytaires professionnelles comme les DCs et les macrophages sont recrutées vers le site d'infection. Ces cellules expriment à leur surface un groupe spécialisé de PRR pour promouvoir la phagocytose. Les PRR impliqués dans ce processus peuvent identifier le virus de façon directe par reconnaissance des glycoprotéines virales (De Jong *et al.*, 2008) ou de façon indirecte médiée par des opsonines (Van Strijp *et al.*, 1989; Jenks, Goodwin and Permar, 2019). La phagocytose et l'autophagie ne seront pas ici traitées davantage. Par contre, plusieurs articles de revue sur le sujet et leurs impacts dans les infections par virus à ADN ont été publiés (Jaumouille and Grinstein, 2016; Nikitina *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019). À l'exception des PRR impliqués dans la phagocytose, la plupart des autres PRR sont exprimés dans plusieurs types de cellules, spécialement celles qui sont exposées régulièrement aux pathogènes comme les cellules épithéliales, les cellules stromales et les fibroblastes (Punt *et al.*, 2018) (Figure 1.11).



**Figure 1.11 Les PRR et les PAMP du HSV-1**

Les TLR (texte en bleu) se situent associés à la membrane plasmique (PM) ou bien à la membrane des endosomes (EM). Différentes PAMP du HSV-1 sont reconnus par les TLR, tels que les glycoprotéines (TLR2), l'ADN double brin (TLR9), et les ARN simple brin (TLR7/8) ou double brin (TLR3). CLR et RLR (texte en rouge) ne reconnaissent que les glycoprotéines et les ARN double brin respectivement. Les senseurs d'ADN double brin (texte en vert) peuvent reconnaître l'ADN viral dans le cytoplasme autant que dans le noyau. Tous les acides nucléiques (ARN ou ADN) pourraient aussi être d'origine cellulaire dont la localisation et/ou la composition seraient modifiées lors de l'infection.

### 1.3.1.1 Les PRR associés à des membranes

Parmi les familles majeures de PRR, les récepteurs de type Toll (TLR) et lectines de type C (CLR) sont associés à des membranes. La famille des TLR est la mieux étudiée et son rôle dans l'immunité innée contre le HSV-1 a été révisé au cours des cinq dernières années sous différents angles (Ma and He, 2014; Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2019). Il y a dix TLR humains (TLR 1-10), dont six qui sont exprimés dans la membrane plasmique (TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10) et quatre dans les membranes des endosomes (TLR 3, 7, 8 et 9). En bref, ces récepteurs peuvent reconnaître plusieurs PAMP du HSV-1 comme les glycoprotéines (TLR2), les ARN double brin (TLR3) ou simple brin (TLR7/8), et l'ADN double brin (TLR9). Tous les TLR sont intégrés aux voies de signalisation médiées par MyD88 et TRIF qui permettent l'activation en aval des facteurs de transcription AP-1, NF- $\kappa$ B, et IRF3/7. Un aspect intéressant des TLR, est leur importance dans les neurones du TG pour initier une réponse immunitaire innée efficace (Ma and He, 2014; Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2019). Les CLR, au contraire des TLR, ne reconnaissent que les glycoprotéines du virus dont le rôle dans l'immunité innée contre le HSV-1 a été soulevé dans le processus de phagocytose (De Jong *et al.*, 2008; Bermejo-Jambrina *et al.*, 2018).

Malgré l'existence du TLR9 dans les endosomes, leur contribution à la détection de l'ADN viral n'est pas entièrement comprise. D'un côté, le HSV-1 est un virus enveloppé qui, dépendamment de la cellule hôte, peut s'échapper de la voie d'entrée endosomale et, en revanche, entrer par fusion directe de son enveloppe avec la membrane plasmique cellulaire (Sayers and Elliott, 2016; Weed and Nicola, 2017). D'un autre côté, même dans un endosome, le virus semble le quitter avant que son génome soit exposé à l'intérieur de ce type de vésicule (Kilcher and Mercer, 2015). Néanmoins, la présence d'ADN double brin mitochondrial ou cellulaire contenu dans des vésicules par processus d'autophagie, pourrait expliquer l'importance de TLR9 lors d'une infection par HSV-1 (West *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019)

### **1.3.1.2 Les PRR non associés à des membranes**

Les familles majeures de PRR, les récepteurs de type RIG-I (RLR) et de type NOD (NRL), se localisent dans le cytoplasme et reconnaissent notamment les ARNs double brin et les peptidoglycanes respectivement. La contribution de ces deux familles de PRR à la réponse immunitaire innée contre le HSV-1 ne semble pas être essentielle. Néanmoins, il a été rapporté que la protéine virale US11 affecte la voie de signalisation des récepteurs RLR via l'interaction avec RIG-I et MDA-5 (Xing *et al.*, 2012). Tel que décrit pour l'ADN double brin ci-dessus, l'ARN double brin pourrait aussi être d'origine cellulaire ou bien représente l'hybridation complémentaire entre les ARN messagers viraux qui proviennent des gènes chevauchants (Jacquemont and Roizman, 1975; da Silva and Jones, 2013; Chiang *et al.*, 2018), bien que son accumulation dans le cytoplasme serait limitée par la RNase virale *vhs* (Dauber, Saffran and Smiley, 2019). L'induction des ARNs double brin lors d'une infection par HSV-1 permettrait aussi l'activation de TLR3 si ceux-ci se retrouvaient dans des endosomes.

### **1.3.1.3 Les senseurs de l'ADN viral**

Une fois le virus fusionne son enveloppe avec la membrane cellulaire, plasmique ou des endosomes, la nucléocapside entourée du tégument est exposée à l'environnement cytoplasmique. Cette exposition induit un mécanisme central de dégradation des protéines étrangères, le système ubiquitine-protéasome, qui provoque le relâchement de l'ADN viral dans le cytoplasme (Horan *et al.*, 2013). La détection de l'ADN double brin viral dans ce compartiment de la cellule est aujourd'hui un aspect central et important dans la réponse immunitaire innée contre les herpèsvirus (Stempel, Chan and Brinkmann, 2019).

Il existe au moins onze senseurs cellulaires qui potentiellement peuvent détecter l'ADN cytoplasmique (Dempsey and Bowie, 2015; Abe, Marutani and Shoji, 2019) (tableau 1.3). Cette diversité de senseurs montre l'importance de contrôler la présence de cette molécule dans le cytoplasme. En effet, l'ADN dans ce compartiment est synonyme de PAMP (ADN exogène) ou de DAMP (ADN cellulaire ou mitochondrial). L'existence de plusieurs senseurs ne semble pas être une question de redondance, au contraire, c'est probablement une réponse aux caractéristiques particulières de l'ADN. De fait, certains d'entre eux peuvent reconnaître la structure de l'ADN, tel que la conformation des hélices et les phosphates aux extrémités, tandis que d'autres reconnaissent les séquences de l'ADN, tels que les îlots CpG et les régions riches en AT, entre autres. De cette manière, les senseurs ont la capacité de distinguer l'ADN endogène et l'ADN exogène.

**Tableau 1.3 Les senseurs cellulaires d'ADN cytoplasmique**

Senseur	Type d'ADN	Localisation	Références
DAI	<i>Z-form DNA</i>	Cytoplasme	(Takaoka <i>et al.</i> , 2007)
ARN polymérase III	<i>AT-rich dsDNA</i>		(Chiu, Macmillan and Chen, 2009)
DED/H-box (ex. DDX 41)	<i>CpG DNA</i>		(Jiang <i>et al.</i> , 2017)
STING	<i>ssDNA and dsDNA</i>		(Abe <i>et al.</i> , 2013)
ALRs (ex. IFI16 et AIM2)	<i>Long naked DNA and B-form DNA.</i>	Cytoplasme et noyau	(Unterholzner <i>et al.</i> , 2010; Stratmann <i>et al.</i> , 2015)
Rad50/MRE11	<i>DNA double-strand breaks</i>		(Roth <i>et al.</i> , 2014)
LRRF1P1	<i>B- and Z-form DNA</i>		(Yang <i>et al.</i> , 2010)
LSm14A (Rap55)	<i>dsDNA</i>		(Li <i>et al.</i> , 2012)
DNA-PK (Ku70)	<i>DNA double-strand breaks</i>		(Ferguson <i>et al.</i> , 2012)
HMGB	<i>specific DNA sequences</i>		(Stros, 2010)
cGAS	<i>Phosphate backbone DNA</i>		(Sun <i>et al.</i> , 2013)

Type d'ADN reconnu et localisation des senseurs cellulaires d'ADN cytoplasmiques.

La plupart des senseurs nucléaires participent dans la réparation de l'ADN cellulaire et possèdent en plus un mécanisme de translocation vers le cytoplasme pour y faire face aux ADN cytoplasmiques. L'exception à cette règle est le senseur cGAS dont la forme active est cytoplasmique, et sa translocation vers le noyau laisse celui inactive (Volkman *et al.*, 2018). Malgré l'abondance de senseurs mentionnés dans le tableau 1.3, la validation et/ou la

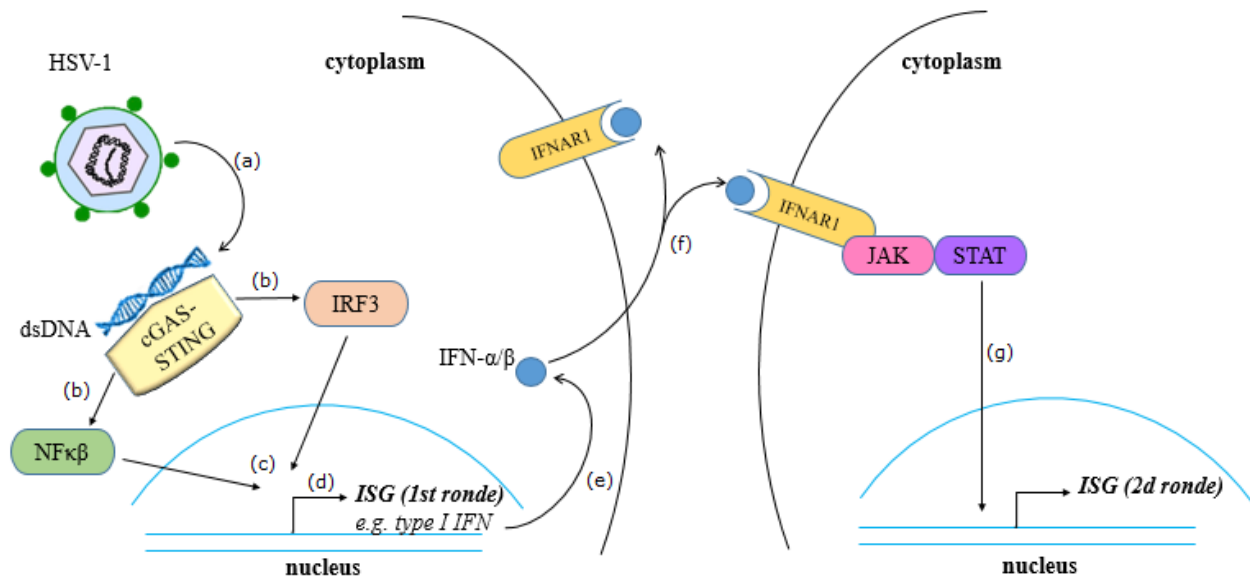


fonctionnalité dans des modèles *in vivo* sont restreints au senseur d'ADN majeur : *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) (Li *et al.*, 2013; Schoggins *et al.*, 2014; Motwani, Pesiridis and Fitzgerald, 2019).

Le senseur cGAS a été amplement étudié depuis sa découverte en 2013 (Sun *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). Dès que la cGAS est activée par la reconnaissance des formes aberrantes du groupe phosphate de l'ADN (5' di ou tri-phosphorylé), elle catalyse la conversion de GTP et ATP dans *cyclic GMP-AMP* (cGAMP) (Mankan *et al.*, 2014). cGAMP est un deuxième messager qui déclenche une réponse médiée par le *stimulator of interferon genes* (STING). L'activation de STING par cGAMP, à son tour, initie essentiellement une réaction de phosphorylation en chaîne qui mène à l'activation et translocation des facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B vers le noyau. Ces facteurs vont par la suite induire la première vague d'expression des *IFN-stimulated genes* (ISGs), y compris les IFN de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Les IFN de type I sont des cytokines centrales pour déclencher l'état antiviral de la cellule. Une fois qu'elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire, ces cytokines peuvent agir de façon autocrine ou paracrine. L'interaction de l'IFN de type I avec son récepteur IFNAR1, permet l'activation en aval de la voie JAK-STAT. Ce dernier, le facteur de transcription STAT, est important pour l'induction de la deuxième vague d'expression des ISG (Schneider, Chevillotte and Rice, 2014; Majoros *et al.*, 2017) (Figure 1.12). Les gènes ISG codent pour des protéines qui, dans leur ensemble, déclenchent les mécanismes moléculaires par lesquels la cellule se défend contre l'infection virale, y compris la sécrétion des cytokines et chimiokines qui vont activer et attirer d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative.

Un aspect qui ressort de la voie de signalisation cGAS-STING, est la conservation évolutive de ces deux protéines qui sont présentes même dans les animaux diblastiques comme les cnidaires dont la divergence entre celui et les humains date de plus de 500 millions d'années (Wu and Chen, 2014; Kranzusch *et al.*, 2015). Cette observation démontre l'importance de la voie cGAS-STING dans la reconnaissance d'ADN cytoplasmique. Comme on pouvait s'y attendre, les mécanismes de régulation de cette voie sont variables et touchent plusieurs aspects spécifiques qui ne peuvent pas être détaillés ici. Cependant, une revue détaillée sur cet égard a récemment été publiée (Motwani, Pesiridis and Fitzgerald, 2019).



