

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

RÔLE DE LA PROTÉINE UL24 DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE GÈNES VIRAUX DU VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX DE TYPE 1

Par
Carolina Sanabria-Solano

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
En Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Patrick Labonté
INRS Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Roger Lippé
Université de Montréal

Examineur externe

Guy Lemay
Université de Montréal

Directeur de recherche

Angela Pearson
INRS Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier ma directrice de recherche, Dr. Angela Pearson. Après m'avoir accepté dans son laboratoire et encadré tout au long de ma Maîtrise, elle m'a guidé tout au long de mon doctorat. La liberté dont j'ai pu bénéficier au cours de ce travail m'a permis d'explorer les nouvelles idées qui sont au cœur de la présente thèse et qui m'ont aidée dans mon cheminement.

Je souhaite également exprimé ma gratitude à Dr. Yves Langelier, co-directeur de ma Maîtrise et importante référence positif lors de mes études. Merci également au Dr. Guy Lemay, au Dr. Roger Lippé et au Dr. Patrick Labonté, pour leurs commentaires pertinents et constructifs sur mes travaux de doctorat. Vos retours ont grandement amélioré le rendu de ce travail.

Ma gratitude va également à mes collègues du Laboratoire Pearson. Luc Bertrand a été mon mentor au Canada, il a répondu à mes nombreuses questions et ses conseils précieux, même après son départ à Miami, m'ont aidé tout au long de mon aventure à l'Institut Armand Frappier. Pierre-Alexandre Rochette, Slimane Dridi, Soumia Lahmidi ont aussi joué un rôle important dans la finalisation de ce travail. D'autres étudiants du laboratoire m'ont également soutenu tout au long de ce travail mais il y a pas suffisamment d'espace pour tous les noms ... Une mention spéciale est rendue à Carolina P. Gomez et Carmen Gonzales, amies précieuses sans qui mon expérience à l'institut mais aussi au Canada n'aurait pas la même saveur. Je voudrais remercier Dr Maritza Jaramillo pour tout son aide tout au long de mon doctorat. Elle m'a permis d'utiliser son laboratoire afin de finir à temps mes expérience et elle était toujours ouverte à des longues discussions très productives.

Me gustaría agradecer a mi familia por el apoyo incondicional durante este experimento. Las muchas horas de comunicación Skype que hicieron la distancia más agradable. Particularmente a mi madrecita (Chabelita), mi hermano (Flito) y mi Aguela. Gracias a mi querida Angela Maria Paula Bayona por ser la voz que canta Reguetón en las noches para hacerme sonreír ☺

J'aimerais remercier mes beaux-parents (Marie Christine et Jean Pierre Fays) pour votre soutien et surtout pour la relecture de mes nombreux erreurs d'orthographe et grammaire ☺

Plusieurs employés de l'institut m'ont aussi beaucoup aidé lors de mes études, spécialement Anne Philippon, pour son dévouement aux étudiants et pour les réponses à toutes mes questions. Je remercie aussi Suzanne Lemieux et le programme des apprentis en biosciences ainsi que l'ensemble du personnel du musée Armand-Frappier.

Finalement, je tiens à remercier mon « Moureux », Julien Fays, qui a partagé cette expérience du début à la fin. Tu m'as permis de grandir, d'apprendre et d'explorer des nouveaux chemins même quand tu n'étais pas d'accord avec les idées proposées. T'as été un guerrier à venir avec moi tous ces nuits au laboratoire pour des time-points ou des weekends piquenique afin de me tenir compagnie. Tu m'as fait sourire et tu m'as remonté la morale quand le monde s'effondrait devant moi. Mais surtout merci de m'avoir permis de fonder une famille au Canada avec Pain, Pita et surtout le nouveau arrivant : Chtulhu! ☺

RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), un virus neurotrope, affecte environ 80 % de la population. Il peut causer des feux sauvages, des kératites virales ou dans des rares cas des encéphalites virales. Chez des patients immunosupprimés et chez les nouveau-nés, l'infection peut être très sévère.

Le gène codant pour la protéine virale UL24 est conservé parmi tous les *Herpesviridae*. Un virus déficient en UL24 est affecté, entre autres, dans son efficacité de réplication et de réactivation à partir de l'état de latence. En contexte de transfection, l'expression d'UL24 corrèle avec une réduction de l'expression de la protéine virale R1, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN viral, ainsi que celle d'autres gènes viraux (*ICP27*, *R2*, *TK* et *gC*) et sa propre expression. Ces gènes viraux ne possèdent pas de similitude de séquence mais ils ont un contenu en guanidine et cytosine (GC) élevé. L'impact d'UL24 s'est manifesté par un effet sur l'accumulation des transcrits, quoique la stabilité des transcrits de R1 n'était pas affectée. L'effet observé était spécifique aux gènes viraux puisqu'aucune réduction d'expression n'a été observée pour les gènes *GST* ou *mCherry*, malgré le taux élevé en GC de ce dernier. Aussi, des versions mutées d'UL24 dans des résidus hautement conservé inhibe la réduction de l'expression de gènes viraux. L'orthologue d'UL24 chez l'herpès simien « B-virus » était également capable de réduire l'expression de R1. Ces résultats suggèrent que la fonction régulatrice de l'expression de gènes viraux d'UL24 n'est pas uniquement spécifique au HSV-1 mais aux *Alphaherpesvirinae*. Afin d'identifier l'élément dans la séquence de R1 qui confie la susceptibilité à la régulation par UL24, une librairie de quatre plasmides codant pour des fragments de *R1* fusionnés à *GST* a été créée. UL24 a réduit l'expression des quatre fragments de *R1* suggérant que la reconnaissance des gènes viraux par UL24 peut être due à la présence d'un ou plusieurs motifs dans leurs séquences. En plus de *GST*, l'insertion d'un fragment de *R1* dans le cadre de lecture ouvert de *cherry*, dont l'expression n'est normalement pas susceptible

d'être régulée par UL24 est suffisante pour induire une reconnaissance et une diminution de l'expression de ces protéines chimères par UL24 en contexte de transfection transitoire. Une quantification par qPCR a révélé qu'UL24 entraîne une diminution de 50% des ADN plasmidique contenant R1 et R2 mais pas mCherry.

En contexte d'infection, l'absence d'UL24 induit une suraccumulation des transcrits viraux R1 et R2 relative à la quantité d'ADN viral. Ces données montrent un nouveau rôle de la protéine UL24 dans la régulation de l'expression de gènes viraux qui pourrait avoir un impact sur la réactivation virale. Nous proposons un modèle où UL24 pourrait réguler à la baisse l'expression de gènes viraux (de différentes cinétiques) afin de favoriser la traduction des transcrits déjà présent dans le cytoplasme dans les temps tardif de l'infection lytique. Aussi, UL24 pourrait contribuer au maintien de la latence en régulant à la baisse l'accumulation de transcrits viraux de gènes lytiques dans les neurones.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	13
1.1 VIRUS HERPES SIMPLEX.....	14
1.1.1 <i>La famille des Herpesviridae</i>	14
1.1.2 <i>Famille des virus herpès humains</i>	15
1.1.3 <i>La pathogénèse du HSV-1</i>	16
1.1.4 <i>Vaccin contre HSV</i>	19
1.1.5 <i>Structure du virion HSV-1</i>	20
1.1.6 <i>Cycle de réplication lytique du HSV-1</i>	21
1.1.7 <i>Cycle de réplication d'HSV-1 en neurone</i>	25
1.1.8 <i>Latence et réactivation d'HSV-1</i>	25
1.2 REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES VIRAUX.....	28
1.2.1 <i>Régulation transcriptionnelle des gènes du HSV-1</i>	28
1.2.2 <i>Régulation post-transcriptionnelle</i>	34
1.2.3 <i>Régulation traductionnelle et post-traductionnelle</i>	42
1.3 LA PROTEINE UL24	47
1.3.1 <i>UL24 du HSV-1</i>	47
1.3.2 <i>Fonctions connues d'UL24</i>	53
1.4 LES ORTHOLOGUES D'UL24.....	56
1.4.1 <i>UL24 d'HSV-2</i>	56
1.4.2 <i>ORF35 du VZV</i>	57
1.4.3 <i>UL24 du virus de l'herpès bovin 1 et 2 (BHV)</i>	58
1.4.4 <i>ORF37 du virus herpès équin 1 (EHV-1)</i>	59
1.4.5 <i>U49 d'HHV6 et HHV7</i>	59
1.4.6 <i>ORF20 du virus du sarcome de Kaposi</i>	60
1.4.7 <i>ORF20 du gamma herpès virus 68 murin</i>	60
1.4.8 <i>UL76 d'HCMV</i>	61
PROBLÉMATIQUE.....	66
HYPOTHESES.....	68
CHAPITRE 2: REGULATION OF VIRAL GENE EXPRESSION BY THE HERPES SIMPLEX VIRUS 1UL24 PROTEIN (HSV-1UL24 INHIBITS ACCUMULATION OF VIRAL TRANSCRIPTS).....	69
CHAPITRE 3: THE HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-1 R1 GENE CONTAINS MULTIPLE UL24 SUSCEPTIBILITY ELEMENTS	116
THE HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-1 R1 GENE CONTAINS MULTIPLE UL24 SUSCEPTIBILITY ELEMENTS.....	119
1.1 UL24 AFFECTE L'EXPRESSION DU GENE <i>R1</i> EN CONTEXTE DE TRANSFECTION TRANSITOIRE	141
1.2 UL24 AFFECTE L'EXPRESSION DE MULTIPLE GENES VIRAUX	143
1.3 UL24 N'AFFECTE PAS L'EXPRESSION DE MCHERRY	144
1.4 UL24 AFFECTE L'ACCUMULATION DES TRANSCRITS DE <i>R1</i> MAIS PAS LEUR STABILITE.....	145
1.5 UL24 AFFECTE LA STABILITE DE L'ADN PLASMIDIQUE QUI CODE DES GENES VIRAUX	146

1.6	UL24 RECONNAIT UN MOTIF DANS LA REGION CODANTE DES GENES VIRAUX	147
1.7	UL24 AFFECTE L'ACCUMULATION DE TRANSCRITS VIRAUX LORS DE L'INFECTION	149
1.8	UL24 DU B-VIRUS AFFECTE L'EXPRESSION DE R1	150
	154	
PUBLICATIONS PRESENTEES		176
ÉTUDE VISANT L'IDENTIFICATION DE MOTIF RECONNU PAR UL24 DANS LES REGIONS CODANTES DES GENES VIRAUX		177

LISTE DES FIGURES

Introduction

- Figure 1..... La réplication du HSV-1 dans la muqueuse et dans les neurones
- Figure 2..... Structure du virion de HSV-1
- Figure 3..... Cycle lytique de réplication du HSV-1
- Figure 4..... Représentation graphique de la région génomique d'UL24 d'HSV-1 et de ses transcrits

Première publication

- Figure 1...UL24 reduces expression of the viral ribonucleotide reductase subunit R1 in transfection experiments
- Figure 2..... UL24 reduces the expression of R1 in a dose dependent manner
- Figure 3..... Substitution of conserved residues in UL24 blocks repression of R1 synthesis
- Figure 4.....UL24 affects the expression of several HSV-1 proteins
- Figure 5.....UL24 affects the accumulation of R1 transcripts even when produced following R1 expression
- Figure 6..... Characterisation of BAC-based UL24 negative HSV-1
- Figure 7..... Absence of UL24 induces an increase in R1 and R2 transcripts relative to viral DNA levels
- Figure 8.....Effect of the absence of UL24 on viral R1 and R2 transcripts levels early in infection
- Figure 9...UL24 from BV reduces expression of the HSV-1 GST-R1 protein in transfection experiments

Deuxième publication

- Figure 1.....R1 contains multiple UL24 susceptibility elements
- Figure 2.....A UL24 susceptibility element is transferable to a heterologous gene
- Figure 3.....Downregulation of the true late gene gC by UL24
- Figure 4UL24 can downregulate its own gene
- Figure 5.....UL24 affects the stability of plasmids encoding viral genes

Perspectives et Conclusions

Figure 1.....**Modèle de l'effet d'UL24 sur l'expression de gènes viraux lors de l'infection lytique**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm	ARN messenger
BHV.....	Virus herpès bovin
C	Cytosine
CTD.....	Domaine Carboxy terminal
CMV.....	CytomégaloVirus
CoREST	Corépresseur de l'élément-1- de « silencing » de facteur de transcription
E.....	Précoce
EBV.....	Virus Epstein Barr
G	Guanine
gB	Glycoprotéine B
gC	Glycoprotéine C
gD	Glycoprotéine D
gH	Glycoprotéine H
gL	Glycoprotéine L
HCLR.....	Complexe des protéines CoREST HDAC LSD1 et REST
HVEM.....	Méiateur de l'entrée du virus herpès simplex I
HHV-6A.....	Virus herpès humain 6A
HHV-6B.....	Virus herpès humain 6B
HHV-7.....	Virus herpès humain 7
HHV-8.....	Virus herpès humain 8
HSV-1.....	Virus herpès humain 1
HSV-2.....	Virus herpès humain 2
IE.....	Immédiat précoce
IRES.....	Site d'entrée interne des ribosomes
L	Tardif
LAT.....	Transcrits associés à la latence
MDBK.....	Cellules de rein bovin Madin-Darby
miARN	microARN
NM2A.....	Myosine de type IIA
ORF.....	Cadre de lecture ouvert
PIC.....	Complexe de préinitiation
PML.....	Cellules de leucémie promyélocyte

PQC.....Contrôle de la qualité protéique
 P-TEFb..... Facteur de transcription positive et d'élongation
 SR.....Facteurs d'épissage
 SUMO..... Petites protéines similaires à l'ubiquitine
 TF..... Facteur de transcription
 TBP..... Protéine de liaison avec la boîte TATA
 UTRRégion non traduite
 UPS..... Système de dégradation de protéines ubiquitinées par protéasome
 VEGF.....Facteur de croissance endothéliale vasculaire

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Virus herpès simplex

1.1.1 La famille des *Herpesviridae*

Les virus herpès sont très diversifiés dans la nature ; la plupart des animaux sont infectés par au moins un virus herpès. En 1971, le genre *Herpesvirus* a été établi. Après 1979, un système formel pour nommer les herpesvirus a été mis en place. Ce système dit que chaque herpesvirus doit être nommé par le taxon à qui appartient l'hôte naturel primaire. Après le nom dérivé de l'hôte, le nom « herpesvirus » et un numéro en chiffres arabes doivent suivre. La famille *Herpesviridae* a été divisée en 3 sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammapherpesvirinae*. En 2009, la dernière mise à jour sur la taxonomie des herpesvirus inclut l'introduction de nouveaux taxons à la famille des *Alloherpesviridae*, ainsi que le changement du statut de l'ancienne famille *Herpesviridae* en ordre *Herpesvirales* (Davison, 2010a).

Les *Herpesviridae* ont quatre caractéristiques principales. Premièrement les virus herpès possèdent un grand nombre de protéines associées avec le métabolisme d'acide nucléique, synthèse d'ADN et production de protéines. Deuxièmement, la transcription des gènes, la synthèse d'ADN et l'assemblage de la nucléocapside sont faits dans le noyau de la cellule. Une partie du tégument est acquise dans le cytoplasme. Troisièmement, la production de nouveaux virions accompagne généralement la destruction de la cellule hôte. Quatrièmement, les virus herpès utilisent la latence comme méthode de persistance dans leur hôte (revue en Knipe and Howley, 2013). Les virus herpès humains font partie de l'ordre des *Herpesvirales* et de la famille des *Herpesviridae* (Davison, 2010b; Matthews, 1979; Roizmann et al., 1992).

1.1.2 Famille des virus herpès humains

Les neuf virus herpès qui infectent l'humain sont le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et 2 (HSV-2), le virus de la varicelle et du zona (VZV) dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, le cytomégalo virus (CMV), les herpès virus humains 6A, 6B et 7 (HHV-6A, HHV-6B et HHV-7) appartenant au *Betaherpesvirinae*, et les virus Epstein-Barr (EBV) et herpès humain 8 ou virus associé au Sarcome de Kaposi (HHV-8) dans la sous famille des *Gammapherpesvirinae* (Davison et al., 2008).

Les membres des *Alphaherpesvirinae* possèdent un cycle de réplication court, une propagation rapide en culture cellulaire, une capacité de destruction de la cellule hôte lors de l'infection lytique et la capacité d'établir une latence dans les neurones des ganglions sensoriels. Les virus appartenant au *Betaherpesvirinae* ont une gamme d'hôtes plus restreinte que les virus appartenant à la sous-famille alpha. Les cellules infectées deviennent larges. Ils possèdent un cycle de réplication plus long et ils deviennent latents principalement dans les leucocytes et les cellules endothéliales mais ils peuvent rentrer en latence chez des cellules de glandes sécrétoires, cellules du foie et d'autres tissus (Jarvis and Nelson, 2002). Les virus appartenant à la famille des *Gammapherpesvirinae* peuvent infecter *in vitro* certains types de cellules épithéliales, certains fibroblastes et dans le cas du virus du sarcome de Kaposi (KSVH) il peut infecter des cellules endothéliales (Flore et al., 1998), mais ils ont une préférence pour les lymphocytes B ou T. Leur cycle de réplication est long, la latence est établie principalement chez les cellules B et ils peuvent être oncogéniques (Wen and Damania, 2010).

1.1.3 La pathogénèse du HSV-1

HSV-1 est très répandu dans la population mondiale. Sa prévalence varie selon l'âge, la race, la localisation géographique et la position socioéconomique (Whitley and Roizman, 2001 ; revue par Fatahzadeh and Schwartz, 2007). La prévalence du virus chez l'hôte augmente avec l'âge ; une étude aux États-Unis en 2006 montre qu'environ 25% des enfants de 6 à 7 ans, 36% des enfants entre 12 et 13 ans et 90% des personnes âgées de plus de 70 ans sont infectés par le HSV-1 (Chayavichitsilp et al., 2009). L'incidence de ce virus n'est pas saisonnière. La transmission se fait par un contact direct entre une personne susceptible de l'infection et une personne qui produit activement le virus. L'infection commence quand le virus entre en contact avec les muqueuses ou des lésions de la peau (Kleymann, 2003).

Après l'exposition initiale, le virus entre et se réplique activement dans les cellules épithéliales du site d'infection. Par la suite, l'infection se répand vers les axones des neurones sensitifs qui innervent le tissu. Puis, via ces axones, le virus migre jusqu'aux corps cellulaires situés dans les ganglions trigéminaux (infections oropharyngées) ou les ganglions de la racine dorsale (infections génitales) (revue par Steiner et al., 2007 ; revue par Corey et al., 1983). Là, le virus entre dans un état de latence. Suite à certains stress, le virus peut se réactiver de manière récurrente et migrer jusqu'au site d'infection initial où il infecte des cellules épithéliales (figure 1). Plus l'infection initiale est sévère (exemple : taille des lésions, nombre de lésion et leur extension etc...), plus il y a de chances que la réinfection soit récurrente.

Deux propriétés biologiques caractérisent les virus herpès simplex. Premièrement, leur neuro-virulence et deuxièmement leur capacité à établir une latence chez les neurones de l'hôte. La neuro-virulence du HSV est définie par sa capacité à atteindre le système nerveux à partir des sites périphériques et à se répliquer dans les cellules neuronales.

La sévérité de l'infection peut varier grandement avec des symptômes allant d'un malaise minimal à des lésions visibles sur différents sites incluant les lèvres, les joues, le nez et le septum nasal jusqu'à des encéphalites qui peuvent être mortelles (Fatahzadeh and Schwartz, 2007). L'infection au niveau des yeux peut causer des ulcérations oculaires et mener à des kératoconjunctivites. Les infections oculaires par HSV-1 peuvent ainsi mener à la cécité. Par ailleurs, il existe des risques de complications chez les nouveaux nés et les personnes immuno-supprimées. Chez les nouveaux nés, les complications peuvent inclure l'encéphalite néonatale et la dissémination de la maladie au poumon, au foie et aux autres organes vitaux. Ainsi, chez les patient immuno-supprimés les complications incluent aussi la dissémination de la maladie au tractus respiratoire, œsophage ou le tractus gastro-intestinal (Whitley and Roizman, 2001).

Les caractéristiques histo-pathologiques des lésions cutanées causées par HSV-1 sont dues à la combinaison de mort cellulaire et de l'inflammation qui en découle. L'infection virale induit un gonflement des cellules et la condensation de la chromatine dans les noyaux de ces cellules. Ensuite, les membranes cellulaires sont compromises, ce qui peut induire la formation de cellules géantes multi-nucléées. Après la lyse cellulaire, des fluides contenant les virions apparaissent entre l'épiderme et les couches dermales. Dans ces dernières, la réponse inflammatoire est prononcée. La réponse immunitaire et la résolution de l'infection sont associées à la formation de pustules. La formation de cicatrices est rare mais peut se présenter chez des patients qui ont des épisodes de réactivation fréquentes du virus (Arduino and Porter, 2007).

Réplication lytique dans les muqueuses

Latence

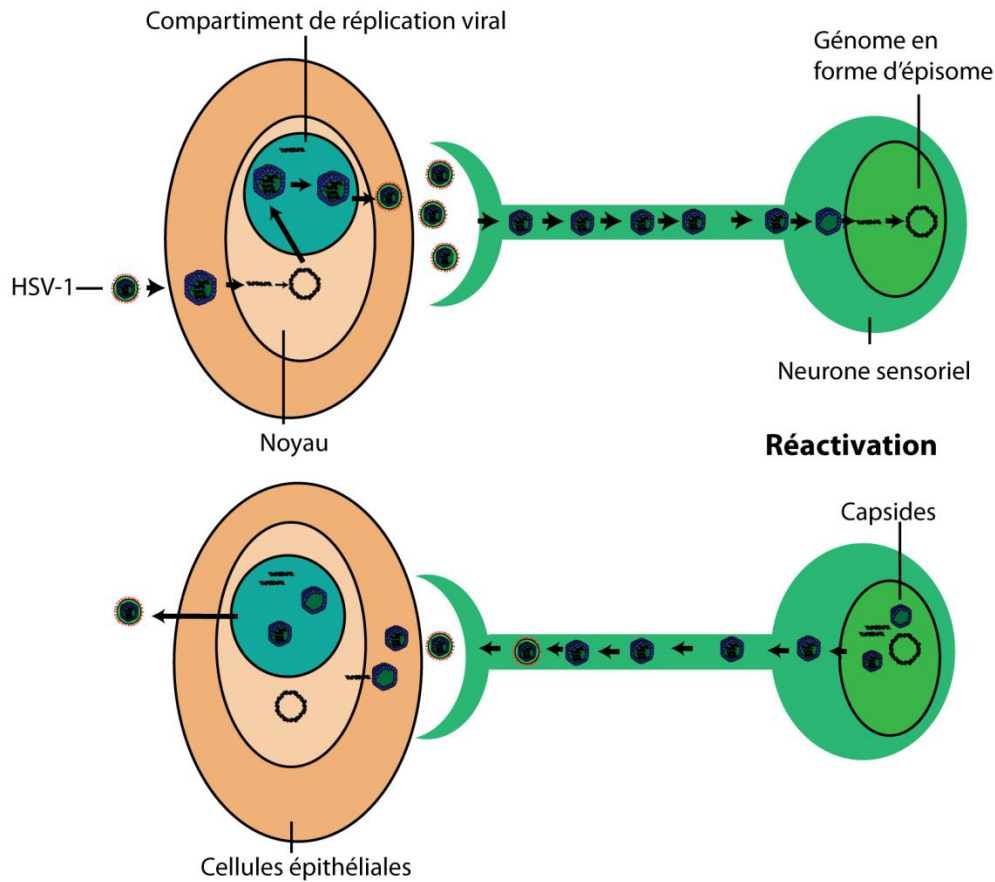


Figure 1. La réplication du HSV-1 dans la muqueuse et dans les neurones. Lors de l'infection initiale, le virus infecte la muqueuse où il se réplique activement. Par la suite, le virus infecte les neurones innervant cette région. Les flèches foncées représentent la direction de migration des capsides. Entre les terminaisons des axones et les noyaux des neurones sensoriels. Le génome viral persiste sous forme d'épisome pendant la latence. Sous certains stress il y a enclenchement du cycle lytique de réplication menant à la réactivation virale. Il y a expression des gènes viraux et des capsides sont nouvellement synthétisées. Les virions sont transportés le long de l'axone jusqu'au site d'infection initial où ils infectent des cellules épithéliales et se répliquent à nouveau, résultant en des infections récurrentes. Basé sur l'article de Knipe and Cliffe, 2008.

1.1.4 Vaccin contre HSV

Il n'existe pas de vaccin commercial contre le HSV-1. De nombreuses équipes continuent leurs efforts pour trouver un vaccin efficace contre HSV-1. L'inoculation de patients avec des virus réplicatifs a été essayée, mais cette méthode a été abandonnée en raison de problème dans la fiabilité des résultats (Biberstein and Jessner, 1958; Brain, 1938; Frank, 1938). L'utilisation de virus inactivés aux UV, à la chaleur ou à la formaline a eu un succès significatif en diminuant de 60% à 80% les réactivations de l'infection. Par contre, certaines de ces expériences n'ont pas des bons témoins (Dundarov et al., 1982; Nasemann and Schaeg, 1973). Les vaccins faits à partir de sous-unités (glycoprotéines gB et gD) ont été essayés afin d'augmenter les concentrations antigéniques et d'induire donc une réponse immunitaire plus forte. Malheureusement, les résultats cliniques chez les humains n'ont pas donnés les résultats escomptés. Les individus traités avec un vaccin de sous-unités développent autant d'infections que ceux ayant reçu un placebo, ce qui indique que ce vaccin n'est pas efficace (Ashley et al., 1987; Boukhvalova et al., 2015; Zarling et al., 1988). D'autres méthodes de vaccination sont actuellement en phase clinique, particulièrement la construction de virus herpès recombinants ainsi que l'expression de protéines d'HSV-1 chez l'hôte grâce à des vecteurs viraux (vaccin de vecteur recombinant) (revue par Coleman and Shukla, 2013).

Le traitement principal pour contrôler l'étendue de l'infection est l'acyclovir, un agent antiviral (un analogue synthétique de nucléoside) qui bloque la réplication virale par inhibition de l'ADN polymérase dans les cellules infectées. Néanmoins, chez les personnes immuno-supprimées, il peut y avoir émergence de souches virales résistantes à cette drogue (Kleymann, 2003 ; Davis and McLaren, 1983; revue par Arvin, 2007).

1.1.5 Structure du virion HSV-1

Les virions d'HSV sont composés de quatre éléments, un noyau contenant l'ADN viral, une capsidie icosaédrale qui contient ce noyau, le tégument qui forme une structure d'au moins 23 protéines entourant la capsidie (Kelly et al., 2009; Loret et al., 2008) et finalement une membrane bilipidique appelée l'enveloppe. Cette dernière contient au moins onze glycoprotéines virales distinctes insérées dans sa surface qui forment des structures en pics de longueurs variables, importantes, entre autres, pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Grunewald, 2003) (Figure 2).