**Figure 1.12 Les composants majeurs de la voie de signalisation cGAS-STING**

(a) Le relâchement de l'ADN viral dans le cytoplasme déclenche l'activation de la voie cGAS-STING, ce qui mène à la phosphorylation et translocation vers le noyau en aval des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 (b-c). (d) Ces facteurs induisent l'expression, entre autres, de l'interféron de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ). (e-f) Une fois l'interféron est exprimé et sécrété, il peut agir de manière autocrine ou paracrine. (g) La reconnaissance de l'IFN par son récepteur IFNAR1 permet l'activation en aval de la voie JAK-STAT qui est, en fin de comptes, la voie responsable de déclencher l'état antiviral de la cellule via l'expression des ISGs.

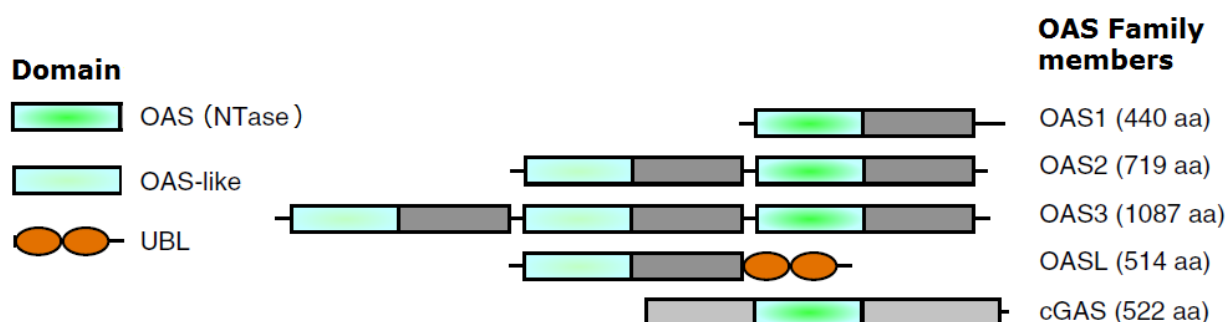
Dans le cas d'une infection par HSV-1, la voie cGAS-STING a un rôle important à jouer. Des expériences *in vivo* sur des souris *knockout* dans le senseur (*cGAS*<sup>-/-</sup>) démontrent plus de susceptibilité à l'infection fatale par HSV-1 dont les cellules sont en plus incapables de produire l'interféron de type I (Li *et al.*, 2013). Le même résultat est obtenu dans des souris *knockout* pour le médiateur de cGAS (*STING*<sup>-/-</sup>) (Ishikawa, Ma and Barber, 2009). De plus, la voie de l'interféron de type I est aussi important dans la réponse immunitaire innée contre le HSV-1. Des souris *knockout* dans le récepteur de l'interféron (*IFNRA1*<sup>-/-</sup>) ou dans la voie de signalisation JAK-STAT (*STAT*<sup>-/-</sup>) sont plus susceptibles à l'infection fatale par HSV-1 (Pasiaka *et al.*, 2011; Geurs *et al.*, 2012). Ces résultats mettent en évidence que l'activation de la voie cGAS-STING, médiée par la reconnaissance d'ADN cytoplasmique, est un aspect critique de la réponse immunitaire innée contre le HSV-1 via l'interféron de type I.

### 1.3.2 La protéine cellulaire oligoadenylate synthetase-like (OASL)

La famille de protéines *oligoadenylate synthetases* (OAS) appartient aux ISG et est actuellement composée de cinq membres : OAS1, OAS2, OAS3, OAS-like (OASL) et cGAS (Zhu, Ghosh and Sarkar, 2015). Cette famille est caractérisée par la présence des domaines OAS avec une activité

nucleotidyltransferase (NTase) ou en absence de celle-ci, un domaine OAS-like (Figure 1.13). Les OAS (1-3) et cGAS partagent toutes la partie NTase par laquelle leur fonction enzymatique est réalisée.

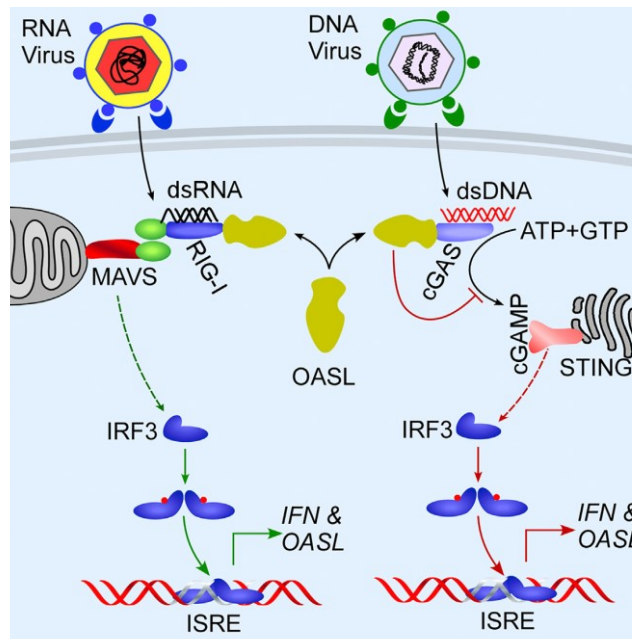
Dans le cas des OAS (1-3), l'activité NTase promeut la dégradation des ARN via l'activation de la RNase L, ce qui se traduit par un empêchement de la production des protéines virales et, dans le cas de virus à ARN, de la réplication du génome viral. Également, l'activité NTase de la cGAS est responsable de la production de cGAMP, un deuxième messager qui active STING (voir les détails dans la section 1.3.1.3) (Kuchta *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013).



**Figure 1.13 Organisation des domaines protéiques dans les membres de la famille OAS chez l'humain**

Les protéines OAS (1-3) ont 1, 2 et 3 domaines OAS-like (boîte bleu) respectivement. Parmi ces domaines, il y en a juste un qui a une activité nucleotidyltransferase (NTase) (en vert diffuse) et devient alors un domaine OAS (NTase). OASL contient un domaine OAS-like dans son extrémité N-terminale et deux domaines ubiquitin-like (UBL) en tandem dans son extrémité C-terminale. Le dernière membre dans la liste, cGAS, conserve une structure similaire au domaine OAS (NTase) malgré que la séquence des acides aminés est différente (modifiée de Zhu, Ghosh and Sarkar, 2015).

L'OASL est un membre très particulier dans la famille OAS car elle présente deux caractéristiques uniques : l'absence d'une activité NTase et la présence de deux répétitions en tandem d'un domaine ubiquitin-like (UBL). Aujourd'hui il est bien connu que l'OASL a un rôle double et opposé dans les infections virales. Dans le cas de virus à ARN, l'OASL est antiviral car elle promeut l'activité du senseur RIG-I dans la reconnaissance de l'ARN viral. En plus, pour cette activité antivirale son domaine UBL est indispensable (Marques *et al.*, 2008). Par contre, dans le cas de virus à ADN, l'OASL est provirale car elle bloque l'activité enzymatique de son proche parent, le senseur cGAS, c'est-à-dire la production de cGAMP (Ghosh *et al.*, 2019). Encore une fois le domaine UBL est essentiel pour cette activité provirale (Lum *et al.*, 2018) (Figure 1.14).



**Figure 1.14 Rôles différentiels d'OASL dans les infections virales**

L'OASL promeut l'activité de RIG-I dans un contexte d'infection par virus à ARN, ce qui augmente l'induction de l'interféron et ses effets antiviraux. En revanche, l'OASL bloque la conversion d'ATP et GTP dans cGAMP du senseur cGAS dans un contexte d'infection par virus à ADN. Ce blocage inhibe la production de l'interféron et aide à la réplication des virus à ADN (Tirée de Ghosh *et al.*, 2019).

Il y a trois isoformes rapportées de l'OASL : OASLa (p59), OASLb (p30) et OASLd (p45). Toutes les isoformes conservent la région N-terminale. L'OASLb est la forme C-terminale tronquée qui est localisée dans le cytoplasme (Choi *et al.*, 2015). L'OASLa, au contraire de l'isoforme b, est la forme dominante et localisée dans le noyau (Rebouillat, Marie and Hovanessian, 1998). Cette observation a mis en évidence l'importance de la région C-terminale dans la localisation de la protéine. L'OASLd est une isoforme induite par IFN- $\gamma$  qui comme l'OASLa, montre aussi une activité antivirale contre les infections de virus à ARN (Guo *et al.*, 2012). L'importance biologique des différentes isoformes n'est pas connue, cependant, la littérature suggère que les isoformes *a* et *d* sont impliqués dans les effets pro- et antiviraux grâce à la présence du domaine UBL dans la région C-terminale.

#### 1.4 Structure du projet : hypothèse, objectifs et approche méthodologique

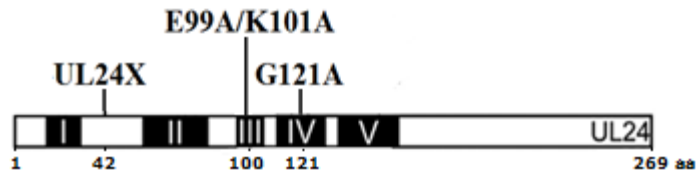
Ce projet est basé sur l'observation qu'il y a une régulation des niveaux des ARNm d'OASL suite à l'infection par le HSV-1 (Ghosh *et al.*, 2019). Plus spécifiquement, les transcrits d'OASL sont régulés à la hausse à des temps précoces post infection, puis il y a une chute dans les niveaux des transcrits à des temps tardifs. Consistent avec le rôle d'OASL comme inhibiteur de l'activité

du senseur d'ADN cGAS, les niveaux des ARNm de l'*IFN-β* sont indétectables à des temps précoces (en présence d'*OASL*). Par la suite, l'*IFN-β* est fortement induit à des temps tardifs où l'*OASL* est moins exprimée et par conséquent le senseur cGAS démarrerait donc la réponse immunitaire innée via la reconnaissance de l'ADN viral.

Dans le but de mieux comprendre la régulation de l'expression d'*OASL* à des temps tardifs de l'infection par le HSV-1, nous avons formulé deux scénarios de départ : actif versus passif. Le premier comprendrait alors la participation d'un produit viral tardif (gène L) impliqué dans la régulation à la baisse d'*OASL*, tandis que le deuxième serait en revanche l'effet de la chute au cours de l'infection de l'expression des gènes IE et E impliqués dans l'évasion immunitaire. Malgré que ce deuxième scénario puisse s'intégrer au premier, les résultats publiés par Ghosh *et al.*, 2019 suggèrent qu'au moins les protéines virales IE ne seraient pas essentielles dans l'induction et la régulation à la baisse d'*OASL* car la souche de virus utilisée dans leur travail (HSV-d109) n'exprime pas les protéines IE (Samaniego, Neiderhiser and DeLuca, 1998).

Cela dit, nous avons testé l'hypothèse que la protéine UL24 du HSV-1 est impliquée dans la régulation à la baisse de l'expression d'*OASL*. L'origine de cette association est l'observation d'un autre groupe de recherche qui a détecté une faible interaction entre *OASL* et UL24 du HSV-1 par des études de co-immunoprécipitation dans un modèle d'expression ectopique de ces deux protéines (Bussey *et al.*, 2018). De plus, la protéine UL24 a un rôle immunomodulatrice car elle bloque la translocation de NF- $\kappa$ B (Xu *et al.*, 2017) et dans un modèle murin d'infection, notre équipe a démontré que l'absence d'UL24 entraîne quasiment aucun signe clinique (Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Rochette *et al.*, 2015), ce qui a renforcé la notion qu'UL24 régule la réponse immunitaire contre l'infection par HSV-1.

Pour tester cette hypothèse, deux temps d'infection sont comparés tout au long de notre étude. Le temps précoce ou 5 hpi où la plupart de gènes IE/E sont déjà exprimés et le temps tardif ou 12 hpi où l'expression d'UL24 arrive à son maximum (Pearson and Coen, 2002). En bref, notre approche consiste en un modèle d'infection *in vitro* en utilisant des virus qui expriment la protéine UL24 (KOS et UL24Xres) et un virus mutant en UL24 qui sont représentés et expliqués dans la figure 1.15. Des cellules HFF1 ou HeLa ont été infectées à une multiplicité d'infection de 10 avec les souches de HSV-1, tel qu'indiqué dans les figures de résultats. La quantification des niveaux des transcrits cellulaires a été fait par RT-qPCR, tandis que l'expression des protéines, y compris les formes phosphorylées, a été évaluée par Western blot.



**Figure 1.15 Représentation des mutations testées ici dans la protéine UL24**

La protéine UL24 (rectangle en blanc) est représentée avec les domaines d'homologie (HD) I-V (carrés noirs). Les mutations testées ici sont indiquées en dessus avec les positions des acides aminés (aa) d'UL24 en dessous. En bref, UL24X correspond à l'introduction des codons d'arrêt de la traduction à la position 42 aa ; E99A/K101A est une substitution dans la séquence endonucléase (HD-III) d'acide glutamique (E) et lysine (K) par alanine (A), position 99 et 101 aa respectivement ; et G121A est une substitution de glycine (G) par A dans l'HD-IV, position 121 aa (modifiée de Bertrand *et al.*, 2010)

Le présent projet aborde deux objectifs. Dans le premier objectif, nous avons testé l'impact d'UL24 sur la régulation de l'expression d'OASL. Premièrement, nous avons validé l'induction précoce des transcrits d'OASL lors de l'infection par HSV-1 avec toutes les souches utilisées dans cette étude. Deuxièmement, les niveaux des transcrits d'OASL ont été suivies à 12 hpi afin d'évaluer la contribution par UL24 dans la régulation à la baisse d'OASL. Puis et étant donné que l'OASL bloque cGAS, ce qui affecte l'induction de l'IFN de type I, nous avons testé les niveaux des transcrits de l'*IFN-β* à 5 et 12 hpi. Finalement, l'impact d'UL24 sur la régulation d'OASL a aussi été évalué au niveau protéique par Western Blot.

Dans le deuxième objectif, encore une fois la technique de Western blot est utilisée dans le but de déterminer l'effet d'UL24 dans l'activation des facteurs de transcription IRF3 et STAT1 qui promeuvent l'expression d'OASL (Melchjorsen *et al.*, 2009). D'un côté, la détection de l'état de phosphorylation d'IRF3 et STAT1 avec des anticorps spécifiques nous a permis de mieux comprendre les voies de signalisation modulées par UL24 du HSV-1 qui induisent l'expression précoce et la régulation à la baisse tardive d'OASL. D'un autre côté, nous avons testé les niveaux des transcrits de deux ISG, dont l'un est notamment induit par IRF3 (*ISG54*) et l'autre par STAT1 via l'IFN (*CXCL10*) dans le but de renforcer la relation entre l'activation des facteurs de transcription et leurs effets sur l'induction des ISGs.

## **2 HERPES SIMPLEX VIRUS 1 UL24 IS REQUIRED FOR DOWNREGULATION OF OLIGOADENYLATE SYNTHETASE-LIKE EXPRESSION AT LATE TIMES IN INFECTION**

---

**Traduction française:** La protéine UL24 du virus herpès simplex 1 régule à la baisse l'expression de l'*oligoadenylate synthetase-like* à des temps tardifs de l'infection

**Auteurs :**

Fernando Sánchez Quete<sup>1</sup>, Maha Ben Hamouda<sup>1</sup>, Angela Pearson<sup>1,2</sup>

1. Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

2. Centre of excellence in orphan disease research - Courtois Foundation

**Titre de la revue ou de l'ouvrage :**

Journal of General Virology

Date de soumission : novembre-2019

**Contribution des auteurs :**

Fernando Sánchez Quete : Conception et réalisation des expériences ; élaboration des figures ; analyse des résultats ; et rédaction du manuscrit.

Maha Ben Hamouda : Réalisation des expériences ; élaboration des figures ; et révision du manuscrit.

Angela Pearson : Conception des expériences ; analyse des résultats ; révision et correction du manuscrit.





## 2.1 ABSTRACT

Inhibition of the DNA sensor Cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS) by interferon (IFN)-stimulated gene (ISG) product oligoadenylate synthetase-like (OASL) results in a decrease of type I IFN production, which enhances replication of DNA viruses. Because cGAS is an important DNA sensor of herpes simplex virus 1 (HSV-1), we hypothesized that the virus encodes functions that control the expression of OASL. The HSV-1 gene *UL24* is a determinant of pathogenesis. *UL24* has a negative impact on Nuclear Factor  $\kappa\beta$  activity, and on levels of several viral transcripts. Using a *UL24*-null virus, we discovered a requirement for *UL24* in the reduction of OASL levels in fibroblasts at 12 hours post infection, which coincided both with an increase in levels of IFN- $\beta$  mRNA and a reduction in IRF3 phosphorylation. In contrast, *UL24* was not required for phosphorylation of STAT1 on S727 at late times, but was critical for this phosphorylation event at early times. Moreover, the impact of *UL24* on mRNAs levels of the ISGs *CXCL10* and *ISG54* was consistent with the effect of *UL24* on IFN- $\beta$  induction and IRF3 phosphorylation respectively. Our data reveal a new function for *UL24* in the downregulation of OASL expression and of IRF3 phosphorylation. In addition, we identified a requirement for *UL24* in the regulation of STAT1 phosphorylation at S727 early in infection. Our results support an important role for *UL24* in the modulation of the innate immune response by HSV-1.

Keywords: Herpes simplex virus 1, *UL24*, OASL, IRF3, STAT1, type I interferon.

## 2.2 INTRODUCTION

Early detection of viral nucleic acids by pattern recognition receptors (PRRs) has emerged as a key feature of innate immunity against viruses (Hartmann, 2017; Abe, Marutani and Shoji, 2019). Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) is a major PRR able to recognize viral double-stranded DNA, and trigger the stimulator of interferon genes (STING) (Dempsey and Bowie, 2015; Motwani, Pesiridis and Fitzgerald, 2019). DNA sensing through the cGAS-STING pathway leads to activation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), resulting in the production of type I interferon (IFN) (IFN- $\alpha/\beta$ ) and other proinflammatory cytokines (Chen, Sun and Chen, 2016). These cytokines then interact with their receptors activating receptor-associated Janus Kinases (JAKs) that in turn activate the signal transducers and activators of transcription (STAT) family of transcription factors (Majoros *et al.*, 2017). The JAK-STAT signaling pathway leads to transcription of IFN-stimulated genes (ISGs) to orchestrate antiviral defenses and activate adaptive immunity (Villarino, Kanno and O'Shea, 2017; Motwani, Pesiridis and Fitzgerald, 2019).

Oligoadenylate synthetase-like (OASL) has been identified as a negative regulator of cGAS activity during infection by DNA viruses (Ghosh *et al.*, 2019). Recent studies have demonstrated that herpes simplex virus 1 (HSV-1) promotes OASL expression early in infection, which limits the type I IFN response, and thus enhances virus replication (Lum *et al.*, 2018; Ghosh *et al.*, 2019). Interestingly, OASL expression is subsequently negatively regulated at late times post-infection, coinciding with type I IFN induction. To date, limited information is available regarding how HSV-1 modulates the expression of OASL, and no viral factors have been identified that are responsible for this activity.

The HSV-1 genome encodes over 80 genes, which during a lytic infection are expressed in three main kinetic classes: immediate-early (IE), early (E) and late (L) (Roizman and Zhou, 2015). Following lytic replication in epithelial cells, the virus goes on to infect the endings of sensory neurons, ultimately leading to the establishment of latency (Roizman and Whitley, 2013). During latency, the lytic pattern of viral gene expression shifts to a restricted pattern of expression where most viral genes are repressed. *UL24* is a determinant of pathogenesis (Jacobson *et al.*, 1998; Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Rochette *et al.*, 2015; Dridi *et al.*, 2018), is a conserved gene among *Herpesviridae* members (Jacobson, Martin and Coen, 1989), and encodes a leaky-late protein (Pearson & Coen 2002). In experimental infections in mice using *UL24* mutant viruses, strains deficient in full length *UL24* exhibit a decrease in viral titers and in

the number of infected neurons, a drastic reduction in clinical signs, and a reduction in the amount of HSV-1 DNA present in TG during latency (Jacobson *et al.*, 1998; Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Rochette *et al.*, 2015). HSV-1 UL24 inhibits NF- $\kappa$ B activity, and has been shown to negatively affect expression of several HSV-1 genes (Sanabria-Solano *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). Herein, we tested the hypothesis that UL24 modulates the innate immune response to HSV-1 in part by inhibiting OASL expression. Our results reveal a link between OASL expression and UL24 during HSV-1 infection of fibroblasts in culture.

## 2.3 METHODS

### 2.3.1 Cells and viruses

Human foreskin fibroblasts (HFF) and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with penicillin (50 U/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/ml), and 8% or 10% FBS respectively. All cell lines were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified chamber. The HSV-1 strains KOS and UL24X were originally provided by DM Coen (Harvard Medical School) (Jacobson *et al.*, 1998). The UL24X-rescue strain was generated by homologous recombination, and described previously (Rochette *et al.*, 2015).

### 2.3.2 RT-qPCR

Cells in 6-well plates were either mock-infected or infected at an MOI of 10 with the indicated HSV-1 strains. Total RNA was isolated 5 and 12 hours post infection (hpi) (BioBasic All-in-One DNA/RNA kit), and treated with DNase. Quantification of specific mRNA species was done by RT-qPCR using the Luna® Universal One-Step RT-qPCR kit (New England Biolabs [NEB]), and an Agilent Mx3000P instrument. The primer sequences for *OASL*, *IFN- $\beta$*  and *GAPDH* have been published previously (Bussey *et al.*, 2018; Cingöz and Goff, 2018). For *CXCL10*, the primers used were 5'-ACCTCTCTCTAGAACTGTACGC-3' and 5'-GATTCAGACATCTCTTCTCACCC-3'. For *ISG54*, the primer sequences were 5'-GCCATTCGGCTGAATCCTGA-3' and 5'-GCAGGTAGGCATTGTTTGGT-3'. Target gene mRNA levels were quantified relative to those for *GAPDH* using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001).

### **2.3.3 Western Blotting**

Cells were washed twice with cold PBS, and lysed directly in the well in RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCL, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, and 1x protease/phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling, NEB). After incubation on ice for 10 min, protein loading buffer was added to the lysates, which were then heated at 95°C for 5 min. Proteins were resolved by SDS-PAGE using a 10% acrylamide gel, and electrotransferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad). The membrane was incubated at 4°C overnight in blocking solution (1% BSA in TBS) with gentle shaking. The next day, the blots were washed three times in TTBS, incubated with the indicated primary antibodies (diluted 1:1,000 in TTBS containing 0.5% gelatin), washed three times with TTBS, incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (diluted 1:10,000 in TTBS with 0.5% gelatin), and washed three times with TBS. Signal was developed using the Clarity Western chemiluminescence substrate (Bio-Rad), and detected using X-ray film. All primary antibodies were obtained from Cell Signaling (NEB), with the exception of the antibody against OASL, which was obtained from Abgent.

### **2.3.4 Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SD or SE of three and two independent experiments respectively. One and two-way ANOVA were used for comparison among all different groups depending on the number of times analyzed. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

## **2.4 RESULTS AND DISCUSSION**

### **2.4.1 Down-regulation of OASL expression during HSV-1 infection is dependent on UL24**

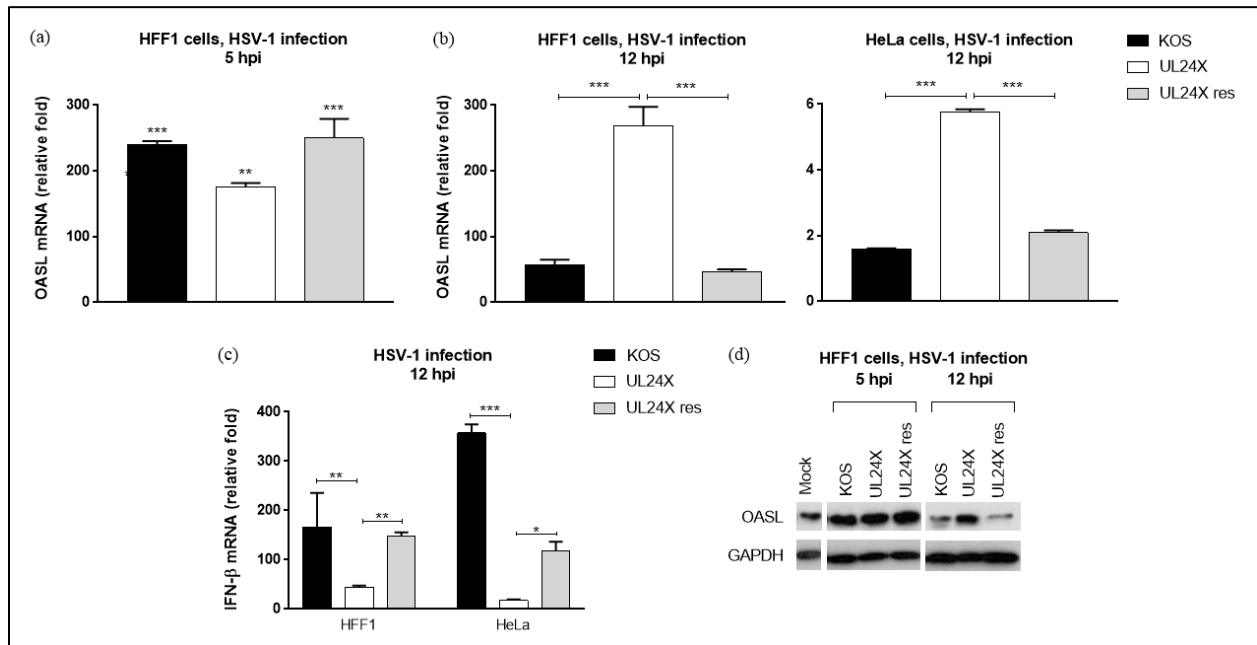
HSV-1 encodes several gene products that counter innate immune strategies of the host cell, and it also induces proviral cellular proteins such as OASL (Ghosh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). Type I IFN induction following HSV-1 infection is important for viral clearance and to limit extensive damage to the host via the triggering of the host antiviral and inflammatory responses (Teijaro, 2016; Giraldo, Wilcox and Longnecker, 2017). OASL, an inhibitor of the DNA sensor cGAS, is a protein whose expression is moderated temporally during infection. Levels of OASL increase early in infection, and then drop down late in infection (Ghosh *et al.*, 2019). We have previously shown that the late protein UL24 has a negative impact on the expression of several viral genes in

infected cells, and UL24 has also been shown to inhibit the activity of NF- $\kappa$ B (Sanabria-Solano *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). We tested the hypothesis that UL24 inhibits the expression of *OASL* gene products in infected cells. We either mock-infected or infected HFF1 cells with the HSV-1 strain KOS, the UL24-null strain UL24X, or the corresponding rescue virus, and quantified the relative amounts of *OASL* mRNA at 5 hpi by RT-qPCR. Similar to previous (Lum *et al.*, 2018; Ghosh *et al.*, 2019), we found that *OASL* transcription was strongly induced in response to infection with wild type HSV-1 at early times, with levels that increased over 200-fold compared to mock-infected cells (Fig. 1a). Infection with the UL24X strain and the rescue strain also induced *OASL* transcription to the same order of magnitude. Because *OASL* inhibits type I IFN induction, as expected, we found that *IFN- $\beta$*  mRNA levels were undetectable at early times post infection (data not shown).