Le génome de HSV-1 est composé de 152 kilopaires de bases (Whitley and Roizman, 2001). Il contient au moins 89 cadres de lecture ouverts ou « ORFs » et, à ce jour, pour 85 d'entre eux des preuves expérimentales ont été obtenues de leur capacité à coder pour des polypeptides (revue par Arvin et al., 2007; Knipe and Howley, 2013). HSV-1 et HSV-2 se distinguent par son génome qui contient une quantité élevée des nucléotides G et C (Guanine et Cytosine). Les génomes de HSV-1 et HSV-2 possèdent un pourcentage de GC de 68% et 70% respectivement, comparativement au génome humain où le pourcentage de GC est de 41%. Par contre, il existe des variations entre la distribution des nucléotides GC entre les régions codantes et les régions intergéniques du génome d'HSV-1. Les régions codantes sont uniformément riches en GC avec une moyenne de 66.9%. Tandis que, les régions intergéniques se divisent en deux populations, une riche en GC (moyenne de 69.3%) et une avec un contenu de GC moins élevé (56% en moyenne). Cette dernière est enrichie par des séquences CACACA et TTAAAA connues pour être des cibles pour des événements de rétrotransposition (Brown, 2007). Le génome possède une architecture particulière qui inclut deux segments uniques entourés par des segments inversés répétés de longueur variable. Les segments uniques sont appelés longs (UL) et courts (US) (Baines and Pellet, 2007).

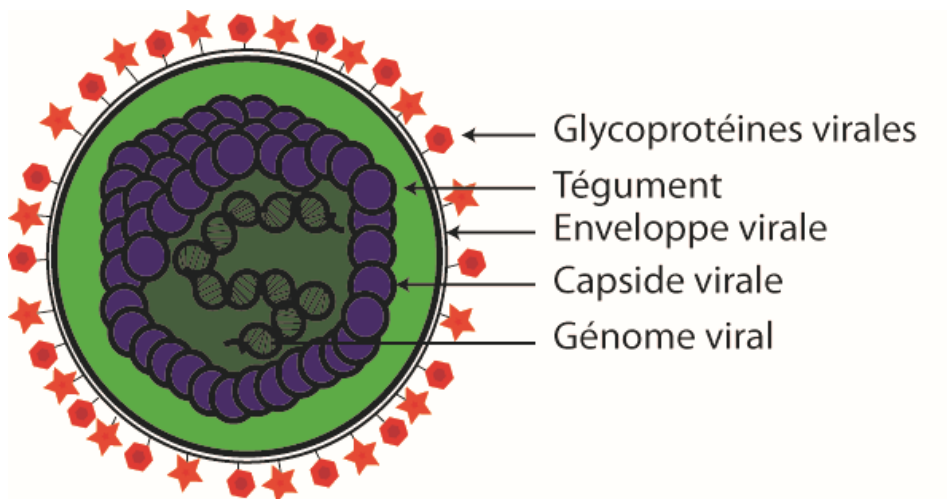


Figure 2 : Structure du virion de HSV-1. Schéma représentant une particule du HSV-1. Les différentes parties formant le virion sont identifiées dans la figure par des flèches.

1.1.6 Cycle de réplication lytique du HSV-1

Le HSV-1 peut infecter différents types de cellules incluant les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones et les lymphocytes B. Les glycoprotéines multifonctionnelles de l'enveloppe virale sont responsables de l'entrée du virus dans la cellule. Elles interagissent avec des récepteurs cellulaires et d'autres glycoprotéines et subissent des changements conformationnels pour induire la fusion avec la membrane cellulaire. Deux mécanismes principaux ont été décrits jusqu'à présent pour expliquer l'entrée du virus dans la cellule : 1) fusion avec la membrane plasmique ou 2) endocytose pH dépendante ou indépendante (Clement et al., 2006 ; Connolly et al., 2011). Cette variation est due aux différents types cellulaires, comme observé chez EBV (Milne et al., 2005). Le virus a une affinité élevée ou faible pour les récepteurs de la cellule utilisés pour son attachement. Les glycoprotéines gB et gC, par leur interaction avec l'héparine sulfate, permettent l'attachement du virus à la surface de la cellule (Shieh et al., 1992 ; Pertel et al., 2001).

Ensuite la protéine gD interagit avec ses récepteurs cellulaires via son domaine N-terminal. Il y a trois classes de récepteurs pour gD: 1) le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM), un membre de la famille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (Montgomery et al., 1996) ; 2) les nectines 1 et 2, des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines ; 3) l'héparine sulfate 3-O (Shukla et al., 1999 ; Laquerre et al., 1998). L'interaction entre gD et ces récepteurs permet une interaction forte avec la membrane plasmique qui active la mécanique de fusion. Le domaine de « pro-fusion » inclus dans la partie N-terminale de gD est chargé de recruter et d'activer d'autres glycoprotéines afin de déclencher la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (Cocchi et al., 2004). La protéine gB est la protéine de fusion du HSV-1, sa conformation post-fusion lui a valu sa classification comme une protéine de fusion classe III (Backovic and Jardetzky, 2011; Cai et al., 1988). En présence de gD, la glycoprotéine gB peut induire la fusion grâce à son interaction avec la chaîne lourde de la myosine de type IIa (NM2a) ou la glycoprotéine associée à la myéline (Arii et al., 2010; Suenaga et al., 2010). Le complexe gH/gL est requis pour l'attachement du virus aux intégrines, en présence de gB, mais il n'est pas essentiel pour la fusion avec la membrane plasmique de la cellule (Chowdary et al., 2010) (Figure 3).

L'entrée du virus par endocytose ou par fusion avec la membrane plasmique est dépendante du type cellulaire. Chez les cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert africain) le virus fusionne avec la membrane plasmique de la cellule. Chez des cellules CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois) et les cellules HeLa (cellules dérivées de cancer cervical humain) le virus est internalisé par endocytose. L'acidification de l'endosome est nécessaire pour permettre le transfert de la capside au cytoplasme de la cellule. Par contre, chez des cellules C10 (cellules de mélanome murin) l'internalisation du virus se fait par endocytose indépendante du pH (Milne et al., 2005).

Suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, la capside du virus et des protéines du tégment sont libérées dans le cytosol. La plupart des protéines du tégment restent au site de fusion avec la membrane, les autres sont libérées dans le cytoplasme (Aggarwal et al., 2012). Seulement quelques protéines du tégment restent associées avec la capside afin d'interagir avec les microtubules et la transporter jusqu'au noyau (UL36, UL37 et US3) (Enquist et al., 1998 ; revue par Döhner and Sodeik, 2005). La capside libère le génome du virus dans le noyau. Le génome se circularise et les gènes viraux sont exprimés de façon séquentielle avec trois phases principales : 1) la phase immédiate précoce ou alpha (IE ; α). 2) la phase précoce ou beta (P ; β) et 3) la phase tardive ou gamma (T ; γ). La transcription du génome est faite par l'ARN polymérase II de la cellule. Les ARNm viraux produits dans chaque phase sont exportés du noyau au cytoplasme pour être traduits par la machinerie de traduction cellulaire (Honess and Roizman, 1975).

Dans le noyau, la réplication du génome viral commence au niveau des trois sites d'origine de réplication (deux copies de oriS situées dans la région IRS/TRS et une copie oriL dans la région unique longue) et le génome forme une structure de type thêta (Summers and Leib, 2002). Peu après le début de la synthèse, la structure change en une forme de type « tapis roulant » où le génome est répliqué en continue formant des concatémères et des monomères du génome qui sont coupés et encapsidés (Hay and Ruyechan, 2007). Une copie du génome viral nouvellement synthétisée est injectée dans une capside préformée. La précapside est formée de plusieurs protéines, entre autres: VP5, VP19C, VP23, VP26 majoritairement et UL6, UL15, UL17, UL25, UL28 et UL33 minoritairement, en retrouve aussi préVP22a. Quand l'ADN viral entre dans la précapside, cette dernière subit des changements conformationnels qui lui donnent sa structure finale icosaédrique (Cockrell et al., 2008). Certaines protéines du tégment (UL36 et UL37) sont

recrutées au noyau avant la sortie des virions du noyau, ainsi ICP0 et ICP4 sont partiellement recrutés sur les capsides nucléaires (Henaff et al., 2013).

Lors de l'infection, la lamina nucléaire est dégradée et le virion est ensuite enveloppé par la membrane nucléaire interne (enveloppement primaire), ce qui amène à son bourgeonnement entre les membranes nucléaires. Plusieurs modèles pour la sortie des capsides du noyau existent. Le premier modèle appelé luminal ou modèle d'un enveloppement simple indique que les capsides enveloppés entre les membranes nucléaires ou dans le réticulum endoplasmique sont transportées par la voie de sécrétion cellulaire et ultimement les vésicules contenant les virions fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les virions (Enquist et al., 1998; Johnson and Spear, 1982). Un autre modèle propose que les capsides peuvent accéder directement au cytosol par une dilatation des pores nucléaires (Leuzinger et al., 2005; Wild et al., 2005). Finalement, le modèle le plus accepté en ce moment, appelé re-enveloppement, propose que l'enveloppe virale primaire aille fusionner avec la membrane externe du noyau et libérer la particule virale non enveloppée dans le cytoplasme. Là, la particule est recouverte par une couche de 16 à 35 protéines qui forment le tégument (revue par Mettenleiter, 2002 ; Loret et al., 2008). Ensuite, elle subit un deuxième processus d'enveloppement dans les membranes cytoplasmiques au niveau de l'appareil de Golgi ou dans les endosomes (Siminoff and Menefee, 1966). Dans ces vésicules, le virion acquiert sa maturité infectieuse. Les vésicules cellulaires qui contiennent les virions sont transportées à la surface de la cellule où elles fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer les virions (Johnson and Baines, 2011; Turcotte et al., 2005).

1.1.7 Cycle de réplication d'HSV-1 en neurone

L'infection primaire par le HSV-1 se traduit par une infection lytique au site d'infection. Par la suite, le virus entre dans les neurones sensitifs et est transporté de manière rétrograde jusqu'aux corps neuronaux situés dans les ganglions sensoriels. Le virus peut se répliquer dans certains neurones, mais après quelques jours une infection latente s'établit où l'on ne détecte plus de virus infectieux (le virus perd son infectivité). Cette phase de latence est caractérisée par la présence d'épisome viral, ainsi qu'une répression de l'expression des gènes viraux lytiques (Steiner et al., 2007). Seule la région du génome qui code pour les transcrits associés à la latence (LAT) reste active. Elle est contenue dans les régions répétées flanquant le segment UL. Pendant cette phase, les promoteurs des LAT sont enrichis en histones H3 acétylées à la différence des promoteurs lytiques pour lesquels l'association avec les histones H3 est plus faible (Kubat et al., 2004). Le génome viral persiste sous forme d'hétérochromatine dans les neurones durant la vie de l'hôte et périodiquement, particulièrement, sous certaines conditions de stress, le virus peut se réactiver (C. M., Preston and S., Efstathiou, 2007).

1.1.8 Latence et réactivation d'HSV-1

Pendant la latence, l'ADN viral est sous forme d'hétérochromatine où le HSV-1 induit un état d'expression de gènes limité. Il y a trois transcrits principaux associés à la latence. Le premier, appelé *LAT* mineur ou *LATm* est transcrit de manière antisens du gène qui code pour ICP0 et s'étend jusqu'au site de polyadénylation de la région courte répétée. Le deuxième transcrit, appelé majeur, est dérivé du *LATm* par épissage alternatif. C'est un segment très abondant et stable, non polyadénylé, de 2,0 kb. Enfin, il existe un troisième transcrit stable de 1,5 kb, dérivé du transcrit *LAT* majeur par épissage alternatif (Zabolotny et al., 1997). Ces transcrits s'accumulent dans les ganglions mais leur traduction n'a pas

encore été montrée même s'ils s'associent à des polyribosomes (Steiner et al., 2007). Aussi, un nombre élevés de microARN viraux sont exprimés lors de la latence (dans le modèle d'infection murin on retrouve miR-H1, miR-H2, miR-H3, miR-H4, miR-H5, miR-H6, miR-H7, miR-H8, miR-H17 et miR-H18). Ils sont produits à partir des transcrits *LAT* et leurs expressions dépendent du promoteur *LAT*. Les microARN viraux contribuent à la latence virale en contribuant à la régulation à la baisse de gènes viraux important pour l'infection lytique (Cui et al., 2006; Jurak et al., 2010; Umbach et al., 2008). L'expression des transcrits *LAT* et des microARN viraux corrèle avec le remodelage de l'ADN et ils permettent la surveillance et la dégradation des transcrits viraux exprimés à des niveaux basaux. Ainsi les transcrits *LAT* et les microARN surveillent la synthèse spontanée de transcrits viraux afin d'empêcher la réactivation et la destruction des neurones.

Lors de la réactivation virale, les modèles actuels indiquent que c'est un processus fait en deux étapes. Dans un premier temps les gènes viraux appartenant aux différentes classes cinétiques sont exprimés dans les neurones en même temps. Ensuite, l'expression des protéines virales induit une diminution de la transcription des *LATs* et des microARN viraux. Suite à cette étape, le virus peut se répliquer activement et il transcrit ses gènes comme lors de la réplication lytique (Du et al., 2011; Roizman and Zhou, 2015).

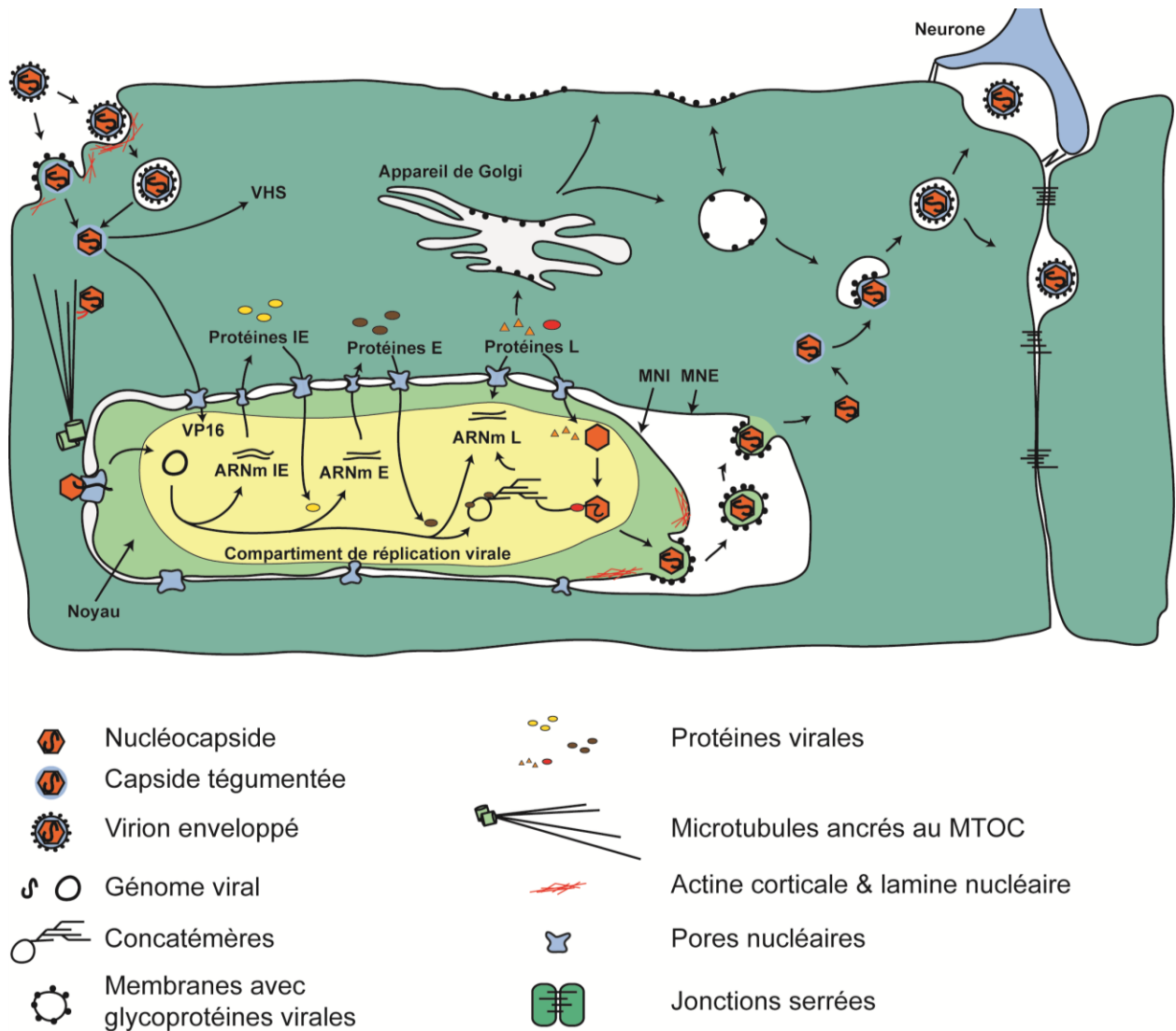


Figure 3. Cycle lytique de réplication du HSV-1. Le virus entre dans la cellule soit par fusion avec la membrane plasmique ou par endocytose. La capside est libérée au cytoplasme où elle va se diriger vers le noyau grâce aux microtubules. Le génome viral va être relâché au noyau et va se circulariser. Par la suite, l'expression des gènes et leur traduction se fait de manière séquentielle : l'expression des gènes immédiats précoces (IE) est suivie de l'expression des gènes précoces (E) et des gènes tardifs (L). La réplication de l'ADN viral commence au niveau des trois origines de réplication où le génome forme une structure de type thêta. Peu après le début de la synthèse, la réplication change en une forme de type « tapis roulant » où des monomères du génome sont coupés et emballés. Les ADN viraux nouvellement synthétisés sont injectés dans des capsides

préformées. Suite aux étapes d'enveloppement et dé-enveloppement les capsides se rendent au cytoplasme. Les capsides acquièrent leurs téguments et ensuite, elles subissent un deuxième processus d'enveloppement dans les membranes cytoplasmiques de l'appareil de Golgi ou des endosomes. Dans ces vésicules, le virion acquiert sa maturité infectieuse puis bourgeonne de la cellule. Image créée par Dr Pierre Alexandre Rochette, thèse doctoral, basée sur une figure tirée de la thèse de Luc Bertrand.

1.2 Régulation de l'expression des gènes viraux

Lors de l'infection lytique du HSV-1, l'expression des gènes viraux se fait sous forme séquentielle en utilisant la machinerie de transcription de la cellule hôte. La transcription des gènes viraux ainsi que l'entrée en latence du virus sont des étapes de la réplication strictement régulées. Cette régulation génique peut être effectuée à différents niveaux, incluant le recrutement de l'ARN polymérase aux gènes d'intérêt, l'initiation de la transcription, l'élongation des transcrits, l'épissage, la polyadénylation, l'export du noyau, la stabilité des ARNm dans le cytoplasme et la traduction en protéines (Thomas and Chiang, 2006).

1.2.1 Régulation transcriptionnelle des gènes du HSV-1

Au niveau de la transcription, des points centraux de régulation incluent : les modifications dans la chromatine, le recrutement de la machinerie de transcription, ainsi que sa stabilisation, la pause de l'élongation et la terminaison de la transcription.

1.2.1.1 Association de l'ADN viral avec des histones.

L'ADN viral dans les capsides ne contient pas des nucléosomes. Par contre, à l'intérieur de la cellule, l'ADN viral est rapidement associé à de la chromatine de répression

(ajout d'histones et méthylation). Cette association est un mécanisme de défense de la cellule. La structure de la chromatine peut être altérée par des modifications post-traductionnelles sur les histones et à travers le remodelage-dépendant-d'ATP des nucléosomes. Le remodelage de la chromatine implique un dégagement des nucléosomes sur l'ADN, ce qui augmente l'accès à l'ADN pour d'autres protéines. Les modifications possibles sont la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Par exemple, l'acétylation des histones permet une relaxation de l'interaction entre les histones et l'ADN. Néanmoins, HSV-1 possède des protéines capables de réduire de manière progressive l'accumulation de chromatine répressive et induire l'installation de marqueurs de la transcription. Lors de l'infection lytique les quantités d'histones sur le génome viral sont basses et leurs localisations sont désorganisées. Entre autres, une des protéines responsable de la disposition des histones sur le génome viral est VP16. Le domaine active de la protéine VP16 est capable de recruter des facteurs de transcription, l'ARN polymérase II, des histones acétyltransférases et des complexes de remodelage de la chromatine dépendante de l'ATP aux promoteurs IE (Cun et al., 2009; Herrera and Triezenberg, 2004; Wysocka and Herr, 2003). Cette protéine a aussi été impliquée dans l'augmentation du dégagement d'histones sur les promoteurs IE. La protéine ICP0 a aussi était associée avec la régulation de l'ajout de chromatine au génome viral. Elle induit une acétylation de l'histone H3 (Hancock et al., 2010).

1.2.1.2 « De-répression » et transcription des gènes immédiats précoces

L'expression des gènes viraux est réprimée lors de l'entrée de l'ADN viral dans le noyau cellulaire (Bryant et al., 2011; Cliffe et al., 2009). Les similitudes entre la transcription cellulaire et virale permettent à HSV-1 d'exploiter la machinerie de transcription cellulaire pour son propre bénéfice et ainsi surmonter cette répression.

Les gènes viraux possèdent des régions promotrices aux alentours du site d'initiation de la transcription, permettant le recrutement de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase de type II de l'hôte, ainsi que son orientation sur l'ADN. Les deux séquences promotrices les plus connues pour le HSV-1 sont la boîte TATA et l'élément Inr (McGeoch et al., 1991). L'expression des gènes viraux est contrôlée par des interactions dynamiques entre les facteurs viraux et cellulaires au niveau de la transcription et de la traduction (Wagner et al., 1995). Une des différences permettant de séparer chaque classe cinétique est la variation dans la structure générale des promoteurs viraux. Ces modifications structurales font de ces segments de gènes des sites de contrôle importants (Alwine, 1974).

Les promoteurs des gènes immédiats précoces ont des séquences conservées (5' G/CTAATGAG/AATTCC/TTTGNGGG 3') qui permettent la liaison d'un complexe protéique qui inclut la protéine virale VP16, transcrite à partir du gène viral *UL48* et les protéines cellulaires Oct1, HCF1 et LSD1 (VP16/Oct1/HCF1/LSD1). Le complexe formé avec VP16 permet la dé-répression des promoteurs immédiats précoces et le recrutement de facteurs de transcription (TF de l'acronyme en anglais : « transcription facteur ») pour l'initiation de la transcription des gènes immédiats précoces (Kristie and Roizman, 1988; Mackem and Roizman, 1982).

L'initiation de la transcription se fait par le recrutement de TFIIB, TFIIH, la protéine de liaison avec la boîte TATA : TBP (de l'acronyme en anglais : « TATA binding protein ») et les facteurs associés à TBP et la holoenzyme de l'ARN polymérase II. Le recrutement de ces facteurs par VP16 permet la formation du complexe de préinitiation (PIC de l'acronyme en anglais : « Preinitiation Complex ») sur les régions promotrices avec l'ARN polymérase II. Cette étape est un des points majeurs de la régulation virale au niveau de la transcription. Les premières protéines virales synthétisées sont les cinq

protéines immédiates précoces : ICP0, ICP27, ICP4, ICP22 et ICP47. Ces protéines ont tous des éléments de réponse à la liaison du complexe VP16/Oct1/HCF1/LSD1 (Knipe and Howley, 2013).

Après l'expression des gènes immédiats précoces, l'expression d'ICP4 et ICP0 est régulé à la baisse par le virus. ICP4 est capable d'autoréguler son expression et se lie à deux séquences différentes d'ADN. La première séquence (ATGGTCNNNNYCGRC) est définie comme le site consensus de liaison d'ICP4 et cette liaison va induire la transcription des gènes précoces et tardifs (Pizer et al., 1991). La deuxième séquence correspond à un ensemble de séquences différentes du site consensus. Ces séquences correspondent au site d'initiation de la transcription des gènes régulés à la baisse par ICP4 et ont été associées jusqu'à présent à ORF P/ORF O, ICP0 et ICP4 (Knipe and Howley, 2013; Liu et al., 2010).

1.2.1.3 Expression des gènes précoces et tardifs

La dé-répression des gènes immédiats précoces n'est pas suffisante pour induire l'expression de gènes précoces et tardifs ; elle nécessite la présence de la protéine ICP0 (Roizman and Zhou, 2015). La protéine ICP0 est une protéine multifonctionnelle. Deux des fonctions d'ICP0 sont pertinentes pour l'expression des gènes précoces et tardifs. Lors de l'entrée de l'ADN viral dans le noyau, celui-ci se localise dans des corps nucléaires appelés ND10. Premièrement, la protéine ICP0 est une ubiquitine ligase de type E3. À l'aide de l'enzyme UbCH5A, ICP0 est capable de dégrader PML et SP100, deux composantes des corps ND10. Les corps ND10 sont des structures dynamiques nucléaires qui font partie des défenses intrinsèques de l'hôte contre les infections, elles sont responsables de l'inactivation de l'ADN viral à l'aide de facteurs de restriction (Gu et al., 2013). Les protéines immédiates précoces vont former avec ce qui reste des corps ND10 le noyau des compartiments de réplication viral (Boutell et al., 2002, 2003, 2008). La deuxième fonction

d'ICP0 importante pour l'expression des gènes viraux précoces et tardifs implique sa liaison avec le corépresseur CoREST (de l'acronyme: « [co]repressor for element-1-silencing transcription factor » en anglais). Ce corépresseur est capable de modifier la chromatine en formant un complexe avec la protéine HDAC, LSD1 et REST (HCLR) pour réguler l'expression de gènes neuronaux (Lakowski et al., 2006). ICP0 se lie à CoREST et il est capable de déplacer la protéine HDAC, ce qui induit un effondrement du complexe et un mouvement des composants du complexe vers le cytoplasme. La dégradation des PML et l'effondrement du complexe HCLR par ICP0 ont été liées avec une dé-répression des gènes précoces et tardifs (Gu and Roizman, 2009; Gu et al., 2005).

La protéine ICP4 est aussi nécessaire pour la transcription des gènes précoces et tardifs. Elle est l'activateur majeur de la transcription de ces gènes. Elle a un rôle essentiel pour la réplication lytique. Cette protéine possède plusieurs domaines conservés qui incluent un site de liaison à l'ADN, un site de localisation nucléaire et des régions N et C-terminales transactivatrices. Les promoteurs des gènes précoces et tardifs sont moins complexes que ceux des promoteurs immédiats précoces. Les promoteurs précoces tout comme les tardifs n'ont pas de séquences d'activation virales spécifiques. Néanmoins, les promoteurs précoces contiennent des sites de liaison de facteurs cellulaires spécifiques. Les promoteurs tardifs de leur côté n'ont pas d'éléments *cis*- en amont de la boîte TATA qui jouerait le rôle de sites de liaison connue pour des facteurs cellulaires ou viraux. Les promoteurs « true late » possèdent une boîte TATA, quelques sites de liaison de facteurs de transcription en amont et des séquences d'activation dans la région 5' UTR. ICP4 ne nécessite pas de site consensus de liaison dans les promoteurs des gènes précoces ou tardifs pour leur transcription. ICP4 est capable de stabiliser TBP sur la boîte TATA à l'aide de TFs et de médiateurs. ICP4 recrute l'ARN polymérase II afin de réguler la transcription

et l'expression de gènes viraux (Dembowski and DeLuca, 2015; Wagner and DeLuca, 2013; Zabierowski and Deluca, 2008).