We next tested the effect of *UL24* on *OASL* expression at 12 hpi, a time where UL24 protein levels are near their peak during infection (Pearson and Coen, 2002). In HFFs infected with either of the UL24-expressing viruses, we observed a dramatic reduction in *OASL* mRNA levels at 12 hpi compared to 5 hpi (Fig. 1b, left-hand panel). Consistent with this reduction in *OASL* expression, we observed an increase in the accumulation of *IFN- $\beta$*  transcripts (Fig. 1c). Strikingly, no such reduction in *OASL* transcript levels were observed at 12 hpi in HFFs infected with UL24X, and *IFN- $\beta$*  mRNA levels remained low (Fig. 1b, left-hand panel, and c). To test whether the effect was cell type specific, we carried out a similar experiment using HeLa cells, a human epithelial cell line. In HeLa cells, we again found that levels of *OASL* mRNA were significantly higher at 12 hpi with UL24X than with either the wild type or rescue virus (Fig. 1b, right-hand panel). Similar to our results for HFFs, we found that infection with the UL24-null strain resulted in a decrease of *IFN- $\beta$*  mRNAs levels compared to levels in HeLa cells infected with a UL24-expressing strain (Fig. 1c). These results demonstrate that the decrease in *OASL* transcript levels at late times in infection with HSV-1 is *UL24*-dependent, and that this effect of UL24 is not specific to HFFs.

Next, we asked if the impact of UL24 on *OASL* mRNA levels would be reflected at the protein level. HFF1 cells were infected with HSV-1, lysates collected at 5 and 12 hpi, and *OASL* protein was detected by Western blot. The signal for *OASL* protein was similar for all HSV-1 strains at 5 hpi; however, at 12 hpi, we observed a stronger *OASL* signal in the lysates from cells infected with the UL24-null strain compared to those from cells infected with strains that express UL24 (Fig. 1d). Taken together, these data show that UL24 inhibits expression of *OASL* at both the mRNA and protein levels at late times during infection.

The orthologue of HSV-1 *UL24* in the *Gammaherpesvirinae* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is the *ORF20* gene. KSHV ORF20 protein was identified as an OASL-binding partner in proteomic studies using cells that ectopically expressed ORF20 (Bussey *et al.*, 2018). A weak interaction between HSV-1 UL24 and OASL was also noted in the study; however, we have no evidence that a physical association of OASL with HSV-1 UL24 drives reduced expression of *OASL*. In our experiments, we found that HSV-1 UL24 expression had a negative impact on OASL levels during infection. In contrast, KSHV ORF20 was found to stimulate *OASL* expression; however, the impact of ORF20 on *OASL* expression was only tested for ectopically expressed ORF20, and not in the context of infection, which may explain the conflicting results. We also cannot rule out the possibility that *UL24* orthologues of *Alphaherpesvirinae* and *Gammaherpesvirinae* viruses have distinct functions during infection.



**Figure 2.1 Reduction of OASL expression at late times in HSV-1 infection is UL24-dependent.**

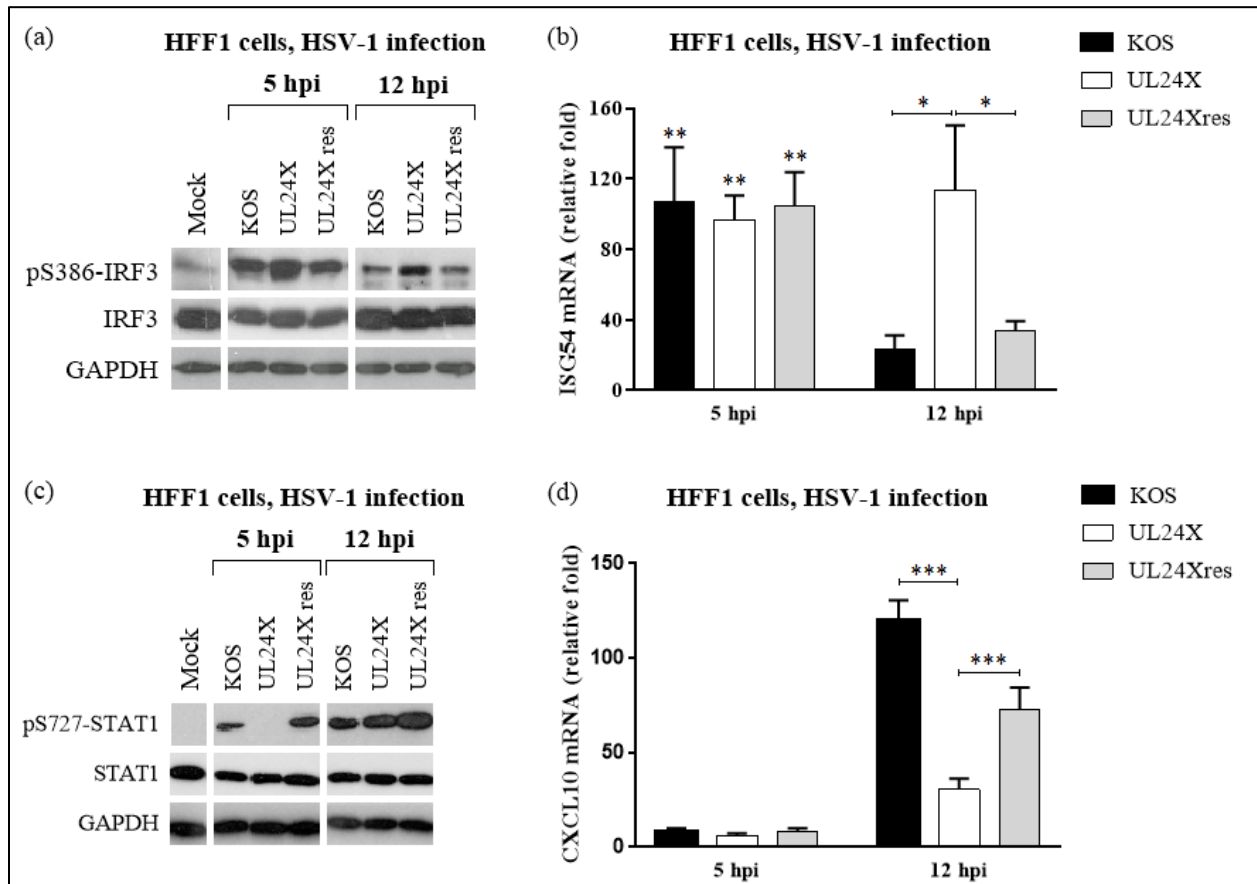
Cells were infected with the indicated HSV-1 strains or mock-infected, and analyses were performed comparing levels of the indicated gene products in infected cells to those in mock-infected cells. (a) *OASL* mRNA levels were quantified at 5 hpi in HFF1 cells by RT-qPCR; (b) *OASL* and (c) *IFN-β* mRNAs levels were quantified at 12 hpi in both HFF1 and HeLa cells by RT-qPCR; values presented are relative to *GAPDH* expression (n= 3). Results presented represent the average of three technical replicates for each of three biological replicates. (d) Total HFF1 lysates were collected at 5 and 12 hpi and analyzed by Western blot using an antibody against OASL. The membrane was subsequently reprobed with an antibody to GAPDH, which served as a loading control. Error bars represent the standard deviation from the mean. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

#### 2.4.2 UL24 affects IRF3 activation late in infection

*OASL* is an ISG expressed downstream of the type I IFN receptor via the JAK-STAT pathway, however, its expression is also driven directly by IRF3 (Melchjorsen *et al.*, 2009). To investigate the mechanisms by which UL24 modulates *OASL* expression during infection, we studied the effect of UL24 on IRF3 and STAT1 activation by monitoring post-translational modifications of each of these factors. We tested the impact of UL24 on phosphorylation of S386-IRF3 and of S727-STAT1 by Western blot, each of which is associated with the activation of the respective factor (Chen *et al.*, 2008; Sadzak *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2016). Consistent with increased *OASL* levels at early times in infection, we detected an increase in IRF3 phosphorylation at 5 hpi with all viruses tested (Fig. 2a). This increase was transient, and at 12 hpi with either the wild type or the rescue strain, IRF3 phosphorylation levels had decreased; however, in lysates from cells infected with the UL24-null virus, levels of S386-IRF3 phosphorylation did not drop down to the levels observed with the UL24-expressing strains. In the absence of UL24, IRF3 activation remained strong at late times in infection. To validate our conclusion that UL24 affects transcriptional activation downstream of the IRF3 signaling pathway, we quantified the relative amounts of *ISG54* mRNA, which like *OASL*, is a known IRF3-inducible ISG (Reich, 2013). Similar to our results for *OASL* transcript levels, in infected HFFs we observed a strong induction of *ISG54* mRNA at 5 hpi followed by down-regulation at 12 hpi. Moreover, this reduction in *ISG54* transcript levels at late times was UL24-dependent because it was not observed in cells infected with the UL24-null virus (Fig. 2b). Thus, the increase, and UL24-dependent reduction of IRF3 activation, at early and late times post-infection respectively, correlate with transcription levels of IRF3-inducible ISGs, including *OASL*.

We next investigated the impact of UL24 on the state of STAT1 post-translational modifications during HSV-1 infection. Phosphorylation of S727 of STAT1 is associated with the stimulation of the STAT1 transactivation function (Sadzak *et al.*, 2008). At 12 hpi, a time when the absence of UL24 affects *OASL* and *ISG54* transcript levels, phosphorylation of S727 was similar for all viruses tested. Rather, we found that STAT1 phosphorylation at S727 was UL24-dependent at 5 hpi (Fig. 2c). Thus, due to the difference in kinetics, we concluded that the impact of UL24 on STAT1 activation is not related to the UL24-dependent regulation of *OASL* expression. Nevertheless, these results reveal a surprising role for the leaky-late protein UL24 in the activation of STAT1 at early times in infection. To date, there is no evidence to suggest that UL24 is part of the HSV-1 virion (Pearson and Coen, 2002; Loret, Guay and Lippe, 2008). Given that UL24 affects HSV-1 gene expression (Sanabria-Solano *et al.*, 2016), one possibility is that UL24X virions

harbor a modified constellation of teguments proteins, which may have an impact on specific post-translational modifications affecting innate immunity during a lytic infection (Yang *et al.*, 2019).



**Figure 2.2 Absence of UL24 affects IRF3 activation late in infection, and delays STAT1 activation**

HFFs were infected with the indicated HSV-1 strains or mock-infected. (a) Total cell lysates were collected at 5 and 12 hpi, and analyzed by Western blot with antibodies against pS386-IRF3 or against total IRF3. The membrane was subsequently reprobed using antibody against GAPDH, which served as a loading control. (b) Levels of *ISG54* mRNA at 5 and 12 hpi compared to levels in mock-infected cells were quantified by RT-qPCR. Values presented are relative to *GAPDH* expression (n= 2). (c) Western blotting was performed as described in (a) with antibodies against pS727-STAT1, total STAT1, pS235/236-S6 and total ribosomal protein S6. The membrane was subsequently reprobed using antibody against GAPDH, which served as a loading control. (d) *CXCL10* mRNA level were quantified by RT-qPCR at 5 and 12 hpi of HFFs as described in (b) (n=2). Results presented represent the average of three technical replicates for each of two biological replicates. Error bars represent the standard error from the mean. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

*IFN-β* and *CXCL10* mRNA levels were significantly lower at 12 hpi in cells infected with the UL24-null strain compared to the UL24-expressing strains (Fig. 1c and 2d); however, STAT1 phosphorylation of S727 did not appear to be affected by UL24 at this time (Fig. 2c). One possible



explanation for this result, is that during infection with UL24X, the absence of UL24-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B allows activation of STAT1 in an IFN-independent manner (Xing *et al.*, 2016; Nan, Wu and Zhang, 2018). In addition, because both *IFN- $\beta$*  and *CXCL10* mRNAs levels appear unaffected by the absence of UL24 at 5 hpi (undetectable or no significant difference in levels), STAT1 activation at this early point in infection appears also to be IFN-independent. Thus, one can speculate that events upstream of STAT1-activating cytokines are affected differently by UL24 at early and at late times in HSV-1 infection. UL24 is partly a nucleolar protein (Pearson and Coen, 2002; Lymberopoulos *et al.*, 2011). It has been reported that the major nucleolar protein nucleolin promotes nuclear translocation of STAT1 (Jerke *et al.*, 2009). It remains to be determined if the dispersion of nucleolin by UL24 has an impact on the nuclear translocation of STAT1 (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Bertrand and Pearson, 2008; Bertrand *et al.*, 2010).

In conclusion, we have shown that HSV-1 UL24 modulates the innate immune response to the virus via downregulation of OASL expression late in HSV-1 infection. Our data suggest that both early, UL24-independent upregulation (5 hpi) of OASL expression, and late, UL24-dependent downregulation (12 hpi), are consequences of the modulation of IRF3 activation. We found that STAT1 S727 phosphorylation at 12 hpi was similar regardless of whether or not the HSV-1 strain used expressed UL24, suggesting that UL24 does not modulate OASL expression through this pathway. Further work is required to probe the impact of UL24-mediated downregulation of OASL expression on pathogenesis, and to investigate if this regulation contributes to the establishment of latency or the control of HSV-1 reactivation.

## **2.5 FUNDING INFORMATION**

We thank M Jaramillo for constructive comments on the manuscript. FSQ was the recipient of graduate scholarships from the Fondation Armand-Frappier. MBH was the recipient of a graduate scholarship from the Minister of graduate education and scientific research of Tunisia (MESRS). This work was supported in part by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research to A.P. (MOP-82924).



## 3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

---

### 3.1 Régulation à la baisse d'OASL par UL24

Le concept de « course aux armements » s'applique dans les relations hôtes-pathogènes. Plusieurs rapports suggèrent une relation entre l'humain et le HSV-1 basée sur un tel concept. De fait, au cours des dernières années, des révisions sur le sujet ont été faites dans le domaine de l'immunologie. Il est possible d'y apercevoir certains points en communs et d'en tirer une direction d'intérêt vers les senseurs d'ADN cytoplasmique (Su, Zhan and Zheng, 2016; Zheng, 2018; Stempel, Chan and Brinkmann, 2019).

L'équipe de Ghosh *et al.*, 2019 a publié que lors de l'infection par HSV-1 dans les fibroblastes (BJ-5ta), il y a une induction précoce des transcrits d'OASL. Puisque l'OASL bloque le senseur d'ADN cytoplasmique cGAS, l'induction de cette première affecte la production de l'IFN de type I, ce qui favorise la réplication du virus. Toutefois, l'expression d'OASL est ensuite régulée à la baisse à des temps tardifs de l'infection, ce qui est consistant avec l'induction de l'IFN de type I. Dans le même type de cellule (fibroblastes), nous avons découvert que cette régulation à la baisse est dépendante de la protéine virale tardive UL24, tant qu'au niveau des ARNm qu'au niveau de la protéine (Figure 2.1b et d). Nos résultats montrent, comme celui déjà publié, un niveau d'induction qui dépasse 200 fois plus d'expression de l'OASL dans les cellules infectées comparées aux cellules mock-infectées (Figures 2.1a). Cette induction d'OASL se maintient à des temps tardifs de l'infection avec le virus mutant en UL24, contrairement aux virus qui expriment UL24 où les niveaux des transcrits d'OASL chutent (2.1b à gauche). En plus, malgré que l'induction des transcrits d'OASL lors de l'infection des cellules, HeLa, est de seulement six fois comparativement aux cellules mock-infectées, le phénomène d'une régulation à la baisse de l'OASL dépendante d'UL24 est encore observable et statistiquement significatif (Figure 2.1b à droite). Nous avons également constaté que l'induction de l'IFN- $\beta$  coïncide avec la régulation à la baisse d'OASL à des temps tardifs de l'infection avec les virus qui expriment UL24 (Figure 2.1c).

Il est connu que le HSV-1 entre par fusion directe à la membrane plasmique des cellules fibroblastiques, contrairement aux cellules épithéliales HeLa où le virus entre par endocytose (Nicola, McEvoy and Straus, 2003; Simpson *et al.*, 2005). Les intégrines  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$  exprimées à la surface des cellules HeLa ont été démontrés comme étant des récepteurs de gH/gL qui favorisent l'entrée du virus par endocytose (Gianni *et al.*, 2013). Nos résultats montrent une différence dans l'ampleur des ARNm d'OASL entre les fibroblastes et les cellules HeLa infectées

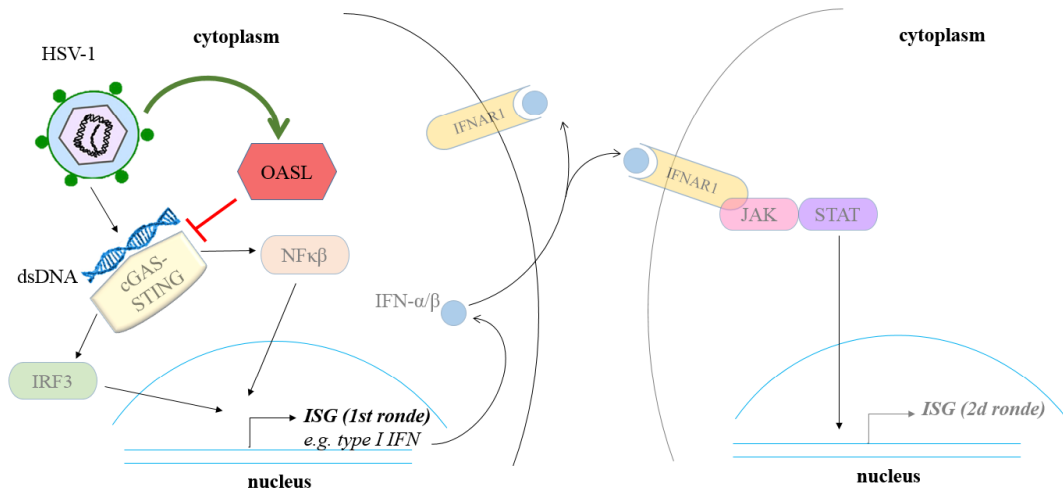
avec le HSV-1. Cette différence pourrait être un effet de l'exposition précoce (par fusion à la membrane plasmique) versus l'exposition tardive (par fusion à des membranes endosomales) de la nucléocapside dans le cytoplasme. Il est connu que cette exposition est responsable d'induire le système ubiquitine-protéasome qui provoque le relâchement de l'ADN viral dans le cytoplasme (Horan *et al.*, 2013). Dans le cas d'une entrée par endocytose, la reconnaissance de l'ADN viral par la cellule et l'expression d'OASL seraient donc moins élevées car cette voie d'entrée favoriserait une « livraison » de la nucléocapside et son contenu dans le noyau. Il faut en plus considérer l'impact de l'immortalisation et la transformation des cellules HeLa sur l'expression d'OASL car il est connu que celles-ci affectent les voies de signalisation cellulaires immunitaires, y compris la voie cGAS-STING (Lau *et al.*, 2015).

En résumé, nos résultats suggèrent deux scénarios différents pendant l'infection par HSV-1 : un premier où la réponse immunitaire innée via cGAS est restreinte par l'OASL, ce qui est suivi par un deuxième où cette restriction est enlevée par le virus lui-même via UL24 (Figure 3.1). En d'autres termes, la protéine UL24 permet (indirectement) l'évocation de la réponse immunitaire tardive via l'IFN de type I. Pour mieux comprendre l'importance biologique de ce phénomène, il faut revenir sur l'aspect que le HSV-1 établit une infection latente dans les neurones qui perdure toute la vie. Tel que discuté auparavant, en ce qui concerne le cycle latent viral (section 1.1.6), l'établissement et le maintien de la latence implique, entre autres, une modulation de la réponse immunitaire (Khanna *et al.*, 2004; Khanna, Lepisto and Hendricks, 2004; Egan *et al.*, 2013). La protéine virale UL24 est impliquée aussi dans le succès de la latence (section 1.2). La régulation à la baisse d'OASL et le blocage de NF- $\kappa$ B constitueraient ainsi les mécanismes connus jusqu'à présent par lesquels UL24 module la réponse immunitaire innée, ce qui favoriseraient la transition du cycle viral lytique vers la latence. Cette modulation contribuerait à l'état d'équilibre dynamique de la réponse immunitaire qui est toujours présente (notion d'innée), et aiderait alors à maintenir la persistance du HSV-1 dans l'hôte, une relation qui date d'environ 6 millions d'années (Wertheim *et al.*, 2014; Eberl, 2016).

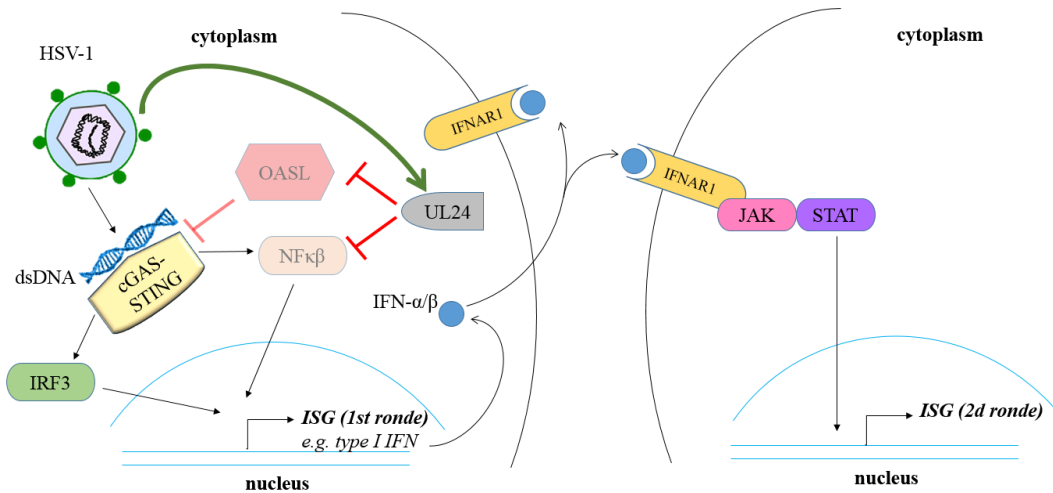
D'ailleurs, l'*ORF20* du KSHV est le gène orthologue d'*UL24* du HSV-1. Dans un modèle de réactivation *in vitro*, *OASL* et *ORF20* sont exprimés de façon concomitante (Bussey *et al.*, 2018). Ce résultat suggère que l'effet immunomodulateur d'*UL24* pourrait en plus être un facteur important pour initier un cycle lytique à partir de la latence. Évidemment, notre modèle d'étude *in vitro* ne répond pas à la question de l'impact de la régulation d'OASL sur la latence et la réactivation. Pour y arriver, il faudrait que ce modèle permette l'expression précoce d'OASL et l'inhibition de celle-ci aux temps tardifs. Un autre aspect qui pourrait être sujet d'étude à

approfondir, serait le rôle de l'IFN de type I dans la latence, une question déjà partiellement abordée (Low-Calle, Prada-Arismendy and Castellanos, 2014). Nos résultats suggéreraient que l'effet paracrine de l'IFN sécrété par les cellules primaires laisse les neurones dans un programme génétique préavisé à la présence de l'infection virale, ce qui favoriserait l'infection latente.

**(a) Temps précoce**



**(b) Temps tardif**



**Figure 3.1** Modèle de régulation d'OASL lors de l'infection par HSV-1

(a) L'infection par HSV-1 déclenche l'expression d'OASL à un temps précoce, ce qui est essentiel pour le succès de la réplication virale. Plus spécifiquement, l'OASL bloque le senseur d'ADN cGAS, ce qui se traduit en un blocage aussi en aval de l'interféron (IFN) de type I. (b) Aux temps tardifs de l'infection, le virus exprime la protéine UL24 qui d'un côté bloque NF-κβ et d'un autre côté régule à la baisse l'expression d'OASL, ce qui mène à l'activation de la réponse immunitaire innée via l'IFN de type I.

D'ailleurs, l'importance des HDs de la protéine UL24 a été discutée à la section 1.2, surtout le rôle de la séquence endonucléase dans le HD-III qui est essentielle pour plusieurs fonctions rapportées de la protéine (Bertrand *et al.*, 2010; Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Lymberopoulos *et al.*, 2011). Les virus mutés en UL24, vE99AK101A et vG121A, affectent les HDs III (la séquence endonucléase) et IV de la protéine respectivement (Figure 1.15). Ces deux virus présentent le phénotype des plaques syncytiales qui est une caractéristique de l'infection par le virus UL24X (Bertrand *et al.*, 2010). Nous avons testé l'impact des HD III et IV d'UL24 dans la régulation des transcrits d'*OASL*. Nos résultats préliminaires montrent encore une fois que toutes les souches de virus testées ici déclenchent l'expression d'*OASL* à temps précoce de l'infection. Néanmoins, la régulation à la baisse d'*OASL* dépendante d'UL24 est largement expliquée par la séquence endonucléase dans son HD-III car le mutant E99AK101A se comporte pareil au mutant UL24X (Annexe 1). Ce résultat renforce la contribution différentielle des HDs de la protéine UL24. Il avait déjà été démontré que le mutant vG121A, au contraire de vE99AK101A, n'affecte pas le rôle d'UL24 dans la pathogenèse du HSV-1. De fait, les signes d'inflammation lors de l'infection avec vG121A sont pareils à ceux obtenus avec les virus qui expriment UL24 (Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010). Ces résultats *in vivo* seraient donc concordants avec la régulation à la baisse d'*OASL* qui est suivie par l'induction de l'IFN- $\beta$ , une cytokine important dans le déclenchement des réponses immunitaire et inflammatoire (Teijaro, 2016; Giraldo, Wilcox and Longnecker, 2017).

### **3.2 UL24 régule de façon différentielle l'activation d'IRF3 et STAT1**

L'expression d'*OASL* peut se déclencher par la voie JAK-STAT ou directement par IRF3 (Melchjorsen *et al.*, 2009). Nous avons examiné l'état d'activation des facteurs de transcription IRF3 et STAT1. Dans le cas d'IRF3, la phosphorylation sur la sérine 386 (pS386) est reconnue comme une modification d'activation essentielle pour sa dimérisation et translocation vers le noyau (Mori *et al.*, 2004; Panne *et al.*, 2007; Jefferies, 2019). Nos résultats montrent que la phosphorylation d'IRF3 coïncide avec la régulation d'*OASL*, c'est-à-dire, une augmentation à 5 hpi dans toutes les conditions d'infection et une réduction plus forte dans les virus qui expriment UL24 à 12 hpi (Figure 2.2a). L'*ISG54* est un gène dont la transcription est principalement induite par IRF3 (Reich, 2013). Encore une fois, les niveaux des transcrits d'*ISG54* se comportent comme ceux d'*OASL*, une augmentation à 5 hpi qui est suivie d'une réduction dépendante d'UL24 à 12 hpi (Figure 2.2b), ce qui renforce la notion que la régulation de l'expression d'*OASL* est un effet en aval d'IRF3. Des études précédentes avaient démontrées l'activation précoce d'IRF3 lors de l'infection par HSV-1 qui est ensuite réduite à des temps tardifs (Paladino, Collins and

Mossman, 2010; Orzalli, DeLuca and Knipe, 2012). L'activation d'IRF3 serait aussi régulée par la protéine virale US3 qui mène à l'hyper-phosphorylation sur la sérine 175 (pS175), une modification importante pour bloquer l'induction précoce de l'IFN de type I via IRF3 (Wang *et al.*, 2013). Ces études mettent en relief l'importance de l'état de phosphorylation d'IRF3 pendant l'infection par HSV-1. D'un côté, l'activation précoce d'IRF3 via pS386 coïncide avec l'induction d'*OASL* et *ISG54* mais qui est cependant régulé via pS175, ce qui empêcherait son rôle comme transactivateur de l'IFN. D'un autre côté, l'activation d'IRF3 est affectée ensuite à des temps tardifs par les protéines virales UL46 et ICP0, et selon nos résultats par UL24. En plus de la contribution à la réduction de la phosphorylation (pS386) d'IRF3, UL24 bloque aussi la translocation d' $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (Xu *et al.*, 2017), ce qui mène à l'hypothèse que l'induction de l'IFN- $\beta$  à des temps tardifs semble impliquer les autres membres de la famille des régulateurs de l'IFN, notamment IRF7 qui a été démontré comme un facteur important pendant les infections virales (Daffis *et al.*, 2008; Ning, Pagano and Barber, 2011).