Une autre protéine qui possède plusieurs fonctions de régulation de l'expression de gènes précoces et tardifs est ICP27. Elle permet l'expression efficace de transcrits précoces particulièrement ceux qui sont moins abondants. Jusqu'à présent, on ne sait pas si l'augmentation de la quantité d'ARNm précoce par ICP27 est un mécanisme transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Knipe and Howley, 2013; Sandri-Goldin, 2008). ICP27 est capable de se lier avec l'ARN polymérase II (interaction avec la partie CTD de l'ARN polymérase II) pour augmenter ou réduire la transcription de gènes viraux. ICP27 peut se lier avec ICP4 et altérer sa phosphorylation. Elle interagit également avec ICP8 et l'ARN polymérase pour s'associer avec l'ADN nouvellement synthétisé et ainsi promouvoir la transcription de gènes tardifs (Olesky et al., 2005; Sandri-Goldin, 2011; Zhou and Knipe, 2002).

L'expression de gènes tardifs augmente lors de l'initiation de la réplication de l'ADN viral. La transcription de ces gènes se fait dans les compartiments de réplication virale dans le noyau cellulaire. Les protéines ICP4, ICP8, ICP22 et ICP27 sont nécessaires pour l'expression des gènes tardifs (Kim et al., 2002; Knipe and Howley, 2013).

ICP22 est associée avec la régulation de l'expression de quelques gènes tardifs. ICP22, en association avec la protéine kinase UL13, va dégrader la cycline A et B et ainsi promouvoir le recrutement de la protéine UL42 (une sous unité de la polymérase d'ADN viral). Le complexe formé par UL42 dépendant d'ICP22 va permettre le recrutement de la topoisomérase II α et promouvoir la transcription des gènes « true late » en permettant l'accès de la machinerie de transcription à l'ADN viral (Guo et al., 2012; Knipe and Howley, 2013; Leopardi et al., 1997; Phatnani and Greenleaf, 2006). ICP22 est capable aussi de réduire les niveaux de phosphorylation de la serine 2 du domaine C-terminal (CTD) de

l'ARN polymérase II. La phosphorylation de la serine 2 induit l'élongation de la transcription en permettant à la polymérase de s'éloigner du promoteur. Cette réduction est faite par l'inhibition de la protéine P-TEFb (de l'acronyme en anglais : « positive-transcription elongation factor b »), un facteur connu pour son activité positive sur l'élongation de la transcription. Ce blocage de l'élongation de la transcription est important pour induire une réduction de la transcription de gènes cellulaires (PLK2 et EIF2S3) et viraux (promoteurs des gènes α , β et γ) (Guo et al., 2012; Ou and Sandri-Goldin, 2013; Zaborowska et al., 2014). ICP22 régule l'expression de certain gènes viraux (exemple *ICP0*, *UL38*, *UL41*, *Us11*, *gC*, *UL26*, *UL26.5* et *gJ*), mais aussi elle interagit avec des protéines virales afin d'induire efficacement l'enveloppement primaire lors de la sortie des capsides du noyau (Aubert et al., 2008; Maruzuru et al., 2014).

1.2.2 Régulation post-transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle est un mécanisme important utilisé par le virus afin de contrôler l'expression de ses gènes. Cependant, il existe également d'autres niveaux de régulation. Lors de la synthèse des transcrits cellulaires, les pré-ARNm vont acquérir une structure en forme de coiffe ou « CAP » dans la partie 5'. La partie 3' va être clivée et l'on verra l'ajout d'une queue polyA. En plus, les ARNm cellulaires doivent souvent subir un processus d'épissage afin d'éliminer les séquences d'introns (Cooper, Geoffrey M. and Hausman, R. E., 2009). Tout comme la cellule, le virus régule ces processus ; on parle alors de régulation post-transcriptionnelle des ARNm produits. La section suivante présente un aperçu général des processus de régulation post-transcriptionnelle affectés par le virus.

1.2.2.1 Polyadénylation

HSV-1 forment des transcrits qui ont une coiffe et qui sont polyadénylés grâce à l'activité de la machinerie cellulaire. Des sites de polyadénylation différents chez les gènes viraux vont induire des variations dans l'expression de ces gènes. Certains sites de

polyadénylation des transcrits tardifs sont mal reconnus par la machinerie cellulaire et sont donc définis comme étant des sites faibles de polyadénylation, comme par exemple les sites des gènes UL38 et UL44 qui codent pour les protéines VP19C et gC respectivement (Arvin et al., 2007; revue par McGregor et al., 1996). Pour améliorer la polyadénylation, la protéine ICP27 facilite le recrutement du facteur stimulant de clivage CstF au site poly(A). ICP27 reconnaît les sites de polyadénylation faibles du virus et induit une augmentation de l'efficacité de traitement de ces transcrits. Néanmoins, la protéine ICP27 n'a pas d'effet dans le traitement de transcrits issus de gènes précoces ou immédiats précoces où le site de polyadénylation est fort (McGregor et al., 1996). Cependant, le rôle d'ICP27 dans la reconnaissance de ces sites est encore peu connu.

Aussi, ICP27 joue un rôle sur la distribution de transcrits dans les compartiments cellulaires particulièrement d'UL24. Six transcrits d'UL24 ont été identifiés, pour trois de ces transcrits la terminaison de la transcription se fait dans le site de polyadénylation d'UL26. Les transcrits possèdent une cinétique tardive et leur export du noyau est dépendant d'ICP27, par contre l'export du noyau des trois autres transcrits d'UL24 n'est presque pas affecté par ICP27 (Pearson et al., 2004).

1.2.2.2 Régulation du dommage à l'ADN et machinerie de contrôle de qualité des protéines

Les voies cellulaires de contrôle de la qualité des protéines (PQC de l'acronyme en anglais : « protein quality control ») et la réponse au dommage de l'ADN sont largement affectées par l'infection avec HSV-1. Le virus fait un remodelage du noyau lors de l'infection. Le PQC est réorganisé. Certaines chaperonnes et des composants du protéasome 20S sont ajoutés au PQC. Des composants du PQC sont recrutés à des foyers du noyau enrichis de chaperonnes induit par le virus (VICE) (de l'acronyme en anglais : « Virus-induced chaperone-enriched domains ») qui sont localisés à la périphérie des compartiments de réplication. Les protéines immédiates précoces sont impliquées dans la

réorganisation de PQC dans des domaines VICE. ICP22 se localise dans les domaines VICE, cette protéine est directement responsable de la réorganisation d'une des chaperonnes, Hsc70 (Bastian et al., 2010; Jahedi et al., 1999; Weller, 2010). La fonction ATPase de Hsc70 est essentielle pour l'expression efficace de gènes immédiats précoces et la formation de complexes de réplication. Les domaines VICE peuvent séquestrer des protéines mal repliées afin d'éviter une suraccumulation et induire un effet cytopathique comme l'apoptose, permettant au HSV-1 d'éviter l'apoptose (Mostafa and Davido, 2013; Weller, 2010).

Chez les cellules eucaryotes, l'on retrouve plusieurs voies de signalisation en réponse au dommage de l'ADN entre autres : l'activation des points de contrôle du cycle de réplication, le « silencing » de gènes et si le dommage est irréparable, induction de l'apoptose. Le dommage à l'ADN active généralement plusieurs kinases (DNA-PK ou ATM sont des exemples de ce type de kinases) (Kemp et al., 2011). Chez des cellules infectées par HSV-1, certaines voies du dommage à l'ADN sont activées et d'autres sont inactivées. ICP0 dégrade la kinase DNA-PK. La dégradation de cette kinase induit l'inactivation de la voie de réparation de cassure de l'ADN double brin chez certains types de cellules. ICP0 est également responsable de la dégradation des ubiquitines ligases cellulaires RNF8 et RNF168. Ces dégradations évitent la formation de foyers de dommage qui induiraient des mécanismes intrinsèques antiviraux de la cellule (Weller, 2010). La régulation de ces voies cellulaires promeut l'infection lytique dans des cellules épithéliales.

D'autres virus herpès sont aussi connus comme étant capable de réguler la réponse au dommage à l'ADN, afin de promouvoir leur réplication. Le cytomégalovirus, un virus herpès qui appartient à la famille des *Betaherpesvirinae*, est capable de réguler la voie de réponse au dommage de l'ADN afin d'assurer sa propagation. L'induction d'IL-8 est particulièrement importante pour l'infection des neutrophiles par CMV. Ce virus attire les

neutrophiles au site d'infection via cette interleukine afin de faciliter sa dissémination. La protéine UL76 du virus a été identifiée comme étant capable d'induire l'expression des transcrits et de la protéine IL-8 de manière indirecte. La régulation de l'expression de cette protéine se fait par l'activation de la voie NF- κ B, qui peut se produire par deux voies indépendantes. Premièrement, quand l'ADN subit un dommage, la protéine ATM est phosphorylée et activée ; cette protéine régule le cycle cellulaire en réponse à des cassures dans l'ADN double brin. La deuxième voie est liée à la SUMOylation de la protéine NEMO et son activation. La protéine NEMO ubiquitinée s'associe avec ATM. Les deux protéines sont transportées au cytoplasme de la cellule où ils vont induire l'activation de NF- κ B et de manière subséquente la synthèse de l'IL8. Les auteurs suggèrent qu'UL76 induit des dommages à l'ADN afin d'activer la voie NF- κ B et par la suite l'expression de l'IL8 (Costa et al., 2013).

1.2.2.3 Épissage et export nucléaire des ARNm

La protéine ICP27 agit au niveau de l'épissage, une autre étape de la maturation des ARNm. Les transcrits cellulaires sont reconnus pour subir multiples événements d'épissage. Dans les cellules, ce phénomène est fortement lié à l'export des ARNm du noyau puisque le complexe de liaison d'exons reste lié aux transcrits qui viennent de subir l'épissage pour les transporter jusqu'aux récepteurs d'export nucléaire (Reed, 2003). Lors de l'infection, seulement quatre gènes viraux contiennent des introns (*ICP0*, *UL15*, *ICP22* et *ICP47*). Les transcrits viraux font de la compétition avec les transcrits cellulaires pour l'exportation au cytoplasme (Cullen, 2000 ; Bryant et al., 2001). Auparavant, la notion était que ICP27 inhibait la machinerie d'épissage cellulaire ce qui avait pour effet de promouvoir l'exportation nucléaire des transcrits viraux (Sciabica et al., 2003). Par contre, une nouvelle étude qui applique des techniques d'analyse de la transcription générale lors de l'infection à l'aide de marquage de l'ARN grâce à l'étiquette 4sU et du profilage des ribosomes, a

permis de montrer que l'épissage des transcrits cellulaires n'est pas affecté lors de l'infection mais plutôt que le virus est capable d'induire une perturbation de la terminaison de la transcription cellulaire. Cet effet sur la terminaison de la transcription résulte en la production de transcrits qui vont au-delà des sites poly(A). Ces transcrits vont subir de l'épissage avec les exons de gènes cellulaires voisins. En conséquence, des centaines de gènes cellulaires semblent être transcrits mais ils ne sont pas traduits en protéines (Rutkowski et al., 2015).

ICP27 recrute la protéine kinase SRPK1 au noyau des cellules infectées où elle phosphoryle des facteurs d'épissage (SR), ce qui empêche la formation du complexe d'épissage. ICP27 est capable de redistribuer des petites particules des ribonucleoprotéines et du SR SC35, néanmoins cette fonction n'est pas suffisante pour inhiber la machinerie d'épissage (Rutkowski et al., 2015; Sandri-Goldin et al., 1995). De plus, ICP27 d'HSV-2 a été identifiée comme régulateur de l'épissage alternatif d'intron des PML par interaction directe avec le pré-ARNm. Cette fonction indique qu'ICP27 d'HSV-2 module l'épissage alternatif afin de favoriser la propagation virale (Nojima et al., 2009; Rutkowski et al., 2015).

L'export des ARNm fait intervenir trois classes de facteurs: les protéines adaptatrices qui s'attachent directement à l'ARN, les protéines réceptrices qui reconnaissent et forment des liaisons avec les protéines adaptatrices et les nucléoporines qui sont des composantes du complexe de pore nucléaire responsable de l'export à travers la membrane nucléaire (Zenklusen and Stutz, 2001). L'export des ARNm cellulaires est lié à l'épissage. La protéine TREX s'associe à la partie 5' des ARNm lors de l'épissage. Cette protéine fait le pont entre les ARNm et le récepteur d'export nucléaire TAP/NXF. La protéine ICP27 promeut l'export nucléaire et l'accumulation cytoplasmique de plusieurs transcrits viraux en interagissant avec Aly/REF, un composant du récepteur TAP/NXF (Chen et al., 2002; Pearson et al., 2004). La protéine ICP27 forme des liaisons avec les

ARNm grâce à son motif RGG dans la partie N-terminale de la protéine. Elle interagit par la suite avec TAP/NXF et ce complexe permet l'export des ARNm viraux du noyau au cytoplasme par l'entremise des pores nucléaires (Chen et al., 2005). Néanmoins, des études ont montré qu'Aly/REF n'est pas nécessaire pour l'export des ARNm viraux (Gatfield and Izaurralde, 2002; Longman et al., 2003). D'autres protéines adaptatrices sont capable d'interagir avec ICP27 ce qui indique une redondance des adaptateurs utilisés par HSV-1 pour faire l'export nucléaire de ces ARNm (Tian et al., 2013). La fonction d'ICP27 dans l'export des ARNm est plus tardive que sa fonction dans l'épissage.

1.2.2.4 Dégradation des ARNm cellulaires et viraux

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes viraux et cellulaires ne se limite pas exclusivement aux transcrits nouvellement synthétisés. Le gène *UL41* code pour la protéine vhs (de l'acronyme en anglais : « virion host shut-off ») d'HSV qui fait partie des protéines du tégument (Strom and Frenkel, 1987). Durant l'infection, cette ARNase débute le processus de changement de l'expression de gènes cellulaires vers l'expression de gènes viraux. La fonction de vhs est d'inhiber et détruire les ARNm cellulaires et viraux, soit par la désagrégation de la structure des polyribosomes (Read and Frenkel, 1983) ainsi que par la dégradation des transcrits de manière directe ou en complexe avec le facteur d'initiation eIF4H (revue par Strom and Frenkel, 1987 ; Cotter et al., 2011; Everly et al., 2002). Cette protéine est fonctionnelle même en absence d'autres protéines virales (Jones et al., 1995). Vhs reconnaît d'abord la partie 5' des transcrits et s'associe ensuite à la séquence polyadénylée de la partie 3' (Karr and Read, 1999). Son activité optimale requiert de l'ATP et induit un clivage des ARNm entre 30 et 40 nucléotides en aval de la structure coiffe 5' CAP (Lu et al., 2001). Vhs cible et dégrade également les ARNm qui contiennent des IRES (de l'acronyme anglais « Internal Ribosome Entry Site ») (Elgadi et al., 1999). La dégradation des ARNm nécessite la protéine cellulaire RNase Xrn1 (Gaglia et al., 2012).

Durant les étapes intermédiaires et tardives de l'infection, la protéine VP16 et VP22 et possiblement UL47 interagissent avec la protéine vhs pour réguler à la baisse son activité ce qui permet ainsi la traduction des ARNm viraux et aide à son inclusion dans le tégument des nouveaux virions (Dauber et al., 2011, 2014; Lam et al., 1996). Vhs a été montrée comme étant capable de moduler la traduction des gènes tardifs. Il a été démontré qu'un virus déficient en vhs mène à la formation de granules de stress, une diminution dans le rendement du virus et une diminution de l'accumulation de gènes très tardifs dans certains types cellulaires. La réduction dans l'accumulation des gènes «true late» est due à un défaut dans la traduction. Ces résultats démontrent une autre fonction de vhs sur l'augmentation de la traduction des gènes «true late», ainsi qu'une capacité à réguler la quantité des transcrits traduits afin d'éviter un débordement de la capacité de la machinerie de traduction (Dauber et al., 2011, 2014).

Malgré sa fonction dans la dégradation des ARNm, cette protéine n'est pas essentielle pour le virus. Néanmoins, les virus mutants déficients pour vhs possèdent un patron d'expression des gènes viraux altéré et ils sont déficients pour l'établissement et la réactivation de la latence (Read et al., 1993; Geiss et al., 2000).

1.2.2.5 microARN

Un autre mécanisme de régulation post-transcriptionnelle est par l'action des microARNs (miARNs) sur les transcrits. Les miARNs sont des molécules d'ARN non codantes d'une taille de 21 à 25 nucléotides qui possèdent des fonctions importantes de régulation génique dans le développement des organismes (Bartel, 2004). Ils sont dérivés d'un ARN plus long (pri-miRNA). Dans le noyau, cet ARN va être traité pour former le précurseur pre-miARN d'une longueur moyenne de 60 à 80 nucléotides, qui possède une structure en tige-boucle permettant son exportation au cytoplasme où il va être clivé par l'enzyme RNase III (DICER) pour former des petits fragments d'ARN double brin ou siARN

(Ambros, 2004). Le brin énergétiquement favorable du siARN va être ensuite reconnu par le complexe RISC, qui régule l'expression génique en se liant aux ARNm. Cette liaison va mener soit à leur dégradation, si la complémentarité entre le siARN et l'ARNm est parfaite ou à l'inhibition temporaire de leur traduction s'il y a des mésappariements entre le microARN et de l'ARNm (Bartel, 2004 ; revue par Ambros, 2004).

Les virus herpès utilisent les microARNs comme mécanisme de régulation de la transcription des gènes viraux et cellulaires (Pfeffer et al., 2005 ; Samols et al., 2005). HSV-1 possède des séquences qui codent pour des microARN principalement dans la région LAT du génome (Cui et al., 2006 ; Jurak et al., 2010) Parmi les microARN présents, miR-H2, possède une séquence antisens au transcrit pour ICP0 et est capable d'inhiber l'expression de cette protéine. Une étude a montré qu'un virus déficient pour le miR-H2 est plus neurovirulent chez les souris par rapport au virus de type sauvage. Ce microARN semble aussi jouer un rôle dans la modulation de la réactivation virale (Feldman and Tibbetts, 2015; Jiang et al., 2015). Le microARN miR-H6 montre une similarité de séquence avec le transcrit de la protéine ICP4 et régule à la baisse l'expression de celle-ci (Umbach et al., 2008). Les microARN produits pendant la latence régulent à la baisse l'expression de protéines importantes pour la réplication lytique du virus. Néanmoins, des études portant sur des virus qui possèdent des délétions dans la région promotrice des gènes LAT démontrent une diminution de l'expression des microARN mais ces virus sont toujours capables d'établir et maintenir la latence. Les microARN, tout comme les LAT, semblent avoir comme fonction de surveiller et dégrader les transcrits viraux produits spontanément mais ils ne sont pas responsables de l'établissement de la latence (Feldman and Tibbetts, 2015; Kramer et al., 2011).

Il a été suggéré que certains miARN-cellulaires jouent un rôle lors de l'infection par HSV-1. Le miARN miR-132 est hautement conservé et est induit dans les cellules

endothéliales en réponse à l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF de l'acronyme en anglais : « vascular endothelial growth factor »). Il est régulé à la hausse entre 10 et 20 fois dans la cornée de souris infecté par le virus. La réduction de l'expression de miR-132, pendant l'infection réduit la nouvelle vascularisation de la cornée de souris et réduit les lésions kératites stromales caractéristiques de l'infection (Mulik et al., 2012). Le microARN cellulaire, miR-101, est capable de réduire la réplication de HSV-1 quand son expression est induite en culture cellulaire (Zheng et al., 2011). Le microARN cellulaire, miRNA-146a est régulé à la hausse lors de l'infection par HSV-1 chez des cellules neuronales primaires. Il est associé avec des signaux de stress pro-inflammatoires et la cascade de signalisation qui active le système du complément, ce qui suggère qu'HSV-1 régule son expression afin de contrôler la réponse immunitaire (Hill et al., 2009). Le miARN, miR-138 est spécifique aux neurones et est capable de réduire l'expression d'ICP0. L'infection de neurones avec un virus qui possède des sites de liaison de miR-138 perturbés induit une augmentation de l'expression d'ICP0 et d'autres gènes lytiques chez des cellules neuronales. Des souris infectées avec ce virus produisent des quantités élevées d'ICP0 et d'autres transcrits viraux dans leurs ganglions trigéminaux. Ces souris présentent également des symptômes d'encéphalites et un taux de mortalité plus important que celles infectées par le virus de type sauvage. Ce miARN est un facteur neuronal qui réduit l'expression de gènes lytiques d'HSV-1 pour promouvoir la survie cellulaire et la latence du virus (Pan et al., 2014). Ces résultats montrent que des microARNs cellulaires jouent un rôle important dans l'infection par HSV-1.

1.2.3 Régulation traductionnelle et post-traductionnelle

1.2.3.1 Régulation de l'initiation de la traduction

Les cellules et les virus régulent la quantité de protéines produites au niveau de la traduction et au niveau post-traductionnel. Pendant l'infection, le virus doit surmonter

plusieurs obstacles afin de se répliquer ; la traduction des ARNm cellulaires et viraux est une étape hautement régulée. La traduction est dépendante de l'ajout d'une coiffe (CAP) aux ARNm qui va être reconnue par le complexe de liaison à la coiffe, eIF4F. Ce complexe protéique, particulièrement le composant eIF4E, va permettre la liaison avec la partie 5' des ARNm et va recruter le complexe de pré-initiation de la traduction 43S. Le complexe de pré-initiation va scanner la région 5'UTR des ARNm (de l'acronyme en anglais : « untranslated region ») à la recherche du codon d'initiation. Le ribosome 60s va être ensuite attaché à ce complexe pour former un ribosome capable de traduire l'ARN, nommé 80S (revue par Dauber et al., 2014). Trois protéines virales sont connues pour augmenter l'induction de l'assemblage du complexe de liaison à la coiffe des ARNm et par conséquent augmenter l'expression des gènes viraux. La protéine US3 est une sérine/thréonine kinase qui va activer la protéine cellulaire mTORC1 afin d'hyperphosphoryler eIF4E (Walsh and Mohr, 2004). De plus, la protéine ICP27 va activer la signalisation de p38-mnk qui va aussi induire une augmentation de la capacité d'eIF4E de se lier au 5'UTR des ARNm (Hargett et al., 2005). Finalement, la protéine ICP6 va augmenter l'interaction entre eIF4E et un autre composant du complexe eIF4F, la protéine eIF4G, afin de recruter la machinerie de traduction (Walsh and Mohr, 2006).

Des kinases de stress comme PKR, une kinase dépendante de l'ARN double brin ou la kinase de stress du réticulum endoplasmique PERK vont inhiber la traduction. Ces kinases vont phosphoryler le facteur d'initiation eIF2 α pour tenter de contrer l'expression de gènes viraux. Pour contrer cette inhibition, les protéines virales ICP34.5, US11 et gB vont diriger la phosphatase cellulaire PP1a qui va permettre la déphosphorylation d'eIF2 α et inhiber l'activation de PKR et PERK (He et al., 1997; Mulvey et al., 2007).

Plusieurs stratégies de régulation post-traductionnelle interviennent. Dans cette partie la dégradation sélective de protéines cellulaires va être décrite en détail (Roizman et al., 2007).

1.2.3.2 Dégradation protéique

Une des voies de dégradation des protéines cellulaires la plus connue est la voie de dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Ce système dégrade les protéines en deux étapes : la première inclut une cascade de signalisation qui permet de faire des modifications covalentes du substrat afin d'ajouter une queue de poly-ubiquitine. Cette poly-ubiquitination sert de signal ciblant la protéine pour dégradation. La deuxième étape est la reconnaissance et dégradation des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome 26S (de Bettignies and Cux, 2010). Le protéasome 26S est composé par le protéasome 20S et le protéasome 19S. Le protéasome 20S, ou la particule core, est un complexe protéique en forme de cylindre composé de 28 sous-unités organisées en forme d'anneaux. On retrouve 7 sous-unités α qui forment l'anneau externe, 7 sous-unités β qui forment l'anneau interne. Trois sous-unités induites par l'INF- γ peuvent remplacer trois des sous-unités β normalement présentes dans la structure du protéasome pour former l'immunoprotéasome. Ce complexe a plusieurs activités catalytiques: 1) une activité chymotrypsine qui clive après les résidus hydrophobes volumineux, 2) une activité trypsine qui permet de cliver des résidus basiques 3) une activité d'hydrolase de peptides peptidyl-glutamyl permettant de couper après les résidus acides, 4) une activité de clivage de chaînes d'acides aminés qui forment des branches, et 5) une activité de clivage d'acides aminés neutres (de Bettignies and Cux, 2010; Meng, 1999). Le protéasome 19S est un complexe formé de 19 sous-unités. Sa partie basale inclut six homologues AAA-ATPases qui forment un anneau et quatre sous-unités non ATPases. Le couvercle de ce complexe est composé d'au moins neuf sous-unités non ATPases. Le protéasome 19S permet

d'ouvrir l'entrée au protéasome 20S, de maintenir le substrat déplié et de faciliter le déplacement du substrat aux différentes chambres catalytiques (de Bettignies and Coux, 2010).

Chez le HSV-1, la protéine multifonctionnelle ICP0 possède une activité ubiquitine ligase grâce à ces deux domaines ubiquitine ligase (Hagglund and Roizman, 2004). ICP0 possède une structure « RING finger » de type ubiquitine ligase E3 (structure particulière de doigt de zinc) (Kalamvoki and Roizman, 2014; Poon et al., 2002). Cette structure lui permet d'interagir avec la protéase spécifique d'ubiquitine (USP7), la protéine EF-1 δ , le facteur de transcription BMAL et la protéine p60 (Lopez et al., 2001; Pozhidaeva et al., 2015; Zheng and Gu, 2015). Dans la phase précoce d'infection, cette protéine se localise dans le noyau, où elle va dégrader les structures ND10 ; ces structures sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, telles la transactivation ou la répression de gènes cellulaires (Roizman et al., 2007). Les composantes PML et Sp100 des structures ND10 sont responsable de la répression de gènes viraux et elles sont des cibles d'ICP0 pour la dégradation (Lukashchuk and Everett, 2010). PML et Sp100 sont modifiées de manière post-traductionnelles par la famille des protéines SUMO (de l'acronyme en anglais : « small ubiquitine-like modifiers »). ICP0 possède des motifs d'interaction avec les protéines SUMO appelé SIMs. Ces motifs lui permet d'interagir avec des facteurs des PML hautement sumoylés pour induire leur dégradation. Néanmoins, ICP0 est aussi capable de dégrader, de manière indépendante de SUMO, certains facteurs des PMLs qui ne sont pas modifiés (Boutell et al., 2011; Everett et al., 2014; Sloan et al., 2015; Zheng and Gu, 2015). Les protéines kinase dépendante d'ADN, la protéine centromérique A et la protéine d'induction de l'interféron 16 (IFI16) sont également dégradée par ICP0 (Lomonte et al., 2001; Orzalli et al., 2012; Parkinson et al., 1999; Zheng and Gu, 2015). Par la suite, ICP0 va être transloquée au cytoplasme de la cellule où elle va s'agréger aux alentours des protéasomes pour dégrader les protéines cdc34, PML, SP100 et des protéines kinases

dépendantes d'ADN. Ces dégradations sélectives sont importantes pour la régulation de la transcription virale, la réplication virale, l'évasion du système immunitaire ainsi que pour le mouvement de la protéine ICP0 dans la cellule (Hagglund and Roizman, 2002; Sloan et al., 2015; Zheng and Gu, 2015).

Une autre voie de dégradation protéique utilisée par la cellule est le système d'endosomes/lysosomes. La voie endosomale est responsable de l'internalisation de fluide, solutés, macromolécules, particules et composants de la membrane plasmique par invagination de la membrane et formation de vésicules. Les différentes fonctions de cette voie permettent aussi de renouveler et de dégrader les membranes : donc c'est le système principal de recyclage de membrane. La dégradation par le lysosome est limitée à une fraction du matériel qui est transporté par la voie endosomale et la sélection de ces matériaux est hautement régulée (Huotari and Helenius, 2011). Les vésicules qui sont ciblées pour la dégradation subissent une acidification graduelle du milieu interne (de 6 à 4,8 dans les endosomes tardifs) jusqu'à la fusion avec le lysosome qui va diminuer le pH jusqu'à une valeur entre 4 et 5. Cette acidification active des réactions hydrolytiques pour permettre de dégrader le contenu de ces vésicules. L'acidification du milieu se fait principalement grâce à une pompe à proton, la V-ATPase. L'inhibition de cette acidification, permet de diminuer l'action hydrolase du lysosome et ainsi arrêter cette voie de dégradation (revue par Huotari and Helenius, 2011).

L'autophagie est un processus homéostatique qui permet l'élimination des composants cytoplasmiques, des organelles abîmés et des agrégats de protéines par la voie de dégradation du lysosome. Ce mécanisme est également une défense cellulaire capable de détecter et détruire des pathogènes intracellulaires. Cependant, HSV-1 est capable de moduler l'autophagie grâce à l'interaction de la protéine virale ICP34.5 et la

protéine cellulaire BECN1 (Orvedahl et al., 2007). Une étude a montré qu'HSV-1 va augmenter la lipidation de la protéine LC3. Cette lipidation se fait par conjugaison de la phosphatidylethanolamine au LC3 cytosolique ou LC3-I pour former la forme LC3-II. Cette forme va aider à la maturation des autophagosomes (Nath et al., 2014). La forme LC3-II va se retrouver dans les membranes des autophagosomes et va être dégradée lors de la fusion avec les lysosomes. L'accumulation de LC3-II va induire une accumulation de compartiments autophagiques, principalement des autophagosomes. Lors de l'infection par HSV-1 l'accumulation de LC3-II n'est pas liée avec une augmentation de la dégradation de la protéine dans les temps tardifs de l'infection. Le virus est donc capable de réguler la maturation des autophagosomes afin de réduire l'activation et la prolifération de cellules T spécifique contre HSV-1 (Grose et al., 2015; Santana et al., 2012) .

HSV-1 est capable de moduler la dégradation de protéines par différents mécanismes, (dégradation par le protéasome ou inhibition de l'autophagie), afin d'évader le système immunitaire de la cellule et permettre la régulation de l'expression de ses gènes et la réplication virale.

1.3 La protéine UL24

1.3.1 UL24 du HSV-1

Le gène *UL24*, situé dans la région unique longue du génome viral, est conservé dans la famille des *Herpesviridae*. Des orthologues d'UL24 du HSV-1 chez les *Alphaherpesvirinae* incluent UL24 de HSV-2 et du virus de l'herpès bovin 1 et ORF35 du VZV. Chez les *Betaherpesvirinae*, on retrouve entre autres UL49 des herpès humains 6 et 7, et UL76 du HCMV. Finalement, chez les *Gammapherpesvirinae*, on retrouve entre autres

Bxrf1 d'EBV, ORF20 de l'herpès murin68, ORF20 du virus du sarcome de Kaposi et ORF37 de l'herpès équin 1 (McGeoch et al., 1995 ; (Nascimento et al., 2009a). La protéine chez HSV-1 est de 269 acides aminés dont une grande proportion est des résidus basiques.

1.3.1.1 Phénotype UL24-déficient en culture cellulaire et *in vivo*

Le gène qui code pour la protéine UL24 se localise tête-à-tête avec celui de la thymidine kinase (TK) (Figure 4). La TK phosphoryle les nucléosides déoxypyrimidines et les analogues de nucléosides comme l'acyclovir. La TK n'est pas essentielle pour la réplication lytique du virus mais elle est importante pour la réplication dans les neurones et la réactivation (Coen et al., 1989). Les cadres de lecture ouverts et les régions promotrices de ces deux protéines se chevauchent partiellement, ce qui complexifie l'étude des fonctions de chacune de ces protéines (Coen et al., 1986). Afin d'étudier l'effet de mutation dans le gène d'*UL24* sans affecter le gène TK (Jacobson et al., 1998), deux isolats d'un mutant portant des codons stops, un pour chacun des trois cadres de lecture ont été isolés (UL24X isolat G et B). Ils codent en théorie pour une protéine tronquée de 43 résidus, quoiqu'à ce jour cette protéine n'a pas été détectée dans des cellules infectées (Jacobson et al., 1998).

Des études avec le virus UL24X démontrent un phénotype de formation de plages syncytiales de lyse (fusion des cellules infectées pour former des cellules géantes avec plusieurs noyaux), phénomène qui n'est pas commun chez le virus de type sauvage en culture cellulaire. La formation des syncytiums est plus marquée à des températures de 39°C. De plus, des essais ont démontré l'importance de cette protéine pour l'efficacité de la réplication virale (Jacobson et al., 1989a). Trois autres protéines de HSV-1 sont associées avec la formation des plages syncytiales de lyse: gB, gN gK et UL20 (Avitabile et al., 2004;

Foster et al., 2008; Kasmi and Lippé, 2015; Ruyechan et al., 1979) ; Foster et al., 2008; Avitabile et al., 2004). Chez la protéine gB, des mutations ponctuelles ou des délétions dans le domaine cytoplasmique de la protéine entraînent une formation exacerbée de syncytiums. La protéine gK, codée par le gène *UL53*, a une fonction inhibitrice sur la formation de plages syncytiales. Une substitution dans le premier domaine externe de gK montre une diminution de cette activité (Avitabile et al., 2003). Finalement une mutation chez *UL20* résulte en une diminution de la formation de plages syncytiales virales chez des cellules Vero (Foster et al., 2004).

L'étude *in vitro* des virus UL24X a montré que ces mutants se répliquaient de manière moins efficace (différence de un demi à un log10) que le virus de type sauvage (Jacobson et al., 1989a), démontrant l'importance de cette protéine pour la réplication du virus en culture cellulaire.

In vivo, UL24X présente également une réduction de l'efficacité de réplication comparativement à la souche sauvage KOS. Une différence d'un log10 au niveau des muqueuses dans les larmes de souris CD-1 est observée et cette différence est exacerbée au niveau des ganglions trigéminaux avec une diminution de plus de 4 log10 en comparaison avec le virus de type sauvage. Ces mutants démontrent aussi une réduction de plus de 80% de la réactivation *ex vivo* après l'entrée en latence (Jacobson et al., 1998). De plus, les pathologies associées à la maladie sont réduites chez les souris infectées avec un virus déficient en UL24 (Leiva-Torres et al., 2010). UL24 semble donc être important pour la pathogénèse du HSV-1, surtout au niveau des neurones et pour la réactivation du virus à partir de la latence.

1.3.1.2 Expression de la protéine UL24

Trois sites d'initiation de la transcription ont été décrits pour *UL24* ainsi que deux sites de polyadénylation. Les trois sites d'initiation de la transcription de ce gène se localisent aux positions 47402, 47666 et 48076 dans la séquence du génome d'HSV-1 KOS 1.1 (selon la nomenclature de McGeoch et al., 1988) . Six transcrits sont produits à partir du cadre de lecture ouvert d'*UL24* : trois transcrits courts (0,9 ; 1,2 et 1,4 kb) sont produits avec une cinétique d'expression précoce et trois transcrits longs (5,2; 5,4 et 5,6 kb) sont produits avec une cinétique d'expression tardive (Cook and Coen, 1996). Les transcrits de 5,6 et 1,4 kb sont produits à partir du premier site d'initiation, les transcrits de 5,4 et 1,2 kb sont produits à partir du deuxième site d'initiation et les transcrits de 5,2 et 0,9 kb sont produits à partir du troisième site d'initiation. Le premier site de polyadénylation se trouve à environ 1400 paires de bases en aval du premier site d'initiation (à la position 48739 (McGeoch et al., 1988) et le deuxième est partagé avec *UL26* à environ 5,6 kb (à la position 52766 (McGeoch et al., 1988). Les transcrits produits à partir du troisième site d'initiation n'incluent pas l'ORF complet et leur traduction en protéine n'a pas encore été prouvée. Seulement les deux transcrits longs de 5,4 kb et 5,6 kb semblent être traduits en protéine (Pearson et al., 2004) (figure 4). Le site de polyadénylation inclus dans le 3' UTR d'*UL24* démontre une activité faible. En conséquence, à cause de la modulation des deux sites de polyadénylation, les transcrits de 1,4 et 5,4 kb ont différents sites de terminaison (Hann et al., 1998).

UL24 est une protéine à cinétique tardive dans le cycle de réplication du virus (Pearson and Coen, 2002). La protéine ICP27 est importante pour l'expression d'*UL24*, en partie due à sa contribution sur l'accumulation cytoplasmique des transcrits longs (Pearson et al., 2004). La distribution de la protéine dans la cellule a été étudiée avec une protéine *UL24* liée à une étiquette d'hémagglutinine (HA). Vers 9 heures post-infection on observe

une distribution d'UL24 essentiellement nucléaire, particulièrement dans le nucléole où elle induit la redistribution de la nucléoline. Ensuite, UL24 se localise dans le noyau mais également dans le cytoplasme. Plus tard dans l'infection, elle se situe en périphérie du noyau (perinucléaire) et dans le cytoplasme de la cellule (Lymberopoulos and Pearson, 2007).

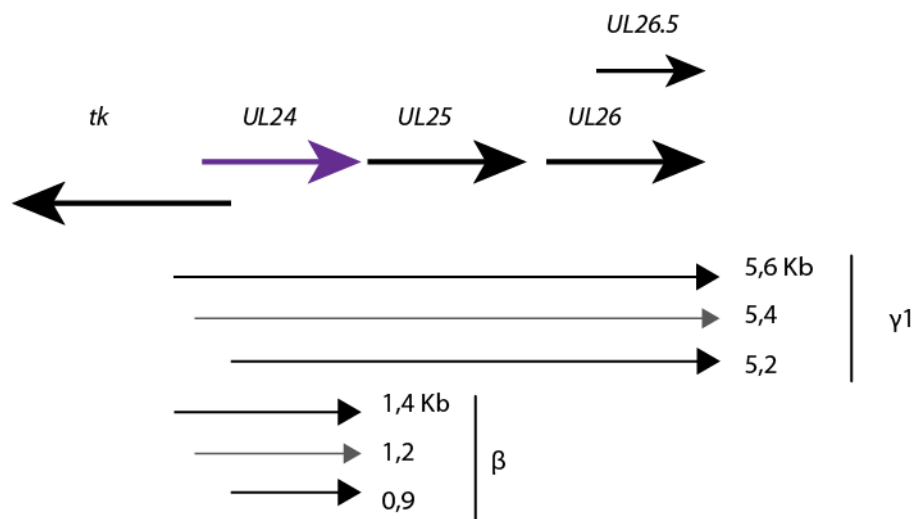


Figure 4 : Représentation graphique de la région génomique d'UL24 d'HSV-1 et de ses transcrits. *UL24* est représenté par la flèche de couleur violette. Les différents gènes entourant *UL24* sont représentés par des grosses flèches de couleur noire. Les transcrits d'*UL24* produits lors de l'infection sont représentés par des flèches fines noires et grises. Les transcrits longs ont une cinétique d'expression tardive (γ_1) et les transcrits courts ont une cinétique précoce (β). Figure modifiée de (Pearson et al., 2004).

1.3.1.3 Domaines conservés d'UL24

Des études comparatives de séquences d'UL24 d'HSV-1 avec les gènes homologues chez d'autres *Herpesviridae* (HSV-2, VZV, EBV) ont permis l'identification de cinq domaines hautement conservés, nommés domaines d'homologie (HD), où l'on retrouve 65% d'identité des acides aminés. La partie N-terminale de la protéine est plus conservée que la partie C-terminale et contient ces cinq domaines d'homologie (Jacobson et al., 1989). Par ailleurs, des analyses de bioinformatique suggèrent que la portion N-terminale d'UL24 est hautement structurée contrairement à la partie C-terminale (Kosinski et al., 2005).

1.3.1.3.1 Le domaine endonucléase de type PD-(D/E) XK

Un domaine d'endonucléase de type PD-(D/E) XK a été identifié par bioinformatique dans la région N-terminale d'UL24 (Knizewski et al., 2006). Néanmoins, la fonction de ce domaine n'a toujours pas été démontrée expérimentalement. Ce type de domaine est présent dans plusieurs protéines qui ont un rôle dans la recombinaison homologue, la dégradation et la réparation de l'ADN, chez des nucléases, particulièrement des enzymes de restriction de type II et chez des protéines importantes pour la transcription de l'ARN. La famille de protéines PD-(D/E) XK n'a pas de similitudes de séquence à l'exception des acides aminés caractéristiques du site actif. Les enzymes de restriction appartenant à cette famille reconnaissent des séquences d'ADN de 4 à 8 paires de bases et clivent l'ADN dans ces deux brins. Cette famille d'enzyme reconnaît un site d'ADN et peut couper dans le site ou aux alentours du site de reconnaissance. Même si les membres de cette famille ne possèdent pas de similitudes de séquence, ils ont une structure conservée qui a permis d'identifier plusieurs de ces membres. Jusqu'à présent, 44 familles de protéines ont été

décrites comme ayant des domaines PD-(D/E) XK (Laganeckas et al., 2011). Chez UL24, le domaine d'endonucléase se retrouve imbibé dans les domaines hautement conservés II et III (Knizewski et al., 2006).

Un virus qui possède des mutations ponctuelles ciblant les résidus du domaine putatif d'endonucléase d'UL24 (vUL24-E99A/K101A) démontre une réduction dans la réplication en culture cellulaire tout comme le virus déficient en UL24 (UL24X) (Bertrand et al., 2010). *In vivo*, ce virus montre une diminution des titres dans les yeux de souris de 10 fois par rapport au virus de type sauvage KOS, et sa réactivation dans les ganglions trigéminaux est significativement réduite. La réduction observée suggère une grande importance du domaine PD-(D/E)-XK pour le rôle d'UL24 lors de l'infection *in vivo* (Leiva-Torres et al., 2010).

1.3.2 Fonctions connues d'UL24

UL24 d'HSV-1 semble avoir différents rôles lors de l'infection. Premièrement, lors de sa localisation au noyau durant l'infection lytique, cette protéine joue un rôle de remodelage du nucléole. Cette structure sous-nucléaire est impliquée dans la synthèse d'ARN ribosomal, dans la régulation du cycle cellulaire et le transport entre le noyau et le cytoplasme (revue par Boisvert et al., 2007). La nucléoline et la protéine B23, deux protéines du nucléole, sont redistribués lors de l'infection de manière dépendante d'UL24 (Bertrand and Pearson, 2008; Bertrand et al., 2010; Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011). De plus, une infection avec un virus déficient en UL24 induit une suraccumulation de particules virales dans le noyau par rapport au cytoplasme. Cette observation suggère qu'UL24 joue un rôle dans la sortie de particules à partir du noyau, potentiellement grâce au remodelage du nucléole (Lymberopoulos et al., 2011). En dehors du contexte d'infection, une étude a démontré qu'UL24 pourrait induire un arrêt du cycle

cellulaire en G2/M en inhibant la formation du complexe cycline B/Cdc2 (Nascimento et al., 2009). Aussi, lors de la transfection transitoire, la protéine UL24 se distribue dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule comme ce qu'on observe en infection. Un site putatif de localisation nucléaire a été identifié dans la partie C-terminale non conservée d'UL24 (Pearson and Coen, 2002). Néanmoins, la partie C-terminale d'UL24, quand exprimée toute seule, se localise uniquement dans le cytoplasme de la cellule. À la différence, la partie N-terminale d'UL24 se localise exclusivement dans le noyau cellulaire. La partie N-terminale très conservée chez tous les Herpesvirus est suffisante pour induire la redistribution de la nucléoline (Bertrand and Pearson, 2008).

La protéine UL24 a aussi été détectée dans le cytoplasme de la cellule lors de l'infection lytique. Elle se localise dans les alentours du noyau dans les temps tardifs de l'infection (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011; Pearson and Coen, 2002). En transfection, la protéine UL24 s'accumule dans le noyau et dans l'appareil de Golgi, particulièrement dans la section trans-Golgi (Bertrand and Pearson, 2008). Comme décrit auparavant, l'infection avec un virus déficient en UL24 induit un phénotype de plaques syncytiales. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse d'une fonction d'UL24 sur la relocalisation des glycoprotéines importantes pour le bourgeonnement des capsides. Une étude récente supporte cette hypothèse. En effet, il a été montré qu'en absence d'UL24, les glycoprotéines virales impliquées dans la fusion membranaire sont relocalisées par rapport au microfilament d'actine chez des cellules humaines non immortalisées. Durant l'infection par ce virus, la co-localisation entre les glycoprotéines gB et gD et l'actine de type F diminue. Aussi, la formation de plaques syncytiales par le virus déficient en UL24 est affectée lorsque le cytosquelette de la cellule est perturbé par des agents chimiques (Ben Abdeljelil et al., 2013).

Un virus déficient en UL24 induit une réduction dans les titres viraux des larmes de souris ($1 \log_{10}$) par rapport au virus de type sauvage dans un modèle murin d'infection. Par contre, les titres viraux chez les ganglions trigéminaux pour le virus déficient en UL24 sont souvent en bas du seuil de détection ($4 \log_{10}$). Aussi, la quantité d'ADN viral est aussi réduite chez ce virus en contexte de culture cellulaire (Leiva-Torres, et al. Données non publiées). Ces observations corrélaient avec une réduction de la sévérité de la maladie et la fréquence de réactivation dans un essai *ex-vivo* de réactivation (Jacobson et al., 1998; Leiva-Torres et al., 2010). Une étude récente a regardé l'impact d'UL24 sur l'infection aiguë dans les ganglions trigéminaux. Ils ont observé que l'impact de l'absence d'UL24 sur les titres était le même dans les larmes et dans les tissus oculaires. Il n'y a donc pas de défaut dans la libération de virus de la cornée. Par contre, ils ont découvert également que le défaut de réplication observé chez des cellules épithéliales n'était pas plus sévère chez des lignées neuronales primaires d'embryons. Ils montrent aussi que la quantité de neurones infectés est réduite pour le virus déficient en UL24 par rapport au virus témoin à trois jours post-infection (Rochette et al., 2015). Ils ont démontré aussi que l'infection avec le virus déficient en UL24 implique une diminution significative du nombre de neurones qui contiennent de l'ADN viral par rapport à l'infection avec un virus de type sauvage ou « Rescue » à deux jours post-infection. Ces observations suggèrent que la protéine UL24 jouerait un rôle dans la dissémination du virus à partir de la cornée jusqu'aux ganglions trigéminaux.

1.4 Les orthologues d'UL24

1.4.1 UL24 d'HSV-2

La protéine UL24 d'HSV-2, composée de 282 acides aminés, a un poids moléculaire de 32 kDa (McGeoch et al., 1991). Elle montre une identité de séquence d'acides aminés de 75% avec UL24 d'HSV-1. Elle possède un signal de localisation nucléaire, est exprimée de manière tardive au cours de l'infection (à partir de 9 heures post-infection) et son expression est dépendante strictement de la réplication virale, comparativement à UL24 d'HSV-1 qui peut être exprimée faiblement avant cette étape. Il n'y a pas d'information disponible sur les transcrits d'UL24 d'HSV-2. Au début de l'infection, UL24 d'HSV-2 se localise en périphérie du noyau et plus tard dans l'infection elle se déplace au noyau (Blakeney et al., 2005). À la différence d'UL24 d'HSV-1 (Loret et al., 2008), il a été rapporté qu'UL24 d'HSV-2 peut être détectée dans le tégument des virions (Hong-Yan et al., 2001).

Un virus déficient en UL24 chez HSV-2 a été créé par insertion d'une cassette de β -glucuronidase dans le gène et la protéine produite représente la protéine de type sauvage avec une délétion des 100 derniers acides aminés (Blakeney et al., 2005). Cette délétion n'affecte pas l'activité de TK. *In vitro*, ce virus produit des plaques syncytiales mais les titres viraux ne varient pas par rapport au virus de type sauvage en culture cellulaire. Néanmoins dans un modèle d'infection intra-vaginale murin, le virus déficient en UL24 montre une réduction de plus de 70% des titres viraux, une réduction de la sévérité des symptômes et un retard de la progression de la maladie par rapport au virus sauvage. Dans un modèle de cochon d'Inde, le virus déficient en UL24 induit la formation de plaques herpétiques après l'établissement de la latence mais en nombre réduit par rapport au virus sauvage, ce qui

suggère que le virus déficient en UL24 est capable de se réactiver avec une efficacité réduite (Blakeney et al., 2005).

La présence de plaque syncytiales lors de l'infection avec un virus déficient en UL24 (UL24- β gluc) suggère une réponse immunitaire et une production d'interféron de type I plus robuste par rapport au virus de type sauvage, cependant l'infection de souris ou de cochon d'inde avec ce virus n'induit pas ou presque pas d'effet pathologique (Blakeney et al., 2005b; Holm et al., 2012; Kasem et al., 2010). Une étude récente montre que l'infection avec le virus UL24- β gluc induit une réponse immunitaire de protection importante. Aussi, l'immunisation de souris ou de cochon d'inde avec le virus HSV-2 déficient en UL24 par une voie intramusculaire ou vaginal permet une protection contre une infection létale avec le virus HSV-2 de type sauvage. Ces résultats montrent que la perturbation du gène qui code pour UL24 peut être considérée comme une cible potentielle pour le développement d'un vaccin vivant atténué contre HSV-2 (Visalli et al., 2014).

1.4.2 ORF35 du VZV

L'ORF35, un orthologue d'UL24 chez VZV, est une protéine de 285 acides aminés. Tout comme UL24 d'HSV-1, *ORF35* se trouve tête-à-tête avec *tk* mais les cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas. La protéine ORF35 se localise dans le noyau et un virus qui possède une délétion du gène qui code pour ORF35 présente des plages de lyse plus petites. L'effet sur les titres viraux est dépendant du type de cellules et est plus prononcé chez des cellules épithéliales que chez des cellules de mélanome (diminution d'un log10). VZV est connu pour former des plages syncytiales appelés des polykaryocytes pendant l'infection (Cole and Grose, 2003; revue par Besser et al., 2004; et Zerboni et al., 2014). *In vitro*, un virus déficient en ORF35 forme des polykaryocytes aberrants. Le noyau ainsi que l'appareil de Golgi sont affectés chez les cellules infectées par ce virus. La protéine gE est

importante pour la formation des syncytiums; chez le virus déficient en ORF35, on observe un changement de la distribution de cette protéine d'une localisation très distincte dans le cytoplasme et dans la membrane cellulaire à une localisation diffuse (Ito et al., 2005).

In vivo, des études d'infection des souris SCIDhu (souris C.B-17 scid/scid ayant subies des transplantations soit de thymus ou foie fœtaux humain, soit de peau fœtale humaine), montrent qu'une souche VZV déficiente en *ORF35* est atténuée dans des cellules différenciées de la peau et des cellules T humaines. Dans les xénogreffes de peau humaine, une diminution des titres viraux (1 à 2 log₁₀) est observée, ce qui est également le cas chez les cellules T où la diminution est moins importante (1 log₁₀). *In vitro*, le défaut dans la réplication d'un virus déficient en *ORF35* est aussi observé chez des cellules immortalisées humaines de peau dérivées de ganglion lymphatique, MeWo, (Ito et al., 2005; Zhang et al., 2010). *In vivo*, la délétion d'*ORF35* montre une formation de plages syncytiales aberrante et une diminution de la réplication du virus dans les cellules de l'épiderme humaine (Ito et al., 2005).

1.4.3 UL24 du virus de l'herpès bovin 1 et 2 (BHV)

Les virus BHV-1 et BHV-2 de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, codent pour un homologue d'*UL24* qui se localise tête-à-tête avec *tk* chevauchant ce dernier gène de deux nucléotides au niveau des cadres de lecture ouverts. La déficience d'*UL24* n'entraîne pas d'impact dans la réplication du virus ou la formation de plages de lyse *in vitro* (Whitbeck et al., 1994). Une étude faite à partir de BHV obtenue directement d'une épidémie de mamillitis bovin en 1973 a permis d'étudier le gène qui code pour *UL24* en état sauvage. Cinq clones de BHV-2 ont été étudiés et 4 de ces 5 clones possédaient un défaut dans le gène qui code pour *UL24*. L'acide aminé 280 est altéré par l'introduction d'un codon stop dans la séquence génique dans la région consensus III. Le cinquième clone a une

séquence non altérée pour UL24. Ce dernier clone se réplique de manière lente par rapport aux autres clones en culture cellulaire. Néanmoins, les différences observées chez le gène qui codent pour *UL24* n'ont pas d'effet dans la réplication du virus dans des cellules de foies bovin MDBK (Jelic and May, 2003). Des études sur d'autres cellules ou sur un modèle animal pourraient permettre de mieux comprendre la fonction d'UL24 chez ces virus.

1.4.4 ORF37 du virus herpès équin 1 (EHV-1)

Ce virus appartenant au genre *varicellovirus* a été montré comme étant responsable de certaines infections respiratoires et pouvant entraîner des avortements spontanés chez les chevaux (Allen and Bryans, 1986). Tout comme les autres homologues d'UL24 décrits jusqu'à présent, *ORF37* d'EHV-1 se localise tête-à-tête avec le gène *tk*, mais leurs cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas (Carvalho et al., 2012). *ORF37*, composée de 272 acides aminés, a un poids moléculaire de 29,2 kDa. En culture cellulaire, un virus déficient en *ORF37* ne montre pas de différences dans les titres viraux ni dans les plages de lyse par rapport au virus de type sauvage. Néanmoins *in vivo*, dans un modèle murin, un virus déficient en *ORF37* présente une diminution dans les symptômes neuronaux et une diminution de la pathogénèse, par rapport au virus de type sauvage (Kasem et al., 2010).

1.4.5 U49 d'HHV6 et HHV7

HHV6 et HHV7 appartiennent au genre des *roseolovirus*. L'homologue d'UL24 chez ces virus s'appelle *U49* et code pour une protéine de 252 acides aminés avec poids moléculaire de 29,3 kDa chez HHV6 et pour une protéine de 239 acides aminés et de poids moléculaire de 28,6 kDa chez HHV7. L'identité de séquence avec UL24 du HSV-1 est de 23% (Dominguez et al., 1999). Contrairement aux autres virus herpès humains, le gène qui code pour *U49* de HHV6 se trouve tête-à-tête avec le gène *U48* qui code pour la gH virale.