Dans le cas de STAT1, la phosphorylation sur la sérine 727 (pS727) est essentielle pour son activité transcriptionnelle une fois transloquée dans le noyau (Sadzak *et al.*, 2008). Contrairement à IRF3, STAT1 ne semble pas être associée à la régulation à la baisse des transcrits d'*OASL* à 12 hpi car les niveaux de phosphorylation sont pareils pour toutes les souches des virus testées ici (Figure 2.2c à droite). En revanche, l'activation précoce de STAT1 est UL24-dépendante (Figure 2.2c à gauche). Le résultat de l'activation de STAT1 à 5 hpi serait une première en regard d'un effet précoce de la protéine virale tardive UL24. Étant donné qu'UL24 n'est pas connue comme une protéine structurale dans le virion du HSV-1, l'impact précoce sur l'activation de STAT1 n'est pas un effet de cause directe par celle-ci (Pearson and Coen, 2002). Toutefois, UL24 régule l'expression des gènes IE et E (Sanabria-Solano *et al.*, 2016), ce qui favoriserait la transition vers l'expression complète des gènes L dont la plupart codent pour des protéines structurales. Cela dit, notre hypothèse est qu'en absence d'UL24, la présence de certaines protéines du tégument seraient altérées, notamment celles déjà associées à la régulation de la réponse immunitaire (Yang *et al.*, 2019), ce qui affecterait alors l'activation précoce de STAT1 d'une manière indépendante de l'IFN (Xing *et al.*, 2016; Nan, Wu and Zhang, 2018).

Finalement, *CXCL10* est un autre ISG induite principalement par la voie JAK-STAT1 via l'IFN (Liu *et al.*, 2011). Les niveaux des transcrits de *CXCL10* corréleraient avec l'induction de l'IFN- $\beta$  (Figure 2.2d). Ce résultat renforce notre modèle qu'en absence d'UL24 il y a un défaut dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et inflammatoire via l'IFN, ce qui est consistant avec les résultats dans des modèles *in vivo* où les infections avec le mutant UL24X présentent une réduction dans

la sévérité clinique, y compris les symptômes d'inflammation (Leiva-Torres, Rochette and Pearson, 2010; Dridi *et al.*, 2018). En plus, ce résultat et les niveaux de transcrits de l'*IFN-β* suggèrent que l'activation de STAT1 à 12 hpi observée avec le mutant UL24X est aussi indépendante de l'IFN. Étant donné qu'UL24 bloque NF- $\kappa$ B, en absence de cet effet, ce facteur de transcription pourrait conduire à la sécrétion d'autres cytokines différentes à l'IFN qui permettraient l'activation de STAT1 (Sun, 2017; Nan, Wu and Zhang, 2018).

En conclusion, nos résultats montrent qu'UL24 régule à la baisse l'expression d'OASL, ce qui est corrélée avec l'activation d'IRF3 et l'induction de l'IFN- $\beta$ . Par contre, l'activation de STAT1 ne semble pas avoir un effet dans la régulation à la baisse des transcrits d'OASL, néanmoins l'activation précoce de ce facteur de transcription est aussi dépendant d'UL24. En plus, l'induction des ISGs, *ISG54* et *CXCL10*, corrélient avec l'activation d'IRF3 et STAT1 via l'IFN respectivement. Ces résultats, dans leur ensemble, renforcent la notion qu'UL24 a des fonctions immunomodulatrice sur la réponse immunitaire innée lors de l'infection par HSV-1.



## 4 BIBLIOGRAPHIE

---

- Abaitua, F. *et al.* (2012) 'A Nuclear localization signal in herpesvirus protein VP1-2 is essential for infection via capsid routing to the nuclear pore', *J Virol.* 2012/06/22. Section of Virology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, United Kingdom., 86, pp. 8998–9014. doi: 10.1128/jvi.01209-12.
- Ben Abdeljelil, N., Rochette, P. and Pearson, A. (2013) 'The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion', *Virology.* Elsevier, 444(1–2), pp. 263–273. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.021.
- Abe, T. *et al.* (2013) 'STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense', *Molecular Cell*, 50, pp. 5–15. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.039.
- Abe, T., Marutani, Y. and Shoji, I. (2019) 'Cytosolic DNA-sensing immune response and viral infection', *Microbiology and Immunology*, 63, pp. 51–64. doi: 10.1111/1348-0421.12669.
- Agelidis, A. M. and Shukla, D. (2015) 'Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years', *Future Virology*, 10(10), pp. 1145–1154. doi: 10.2217/fvl.15.85.Cell.
- Amen, M. A. and Griffiths, A. (2011) 'Packaging of Non-Coding RNAs into Herpesvirus Virions: Comparisons to Coding RNAs.', *Frontiers in genetics*, 2, p. 81. doi: 10.3389/fgene.2011.00081.
- Bello-Morales, R. and López-Guerrero, J. A. (2018) 'Extracellular Vesicles in Herpes Viral Spread and Immune Evasion.', *Frontiers in microbiology*, 9, p. 2572. doi: 10.3389/fmicb.2018.02572.
- Bermejo-Jambrina, M. *et al.* (2018) 'C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape.', *Frontiers in immunology*, 9, p. 590. doi: 10.3389/fimmu.2018.00590.
- Bertrand, L. *et al.* (2010) 'Conserved Residues in the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Are Important for Dispersal of the Nucleolar Protein Nucleolin', *Journal of Virology*, 84(1), pp. 109–118. doi: 10.1128/jvi.01428-09.
- Bertrand, L. and Pearson, A. (2008) 'The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin', *Journal of General Virology*, 89, pp. 1142–1151. doi: 10.1099/vir.0.83573-0.
- Bo, R. G., Cook, W. J. and Wobbe, K. K. (1996) 'Regulation of Neighboring Gene Expression by the Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene', 203(218), pp. 193–203.
- Box, J. K. *et al.* (2016) 'Nucleophosmin: from structure and function to disease development.',

*BMC molecular biology*, 17(1), p. 19. doi: 10.1186/s12867-016-0073-9.

Bradshaw, M. J. and Venkatesan, A. (2016) 'Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.', *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. United States, 13(3), pp. 493–508. doi: 10.1007/s13311-016-0433-7.

Brdovčak, M. C., Zubković, A. and Jurak, I. (2018) 'Herpes simplex virus 1 deregulation of host microRNAs', *Non-coding RNA*, 4(4). doi: 10.3390/ncrna4040036.

Burgess, H. M. and Mohr, I. (2018) 'Defining the Role of Stress Granules in Innate Immune Suppression by the Herpes Simplex Virus 1 Endoribonuclease VHS', *Journal of Virology*, 92(15), pp. e00829-18. doi: 10.1128/JVI.00829-18.

Bussey, K. A. *et al.* (2018) 'The interferon-stimulated gene product oligoadenylate synthetase-like protein enhances replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and interacts with the KSHV ORF20 protein', *PLoS Pathogens*, 14(3), pp. 1–37. doi: 10.1371/journal.ppat.1006937.

Bystricka, M. and Russ, G. (2005) 'Immunity in latent herpes simplex virus infection', *Acta Virologica*, 49, pp. 159–167.

Chen, Q., Sun, L. and Chen, Z. J. (2016) 'Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing', *Nature Immunology*, 17(10), pp. 1142–1149. doi: 10.1038/ni.3558.

Chen, W. *et al.* (2008) 'Contribution of Ser386 and Ser396 to activation of interferon regulatory factor 3.', *Journal of molecular biology*. England, 379(2), pp. 251–260. doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.050.

Chiang, J. J. *et al.* (2018) 'Viral unmasking of cellular 5S rRNA pseudogene transcripts induces RIG-I-mediated immunity.', *Nature immunology*. United States, 19(1), pp. 53–62. doi: 10.1038/s41590-017-0005-y.

Chiu, Y.-H., Macmillan, J. B. and Chen, Z. J. (2009) 'RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway.', *Cell*. United States, 138(3), pp. 576–591. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.015.

Choi, U. Y. *un. et al.* (2015) 'Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases', *Experimental & molecular medicine*. Nature Publishing Group, 47(November 2014), p. e144. doi: 10.1038/emm.2014.110.

Cingöz, O. and Goff, S. P. (2018) 'Cyclin-dependent kinase activity is required for type I interferon

production', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), pp. E2950–E2959. doi: 10.1073/pnas.1720431115.

Cliffe, A. R. *et al.* (2015) 'Neuronal Stress Pathway Mediating a Histone Methyl/Phospho Switch Is Required for Herpes Simplex Virus Reactivation.', *Cell host & microbe*. United States, 18(6), pp. 649–658. doi: 10.1016/j.chom.2015.11.007.

Cliffe, A. R., Coen, D. M. and Knipe, D. M. (2013) 'Kinetics of Facultative Heterochromatin and Polycomb Group Protein Association with the Herpes Simplex Viral Genome during Establishment Establishment of Latent Infection', *Mbio*, 4(1), pp. e00590-12. doi: 10.1128/mBio.00590-12.Editor.

Cliffe, A. R., Garber, D. A. and Knipe, D. M. (2009) 'Transcription of the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Promotes the Formation of Facultative Heterochromatin on Lytic Promoters', *Journal of Virology*, 83(16), pp. 8182–8190. doi: 10.1128/jvi.00712-09.

Cook, W. J. and Coen, D. M. (1996) 'Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 UL24 mRNA expression via differential polyadenylation', *Virology*, 218, pp. 204–213. doi: 10.1006/viro.1996.0180.

Daffis, S. *et al.* (2008) 'Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection.', *Journal of virology*. United States, 82(17), pp. 8465–8475. doi: 10.1128/JVI.00918-08.

Dai, X. and Zhou, Z. H. (2018) 'Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes.', *Science (New York, N.Y.)*, 360(6384). doi: 10.1126/science.aao7298.

Dauber, B., Saffran, H. A. and Smiley, J. R. (2019) 'The herpes simplex virus host shutoff (vhs) RNase limits accumulation of double stranded RNA in infected cells: Evidence for accelerated decay of duplex RNA.', *PLoS pathogens*. United States, 15(10), p. e1008111. doi: 10.1371/journal.ppat.1008111.

Dempsey, A. and Bowie, A. G. (2015) 'Innate immune recognition of DNA: A recent history', *Virology*. Elsevier, 479–480, pp. 146–152. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.013.

Dia C. Beachboard and Stacy M. Horner (2016) 'Innate Immune Evasion Strategies of DNA and RNA viruses Dia', *Curr Opin Microbiol*, 32, pp. 113–119. doi: doi:10.1016/j.mib.2016.05.015. Innate.

Dohner, K. *et al.* (2002) 'Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid

Transport', *Mol Biol Cell*, 13(8), pp. 2795–2809. doi: 10.1091/mbc.01.

Dridi, S. *et al.* (2018) 'A Mutation in the UL24 Gene Abolishes Expression of the Newly Identified UL24 . 5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 and Leads to an Increase in Pathogenicity in Mice', *Journal of Virology*, 92(20), pp. e00671-18. doi: 10.1128/JVI.00671-18.

Du, T., Zhou, G. and Roizman, B. (2011) 'HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 108(46), pp. 18820–18824. doi: 10.1073/pnas.1117203108.

Eberl, G. (2016) 'Immunity by equilibrium.', *Nature reviews. Immunology*. England, 16(8), pp. 524–532. doi: 10.1038/nri.2016.75.

Egan, K. P. *et al.* (2013) 'Immunological control of herpes simplex virus infections.', *Journal of neurovirology*. United States, 19(4), pp. 328–345. doi: 10.1007/s13365-013-0189-3.

Fatahzadeh, M. and Schwartz, R. A. (2007) 'Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management.', *Journal of the American Academy of Dermatology*. United States, 57(5), pp. 736–737. doi: 10.1016/j.jaad.2007.06.027.

Ferguson, B. J. *et al.* (2012) 'DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity', *eLife*, 2012. doi: 10.7554/eLife.00047.

Geurs, T. L. *et al.* (2012) 'Sex differences in murine susceptibility to systemic viral infections.', *Journal of autoimmunity*, 38(2–3), pp. J245-53. doi: 10.1016/j.jaut.2011.12.003.

Ghosh, A. *et al.* (2019) 'Oligoadenylate-Synthetase-Family Protein OASL Inhibits Activity of the DNA Sensor cGAS during DNA Virus Infection to Limit Interferon Production', *Immunity*. Elsevier Inc., 50(1), pp. 51-63.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.013.

Gianni, T. *et al.* (2013) ' $\alpha v\beta 6$ - and  $\alpha v\beta 8$ -Integrins Serve As Interchangeable Receptors for HSV gH / gL to Promote Endocytosis and Activation of Membrane Fusion', *PLoS Pathog*, 9(12), p. e1003806. doi: 10.1371/journal.ppat.1003806.

Giraldo, D., Wilcox, D. R. and Longnecker, R. (2017) 'The Type I Interferon Response and Age-Dependent Susceptibility to Herpes Simplex Virus Infection.', *DNA and cell biology*. United States, 36(5), pp. 329–334. doi: 10.1089/dna.2017.3668.

Guo, X. *et al.* (2012) 'Identification of OASL d, a splice variant of human OASL, with antiviral activity.', *The international journal of biochemistry & cell biology*. Netherlands, 44(7), pp. 1133–

1138. doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.001.

Hafezi, W. *et al.* (2012) 'Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection', *PLoS Pathogens*, 8(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1002679.