Leurs cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas. Cependant, il y a chevauchement entre le gène *U49* et le gène *U50* qui code pour une protéine du tégument. Le gène qui code pour *U49* d'HHV7 se retrouve dans un contexte génomique semblable à celui d'HHV6 (Megaw et al., 1998). Néanmoins, à ma connaissance il n'y a pas d'étude sur le rôle ou les fonctions de ces protéines.

1.4.6 ORF20 du virus du sarcome de Kaposi

Ce virus qui appartient à la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* possède comme homologue d'UL24, la protéine ORF20. Le gène qui code pour cette protéine se localise aussi tête-à-tête avec le gène qui code pour TK mais leurs cadres de lecture ouverts se chevauchent que de deux nucléotides. ORF20, d'un poids moléculaire de 28,5 kDa, peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M suite à l'inactivation du complexe cycline B/Cdc2 tout comme ORF20 du gamma herpès virus murin 68 (Nascimento et al., 2009). Une étude récente montre que le gène qui code pour ORF20 de KSHV possède plusieurs codons d'initiation à l'intérieur ou à l'extérieur du cadre de lecture ouvert. Des ribosomes présent au site d'initiation ont été observés sur ces codons d'initiation, ce qui suggère l'existence de plusieurs protéines traduites à partir de ce même transcrit (Arias et al., 2014).

1.4.7 ORF20 du gamma herpès virus 68 murin.

Le gamma herpès virus 68 murin est un virus modèle pour l'étude de l'infection de virus appartenant au *gammaherpesvirus* comme EBV et KSHV (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus). Les similitudes entre ces trois virus font du virus murin un bon modèle d'étude (McGeoch, 1995). L'orthologue d'UL24 chez ce virus s'appelle ORF20. Cette protéine a un poids moléculaire de 28 kDa et se localise dans le noyau de la cellule. Parmi les fonctions décrites en culture cellulaire, lorsque la protéine est exprimée hors du

contexte d'infection, mentionnons le blocage de la progression du cycle cellulaire dans l'étape G2/M et le déclenchement de l'apoptose. Chez des lignées de cellules qui expriment cette protéine de manière stable, il y a une accumulation de la forme inactive de cycline B, c'est-à-dire la forme phosphorylée, ce qui entraîne une accumulation du complexe cycline B/Cdc2 (Nascimento and Parkhouse, 2007). La déficience dans la protéine ORF20 ne semble pas entraîner de différences dans les titres viraux par rapport au virus sauvage, ni en culture cellulaire, ni *in vivo*. Néanmoins, un délai de quatre jours dans l'élimination du virus déficient en ORF20 dans les poumons par rapport au virus sauvage a été observé (Nascimento et al., 2011).

1.4.8 UL76 d'HCMV

HCMV appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. Il est un des virus les plus grands dans la famille des virus herpès. HCMV de la souche de laboratoire AD169 possède un génome d'environ 230 kb d'ADN double brin tout comme la souche de Towne (Dunn et al., 2003). Parmi ses caractéristiques particulières, il démontre une gamme limitée d'hôtes ainsi qu'un long cycle de réplication (Chee et al., 1990). L'homologue d'UL24 chez HCMV est la protéine UL76 qui possède 325 acides aminés et a un poids moléculaire de 38 kDa. Il y a 27% d'identité entre les séquences d'acides aminés d'UL24 d'HSV-1 et UL76. Le motif putatif d'endonucléase de type PD-(D/E) XK est aussi présent dans le gène qui code pour cette protéine (Knizewski et al., 2006). Deux transcrits de 4,5 et 5,5 kb, générés à partir de deux sites différents d'initiation de la transcription, sont exprimés pour cette protéine avec une cinétique tardive: le transcrit de 5,5 kb est un transcrit polycistronique qui contient l'ORF d'UL76, UL77 et UL78 et le transcrit de 4,2 kb est un transcrit qui contient l'ORF d'UL76. La transfection de cellules avec un plasmide qui exprime UL76 attachée à la GFP (de l'acronyme en anglais « Green Fluorescent Protein ») montre que cette protéine

qui possède des signaux de localisation nucléaire, se localise effectivement au noyau (Wang et al., 2004). La protéine, qui est détectée dès 2 heures post-infection, atteint un niveau maximum après 24 heures; par la suite, elle se maintient à un niveau constant tout au long de la phase tardive du cycle de réplication du virus (Wang et al., 2000). Dans cette même étude, il a été démontré qu'UL76 se retrouve aussi dans les virions d'HCMV possiblement associée avec l'enveloppe et le tégment. À cause de son contenu riche en résidus chargés positivement et sa localisation dans le virion, il a été proposé que cette protéine puisse jouer un rôle dans la formation des structures du virion et sa maturation. Il a été proposé qu'elle pourrait entre autres contribuer à neutraliser les charges négatives des phosphoprotéines pUL83 et pUL99 contenues dans le tégment (Wang et al., 2004).

1.4.8.1 Effet d'UL76 du HCMV sur le cycle cellulaire

La protéine UL76, tout comme UL24 d'HSV-1, ORF20 du MHV-68 (Nascimento et al., 2011) et ORF20 du KSHV, est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire chez des cellules humaines et de souris. Suite à cet arrêt, l'apoptose des cellules est induite rapidement. Le mécanisme d'arrêt cellulaire n'est pas encore totalement connu. Une étude a démontré qu'UL76 inactive le complexe cyclineB/cdc2, un médiateur de la transition de la phase G2 du cycle cellulaire à la mitose. Cette inactivation se fait par une augmentation de la phosphorylation de cdc2 à la tyrosine 15 et l'augmentation de l'expression de cycline B (Nascimento et al., 2009a).

1.4.8.2 Formation d'aggrésomes par UL76

Lors d'expériences de transfection, la protéine UL76 se retrouve en forme d'aggrésomes dans le noyau cellulaire. Des analyses bioinformatiques ont montrés que la protéine UL76 a une prédisposition à former des agrégats et elle pourrait cibler les protéines cellulaires impliquées dans le repliement de protéines et le système de dégradation protéique dépendant de l'ubiquitine et du protéasome (UPS). UL76 induit l'accumulation en aggrésomes de protéines mal repliées. UL76 interagit avec la protéine cellulaire S5a qui est le récepteur majeur de protéines polyubiquitinées pour le système UPS. Ces deux protéines sont importantes pour la formation d'aggrésomes lors de l'infection aux temps tardifs et peuvent affecter non seulement la formation d'aggrésomes mais aussi la formation des compartiments de réplication virale (Lin et al., 2013).

1.4.8.3 Activité régulatrice d'UL76 d'HCMV

En 2000, pour identifier des protéines capables de réguler l'expression des protéines immédiates-précoces (MIE), Wang et al. ont criblé des sous-librairies génomiques. Ils cherchent de trouver des protéines capables de réguler l'expression d'un plasmide rapporteur exprimant le chloramphénicol acétyltransférase (pCAT) sous contrôle de la région régulatrice de MIE (MIEP). Les différentes sous librairies ont été co-transfectées avec le plasmide reporteur et 48 heures post-transfection les protéines ont été récoltées afin de quantifier l'activité CAT. Les auteurs ont trouvé que la sous-librairie génomique qui contient les gènes UL75, UL76, UL77 et UL78 avait un effet régulateur de pCAT. Ils ont ensuite identifié qu'UL76 était responsable de cette régulation. Afin de voir l'effet d'UL76 sur la régulation de promoteur, ils ont testé l'effet d'UL76 sur les promoteurs de MIEP, du gène régulateur UL112-113, de l'ADN polymérase virale (UL54) et, comme

témoin d'un autre virus, le promoteur des gènes précoces du SV40. Leurs résultats montrent qu'à faible dose d'UL76 l'activité de MIEP et du gène régulateur UL112-113 augmente. Par contre, au fur et à mesure que la quantité d'UL76 augmente l'activité des promoteurs MIEP et U112 diminue, ce qui montre un effet répressif d'UL76 sur ces deux promoteurs. Aucun effet n'a été observé pour les promoteurs de SV40 et d'UL54. Ces résultats montrent un effet régulateur d'UL76 sur l'expression de gènes immédiats précoces. La protéine UL76 est capable de moduler l'expression de ces gènes soit à la hausse ou à la baisse dépendant de la dose (Wang et al., 2000).

Une autre étude du même groupe a démontré que la production de particules virales était inhibée dans des cellules qui expriment la protéine UL76 de manière stable. De plus, une inhibition de l'expression des protéines immédiates précoces, précoces et tardives et un retard de l'accumulation d'ADN viral ont été observés (Wang et al., 2004). Dans ces mêmes cellules (cellules qui expriment UL76 de manière stable), des études sur l'intégrité de l'ADN ont montré que la présence d'UL76 induit des dommages à l'ADN formant des aberrations chromosomiques. La protéine UL76 forme des foyers dans le noyau par activation de la réponse initiale au dommage à l'ADN. Cette réponse se fait, entre autres, par la phosphorylation des membres de la famille des histones H2A, particulièrement l'histone γ -H2AX (Siew et al., 2009).

Une autre étude sur l'effet direct d'UL76 sur la régulation de la protéine UL77 a démontré qu'UL76 régule à la baisse l'expression d'UL77. Des mutations et un changement dans le cadre de lecture du gène qui code pour la protéine UL76 ont pour effet d'augmenter la quantité des transcrits de la protéine UL77. Les auteurs proposent que cette régulation soit due à un mécanisme de ré-initiation de la transcription qui permettrait au virus de contrôler l'accumulation de la protéine UL77. Les auteurs suggèrent également que cette régulation contribuerait à une réplication efficace du virus (Isomura et al., 2010).

L'infection par HCMV induit l'expression de l'interleukine-8 (IL-8). La production de cette interleukine pro-inflammatoire attire principalement des neutrophiles à proximité des cellules infectés. Le virus profite de cette proximité pour augmenter son efficacité de dissémination en infectant les neutrophiles. De plus, la présence d'IL-8 augmente la production et la réplication du virus (Murayama et al., 1994). Une étude récente démontre que le gène qui code pour UL76 régule l'expression de l'IL-8 au niveau de la transcription et au niveau protéique. La régulation à la hausse d'IL-8 se fait par l'activation de la voie de NF- κ B, grâce à l'activation de la réponse au dommage à l'ADN. Par ailleurs, UL76 induit la translocation de la sous-unité p65 de NF- κ B au noyau où elle s'associe avec le promoteur d'IL-8. Ces résultats illustrent la capacité d'UL76 à réguler les voie de signalisation cellulaire, influençant l'expression de gènes cellulaire afin de contrôler et profiter des interactions hôte pathogène (Costa et al., 2013).

PROBLÉMATIQUE

Le gène codant pour la protéine virale UL24 est conservé parmi tous les *Herpesviridae*. Cette protéine, dont la fonction est mal connue et qui possède un domaine putatif d'endonucléase, s'exprime tardivement dans le cycle réplcatif d'HSV. En culture cellulaire, un virus déficient en UL24 (UL24X) démontre une capacité de réplication diminuée. *In vivo*, ce mutant est également affecté dans son efficacité de réplication et sa capacité de réactivation à partir de la latence est considérablement réduite. UL24 est donc un déterminant important de la pathogenèse virale. Des études sur UL76 du cytomégalo virus humain, l'orthologue d'UL24 du HCMV, ont montré une fonction de régulation génique pour cette protéine impliquant des mécanismes encore méconnus. Des résultats préliminaires du laboratoire obtenus lors d'expériences de co-transfection ont suggéré que l'expression d'UL24 corrélait avec une réduction de l'expression de la grande sous unité (R1) de la ribonucléotide réductase virale, un enzyme impliqué dans la synthèse de l'ADN viral.

Mon hypothèse de maîtrise était qu'UL24 régule les niveaux de la sous unité R1 en intervenant à divers stades de l'expression génique. Mes travaux sur cette hypothèse ont confirmé qu'en contexte de co-transfection, l'expression d'UL24 inhibait l'expression de la protéine R1 à laquelle une étiquette GST avait été ajoutée. L'inhibition de l'accumulation de R1 fut observée dans des cellules humaines et des cellules de singe. Nous avons aussi montré que ce phénomène était dépendant de la dose du plasmide exprimant UL24, et ne semble pas être médié par l'étiquette GST sur la protéine R1. De plus, nous avons observé qu'UL24 n'affectait pas l'accumulation de l'étiquette GST, démontrant ainsi une spécificité à ce phénomène de régulation génique. Les résultats de « Northern blot » et de PCR ont montré une diminution significative de la quantité de

transcrits de R1 en présence d'UL24. Par ailleurs, nous avons également démontré que la diminution de la quantité de R1 était indépendante de la dégradation protéique via le protéasome et via le lysosome. Des analyses avec des versions d'UL24 portant des substitutions des résidus hautement conservés (E99, K101 et G121), entre autres dans le motif d'endonuclease PD-(D/E) XK, ont montré une absence de répression sur l'expression de R1. Ces résultats suggèrent que c'est la protéine et non l'ARN d'UL24 qui module l'expression de R1.

Ces résultats suggèrent un rôle pour UL24 d'HSV-1 sur l'impact au niveau de la régulation génique de R1. Quand cette thèse a été entamée, l'impact potentiel d'UL24 sur d'autres gènes viraux ainsi que les caractéristiques permettront à un gène d'être régulé par UL24 restaient à être déterminés. De plus, l'étape où UL24 intervenait dans l'accumulation des transcrits de R1 était méconnue.

HYPOTHÈSES

Mon projet de doctorat est basé sur mes travaux de maîtrise qui ont montré un rôle d'UL24 dans la régulation de l'expression de R1 viral et cherchera à tester les hypothèses suivantes :

- 1) UL24 d'HSV-1, en contexte de transfection, régule négativement l'expression non seulement de R1 mais d'autres gènes viraux en agissant spécifiquement au niveau de la transcription
- 2) UL24 d'HSV-1 régule négativement l'expression de gènes viraux en contexte d'infection.
- 3) UL24 d'HSV-1 régule la transcription de gènes viraux par la reconnaissance d'un motif présent dans la séquence codante des gènes viraux.

**CHAPITRE 2: REGULATION OF VIRAL GENE EXPRESSION BY THE
HERPES SIMPLEX VIRUS 1UL24 PROTEIN (HSV-1UL24 INHIBITS
ACCUMULATION OF VIRAL TRANSCRIPTS).**

C. Sanabria-Solano, C. Elena Gonzalez, N. Richerieux, L. Bertrand, Slimane Dridi, A. Griffiths Y.Langelier and A. Pearson. (2015). Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein. *Virology*. doi: 10.1016/j.virol.2016.05.006.

Résumé de la première publication

Titre : Régulation de l'expression de gènes viraux par la protéine viral UL24 du virus de l'herpès simplex de type 1.

Le gène codant pour la protéine virale UL24 est conservé parmi tous les *Herpesviridae*. En culture cellulaire et *in vivo*, un virus mutant pour UL24 entraîne une diminution des titres viraux par rapport à un virus de type sauvage et une pathogénèse réduite. L'orthologue d'UL24 chez le cytomégalovirus humain a une fonction de régulation génique. Néanmoins, il n'a pas été démontré qu'un autre orthologue d'UL24 puisse affecter l'expression de gènes. Nous avons trouvé que l'expression d'UL24 corrélait avec une réduction de l'expression de certaines protéines et transcrits viraux. Des mutations chez des résidus hautement conservés d'UL24 affectent cette fonction. La stabilité des transcrits viraux ne semble pas être affectée par UL24. Aussi, l'orthologue de la protéine UL24 chez le B-virus semble avoir la même fonction observée chez UL24 d'HSV-1. En contexte d'infection, nous avons observé que l'absence d'UL24 induit une suraccumulation des transcrits *R1* et *R2* comparé au taux d'ADN dans les temps tardif de l'infection par rapport au virus de type sauvage et le virus rescue. L'ensemble de ces données montrent un nouveau rôle de la protéine UL24 sur la régulation de la transcription de gènes viraux.

Contribution des auteurs:

Carolina Sanabria-Solano : Conception d'expériences, expériences pour les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9, préparation des figures et du manuscrit.

Carmen Elena Gonzalez : Fabrication du virus BAC UL24neg

Nicolas Richerieux : Fabrication de certains plasmides d'expression pour BV-UL24

Luc Bertrand : Expériences préliminaires et fabrication de certains plasmides d'expression

Slimane Dridi : Cinétique d'expression pour l'expérience figure 8

Anthony Griffiths : Isolation du clone initial pour BV-UL24 et correction du manuscrit

Yves Langelier : Conception des expériences et révision et correction du manuscrit et des figures.

Angela Pearson : Conception des expériences, révision et correction du manuscrit et des figures.

Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein

(HSV-1 UL24 inhibits accumulation of viral transcripts)

Carolina Sanabria-Solano^a, Carmen Elena Gonzalez^a, Nicolas Richerieux^a, Luc
Bertrand^{a,1}, Slimane Dridi^a, Anthony Griffiths^c Yves Langelier^b and Angela Pearson^a

(a) INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7,
Canada

(b) CRCHUM (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,
Pavillon R, 900 Saint-Denis, Montréal, H2X 0A9, Canada

(c) Texas Biomedical Research Institute, 7620 NW Loop 410, San Antonio, Texas,
78227-5301, United States

Correspondance to:

Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

CANADA

E-mail address: angela.pearson@iaf.inrs.ca

Telephone: +1 (450) 687 5010

Abstract

UL24 is conserved among all *Herpesviridae*. In herpes simplex virus 1 (HSV-1), *UL24* mutations lead to reduced viral titers both in cell culture and *in vivo*, and reduced pathogenicity. The human cytomegalovirus ortholog of *UL24* has a gene regulatory function; however, it is not known whether other *UL24* orthologs also affect gene expression. We discovered that in co-transfection experiments, expression of *UL24* correlated with a reduction in the expression of several viral proteins and transcripts. Substitution mutations targeting conserved residues in *UL24* impaired this function. Reduced transcript levels did not appear attributable to changes in mRNA stability. The *UL24* ortholog of Herpes B virus exhibited a similar activity. An HSV-1 mutant that does not express *UL24* produced more viral *R1* and *R2* transcripts than the wildtype or rescue virus relative to the amount of viral DNA. These results reveal a new role for HSV-1 *UL24* in regulating viral mRNA accumulation.

Keywords

Herpes simplex virus 1; *UL24*; viral gene regulation

Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a double-stranded DNA virus that encodes over 80 genes. After replication in epithelial cells, the virus establishes a life-long latent infection in sensory neurons of trigeminal ganglia during which lytic gene expression is repressed. Reactivation from latency requires the resumption of lytic gene expression resulting in the formation of new infectious virions (reviewed in (Al-Dujaili et al., 2011; Nicoll et al., 2012)). During lytic infection, the virus requires the host RNA polymerase II machinery to transcribe its own genes (Weir, 2001). HSV-1 gene expression occurs in three kinetic stages: immediate early (IE), early (E) and late (L) (reviewed in (Honess and Roizman, 1974)).

The *UL24* gene codes for a late viral protein (Pearson and Coen, 2002), and is conserved among all Herpesviridae (Jacobson et al., 1989b). *UL24* is comprised of 269 amino acids, and the N-terminal portion contains five stretches of highly conserved residues termed homology domains (HDs) (Jacobson et al., 1989b). A PD-(D/E)-XK endonuclease motif has been identified that is located within the HDs, and it contains several residues that are perfectly conserved among *UL24* orthologs (Coen et al., 1989; Knizewski et al., 2006a). In cell culture, a virus deficient for *UL24* (*UL24X*) exhibits a reduction in viral titers, and a syncytial plaque phenotype. *In vivo*, viral titers are decreased in epithelial cells, and are drastically decreased in the trigeminal ganglia (TG) (Jacobson et al., 1998) due to a reduction in the number of neurons infected (Rochette et al., 2015). There is also a large reduction in clinical signs (Leiva-Torres et al., 2010), and the efficiency of reactivation from latency *ex vivo* is highly reduced (Jacobson et al., 1998). *UL24* is found both in the nucleus, where it leads to the

redistribution of several nucleolar proteins (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011), and in the cytoplasm where it affects the distribution of viral glycoproteins (Ben Abdeljelil et al., 2013). As such, UL24 appears to have multiple functions in host cells. An impact on the nucleolus is also observed when UL24 is expressed ectopically in cells (Bertrand and Pearson, 2008; Lymberopoulos et al., 2011), and under these conditions UL24 induces a G2 cell cycle block (Nascimento et al., 2009b).

The UL24 ortholog from human cytomegalovirus (HCMV), UL76, was identified in a screen for viral proteins that promote expression from the immediate early promoter/enhancer. It was shown to stimulate or repress transcription depending on the dose, and in a promoter dependent manner (Wang et al., 2000). Neither the mechanism involved in the gene regulatory function, nor whether other herpesvirus orthologs share this activity is known.

In previous work, we encountered difficulty when attempting to express the large subunit of the viral ribonucleotide reductase (R1) in cells that were expressing UL24 (unpublished data). In this report, we tested the hypothesis that HSV-1 UL24 possesses a gene regulatory function similar to that of HCMV UL76, and probed the mechanism involved.

Material and methods

Plasmids and cloning

The plasmids pLBPfl-GST, pLBPfl-GST-R1, pLBPfl-HA-UL24, pLBPfl-HA-UL24 E99A/K101A and pLBPfl-HA-UL24 G121A have been described elsewhere (Bertrand and Pearson, 2008; Bertrand et al., 2010; Dufour et al., 2011). The open reading frames for HSV-1 *R2*, *ICP27* and *tk* were amplified from HSV-1 KOS genomic DNA with the following primers:

R2_HSV-1_F (5'-CACAGGATCCTCTCCCCTGCTGCCATGGATTCCGC-3'), R2_HSV-1_R (5'-CACAGTCGACCGCGCCGCGACACTCACAGATCG-3'), ICP27_HSV-1_F (5'-CACAGGATCCCCGACAGCCCGGTCATGGCGACTG-3'), ICP27_HSV-1_R (5'-CACATCTAGATTTTTATTGTACCTAAAACAGGGAG-3'), TK_HSV-1_F (5'-CACAGGATCCGTAGAAGCGCGTATGGCTTCGTACC-3'), TK_HSV-1_R (5'-CACAGTCGACTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCC-3') respectively, and were ligated into pBluescriptSK+ (Stratagene) using T4 DNA ligase (New England Biolabs). The *R2* and *tk* genes were excised from the vector pBluescriptSK+ with *Bam*HI (New England Biolabs) and *Sa*II (New England Biolabs). The *ICP27* gene was excised from the vector pBluescriptSK+ using *Bam*HI and *Xba*I (New England Biolabs). The *mCherry* gene from the vector pRSET A (Life Technologies) was excised with *Bam*HI and *Hind*III (New England Biolabs). Each fragment was individually inserted into the pLBPfl vector that had been previously digested with the same restriction enzymes, resulting in the vectors pLBPfl-R2, pLBPfl-TK, pLBPfl-ICP27 and pLBPfl-mCherry respectively.

The open reading frame of Herpes B virus (BV, Macacine herpesvirus 1) UL24 was amplified from BV E2490 genomic DNA with the following primers: BV UL24 F (5'-

ACGTACTCGATCTCGTCGCGC-3') and BV UL24 R (5'-CGCGGGGTTGGTGGTGATC-3') and inserted by TA-cloning into pCR-TOPO (Invitrogen) to generate pBVUL24. The open reading frame for BV UL24 was subcloned from the plasmid pBVUL24 by polymerase chain reaction using the following primers: BV-HA-UL24_F (5'-tat gga tcc atg tac cca tac gat gtt cca gat tac gct gcc cgc cgg acc ggc-3') and BV-HA-UL24_R (5'- tct gaa ttc tca ctc ggg ccg cga gac-3'). The forward primer also introduced an HA tag at the N-terminus of BV UL24. The PCR fragment was ligated into pBluescriptSK+ (Stratagene) using T4 DNA ligase (New England Biolabs), and the HA-UL24 BV gene was subsequently excised from this vector using *Bam*HI. The fragment was inserted into the pLBPfl vector that had been previously digested with the same restriction enzyme, resulting in the vector pLBPfl-HA-UL24 BV.

Cell and virus culture

COS-7 and 293T cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5 % newborn calf serum (NCS), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. HeLa cells were propagated in DMEM containing 8 % foetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Cells were maintained in humidified incubators at 37°C with 5 % CO₂. The viruses vBAC_KOS HSV-1, vBAC_UL24neg and vBAC_UL24neg Rescue were propagated on Vero cells (African green monkey kidney cells) grown in DMEM containing 5 % NCS with 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

Transfections

3.5×10^5 COS-7, 293T or HeLa cells were plated per well in six-well plates. Twenty-four hours later, cells were co-transfected with 4 μ g of total plasmid DNA per well, as indicated in each figure, using Lipofectamine transfection reagent (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. For RNA extraction, total RNA was harvested 24 hours post-transfection, and for protein extraction samples were harvested two days post-transfection unless indicated otherwise.

Immunoblotting

Protein samples for immunoblotting were prepared by scrapping the cells in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were pelleted in a microcentrifuge, and then lysed in 2X sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel sample buffer. Protein samples were separated by SDS-PAGE, and then subjected to electrophoretic transfer to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The membranes were washed three times with Tris-Buffered Saline containing Tween 20 (TTBS) (15 mM Tris-HCL [pH 7.4], 50 mM NaCl and 0.05 % Tween 20), and blocked overnight at 4°C in TTBS containing 5 % nonfat powdered milk (Biorad). The blots were then washed three times for 5 minutes in TTBS, and incubated with the indicated primary antibodies at room temperature. The following antibodies were used at the indicated dilutions: a Glutathion-S Transferase (GST) polyclonal antibody (Life Technologies) (1:2000), an HA monoclonal mouse antibody (Covance) (1:250), a DsRed polyclonal antibody that detects mCherry (Clontech) (1:1000), an ICP27 polyclonal antibody (Fitzgerald) (1:1000), a TK monoclonal antibody provided by Dr William Summers, Yale University

(1:1000), an R2 polyclonal antibody (Cohen et al., 1986) (1:20000), an α -tubulin polyclonal antibody (Abcam) (1:1000) and a GAPDH monoclonal antibody (Medimabs) (1:1000). After two hours of incubation with the primary antibody, the blots were washed three times with TTBS, and then incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 minutes. An anti-mouse secondary antibody was used to detect the expression of TK and ICP27 (1:5000), GAPDH (1:10000) and of HA-UL24 (1:2500), and an anti-rabbit secondary antibody was used for detecting expression of GST-R1, R2, mCherry and α -tubulin (1:5000). Membranes were subsequently washed five times five minutes with TTBS. Immunoreactive proteins were detected by enhanced chemiluminescence using the Immun-Star HRP Substrate kit (Biorad).

Total RNA isolation, northern blots and RNA half-life determination

Total RNA from cells was isolated using Trizol reagent (Life Technologies). One μ g of each RNA sample was resolved by electrophoresis using a 1 % agarose denaturing formaldehyde gel for transfection experiments or five μ g for infection experiments, visualised by ethidium bromide staining, and transferred to a positively charged nylon membrane (Immobilon). 32 P-labelled probes corresponding to HSV-1 *R1*, *R2*, *ICP27* and *tk* were generated using the High Prime DNA labelling kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. The same PCR products used for the creation of the plasmids pLBPfl-R2, pLBPfl-TK, and pLBPfl-ICP27 were used as templates for the production of the *R2*, *TK* and *ICP27* probes. For *R1*, the primers R1_HSV1F (5' CTACGCCAGAGCATGATGAAAC) and R1_HSV1_R (5'GCTAAACGTGCGTTCCAGTTC) were used to produce the template for synthesis of

the probe. Hybridization was carried out in PerfectHyb solution (Sigma) at 68°C. Signals were analyzed by phosphorimager using the software ImageQuant TL version 7 (GE life science).

Half-life determination of transcripts was carried out by plating 1×10^6 COS-7 cells in 6 wells plates. The next day, cells were transfected with 2 µg of the plasmid encoding GST-R1. Twenty-four hours after the first transfection, cells were transfected again with 2 µg of pLBPfl or with 2 µg of pLBPfl-HA-UL24. Twenty-four hours following the second transfection, the RNA polymerase II inhibitor actinomycin D was added to a final concentration of 5 µg/ml (Sigma). At the indicated times post-addition of the drug, total RNA was harvested and analyzed by Northern Blot using a probe specific for *R1*.

DNA extraction and slot blot analysis

Total DNA extractions were performed on what remained after RNA extraction by Trizol using the manufacturer's instructions (Life Technologies). DNA was subsequently treated with 0.5 µg/µl of RNase A (Life Technologies) for 30 minutes at room temperature. Five µg of total RNase-treated DNA per sample were transfer by slot blot to a positively charged nylon membrane (Immobilon). ³²P-labelled probes corresponding to HSV-1 *R1* were generated as described above. Hybridization was carried out in PerfectHyb (Sigma) solution at 68°C. Signals were analyzed by phosphorimager using the software ImageQuant TL version 7 (GE life science).

Generation of BAC plasmids and recombinant viruses

Recombinant viruses were generated by Red recombination using a bacterial artificial chromosome (BAC)-based system as described previously (Tischer et al., 2006, 2010). The *Escherichia coli* strain GS1783, harboring a BAC containing the full-length genome of HSV-1 strain KOS was used as the starting material (Jurak et al., 2012). Briefly, mutagenic oligonucleotides were used to amplify the kanamycin resistance gene and insert the desired mutations into the *UL24* open reading frame of the viral genome. Primers sequences for mutagenesis are listed in Table 1. BAC_KOS-HSV-1-containing GS1783 cells that had been induced at 42°C for 15 min were electroporated to induced the uptake of the PCR products. The parameters for electroporation were set at 1800 volts, 200 Ω , and 25 μ F in a 0.1 cm cuvette (Bio-Rad). Using BAC_KOS HSV-1 as backbone, we introduced point mutations targeting the first two ATGs within the *UL24* ORF (BAC_UL24neg). Next, starting from BAC_UL24neg, the rescue BAC virus was created by inserting the wild type *UL24* sequence back into the genome (BAC_UL24neg Rescue). The BAC DNAs were extracted using the NucleoBond PC100 kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Regions of interest of the BAC DNAs were analyzed by PCR and DNA sequencing, while the general genomic organisation was verified by restriction enzyme digestion. BAC DNAs were transfected into Vero cells using Lipofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Recombinant viruses were purified by limiting dilution two times to ensure that each viral stock resulted from a single isolate. The *UL24* gene of the recombinant viruses was sequenced to ensure the absence of

undesired mutations. Sequencing was carried out by the McGill University and Génome Québec Innovation Centre.

Viral replication curves and plaque morphology determination

Viral yield was assessed in a multi-step replication assay. 2×10^5 of Vero cells were seeded in cell culture tubes the night before, infected at an MOI of 0.01, and virus was harvested at the indicated times post-infection. To analyze plaque morphology, 1×10^6 of Vero cells were plated per well in six-well plates. Twenty-four hours later, cells were infected with the virus at low MOI and incubated at 37°C or 39 °C for 48 hours. Cells were fixed and plaque morphology was observed using a Nikon (SMZ800) stereoscope. Images were acquired using a Qimaging camera (RETIGA 2000r Fast1394).

Results

UL24 reduces expression of the HSV-1 R1 protein in transfection experiments

Previous studies with UL76, the UL24 ortholog from HCMV, showed that this protein has a gene regulatory function (Wang et al., 2000, 2004). HSV-1 UL24 is a multifunctional protein important for pathogenesis (Jacobson et al., 1989b). In the course of co-transfection experiments, we found that we were unable to efficiently co-express the large subunit of the HSV ribonucleotide reductase (R1) with UL24 (unpublished data). Thus, we hypothesized that HSV-1 UL24 also possessed a gene regulatory function.

To test this hypothesis, we used either COS-7 cells, derived from the African green monkey, human 293-T cells derived from embryonic kidney or HeLa cells derived from a human cervical carcinoma, with the pCG-based expression vector pLBPfl (Bertrand and Pearson, 2008), which contains an HCMV early promoter. Cells were transfected with plasmids expressing either HSV-1 R1 fused with glutathion-S transferase (GST) at its amino terminus (pLBPfl-GST-R1), HSV-1 UL24 with an N-terminal hemagglutinin tag (HA) (pLBPfl-HA-UL24), the empty vector, or a combination of the vectors as indicated in Fig. 1. Forty-eight hours later, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. Each membrane was immunoblotted successively for GST, HA and α -Tubulin, which served as a loading control. Although a band corresponding to the predicted molecular weight of GST-R1 was detected when the corresponding vector was transfected alone or with the empty vector, this band was not readily detected when the GST-R1 vector was co-transfected with the vector expressing HA-UL24. Moreover, this large decrease in GST-R1 expression was observed in COS-7, 293-T and HeLa cells (Figs. 1A, 1B and 1C).

In these experiments, the R1 protein was expressed fused to a GST tag. In order to determine if UL24 also affected the expression of GST alone, COS-7 cells were co-transfected with the plasmids pLBPfl-GST and either the plasmid pLBPfl or pLBPfl-HA-UL24. As a positive control, cells were co-transfected in parallel with the plasmid pLBPfl-GST-R1 and either the empty vector or pLBPfl-HA-UL24 (Fig. 1D). We found that expression of GST alone was not reduced in the presence of UL24, in contrast to the reduction seen for the expression of GST-R1 (Fig. 1A). Thus, we concluded that the decrease in expression of GST-R1 by UL24 was not mediated by an effect on GST.

Furthermore, these results suggest that the UL24-related repression of GST-R1 expression was not due to an effect of UL24 on elements in the vector backbone, such as the promoter.

UL24 reduces the expression of R1 in a dose dependent manner.

In order to determine if the effect of UL24 on GST-R1 expression was dose dependent, COS-7 cells were co-transfected with the plasmid encoding GST-R1 and increasing amounts of pLBPfl-HA-UL24 as shown in Fig. 2A. The total amount of plasmid was kept constant at 4 µg through the addition of the empty vector. Total proteins were extracted 48 hours post-transfection and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α -Tubulin, which served as a loading control. We found that 1 µg of plasmid pLBPfl-HA-UL24 was sufficient to considerably diminish the expression of GST-R1 (Fig. 2A). In contrast, under similar conditions, levels of GST remained stable even at the highest level of UL24 expression (Fig. 2B).

Substitution of highly conserved residues in UL24 inhibits its ability to reduce steady-state levels of R1 gene products

Mutations in the HSV-1 genome targeting several highly conserved residues in UL24 have been associated with replication and plaque phenotype defects (Bertrand et al., 2010; Leiva-Torres et al., 2010). We tested whether these mutations also affected

the gene regulatory function of UL24. COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding GST-R1 and either the empty vector, a plasmid encoding HA-UL24, or a plasmid carrying mutations leading to single and double substitutions in highly conserved residues of UL24 (HA-UL24 G121A and HA-UL24 E99A/K101A) (Fig. 3A). The G121A substitution in HA-UL24 confers a syncytial phenotype during HSV-1 infection in cell culture, while maintaining wild type replication efficiency (Bertrand et al., 2010; Leiva-Torres et al., 2010). The E99A and K101A substitutions target highly conserved residues in the putative endonuclease domain of UL24. This double substitution confers a phenotype similar to that seen with UL24X, which is characterized by the formation of syncytial plaques and decreased replication *in vitro* and *in vivo* (Leiva-Torres et al., 2010). The faster mobility observed for the E99A/K101A form of UL24 in SDS-PAGE is reproducible (Leiva-Torres et al., 2010) although the cause is presently unknown; sequencing has not revealed any other differences in the *UL24* gene. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α -Tubulin, which served as a loading control. We found that neither substituted forms of UL24 reduced R1 protein expression, demonstrating the importance of these highly conserved residues for the regulatory function of UL24 (Fig. 3B). Moreover, these results suggest that the UL24 protein and not its transcript is responsible for this function. We next tested whether the effect of UL24 on R1 protein expression was due to an effect on mRNA levels. Total RNA was harvested from cells transfected as described above, and Northern blot analysis was performed with a probe specific for *R1* transcripts. The 18S ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide was used as loading control (Fig. 3C). We observed that levels of *R1*

transcripts were greatly reduced in the presence of wild type UL24 but not in the presence of the substituted forms of UL24.

UL24 down-regulates expression of several viral genes

The preceding data show a reduction in expression of R1, but not of GST, in the presence of UL24. We next tested if the effect of UL24 was restricted to the *R1* viral gene. To this end, the HSV-1 genes *R2*, which codes for the small subunit of the ribonucleotide reductase, *ICP27* (infected cell protein 27) and *tk* (thymidine kinase) were each cloned into the pLBPfl vector. We also cloned the non-viral gene *mCherry* into pLBPfl. Each of these plasmids was co-transfected with either the empty vector or a vector expressing the wild type or one of the substituted forms of UL24. Cell lysates were analyzed by immunoblotting (Fig. 4A, B, C, upper panels, and D) and total RNA subjected to Northern blot analysis using probes specific for *R2*, *ICP27*, and *TK* (Fig. 4A, B and C, lower panels). Our results show that UL24 reduced the expression of ICP27, R2 and TK in a manner similar to what we observed for GST-R1. In addition, we found that expression of these viral proteins was not reduced when co-expressed with the substituted forms of UL24. We obtained similar results in our analysis of the effect of UL24 on viral transcripts. One characteristic shared by most HSV-1 genes is their high GC content. All of the viral genes we tested had a GC content of at least 61.5%. In contrast, the gene coding for GST has a relatively low GC content of 45.9%. To test whether a high GC content was sufficient to render a gene susceptible to repression by UL24, we used *mCherry*, which has a relatively high GC content of 62.4%. Despite having a GC content similar to that seen for many HSV-1 genes, expression of the non-

viral gene *mCherry* did not appear to be affected by UL24 (Fig. 4D), consistent with our observation for GST. Taken together, these results suggest that UL24 specifically down-regulates the expression of several HSV-1 genes.

UL24 reduces levels of R1 transcripts even when expressed after R1

During infection with HSV-1, R1 is expressed prior to UL24 (Huszar and Bacchetti, 1981; Pearson and Coen, 2002). Therefore, we tested if UL24 could affect steady state levels of R1 protein or mRNA when expressed following the synthesis of R1 such as what occurs during lytic replication. COS-7 cells were first transfected with the plasmid coding for GST-R1 only, and 24 hours later they were transfected with either an empty vector or a plasmid coding for HA-UL24. Total proteins and RNA were harvested 24 hours after the second transfection and analyzed by Western and Northern blot (Fig. 5A and B). Levels of R1 protein remained stable after expression of UL24, which is consistent with our results showing that the down-regulation of R1 by UL24 is not blocked by proteasome and lysosome inhibitors (data not shown). Using the plasmid expressing mCherry and fluorescent microscopy we had found that the transfection efficiency of COS-7 cells under our conditions was approximately 50%. Thus, it is also possible that certain cells that expressed R1 were not subsequently transfected with the vector for UL24, which would reduce the apparent impact of UL24 on R1 expression in this experiment and contribute to variability. Nevertheless, we found that under these conditions, levels of *R1* transcripts normalized to 18S RNA levels were significantly reduced in the presence of UL24 when compared to the empty vector control (t-test analysis, $P < 0.05$). UL24 reduced *R1* transcript levels by an

average of 50 % $\pm$ 6.8 (SE). Thus, even when UL24 is expressed following the expression of R1, an impact on *R1* transcripts is observed.

Stability of R1 transcripts is not altered by UL24

To investigate the mechanism by which UL24 affects the accumulation of *R1* transcripts, we tested the effect of UL24 on *R1* mRNA stability. COS-7 cells were initially transfected with the plasmid coding for GST-R1, and 24 hours later they were transfected with either an empty vector or a plasmid coding for HA-UL24. After a further 24 hours, to allow expression of HA-UL24, cells were treated with an RNA polymerase II inhibitor (actinomycin D) for ten hours. Total mRNA was extracted at the indicated times, and analyzed by Northern blot. We found that in the absence of UL24, *R1* transcripts were quite stable with a half-life of approximately six hours. No significant reduction in the half-life of R1 was observed in the presence of UL24 (t-test analysis, $P < 0.05$) (Fig. 5C). Thus, UL24 does not appear to down regulate R1 protein expression by destabilizing the mRNA.

UL24 modulates viral gene expression during infection

To study the impact of UL24 on viral gene expression during infection, we wished to directly compare a wild type virus, a UL24-null virus and the corresponding rescue virus. We recently showed that although the rescue virus of the UL24-null strain UL24X behaved similarly to the wild type strain KOS in terms of plaque morphology, *in vivo* replication, pathogenesis, and *ex vivo* reactivation, the viral yield in cell culture—while

higher than that for UL24X—did not reach levels observed for KOS (Rochette et al., 2015). Thus, we decided to generate a new set of viruses for the present study. We used a BAC-based system to create an HSV-1 strain where the first two ATGs of the *UL24* ORF (residues 1 and 16) were changed to GTG. We called this virus vBAC_UL24neg. These mutations were designed to block expression of the UL24 protein without changing any amino acid encoded by the *TK* gene, which partially overlaps *UL24*. We also created a corresponding rescue virus (vBAC_UL24neg Rescue), and characterized both viruses. The genomic DNA digestion patterns were the same for BAC_UL24neg and BAC_UL24neg Rescue and BAC_KOS (Fig. 6A). Furthermore, replication of vBAC_KOS virus and vBAC_UL24neg Rescue were similar in a multistep replication assay. In contrast, infection with vBAC_UL24neg produced viral titers 5 to 10 times lower compared to the rescue virus or the wild type virus (Fig. 6B). This reduction in viral titer is similar to what has been observed for the UL24 null virus, UL24X (Jacobson et al., 1998), which was created by insertion of three stop codons in the 5' end of the *UL24* ORF, interrupting synthesis of the UL24 protein at amino acid 43. Moreover, in contrast to the plaques formed by vBAC_KOS and the rescue virus, vBAC_UL24neg formed small and large syncytia at 37°C and 39°C respectively similar to what is seen for UL24X (Jacobson et al., 1998). These BAC-based viruses were then used to test the impact of UL24 on viral gene expression in the context of infection. Vero cells were infected at an MOI of 10, and total RNA, DNA and proteins were extracted from each sample at the indicated times for analysis by Northern blotting, Slot blot hybridization and Western blotting respectively (Fig. 7). Because UL24 protein is expressed with leaky-late kinetics, we focused at late times in

infection. Levels of the viral proteins tested were lower for vBAC_UL24neg at 9 h.p.i., which reflects the reduction in viral replication of UL24-null viruses; however at later times, the differences appeared less pronounced (Fig. 7A). We next tested the impact on viral transcripts. In addition to a lower viral yield, a virus that does not express UL24 results in lower amounts of viral DNA produced (Leiva-Torres and Pearson, unpublished data). Therefore, in order to accurately assess the impact of the absence of UL24 on viral transcript levels, the Northern blot signals were normalized to the signals for viral DNA (Fig. 7B). We found that in the absence of UL24, there was an increase in the amount of *R1* and *R2* transcripts relative to the amount of viral DNA present. The increases were statistically significant for *R2* at 9 h.p.i. (t-test analysis, $P < 0.05$) and for *R1* and *R2* at 12 h.p.i. This trend continued at later times in infection although the differences were not statistically significant. Because *R1* and *R2* are early genes, we also looked at transcripts in a time course experiment starting at 6 h.p.i (Fig. 8). We found a modest increase in both transcripts relative to viral DNA in the absence of UL24 at 6 h.p.i. Although UL24 protein is not readily detected by Western blot at 6 h.p.i., specific staining can be observed in indirect immunofluorescence confocal experiments. The increase in viral mRNA from *R1* and *R2* indicates that the absence of UL24 somehow favors an accumulation of viral transcripts.

UL24 from Herpes B virus affects the expression of GST-R1

In order to determine if an ortholog of UL24 from another alphaherpesvirus affects the expression of GST-R1, a vector expressing the UL24 protein from Herpes B virus (BV), which normally infects non-human primates, was created (pLBPfl HA-UL24

BV). COS-7 cells were co-transfected with the plasmid pLBPfl-GST-R1 and either the plasmid pLBPfl or pLBPfl-HA-UL24 BV. In parallel, cells were co-transfected with the plasmid encoding GST-R1 and either the empty vector or the vector encoding HA-UL24 HSV-1. Total proteins were extracted 48 hours post-transfection and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α -Tubulin, which served as a loading control (Fig. 9). We found that HA-UL24 BV reduced expression of the GST-R1 protein just as we saw for HA-UL24 HSV-1. These results demonstrate that the effect of UL24 on viral gene expression in our assay is not specific to HSV-1 KOS.

Discussion

UL24 of HSV-1 is a multifunctional protein important for the pathogenesis of the virus (Jacobson et al., 1998; Leiva-Torres et al., 2010; Rochette et al., 2015). In this report we identified a new role for UL24 in reducing the accumulation of multiple HSV transcripts. We initially observed that UL24 down-regulated the expression of R1, a viral protein important for DNA synthesis, both in non-human primate and human cells (COS-7, 293T and HeLa). Expression of the GST tag used to detect R1 was not affected by UL24. This result suggests that the GST tag does not contribute to the effect of UL24 on R1 levels, and that the promoter/enhancer sequence is not sufficient to mediate this effect. Rather, it appears that UL24 inhibits the expression of *R1* by direct or indirect interaction with its coding region. (Isomura et al., 2010)The HCMV homolog of UL24, UL76, was shown to modulate expression of a reporter gene driven by certain immediate early and early HCMV promoters but not when the SV40 early promoter was

used (Wang et al., 2000). In our experiments, we used a pCG-based vector where expression is also driven by the HCMV immediate-early promoter. Thus, although the inhibitory activity of HSV-1 UL24 appears to depend on the coding regions of genes, we cannot rule out the possibility that this activity could also be affected by the promoter.

We next investigated if the down-regulation of R1 was dependent on the amount of UL24 present. We observed a correlation between the decrease in expression of R1 and the amount of HA-UL24 expressed in cells. One μg of pLBPfl-HA-UL24 plasmid was sufficient to reduce significantly the expression of R1. It has been reported that the effect of HCMV UL76 on gene expression varies depending on the amount of UL76 present in the cell. The immediate early HCMV promoter activity is stimulated by very small amounts of UL76 (ng levels of expression plasmid) while in the presence of higher amounts of UL76, the same promoter activity is reduced (Wang et al., 2000, 2004). Unlike the HCMV ortholog, we have only observed an inhibitory effect of HSV-1 and B virus UL24 on the expression of *R1* and the other viral genes we tested, but we cannot rule out that at even lower amounts of UL24 than those tested here, a stimulatory effect could be detected.

Substitutions of highly conserved residues within the conserved N-terminus of UL24 are associated with various phenotypes. For instance, the G121A substitution in UL24 confers a syncytial phenotype in cell culture, without affecting replication efficiency (Bertrand et al., 2010; Leiva-Torres et al., 2010). In contrast, the double substitution E99A/K101A targets highly conserved residues in the putative endonuclease domain of UL24. This mutant forms syncytial plaques and exhibits decreased replication *in vivo* and *in vitro* (Bertrand et al., 2010; Leiva-Torres et al.,

2010). In the present work, we found that both the G121A and E99A/K101A substitutions affected the ability of UL24 to inhibit viral gene expression. Because the G121A substitution does not affect replication, this result suggests that the gene repression activity of UL24 is not important for replication during acute infection; however, it leaves open the possibility suggested by Wang *et al.* for UL76, that this function of UL24 promotes the maintenance of latency (Wang *et al.*, 2004).

Although both the G121A and E99A/K101A mutations affect the gene regulatory function of UL24 and lead to a syncytial phenotype, the link between these related observations is unclear. The substitutions of the conserved residues of UL24 may target residues critical for protein-protein or possibly protein-nucleic acid interactions, or may affect folding of the protein. An effect of *UL24* RNA, for example through the production of microRNAs, seems unlikely given that mutations targeting nucleotides 60 base pairs apart blocked the repressive effect of UL24 on viral gene expression.

We found that UL24 specifically down-regulated the expression of several HSV-1 genes but not of the non-viral genes *GST* or *mCherry*. These results suggest that the regulatory function of UL24 is specific for viral genes; however, we cannot rule out the existence of cellular genes that may be regulated by UL24. We detected no effect of UL24 on the stability of *R1* transcripts, which exhibited a half-life of over six hours. We found that a high GC content such as that seen for HSV-1 genes was not sufficient to target genes for down-regulation by UL24. Nevertheless, the possibility remains that HSV-1 genes contain a GC-rich motif that is somehow recognized by UL24 directly or indirectly, and which leads to blocking of the transcription machinery or affects the stability of the DNA. In addition, although we have demonstrated that UL24 affects

transcript accumulation, this observation does not exclude the possibility that UL24 also reduces translation of the viral mRNAs that are produced.

In contrast to UL76 of HCMV, which has been reported to be part of the virion and thus is present at early times in infection, to date, UL24 has not been detected in extracellular HSV-1 particles, and it is expressed with leaky-late kinetics (Loret et al., 2008a; Pearson and Coen, 2002). Thus, the immediate early and early genes we tested in transfection experiments, namely *R1*, *TK*, *ICP27* and *R2*, are all expressed prior to UL24 during acute infection. Although this apparent discrepancy argues against a role for UL24 in repressing expression of these genes during normal lytic infection, we found that even when expression of UL24 followed the expression of the *R1* gene in transfection experiments, the effect on transcripts levels was observed. Consistent with this result, we found that at 9 and 12 h.p.i, when UL24 expression is readily detected in the nucleus (Lymeropoulos and Pearson, 2007; Pearson and Coen, 2002), a virus that does not express UL24 exhibits a statistically significant increase in the ratio of viral *R1* and *R2* transcripts to viral DNA compared to the ratios observed for the wild type and the rescue virus. This trend is maintained at 15 and 18 h.p.i., though the difference is not statistically significant. It is interesting to note that this reduced impact on transcript levels correlates with a shift of UL24 localization from the nucleoplasm to the perinuclear region (Lymeropoulos and Pearson, 2007). Moreover, results from 6 h.p.i. show that the relative increase in *R1* and *R2* RNA levels at 9 and 12 h.p.i. is not a residual effect of a more pronounced increase at earlier times.

UL76 from HCMV has also been shown to regulate the expression of the adjacent gene *UL77*. In this case, the authors found evidence of down-regulation of

UL77 by UL76 through a translation re-initiation mechanism (Isomura et al., 2010). Such a mechanism does not seem to be responsible for the down-regulation in gene expression observed in our experiments. Although, *UL24* and *UL23* partially overlap, *UL24* does not overlap with *R1*, *R2* or *ICP27*. Furthermore, our results suggest that it is the UL24 protein and not the transcripts that are responsible for the effect observed on viral gene expression.

Although we detected a statistically significant effect of the absence of UL24 on viral transcript levels at 9 and 12 h.p.i., the effect on viral protein expression was less evident. We did however observe that while levels of viral protein were initially lower for cells infected with the UL24-defective virus compared to the control viruses, the effect seemed to be less pronounced as the infection progressed. One possibility is due to the relative increase in viral transcript levels to viral DNA levels. There are several hypotheses possible regarding the relevance of the reduction in the levels of viral transcripts in the presence of UL24. It may be that the reduced accumulation of viral transcripts promotes translation of the viral mRNAs already synthesized. In this way, UL24 may play a role in the transition from early to late kinetics of gene expression. Another possibility is that this function could help maintain latency. Even though UL24 is expressed with late kinetics during lytic infection, its expression during the initial stages of reactivation, which does not follow the temporal cascade of viral gene expression (Du et al., 2011), could allow for a role in repression of viral gene expression in latently infected neurons in a type of negative feedback. It is also possible that the effect of UL24 on viral transcript levels during infection is not direct, and rather is an indirect consequence of the activity we detect in our transient transfection experiments. Of note,

UL76 has been shown to induce the transcription of *IL-8* indirectly through activation of the cellular DNA damage response and translocation of NF- κ B to the nucleus (Costa et al., 2013).

Our data provides evidence for a new role of the HSV-1 UL24 protein as a negative regulator of viral gene expression. UL24 from BV also reduced the expression of GST-R1 in transfection experiments, which suggest that the repression function of UL24 maybe common to many other UL24 orthologs of alpha herpesviruses. In contrast to HCMV UL76, which was shown to down-regulate certain viral genes dependent on the promoter, we found that the UL24 down-regulation of viral genes depends on the coding region. Nevertheless, we cannot rule out a contributing role of the promoter in the ability of UL24 to modulate gene expression. Further studies are aimed at deciphering the mechanism and determining the impact on infection of the host.

Acknowledgements

CSS received a scholarship from the Foundation Armand-Frappier. LB received scholarships from the Foundation Armand-Frappier and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by Institutional funds to AG, and by operating grants from CIHR to YL (MOP 67052) and AP (MOP 82924). This work was also supported by an infrastructure grant from the Canada Foundation for Innovation to AP.

References

- Ben Abdeljelil, N., Rochette, P.-A. & Pearson, A. (2013).** The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* **444**, 263–273.
- Bertrand, L. & 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**, 1142–1151.
- Bertrand, L., Leiva-Torres, G. A., Hyjazie, H. & Pearson, A. (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**, 109–118.
- Coen, D. M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L. & Knipe, D. M. (1989).** Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **86**, 4736–4740.
- Cohen, E. A., Gaudreau, P., Brazeau, P. & Langelier, Y. (1986).** Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *Journal of Virology* **60**, 1130–1133.
- Costa, H., Nascimento, R., Sinclair, J. & Parkhouse, R. M. E. (2013).** Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response. *PLoS Pathogens* **9**, e1003609.
- Dufour, F., Sasseville, A. M.-J., Chabaud, S., Massie, B., Siegel, R. M. & Langelier, Y. (2011).** The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* **16**, 256–271.
- Al-Dujaili, L. J., Clerkin, P. P., Clement, C., McFerrin, H. E., Bhattacharjee, P. S., Varnell, E. D., Kaufman, H. E. & Hill, J. M. (2011).** Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiology* **6**, 877–907.
- Du, T., Zhou, G. & 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 USA* **108**, 18820–18824.
- Honess, R. W. & Roizman, B. (1974).** Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology* **14**, 8–19.