Hans, M. and Madaan Hans, V. (2014) 'Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity.', *International journal of peptides*. United States, 2014, p. 370297. doi: 10.1155/2014/370297.

Hartmann, G. (2017) *Nucleic Acid Immunity*. 1st edn, *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ai.2016.11.001.

Heming, J. D., Conway, J. F. and Homa, F. L. (2017) 'Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging', *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 223, pp. 119–142. doi: 10.1007/978-3-319-53168-7.

Horan, K. A. *et al.* (2013) 'Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors.', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. United States, 190(5), pp. 2311–2319. doi: 10.4049/jimmunol.1202749.

Ishikawa, H., Ma, Z. and Barber, G. N. (2009) 'STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity.', *Nature*. England, 461(7265), pp. 788–792. doi: 10.1038/nature08476.

Jacobson, J. G. *et al.* (1998) 'Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice', *Virology*, 242, pp. 161–169. doi: 10.1006/viro.1997.9012.

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', *Journal of Virology*, 63, pp. 1839–1843. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0024589793&partnerID=40&md5=a25fca3a2279f78b344f9e2bc857da97>.

Jacquemont, B. and Roizman, B. (1975) 'RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them.', *Journal of virology*. United States, 15(4), pp. 707–713.

Jahanban-Esfahlan, R. *et al.* (2019) 'Toll-like receptors as novel therapeutic targets for herpes simplex virus infection.', *Reviews in medical virology*. England, 29(4), p. e2048. doi: 10.1002/rmv.2048.

Jaumouille, V. and Grinstein, S. (2016) 'Molecular Mechanisms of Phagosome Formation.', *Microbiology spectrum*. United States, 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0013-2015.

Jefferies, C. A. (2019) 'Regulating IRFs in IFN Driven Disease.', *Frontiers in immunology*, 10, p. 325. doi: 10.3389/fimmu.2019.00325.

Jenks, J. A., Goodwin, M. L. and Permar, S. R. (2019) 'The Roles of Host and Viral Antibody Fc Receptors in Herpes Simplex Virus (HSV) and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections and Immunity.', *Frontiers in immunology*. Switzerland, 10, p. 2110. doi: 10.3389/fimmu.2019.02110.

Jerke, U. *et al.* (2009) 'Stat1 nuclear translocation by Nucleolin upon Monocyte differentiation', *PLoS ONE*, 4(12). doi: 10.1371/journal.pone.0008302.

Jia, W. *et al.* (2017) 'New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL).', *Life sciences*. Netherlands, 186, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.lfs.2017.07.025.

Jiang, Y. *et al.* (2017) 'The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases', *Protein & Cell*, 8(2), pp. 83–89. doi: 10.1007/s13238-016-0303-4.

Johnston, C., Gottlieb, S. L. and Wald, A. (2016) 'Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus &', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 34(26), pp. 2948–2952. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.076.

De Jong, M. A. W. P. *et al.* (2008) 'Dendritic cells mediate herpes simplex virus infection and transmission through the C-type lectin DC-SIGN.', *The Journal of general virology*. England, 89(Pt 10), pp. 2398–2409. doi: 10.1099/vir.0.2008/003129-0.

Karasneh, G. A. and Shukla, D. (2011) 'Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success.', *Virology journal*, 8, p. 481. doi: 10.1186/1743-422X-8-481.

Kawaguch, Y., Mori, Y. and Kimura, H. (2018) *Human Herpesviruses: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. doi: 10.1007/978-981-10-7230-7.

Kennedy, P. G. E. *et al.* (2015) 'A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation', *Journal of General Virology*, 96, pp. 1581–1602. doi: 10.1099/vir.0.000128.

Khanna, K. M. *et al.* (2004) 'Immune control of herpes simplex virus during latency', *Current Opinion in Immunology*, 16, pp. 463–469. doi: 10.1016/j.coi.2004.05.003.

Khanna, K. M., Lepisto, A. J. and Hendricks, R. L. (2004) 'Immunity to latent viral infection: many

skirmishes but few fatalities.’, *Trends in immunology*. England, 25(5), pp. 230–234. doi: 10.1016/j.it.2004.02.010.

Kibler, P. K. *et al.* (1991) ‘Regulation of Herpes-Simplex Virus True Late Gene-Expression - Sequences Downstream From the Us11 Tata Box Inhibit Expression From An Unreplicated Template’, *Journal of Virology*, 65, pp. 6749–6760.

Kilcher, S. and Mercer, J. (2015) ‘DNA virus uncoating.’, *Virology*. United States, 479–480, pp. 578–590. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.024.

Kim, J. Y. *et al.* (2012) ‘Transient Reversal of Episome Silencing Precedes VP16-Dependent Transcription during Reactivation of Latent HSV-1 in Neurons’, *Plos Pathogens*, 8. doi: 10.1371/journal.ppat.1002540.

Knipe, D. M. and Cliffe, A. (2008) ‘Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection’, *Nat Rev Microbiol*. 2008/02/12. Harvard Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 200 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115, USA. david\_knipe@hms.harvard.edu, 6, pp. 211–221. doi: 10.1038/nrmicro1794.

Knipe, D. M. and Howley, P. M. (2013) *Fields Virology*. 6th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Knizewski, L. *et al.* (2006) ‘Human Herpesvirus 1 UL24 Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease’, *Journal of Virology*, 80(5), pp. 2575–2577. doi: 10.1128/JVI.80.5.2575.

Kobelt, D., Lechmann, M. and Steinkasserer, A. (2003) ‘The interaction between dendritic cells and herpes simplex virus-1’, *Dendritic Cells and Virus Infection*, 276, pp. 145–161.

Kobty, M. (2015) ‘Herpes Simplex Virus: Beyond the Basics.’, *Neonatal network: NN*. United States, 34(5), pp. 279–283. doi: 10.1891/0730-0832.34.5.279.

Kramer, T. and Enquist, L. W. (2013) ‘Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system.’, *Viruses*, 5(2), pp. 678–707. doi: 10.3390/v5020678.

Kranzusch, P. J. *et al.* (2015) ‘Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2’,3’ cGAMP Signaling.’, *Molecular cell*. United States, 59(6), pp. 891–903. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.022.

Kropp, R. Y. *et al.* (2006) ‘Neonatal Herpes Simplex Virus Infections in Canada: Results of a 3-Year National Prospective Study’, *pediatrics*, 117(6), pp. 1955–1962. doi: 10.1542/peds.2005-1778.

Kubat, N. J. *et al.* (2004) 'The herpes simplex virus type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription', *Journal of Virology*, 78, pp. 12508–12518. doi: 10.1128/JVI.78.22.12508-12518.2004.

Kuchta, K. *et al.* (2009) 'Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human.', *Nucleic acids research*. England, 37(22), pp. 7701–7714. doi: 10.1093/nar/gkp854.

Lakin, N. D. *et al.* (1995) 'Down regulation of the octamer binding protein Oct-1 during growth arrest and differentiation of a neuronal cell line.', *Brain research. Molecular brain research*. Netherlands, 28(1), pp. 47–54. doi: 10.1016/0169-328x(94)00183-f.

Lau, L. *et al.* (2015) 'DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 350(6260), pp. 568–571. doi: 10.1126/science.aab3291.

Lavrov, V. F. *et al.* (2006) '[Natural immunity and herpes infection].', *Voprosy virusologii*. Russia (Federation), 51(3), pp. 4–9.

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', *Journal of General Virology*, 91(5), pp. 1109–1116. doi: 10.1099/vir.0.017921-0.

Li, X.-D. *et al.* (2013) 'Pivotal Roles of cGAS-cGAMP Signaling in Antiviral Defense and Immune Adjuvant Effects', *Science*, 341, pp. 1390–1394. doi: 10.1126/science.1244040.

Li, Y. *et al.* (2012) 'LSm14A is a processing body-associated sensor of viral nucleic acids that initiates cellular antiviral response in the early phase of viral infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), pp. 11770 LP – 11775. doi: 10.1073/pnas.1203405109.

Lillycrop, K. A. *et al.* (1991) 'The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons', *Neuron*, 7(3), pp. 381–390. doi: 10.1016/0896-6273(91)90290-G.

Liu, M. *et al.* (2011) 'CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.', *Cytokine & growth factor reviews*. England, 22(3), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001.

Liu, Q. *et al.* (2019) 'Modulation of Innate Immune Signaling Pathways by Herpesviruses.', *Viruses*. Switzerland, 11(6). doi: 10.3390/v11060572.

Liu, S. *et al.* (2015) 'Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF



induces IRF3 activation.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 347(6227), p. aaa2630. doi: 10.1126/science.aaa2630.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Looker, K. J. *et al.* (2012) 'Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012', pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0114989.

Loret, S., Guay, G. and Lippe, R. (2008) 'Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions', *Journal of Virology*, 82, pp. 8605–8618. doi: 10.1128/jvi.00904-08.

Low-Calle, A. M., Prada-Arismendy, J. and Castellanos, J. E. (2014) 'Study of interferon- $\beta$  antiviral activity against Herpes simplex virus type 1 in neuron-enriched trigeminal ganglia cultures', *Virus Research*, 180, pp. 49–58. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.022.

Lum, K. K. *et al.* (2018) 'Interactome and Proteome Dynamics Uncover Immune Modulatory Associations of the Pathogen Sensing Factor cGAS.', *Cell systems*. United States, 7(6), pp. 627-642.e6. doi: 10.1016/j.cels.2018.10.010.

Lymberopoulos, M. H. *et al.* (2011) 'Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress', *Virology*, 412, pp. 341–348. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.016.

Lymberopoulos, M. H. and Pearson, A. (2007) 'Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin', *Virology*, 363, pp. 397–409. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.028.

Ma, Y. and He, B. (2014) 'Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond.', *Journal of molecular biology*, 426(6), pp. 1133–1147. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.012.

Maillet, S. *et al.* (2006) 'Herpes Simplex Virus Type 1 Latently Infected Neurons Differentially Express Latency-Associated and ICP0 Transcripts', *Journal of Virology*, 80(18), pp. 9310–9321. doi: 10.1128/jvi.02615-05.

Majoros, A. *et al.* (2017) 'Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: Lessons from interferons for cytokine responses', *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). doi: 10.3389/fimmu.2017.00029.

Mankan, A. K. *et al.* (2014) 'Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis.', *The EMBO journal*. England, 33(24), pp. 2937–2946. doi: 10.15252/embj.201488726.

- Marques, J. *et al.* (2008) 'The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain', *Journal of General Virology*, 89, pp. 2767–2772. doi: 10.1099/vir.0.2008/003558-0.
- McElwee, M. *et al.* (2018) 'Structure of the herpes simplex virus portal-vertex', *PLoS Biology*, 16(6), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pbio.2006191.
- Melchjorsen, J. *et al.* (2009) 'Differential Regulation of the OASL and OAS1 Genes in', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(4), pp. 199–207. doi: 10.1089/jir.2008.0050.
- Miranda-Saksena, M. *et al.* (2018) 'Infection and transport of herpes simplex virus type 1 in neurons: Role of the cytoskeleton', *Viruses*, 10. doi: 10.3390/v10020092.
- Moore, D. F. (1984) 'Comparison of human fibroblast cells and primary rabbit kidney cells for isolation of herpes simplex virus.', *Journal of clinical microbiology*. United States, 19(4), pp. 548–549.
- Mori, M. *et al.* (2004) 'Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 279(11), pp. 9698–9702. doi: 10.1074/jbc.M310616200.
- Motwani, M., Pesiridis, S. and Fitzgerald, K. A. (2019) 'DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease', *Nature Reviews Genetics*. Springer US. doi: 10.1038/s41576-019-0151-1.
- Nan, Y., Wu, C. and Zhang, Y.-J. (2018) 'Interferon Independent Non-Canonical STAT Activation and Virus Induced Inflammation', *Viruses*, 10(196), pp. 1–22. doi: 10.3390/v10040196.
- Nascimento, R., Dias, J. D. and Parkhouse, R. M. E. (2009) 'The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex', *Archives of Virology*, 154, pp. 1143–1149. doi: 10.1007/s00705-009-0420-y.
- Nicola, A. V, McEvoy, A. M. and Straus, S. E. (2003) 'Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells.', *Journal of virology*. United States, 77(9), pp. 5324–5332. doi: 10.1128/jvi.77.9.5324-5332.2003.
- Nicoll, M. P., Proenca, J. T. and Efstathiou, S. (2012) 'The molecular basis of herpes simplex virus latency.', *FEMS microbiology reviews*. England, 36(3), pp. 684–705. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00320.x.
- Nikitina, E. *et al.* (2018) 'Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs.',

*International journal of molecular sciences*. Switzerland, 19(9). doi: 10.3390/ijms19092821.

Ning, S., Pagano, J. S. and Barber, G. N. (2011) 'IRF7: activation, regulation, modification and function.', *Genes and immunity*, 12(6), pp. 399–414. doi: 10.1038/gene.2011.21.

Orzalli, M. H., DeLuca, N. A. and Knipe, D. M. (2012) 'Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp. E3008–E3017. doi: 10.1073/pnas.1211302109.

Ouwendijk, W. J. D. *et al.* (2013) 'T-cell immunity to human alphaherpesviruses.', *Current opinion in virology*. Netherlands, 3(4), pp. 452–460. doi: 10.1016/j.coviro.2013.04.004.

Owen, D. J., Crump, C. M. and Graham, S. C. (2015) 'Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses', *Viruses-Basel*, 7, pp. 5084–5114. doi: 10.3390/v7092861.

Paladino, P., Collins, S. E. and Mossman, K. L. (2010) 'Cellular Localization of the Herpes Simplex Virus ICP0 Protein Dictates Its Ability to Block IRF3-Mediated Innate Immune Responses', *Plos One*, 5. doi: 10.1371/journal.pone.0010428.

Pan, D. *et al.* (2014) 'A neuron-specific host MicroRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 15(4), pp. 446–456. doi: 10.1016/j.chom.2014.03.004.