Huszar, D. & Bacchetti, S. (1981). Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. *Journal of Virology* **37**, 580–588.

Isomura, H., Stinski, M. F., Murata, T., Nakayama, S., Chiba, S., Akatsuka, Y., Kanda, T. & Tsurumi, T. (2010). The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PLoS ONE* **5**, e11901.

Jacobson, J. G., Martin, S. L. & 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**, 1839–1843.

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

Jurak, I., Silverstein, L. B., Sharma, M. & Coen, D. M. (2012). Herpes simplex virus is equipped with RNA- and protein-based mechanisms to repress expression of ATRX, an effector of intrinsic immunity. *Journal of Virology* **86**, 10093–10102.

Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N. V., Rychlewski, L. & Ginalski, K. (2006). Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *Journal of Virology* **80**, 2575–2577.

Leiva-Torres, G. A., Rochette, P.-A. & 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**, 1109–1116.

Loret, S., Guay, G. & Lippe, R. (2008). Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *Journal of Virology* **82**, 8605–8618.

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

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

Nascimento, R., Dias, J. D. & 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**, 1143–1149.

Nicoll, M. P., Proença, J. T. & Efstathiou, S. (2012). The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews* **36**, 684–705.

Pearson, A. & Coen, D. M. (2002). Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **76**, 10821–10828.

Rochette, P.-A., Bourget, A., Sanabria-Solano, C., Lahmidi, S., Ouellet Lavallée, G. & Pearson, A. (2015). Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of the trigeminal ganglia. *Journal of General Virology*. **96**, 2794–2805

Tischer, B. K., von Einem, J., Kaufer, B. & Osterrieder, N. (2006). Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* **40**, 191–197.

Tischer, B. K., Smith, G. A. & Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods of Molecular Biology* **634**, 421–430.

Wang, S.-K., Duh, C.-Y. & Wu, C.-W. (2004). Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *Journal of Virology* **78**, 9750–9762.

Wang, S. K., Duh, C. Y. & Chang, T. T. (2000). Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* **81**, 2407–2416.

Weir, J. P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* **271**, 117–130.

Figure Legends

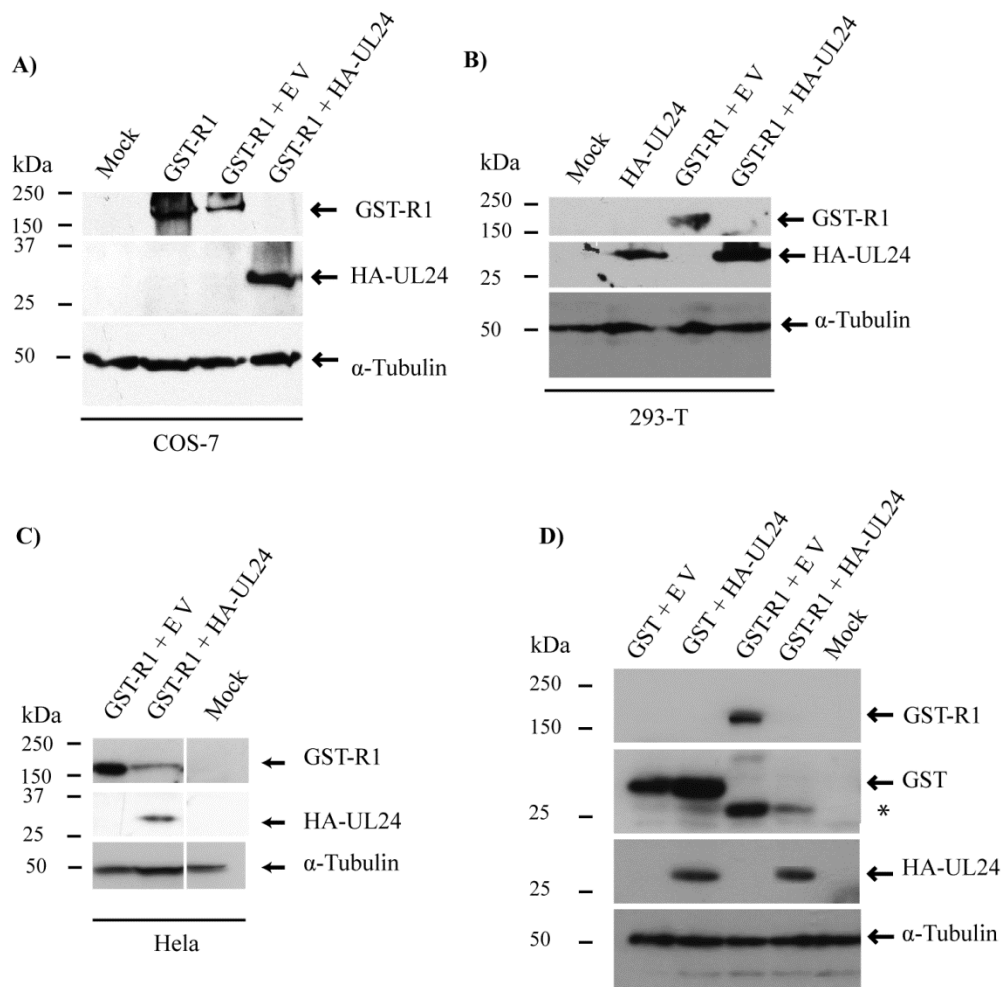


Fig. 1. UL24 reduces expression of the viral ribonucleotide reductase subunit R1 in transfection experiments. Western blots showing the effect of HA-UL24 on GST-R1 expression 48 hours post-transfection. A) COS-7 cells were transfected with a plasmid encoding GST-R1 or co-transfected with this plasmid and either an empty vector (EV) or a plasmid encoding HA-UL24. B) 293-T cells were transfected with a plasmid encoding HA-UL24 or co-transfected with a plasmid encoding GST-R1 and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24. C) HeLa cells were co-transfected with a plasmid encoding GST-R1 and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24. D)

COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding GST and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24. In parallel as a control, COS-7 cells were co-transfected with the plasmid encoding GST-R1 and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24. Positions of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. The asterisk indicates degradation products of GST-R1. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

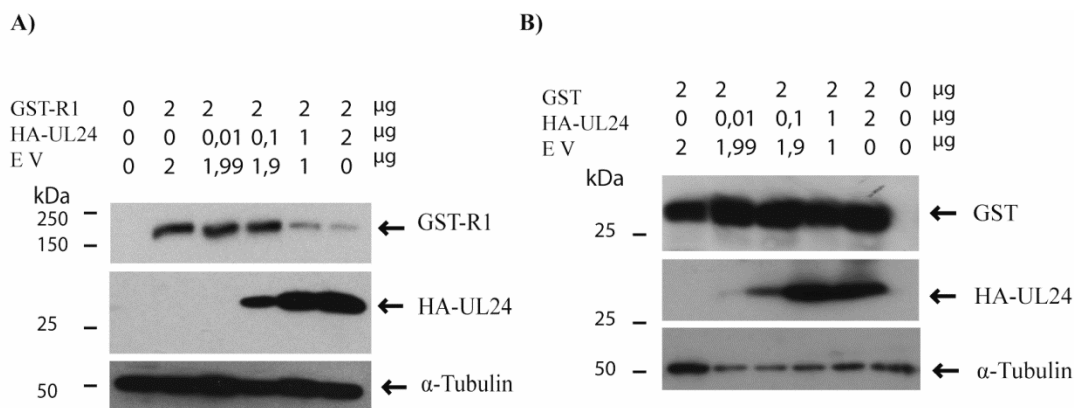


Fig. 2. UL24 reduces the expression of R1 in a dose dependent manner. Western blot analysis showing dose dependency of HA-UL24 repression of GST-R1. A) COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding GST-R1, increasing amounts of plasmid encoding HA-UL24 and correspondingly decreasing amounts of the empty vector (EV). B) COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding GST, increasing amounts of plasmid encoding HA-UL24 and decreasing amount of an EV. Each membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α-Tubulin, which served as a loading control. Positions of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

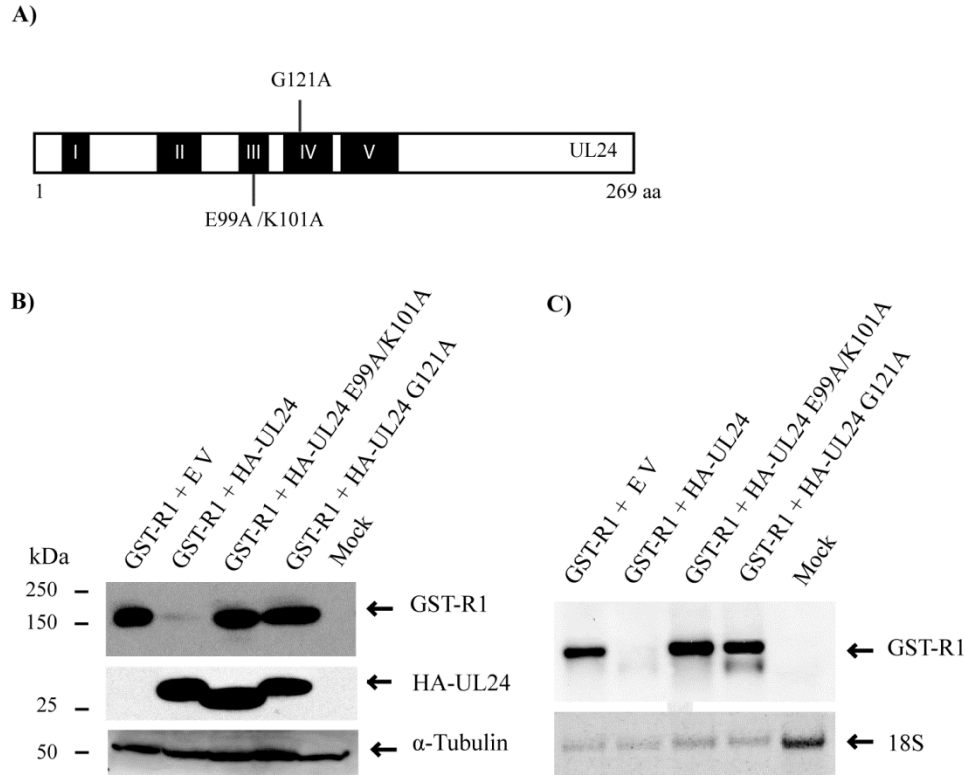


Fig. 3. Substitution of conserved residues in UL24 blocks repression of R1 synthesis. A) Graphic representation of the amino acid substitutions in UL24. The UL24 protein is represented by the white box and the homology domains are represented by black boxes. Amino acid substitutions are indicated by their single letter designation and their position. Figure modified from (Bertrand et al., 2010). B) COS-7 cells were co-transfected with a plasmid expressing GST-R1 and either the empty vector (EV) or plasmids expressing HA-UL24, HA-UL24 E99A/K101A or HA-UL24 G121A. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α -Tubulin, which serves as a loading control. Positions of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. C) COS-7 cells were co-transfected with a plasmid expressing GST-R1 and either the EV

or with a plasmid expressing HA-UL24, HA-UL24 E99A/K101A or HA-UL24 G121A. Twenty-four hours post-transfection, total RNA was harvested for each condition. One μ g of total RNA per sample was analyzed by Northern blot using a probe specific for *R1*. The lower panel shows the 18S ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide. (the increase in 18S observed in the mock lane was not reproducible). The *GST-R1* transcripts and 18S ribosomal RNA are indicated by arrows. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

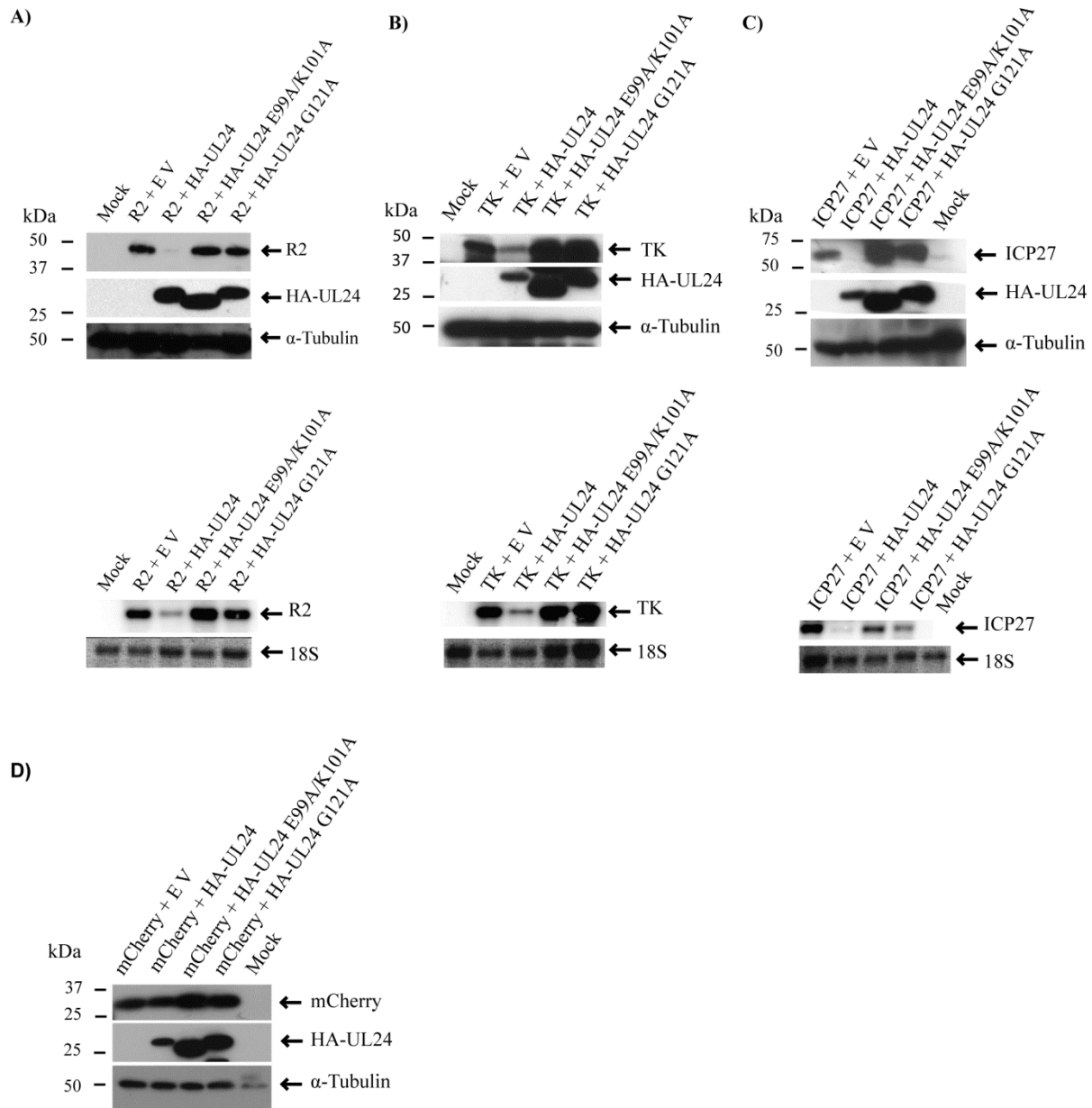


Fig. 4. UL24 affects the expression of several HSV-1 genes. COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding either R2 (A), ICP27 (B), TK (C) or mCherry (D), and either the empty vector (EV) or a plasmid coding for HA-UL24, HA-UL24 E99A/K101A or HA-UL24 G121A. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot (A-C upper panels, and D). The membranes were immunoblotted for R2, ICP27, TK, or mCherry, and then stripped and

reprobed for HA and α -Tubulin, which served as a loading control. Position of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows (upper panels). In parallel, COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding either R2, ICP27 or TK, and either the EV or plasmids coding for HA-UL24, HA-UL24 E99A/K101A or HA-UL24 G121A. Twenty-four hours post-transfection, total RNA was harvested for each condition. One μ g of total RNA per sample was analyzed by Northern blot using a probe specific for *R2*, *ICP27* or *TK* (lower panels). The bottom panels show the 18S ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide. Positions of the different transcripts and the 18S ribosomal RNA are indicated by arrows to the right of the panels. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

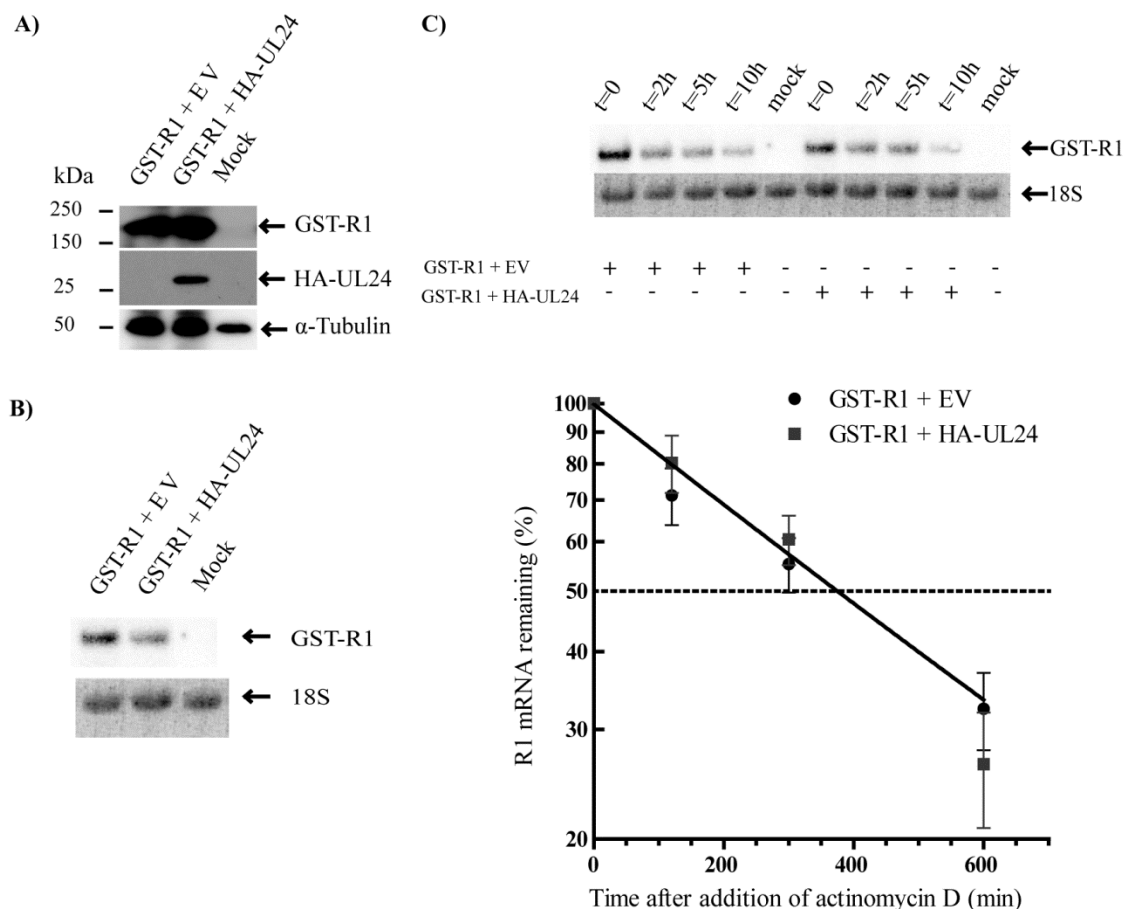


Fig. 5. UL24 affects the accumulation of *R1* transcripts even when produced following *R1* expression. A) COS-7 cells were transfected with a plasmid expressing GST-R1. Twenty-four hours post-transfection, cells were transfected again with the EV or with the plasmid encoding HA-UL24. A further 24 hours later, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α -Tubulin, which served as loading control. Position of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. B) COS-7 cells were transfected as described in (A), and total RNA was harvested for each condition. One μ g of total RNA per sample was analyzed by Northern blot using a probe specific for *R1*. The lower panel shows the 18S

ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide. The *GST-R1* transcripts and 18S ribosomal RNA are indicated by arrows. C) COS-7 cells were transfected with a plasmid expressing GST-R1. Twenty-four hours post-transfection, cells were transfected again with the empty vector (EV) or with the plasmid encoding HA-UL24. Twenty-four hours following the second transfection, cells were treated with the RNA polymerase II inhibitor actinomycin D. At the indicated times post addition of the drug, total RNA was harvested and analyzed by Northern Blot using a probe specific for *R1*. The lower panel shows the 18S ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide. Positions of the *GST-R1* transcripts and 18S ribosomal RNA are indicated by arrows. Below is a graph showing the half-life of *R1* transcripts expressed in the presence or absence of UL24 (note that the two curves overlap).

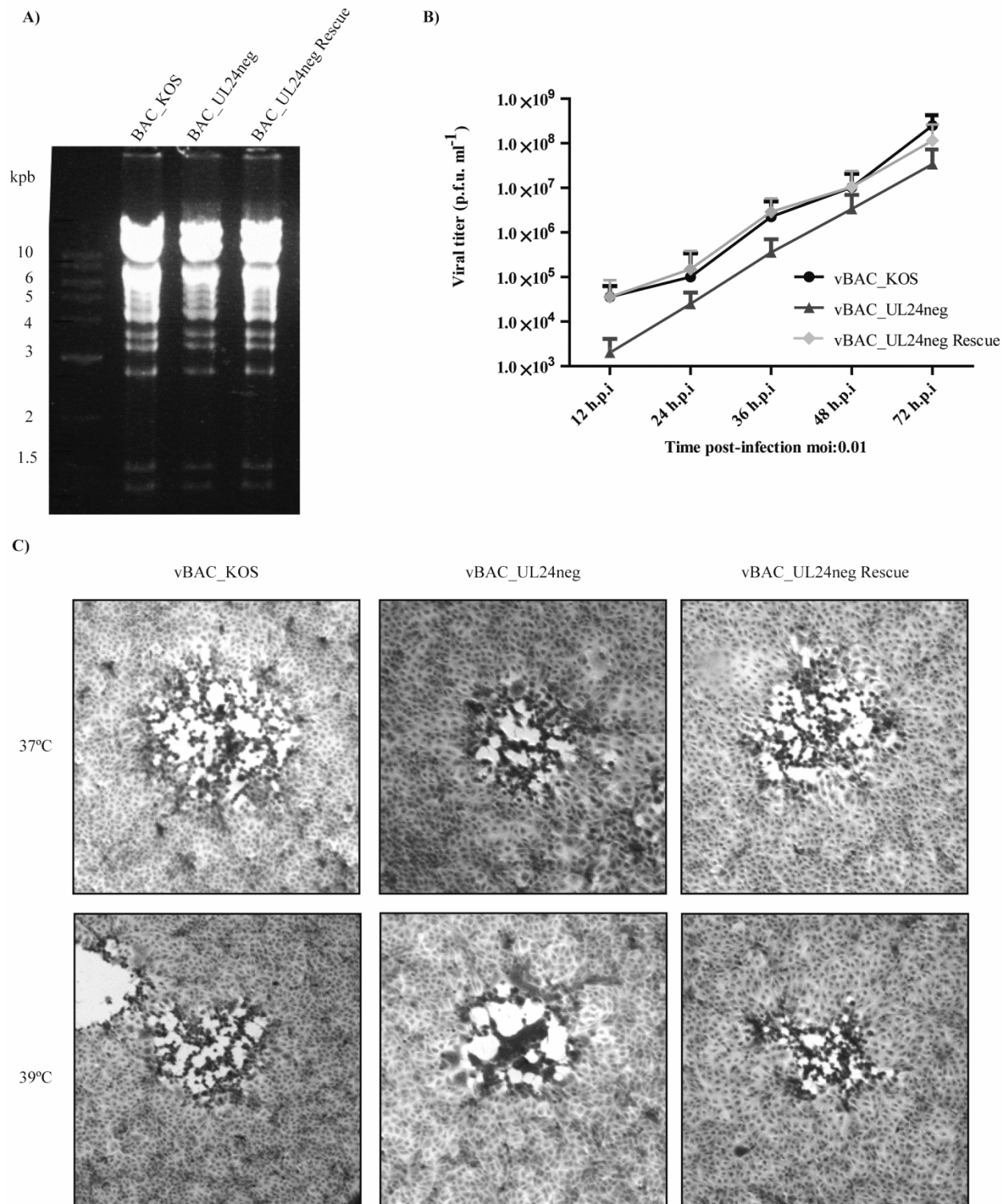


Fig. 6. Characterization of a BAC-based UL24-negative HSV-1 mutant. A) Pattern of *EcoRV* digestion of the genomes of recombinant BACs. The wild type vBAC_KOS (lane

1), the mutant vBAC_UL24neg (lanes 2) and vBAC_UL24neg Rescue (lane 3) were digested with *EcoRV*, for 4 hours at 37°C. DNA was then resolved on a 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. Position of molecular weight markers are indicated to the left of the panel. B) Multistep replication curves comparing vBAC_KOS, vBAC_UL24neg and vBAC_UL24neg Rescue. Vero cells were infected in duplicate with each virus at an MOI of 0.01. Supernatant and cells were harvested at the indicated time points to determine the total amount infectious particles produced. Error bars represent the standard error of the mean of two independent experiments. C) Plaque morphology assays of recombinant viruses. The plaques illustrate the typical morphology observed at 37°C and 39°C of Vero cells infected with vBAC_KOS, vBAC_UL24neg and vBAC_UL24neg Rescue.