Panne, D. *et al.* (2007) 'Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 282(31), pp. 22816–22822. doi: 10.1074/jbc.M703019200.

Papkou, A. *et al.* (2016) 'Host–parasite coevolution: why changing population size matters', *Zoology*. Elsevier GmbH., 119(4), pp. 330–338. doi: 10.1016/j.zool.2016.02.001.

Pasieka, T. J. *et al.* (2011) 'Bioluminescent imaging reveals divergent viral pathogenesis in two strains of Stat1-deficient mice, and in alphassgamma interferon receptor-deficient mice.', *PloS one*. United States, 6(9), p. e24018. doi: 10.1371/journal.pone.0024018.

Pearson, A. and Coen, D. M. (2002) 'Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1', *Journal of Virology*, 76, pp. 10821–10828. doi: 10.1128/jvi.76.21.10821-10828.2002.

Phelan, D., Barrozo, E. R. and Bloom, D. C. (2017) 'HSV1 latent transcription and non-coding RNA: A critical retrospective.', *Journal of neuroimmunology*. Netherlands, 308, pp. 65–101. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.002.

Punt, J. *et al.* (2018) *Kuby Immunology, Eighth Edition*. 8th edn, *macmillan education*. 8th edn. New York: macmillan education. doi: 10.1016/S0377-1237(04)80176-X.

Rebouillat, D., Marie, I. and Hovanessian, A. G. (1998) 'Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase.', *European journal of biochemistry*. England, 257(2), pp. 319–330. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2570319.x.

Reich, N. C. (2013) 'A death-promoting role for ISG54/IFIT2.', *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. United States, 33(4), pp. 199–205. doi: 10.1089/jir.2012.0159.

Rochette, P.-A. *et al.* (2015) 'Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of trigeminal ganglia', *Journal of General Virology*, 96, pp. 2794–2805. doi: 10.1099/vir.0.000189.

Roizman, B. and Whitley, R. J. (2013) 'An Inquiry into the Molecular Basis of HSV Latency and Reactivation', *Annual Review of Microbiology*, 67(1), pp. 355–374. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155654.

Roizman, B. and Zhou, G. (2015) 'The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry', *Virology*. Elsevier, 479–480, pp. 562–567. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.036.

Roller, R. J. and Baines, J. D. (2017) 'Herpesvirus Nuclear Egress', in Osterrieder, K. (ed.) *Cell Biology of Herpes Viruses*. Cham: Springer International Publishing, pp. 143–169. doi: 10.1007/978-3-319-53168-7\_7.

Roth, S. *et al.* (2014) 'Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1beta production.', *Nature immunology*. United States, 15(6), pp. 538–545. doi: 10.1038/ni.2888.

Royer, D. J. *et al.* (2019) 'Vaccine-induced antibodies target sequestered viral antigens to prevent ocular HSV-1 pathogenesis , preserve vision , and preempt productive neuronal infection', *Mucosal Immunology*. Springer US, 12, pp. 827–239. doi: 10.1038/s41385-019-0131-y.

Russell, T. A. and Tschärke, D. C. (2016) 'Lytic Promoters Express Protein during Herpes Simplex Virus Latency', *PLoS Pathogens*, 12(6), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.ppat.1005729.

Sadzak, I. *et al.* (2008) 'Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), pp. 8944–8949. doi:

10.1073/pnas.0801794105.

Sagou, K., Uema, M. and Kawaguchi, Y. (2010) 'Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids.', *Journal of virology*. United States, 84(4), pp. 2110–2121. doi: 10.1128/JVI.02007-09.

Samaniego, L. A., Neiderhiser, L. and DeLuca, N. A. (1998) 'Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins.', *Journal of virology*. United States, 72(4), pp. 3307–3320.

Sanabria-Solano, C. *et al.* (2016) 'Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein (HSV-1 UL24 inhibits accumulation of viral transcripts)', *Virology*, 495, pp. 148–160. doi: 10.1016/j.virol.2016.05.006.

Sayers, C. L. and Elliott, G. (2016) 'Herpes Simplex Virus 1 Enters Human Keratinocytes by a Nectin-1-Dependent, Rapid Plasma Membrane Fusion Pathway That Functions at Low Temperature.', *Journal of virology*. United States, 90(22), pp. 10379–10389. doi: 10.1128/JVI.01582-16.

Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. and Rice, C. M. (2014) 'Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses.', *Annual review of immunology*. United States, 32, pp. 513–545. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

Schoggins, J. W. *et al.* (2014) 'Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity.', *Nature*. England, 505(7485), pp. 691–695. doi: 10.1038/nature12862.

Scott, D. D. and Oeffinger, M. (2016) 'Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair.', *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. Canada, 94(5), pp. 419–432. doi: 10.1139/bcb-2016-0068.

da Silva, L. F. and Jones, C. (2013) 'Small non-coding RNAs encoded within the herpes simplex virus type 1 latency associated transcript (LAT) cooperate with the retinoic acid inducible gene I (RIG-I) to induce beta-interferon promoter activity and promote cell survival.', *Virus research*. Netherlands, 175(2), pp. 101–109. doi: 10.1016/j.virusres.2013.04.005.

Simpson, S. A. *et al.* (2005) 'Nectin-1/HveC Mediates herpes simplex virus type 1 entry into primary human sensory neurons and fibroblasts.', *Journal of neurovirology*. United States, 11(2), pp. 208–218. doi: 10.1080/13550280590924214.

Smiley, M. L., Hoxie, J. A. and Friedman, H. M. (1985) 'Herpes simplex virus type 1 infection of endothelial, epithelial, and fibroblast cells induces a receptor for C3b.', *Journal of immunology*

(Baltimore, Md. : 1950). United States, 134(4), pp. 2673–2678.

Stempel, M., Chan, B. and Brinkmann, M. M. (2019) 'Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway.', *Medical microbiology and immunology*. Germany, 208(3–4), pp. 495–512. doi: 10.1007/s00430-019-00582-0.

Stratmann, S. A. *et al.* (2015) 'The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex.', *eLife*, 4, p. e11721. doi: 10.7554/eLife.11721.

Van Strijp, J. A. *et al.* (1989) 'Complement-mediated phagocytosis of herpes simplex virus by granulocytes. Binding or ingestion.', *The Journal of clinical investigation*. United States, 84(1), pp. 107–112. doi: 10.1172/JCI114129.

Stros, M. (2010) 'HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin.', *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1799(1–2), pp. 101–113. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.09.008.

Su, C., Zhan, G. and Zheng, C. (2016) 'Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update.', *Virology journal*, 13, p. 38. doi: 10.1186/s12985-016-0495-5.

Sun, L. *et al.* (2013) 'Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway', *Science*, 339(6121), pp. 786 LP – 791. doi: 10.1126/science.1232458.

Sun, S.-C. (2017) 'The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation.', *Nature reviews. Immunology*. England, 17(9), pp. 545–558. doi: 10.1038/nri.2017.52.

Takaoka, A. *et al.* (2007) 'DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.', *Nature*. England, 448(7152), pp. 501–505. doi: 10.1038/nature06013.

Teijaro, J. R. (2016) 'Type I interferons in viral control and immune regulation.', *Current opinion in virology*. Netherlands, 16, pp. 31–40. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.001.

Thellman, N. M. and Triezenberg, S. J. (2017) 'Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency.', *Pathogens (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 6(3). doi: 10.3390/pathogens6030028.

Unterholzner, L. *et al.* (2010) 'IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA', *Nature Immunology*, 11, pp. 997–U42. doi: 10.1038/ni.1932.

Villarino, A. V., Kanno, Y. and O'Shea, J. J. (2017) 'Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system', *Nature Immunology*, 18(4), pp. 374–384. doi: 10.1038/ni.3691.

Volkman, H. E. *et al.* (2018) 'cGAS is predominantly a nuclear protein', *bioRxiv*, p. 486118. doi: 10.1101/486118.

- Wang, S. *et al.* (2013) 'Herpes Simplex Virus 1 Serine/Threonine Kinase US3 Hyperphosphorylates IRF3 and Inhibits Beta Interferon Production', *Journal of Virology*, 87, pp. 12814–12827. doi: 10.1128/jvi.02355-13.
- Weed, D. J. and Nicola, A. V (2017) 'Herpes simplex virus Membrane Fusion.', *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. Germany, 223, pp. 29–47. doi: 10.1007/978-3-319-53168-7\_2.
- Weller, S. K. and Coen, D. M. (2012) 'Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4. doi: 10.1101/cshperspect.a013011.
- Wertheim, J. O. *et al.* (2014) 'Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2.', *Molecular biology and evolution*, 31(9), pp. 2356–2364. doi: 10.1093/molbev/msu185.
- West, A. P. *et al.* (2015) 'Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response.', *Nature*. England, 520(7548), pp. 553–557. doi: 10.1038/nature14156.
- Wu, J. *et al.* (2013) 'Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 339(6121), pp. 826–830. doi: 10.1126/science.1229963.
- Wu, J. and Chen, Z. J. (2014) 'Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids.', *Annual review of immunology*. United States, 32, pp. 461–488. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156.
- Wysocka, J. and Herr, W. (2003) 'The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier, 28(6), pp. 294–304. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00088-4.
- Xing, F. *et al.* (2016) 'Non-Canonical Role of IKK  $\alpha$  in the Regulation of STAT1 Phosphorylation in Antiviral Signaling', *Plos One*, 11(12), p. e0168696. doi: 10.1371/journal.pone.0168696.
- Xing, J. *et al.* (2012) 'Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein US11 Downmodulates the RLR Signaling Pathway via Direct Interaction with RIG-I and MDA-5', *Journal of Virology*, 86, pp. 3528–3540. doi: 10.1128/jvi.06713-11.
- Xu, H. *et al.* (2017) 'Herpes Simplex Virus 1 UL24 Abrogates the DNA Sensing Signal Pathway by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation', *Journal of Virology*, 91(7), pp. 1–10. doi: 10.1128/jvi.00025-17.
- Yang, L. *et al.* (2019) 'Innate Immune Evasion of Alphaherpesvirus Tegument Proteins', *Frontiers in Immunology*, 10(September), pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2019.02196.

Yang, P. *et al.* (2010) 'The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a  $\beta$ -catenin-dependent pathway', *Nature Immunology*, 11(6), pp. 487–494. doi: 10.1038/ni.1876.

Yin, H.-C. *et al.* (2019) 'Interactions between Autophagy and DNA Viruses.', *Viruses*. Switzerland, 11(9). doi: 10.3390/v11090776.

Zhao, B. *et al.* (2016) 'Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 133(24), pp. E3403-12. doi: 10.1073/pnas.1603269113.

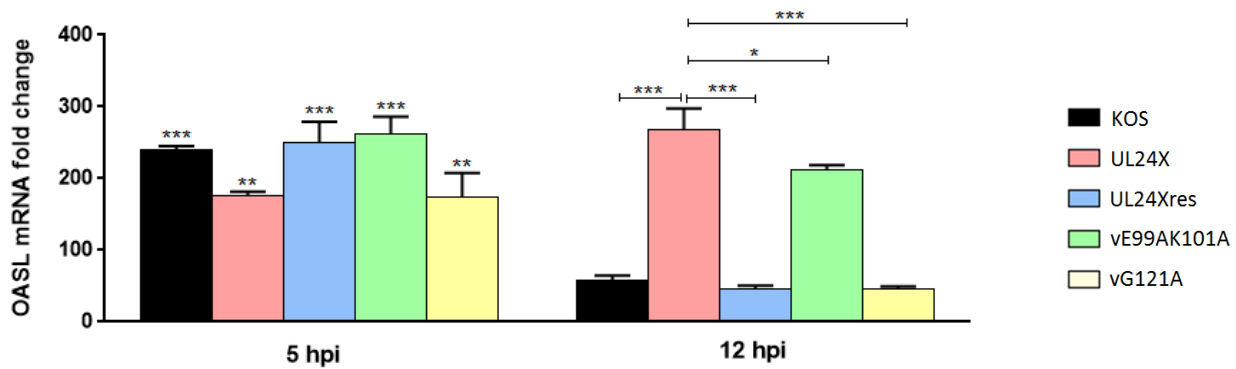
Zheng, C. (2018) 'Evasion of Cytosolic DNA-Stimulated Innate Immune Responses by Herpes Simplex Virus 1', *Journal of Virology*, 92. doi: 10.1128/jvi.00099-17.

Zhu, J., Ghosh, A. and Sarkar, S. N. (2015) 'OASL-a new player in controlling antiviral innate immunity.', *Current opinion in virology*. Netherlands, 12, pp. 15–19. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.010.



## 5 ANNEXE I : IMPACT DES DOMAINES D'HOMOLOGIE III ET IV D'UL24 SUR LES NIVEAUX DES TRANSCRITS D'OASL

Les niveaux des transcrits d'OASL dans les cellules HFF1 ont été testés à 5 et 12 hpi par RT-qPCR en suivant l'approche indiquée dans la section 2.3.2. Les virus mutants en UL24, vE99AK101A et vG121A, ont été préalablement caractérisés par notre équipe (Bertrand *et al.*, 2010). Nous avons confirmé l'induction des transcrits d'OASL à 5 hpi lors de l'infection par HSV-1, y compris les infections avec tous les virus mutants en UL24 (Figure 5.1 à gauche). Ensuite, il y a une régulation à la baisse des transcrits d'OASL dans les infections avec le virus qui expriment UL24 (KOS and UL24Xres) et le mutant vG121A, contrairement aux résultats avec les virus UL24X et vE99AK101A où les niveaux des ARNm d'OASL restent de l'ampleur observée à 5 hpi (Figure 5.1 à droite).



**Figure 5.1** Le domaine d'homologie III est important pour la régulation d'OASL

Les cellules fibroblastiques (HFF1) ont été infectées avec les souches de HSV-1 indiquées à droite. Les niveaux des transcrits d'OASL ont été quantifiés par RT-qPCR à 5 et 12 hpi relative aux transcrits de *GAPDH* et comparées aux niveaux dans les cellules mock-infectées (n=2). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.