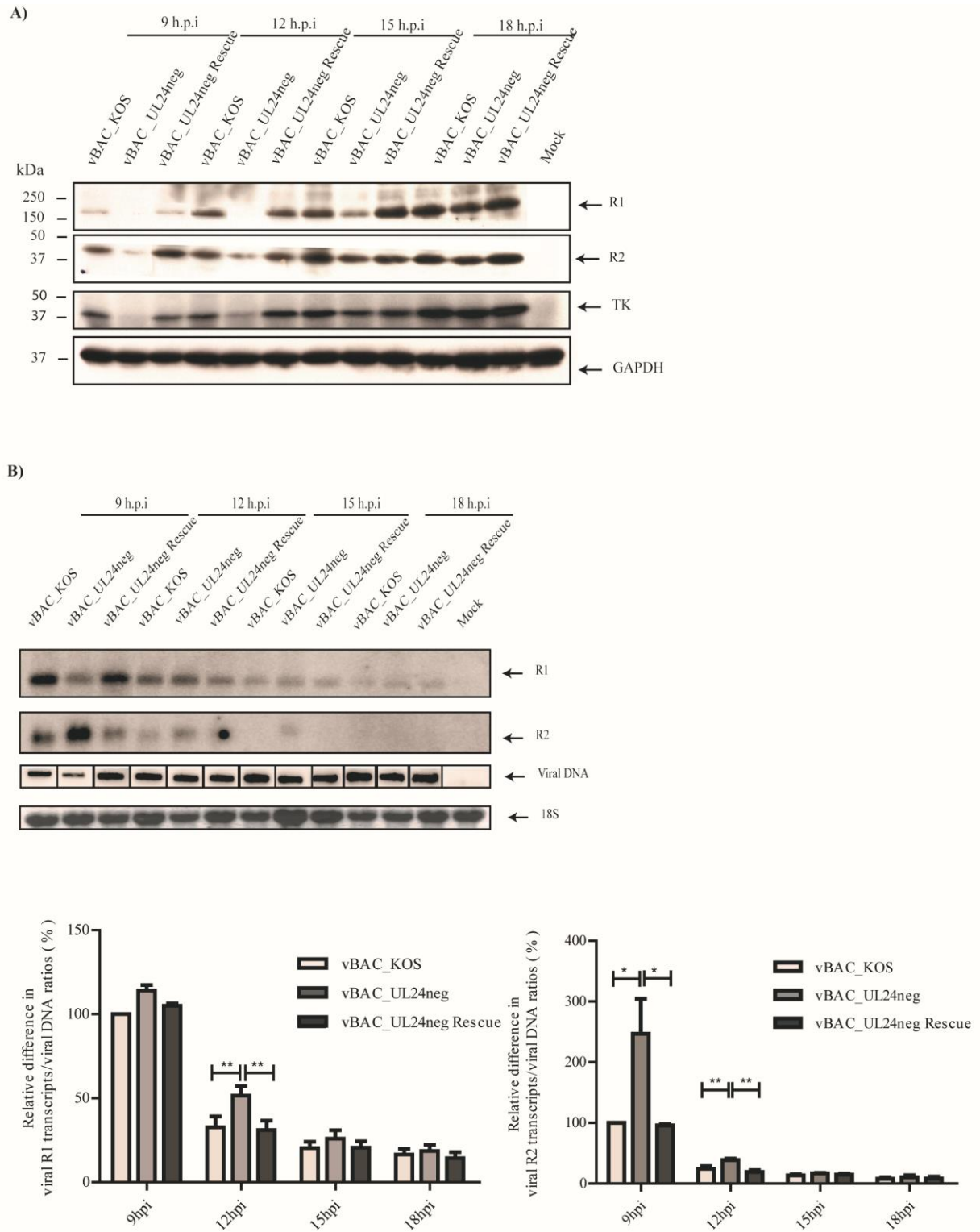


Fig. 7. Absence of UL24 induces an increase in *R1* and *R2* transcripts relative to viral DNA levels. Vero cells were infected at an MOI of 10 with vBAC_KOS,

vBAC_UL24neg or vBAC_UL24neg Rescue. Total RNA, DNA and proteins were extracted at the indicated times. A) Total proteins were analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for R1, R2, TK and GAPDH, which served as loading control. Position of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. B) Five µg of total RNA per sample were analyzed by Northern blot using a probe specific for *R2* and *R1* (upper panels). Five µg of total DNA were analyzed by slot blot using a probe against the viral DNA (third panel). The bottom panel shows the 18S ribosomal RNA from the agarose gel stained with ethidium bromide. Positions of the different transcripts and the 18S ribosomal RNA are indicated by arrows to the right of the panels. The graph represents quantification by phosphor imager of the amount of *R1* and *R2* transcripts expressed in the presence and absence of UL24 (t test with $P < 0.05$). The non-specific spot on the *R2* band for vBAC_UL24 Rescue at 12 h.p.i was excluded from the quantification. Figures represent data from two independent experiments done in duplicate each time.

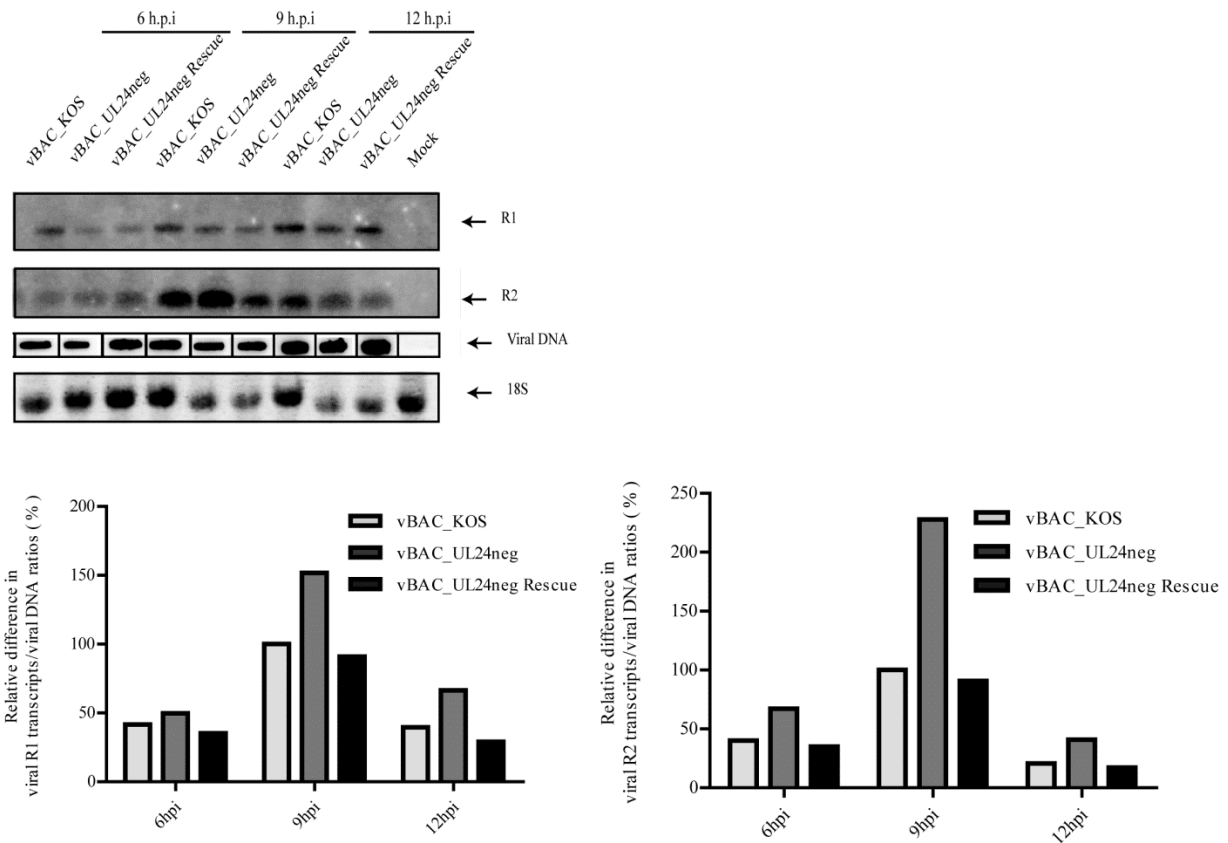


Fig. 8 Effect of the absence of UL24 on viral *R1* and *R2* transcript levels early in infection. Vero cells were infected as described for Fig. 7. Top panels show northern blots of *R1* and *R2* transcripts at 6, 9 and 12 h.p.i. comparing Vero cells infected with vBAC_KOS, vBAC_UL24neg and vBAC_UL24neg Rescue. Bottom panels show slot blot results for viral DNA hybridization and ethidium bromide stained 18S RNA for normalization. Below are graphs showing the relative quantification of the viral RNAs.

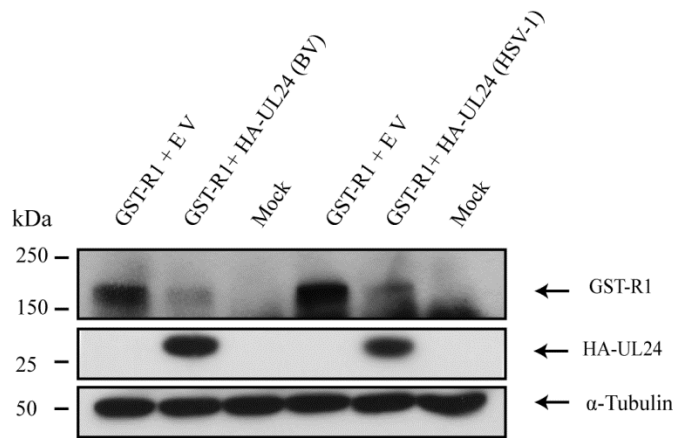


Fig. 9. UL24 from Herpes B Virus reduces expression of the HSV-1 GST-R1 protein in transfection experiments. Western blot showing the effect of HA-UL24 BV on GST-R1 expression 48 hours post-transfection. COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding GST-R1 and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24 from BV or as control a plasmid encoding GST-R1 and either the EV or a plasmid encoding HA-UL24 HSV-1. The membrane was successively immunoblotted for GST, HA and α-Tubulin, which serves as a loading control. Positions of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows.

Table 1: Primers used for the generation of recombinant viruses by the BAC system

Name	Sequence 5'→3'	Mutations
BAC UL24neg F	5'gccggcgagggcgcaacgccgtacgtcggtgct gtggccgc gagaacgcgcagcctggtcgaacgcagacgcgtgttg gtggca ggggtaggatgacgacgataagta 3'	Two point mutations indicated in bold that correspond to the first two ATGs of the open reading frame of UL24.
BAC UL24neg R	5'agcgcctttagaagcgcgtatggcttcgtaccctgcc acaa cacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcgttctcgcgcca cagc acaaccaattaaccaatttcta 3'	
BAC UL24neg Rescue F	5'gccggcgagggcgcaacgccgtacgtcggtgct atggccgcg agaacgcgcagcctggtcgaacgcagacgcgtgttg atggcagg ggtaggatgacgacgataagta 3'	Correction of point mutations in the first two ATGs of the open reading frame of UL24, indicated in bold, to restore wild type sequence.
BAC UL24neg Rescue R	5'agcgcctttagaagcgcgtatggcttcgtaccctgcc atcaac acgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcgttctcgcgcca tagcac aaccaattaaccaatttcta 3'	

CHAPITRE 3: THE HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-1 R1 GENE CONTAINS MULTIPLE UL24 SUSCEPTIBILITY ELEMENTS

C. Sanabria-Solano, Abel Oppong and A. Pearson. The Herpes Simplex Virus type 1 *R1* gene contains multiple UL24 susceptibility elements. Article en préparation

Résumé de la deuxième publication

Titre : le gène *R1* de l'herpès simplex de type 1 possède multiples éléments reconnue par UL24.

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), cause des feux sauvages, des kératites virales ou dans de rares cas des encéphalites virales. Chez des patients immunosupprimés et chez les nouveau-nés, la maladie peut être très sévère. Le gène codant pour la protéine virale UL24, à cinétique tardive, UL24 est conservé parmi tous les *Herpesviridae*. Cette protéine semble être multifonctionnelle durant l'infection. *In vivo*, l'infection avec un virus déficient en UL24 (UL24X) induit une diminution des titres viraux dans les cellules épithéliales qui est exacerbée dans les ganglions trigéminaux. Cette diminution corrèle avec une réduction des signes cliniques et une diminution de la réactivation à partir de l'état de latence. En culture cellulaire, UL24X induit la formation de plages syncytiales. La protéine se localise dans le noyau où elle induit la relocalisation de quelques protéines nucléolaires. Tardivement durant l'infection, elle se retrouve dans le cytoplasme où elle induit une redistribution de certaines glycoprotéines virales. Également, UL24 est capable de réguler l'expression de gènes viraux en réduisant l'accumulation de protéines et transcrits viraux, quoique la stabilité des transcrits n'est pas affectée.

La séquence d'UL24 contient cinq régions avec des regroupements de résidus hautement conservés appelés domaines d'homologie (DH). Un domaine d'endonucléase de type PD-(D/E)-XK a été identifié par bioinformatique et se localise dans les DH. Néanmoins, l'activité endonucléase de cette protéine n'a pas été démontrée expérimentalement. Par contre, un virus avec des substitutions dans les résidus E99 et K101, correspondant à des sites important pour le site actif du motif d'endonucléase, présente un phénotype de plages syncytiales et une réduction dans la réplication virale similaire au phénotype observé chez le virus déficient pour UL24. Le mécanisme par lequel UL24 régule l'expression de gènes viraux est encore méconnu. On a observé qu'UL24 est capable de réguler l'expression de gènes viraux appartenant aux différentes cinétiques d'expression incluant les gènes tardifs et même sa propre expression. Un effet de la protéine UL24 spécifique sur la stabilité de l'ADN codant des gènes viraux a été observé. De plus, UL24 est capable de reconnaître des fragments d'ADN viral et induire une

diminution de l'expression de gènes non-susceptibles qui contiennent un fragment d'ADN viral. L'ensemble de ces données suggèrent qu'UL24 affecte l'expression de gènes viraux par une l'action directe sur l'ADN.

Contribution des auteurs:

Carolina Sanabria-Solano : Conception d'expériences, expériences pour les figures 1, 2, 3, 4 et 5, préparation des figures et du manuscrit.

Abel Oppong: Expériences préliminaires et fabrication de certains plasmides d'expression

Angela Pearson : Conception des expériences, révision et correction du manuscrit et des figures.

THE HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-1 R1 GENE CONTAINS MULTIPLE UL24 SUSCEPTIBILITY ELEMENTS

Carolina Sanabria-Solano^a, Abel Oppong^a and Angela Pearson^a

(a) INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7,
Canada

Correspondance to:

Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

CANADA

E-mail address: angela.pearson@iaf.inrs.ca

Telephone: +1 (450) 687 5010

Abstract

Herpes simplex virus type 1 causes cold sores, viral keratitis and in rare cases it could induce viral encephalitis. The disease could be more severe on immunosuppress patient and newborns. The gene coding for the late viral protein UL24 is conserved in all *Herpesviridae*. *In vivo*, the infection with a virus deficient for UL24 (UL24X) induces a reduction on viral titers in epithelial cells, something that is exacerbated on trigeminal ganglia. This reduction correlates with decrease clinical signs and a reduction on viral reactivation from latency. In cell culture, UL24X induce the formation of syncytial plaques. On the nucleus, the protein induces the re-localisation of some nucleolar proteins. Later on the infection, UL24 localises in the cytoplasm where it induces the redistribution of certain viral glycoproteins. Also, UL24 is capable of regulating viral gene expression by reducing the accumulation of viral transcripts without affecting their stability.

The UL24 sequence encase five homology domains (HD) consisting of highly conserved residues. An endonuclease domain of the PD-(D/E)-XK family was identified between the HDs. Nonetheless, the endonuclease activity of this domain hasn't yet been proven. However, a virus with substitutions on the residues E99 and K101, corresponding to the active site of the putative endonuclease motif, induces a syncytial plaque phenotype and a reduction on viral replication similar to what was observed with UL24X. The mechanism by which UL24 regulates viral gene expression is still unknown. We observe that UL24 is capable to regulate the expression of viral genes of different kinetics including itself. The protein is even capable to recognise fragments of viral DNA and reduce the expression of non-susceptible genes containing fragments of viral DNA. Also, we observed that UL24 affected specifically the stability of viral DNA. Taken together these results suggest that UL24 affects the expression of viral genes by a direct action on viral DNA.

Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a double-stranded DNA virus that establishes a life-long infection in sensory neurons that form the trigeminal ganglia (Al-Dujaili et al., 2011). Primary infection occurs in epithelial cells where HSV-1 gene expression is sequential; first the immediate early (IE) genes are expressed, followed by the early (E) genes and finally the late (L) genes (Honess and Roizman, 1974).

The *UL24* viral gene is conserved among all *Herpesviridae* (Jacobson et al., 1989) ; it encodes the UL24 protein, which is expressed with late kinetics (Pearson and Coen, 2002). UL24 appears to have multiple functions in host cells. *In vivo*, a virus deficient for UL24 (UL24X) shows decreased viral titers in epithelial cells and drastically decreased viral titers in trigeminal ganglia (TG) (Jacobson et al., 1998). This reduction seems to be due to a reduction in the number of infected neurons (Rochette et al., 2015). These decreases correlate with a large reduction in clinical signs (Leiva-Torres et al., 2010). Furthermore, the efficiency of viral reactivation from latency is also highly reduced (Jacobson et al., 1998).

In cell culture, UL24X also exhibits a reduction in viral titers, as well as a syncytial plaque phenotype (Coen et al., 1989). UL24 is found in the nucleus, where it leads to the redistribution of several nucleolar proteins (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Lymberopoulos et al., 2011), a phenomenon also observed when UL24 is expressed ectopically in cells (Bertrand and Pearson, 2008; Lymberopoulos et al., 2011). Under these conditions, UL24 induces a G2 cell cycle block (Nascimento et al., 2009). UL24 is also located in the cytoplasm where it affects the distribution of viral glycoproteins during infection (Ben Abdeljelil et al., 2013).

The N-terminal portion of UL24 contains five blocks of highly conserved residues termed homology domains (HDs) (Jacobson et al., 1989b). A PD-(D/E)-XK endonuclease motif, identified by bioinformatics, is located within the HDs, and contains several residues that are

perfectly conserved among UL24 orthologs (Coen et al., 1989; Knizewski et al., 2006). Nevertheless, the endonuclease activity of UL24 has yet to be proven. A viral mutant with the substitutions E99A/K101A in UL24, residues important for the active site of the endonuclease motif, exhibits a syncytial plaque phenotype and replicates to lower titers than the wild type virus (Bertrand et al., 2010). Proteins belonging to this family of endonucleases are extremely diverse (Steczkiewicz et al., 2012). They are mainly nucleases that may function as DNA restriction enzymes (Orlowski and Bujnicki, 2008), in the splicing of tRNAs (Belfort and Weiner, 1997), excision of transposons (Hickman et al., 2000), recombination of DNA (Dahlroth et al., 2009), resolution of Holliday junctions (HJC) (Aravind, 2000), repair of damaged DNA (Ban, 1998), termination of PolIII (Xiang et al., 2009) or DNA binding (Steczkiewicz et al., 2012; Todone et al., 2000).

In previous work we identified a regulatory function affecting ectopic expression of HSV-1 viral gene expression for the UL24 protein from HSV-1 and B virus (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). UL24 specifically reduced the accumulation of several viral proteins and transcripts. The mechanism involved in regulation of viral gene expression by UL24 is unknown. In this report, we tested the hypothesis that HSV-1 UL24 recognizes elements within viral genes leading to the down regulation of viral gene expression.

Material and methods

Plasmids and cloning

The plasmids pLBPfl-GST, pLBPfl-GST-R1, pLBPfl-HA-UL24, pLBPfl-HA-UL24 E99A/K101A, pLBPfl-HA-UL24 G121A, pLBPfl R2 and pLBPfl-mCherry have been described elsewhere (Bertrand and Pearson, 2008; Bertrand et al., 2010; Dufour et al., 2011, Sanabria-Solano et al., 2016). The plasmid pLBPfl-gC was created using the primers: gC_HSV-1_F (5'-CACAGGATCCAGGCGTCGGGCATGGCCCCGGGGCG-3') and gC_HSV-1_R (5'-CACAGTCGACGGGGGGTCTTGCGTTACCGCCGATG-3') to amplify the complete gC open reading frame (ORF) from HSV-1 strain KOS. gC was ligated into pBluescriptSK+ (Stratagene) using T4 DNA ligase (New England Biolabs), then digested using the enzymes *Bam*HI and *Sal*I (New England Biolabs). The gC fragment was inserted into the pLBPfl vector that had been previously digested with the same restriction enzymes, resulting in the vector pLBPfl-gC.

The ORF for HSV-1 *R1* was divided into 4 fragments that were amplified from pLBPfl-GST-R1 with the following primers:

C1_HSV-1_F (5'-TTAATTAATGGCCAGCCGCCCCGCCGCATCC-3'),	C1_HSV-1_R (5'-
GTTTAAACGGGCAAACATCCAGGGGCGCGGTG-3'),	C2_HSV-1_F (5'-
TTAATTAACACCGCGCCCCTGGATGTTTGCCC-3'),	C2_HSV-1_R (5'-
GTTTAAACCCATGTAGTGCCCGCCAAAGCGCT-3'),	C3_HSV-1_F (5'-
TTAATTAATAAGCGCTTTGGCGGGCACTACATGG-3'),	C3_HSV-1_R (5'-
GTTTAAACGAACATGACGAAGGGGCTCCCGGT-3'),	C4_HSV-1_F (5'-
TTAATTAAGACCGGGAGCCCCTTCGTCATGTTC-3')	C4_HSV-1_R (5'-

GTTTAAACTCACAGCGCGCAGCTCGTGCAGACAAT-3'). The fragments were each ligated into pBluescriptSK+ (Stratagene) using T4 DNA ligase (New England Biolabs). The four fragments were excised from the vector pBluescriptSK+ with *Pac*I and *Pme*I (New England Biolabs). Each fragment was individually inserted into the pLBPf-GST vector that had been

previously digested with the same restriction enzymes, resulting in the vectors pLBPfl-GST-C1, pLBPfl-GST-C2, pLBPfl-GST-C3 and pLBPfl-GST-C4. To generate a vector expressing C1 fused to mCherry, the fragment C1 was re-amplified with the primers C1_2_HSV-1_F (5'-CGAGCTGTACAAGGCCAGCCGCCCCGCCGCATCC-3') and C1_2_HSV-1_R (5'-TCAAAGAAGCTTTTATGACAGCGTCTCCGAGTC-3'). The PCR product was then digested with the enzymes *BsGRI* (New England Biolabs) and *HindIII* (New England Biolabs). The digested fragment was inserted into the pLBPf-mCherry vector that had been previously digested with the same restriction enzymes, resulting in the vector pLBPfl-mCherry-C1.

Cell culture

COS-7 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% newborn calf serum (NCS) (Wisent), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Life technologies). Cells were maintained in humidified incubators at 37°C with 5% CO₂.

Transfections

3.5 x 10⁵ COS-7 cells were plated per well in six-well plates. Twenty-four hours later, cells were co-transfected with 4 µg of total plasmid DNA per well, as indicated in each figure, using Lipofectamine transfection reagent (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. For protein extraction samples were harvested two days post-transfection unless indicated otherwise.

Immunoblotting

Protein samples for immunoblotting were prepared from transfected cells by scrapping the cells in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were pelleted in a microcentrifuge, and then lysed in 2X sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel sample buffer. Protein

samples were separated by SDS-PAGE, and then subjected to electrophoretic transfer to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The membranes were washed three times with Tris-Buffered Saline containing Tween 20 (TTBS) (15 mM Tris-HCL [pH 7.4], 50 mM NaCl and 0.05% Tween 20), and blocked overnight at 4°C in TTBS containing 5% nonfat powdered milk (Biorad). The blots were then washed three times for 5 minutes in TTBS, and incubated with the indicated primary antibodies at room temperature. The following antibodies were used at the indicated dilutions: a Glutathion-S Transferase (GST) polyclonal antibody (Life Technologies) (1:2000), an HA monoclonal mouse antibody (Covance) (1:250), a DsRed polyclonal antibody that detects mCherry (Clontech) (1:1000), an anti-gC monoclonal mouse antibody (Fitzgerald) (1:2000) and an α -tubulin polyclonal antibody (Abcam) (1:1000). After two hours of incubation with the primary antibody, the blots were washed three times with TTBS, and then incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 minutes. An anti-mouse secondary antibody was used to detect the expression of HA-UL24 (1:2500) and gC (1:5000), and an anti-rabbit secondary antibody was used for detecting expression of GST-R1, GST-C1, GST-C2, GST-C3, GST-C4, mCherry, mCherry-C1 and α -tubulin (1:5000). Membranes were subsequently washed five times five minutes with TTBS. Immunoreactive proteins were detected by enhanced chemiluminescence using the Immuno-Star HRP Substrate kit (Biorad).

DNA extraction and slot blot

Total DNA extractions were performed using phenol/chloroform as described elsewhere (Sambrook and Russell, 2006). DNA was subsequently treated with 0.5 μ g/ μ l of RNase A (Life Technologies) for 30 minutes at room temperature. Five μ g of total RNase-treated DNA per sample were transferred by slot blot to a positively charged nylon membrane (Immobilon). 32 P-labelled probes corresponding to pLBPl were generated using the High Prime DNA labelling kit

(Roche) according to the manufacturer's instructions. The PCR products corresponding to *GST-R1*, *R2* and *mCherry* were synthesised using the primers pLBPfl_F (5'-GCATGCCTGCAGGTTTAAACAGTCG-3') and pLBPfl_R (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'). These primers correspond to the vector pLBPfl, flanking the multiple cloning site. Hybridization was carried out in PerfectHyb (Sigma) solution at 68°C. Signals were analyzed by phosphorimager using the software ImageQuant TL version 7 (GE life science).

Results

R1 contains multiple UL24-susceptibility elements.

First, we investigated if UL24 recognizes a motif present in the coding region of viral genes. To this end, the HSV gene for *R1* was fragmented into 4 sub-fragments named: C1, C2, C3 and C4. The four fragments created were: C1 corresponding to nucleotides 1 to 630 of the open reading frame of *R1* from HSV-1 strain KOS, C2 corresponding to the nucleotides 612 to 1470, C3 corresponding to nucleotides 1451 to 2310 and finally C4 corresponding to nucleotides 2291 to 3414. Fragments were each cloned in frame into the pLBPfl-GST vector. Each of these plasmids was co-transfected with either the empty vector or a vector expressing the wild type form of HA-UL24. Cell lysates were analyzed by immunoblotting (Fig. 1). Proteins corresponding to GST-C1, GST-C2, GST-C3 and GST-C4 were observed on the western blot membranes; however the size of GST-C1 and GST-C3 was not as predicted. GST-C1 was detected at around 75 KDa compared to 50 KDa as predicted. On the other side, GST-C3 was detected around 40 KDa compare to the expected 50 KDa predicted. We do not know the reason for this discrepancy although the sequence for each plasmid was checked and the discrepancy in size was observed in every experiment. We found that HA-UL24 reduced the expression of GST-C1, GST-C2, GST-C3 and GST-C4 similar to what we saw for GST-R1.

These results suggest that an element or elements recognized by HA-UL24 are present in each of the four fragments of *R1*.

A UL24 susceptibility element is transferable

The *R1* gene appears to contain elements recognized by UL24 that render the gene susceptible to down regulation by UL24. We investigated if such an element was transferable to a non-viral gene that is normally not affected by UL24. Previously, we showed the expression of the fluorescent protein mCherry is not reduced upon co-expression of UL24 in transient transfection experiments. Thus, we cloned the C1 fragment from *R1*, in frame with the C-terminus of *mCherry* in the plasmid pLBPfl-mCherry. COS-7 cells were co-transfected with the plasmids pLBPfl-mCherry-C1 and either the plasmid pLBPfl or pLBPfl-HA-UL24. As controls, cells were co-transfected in parallel with the plasmid pLBPfl-GST-C1 and either the empty vector or pLBPfl-HA-UL24, and the plasmid pLBPfl-mCherry with either the empty vector or pLBPfl-HA-UL24 (Fig. 2). As shown previously, the expression of mCherry was not reduced in the presence of UL24. In contrast we found that levels of mCherry-C1 were lower upon co-transfection of the HA-UL24 expressing vector compared to the empty vector. Thus, we concluded that elements present in the C1-fragment of *R1* are sufficient to induce recognition and decrease of expression of *mCherry-C1* by HA-UL24.

Downregulation of the true late gene gC by UL24

In the course of previous experiments, we established that UL24 affects the expression of the viral genes *R1*, *R2*, *ICP27* and *TK*. During the lytic phase of viral infection these genes are expressed with either immediate-early or early kinetics. An effect on the expression of late genes has not been tested before. We investigate if UL24 is capable of reducing the expression of *gC*, a true late viral gene. COS-7 cells were co-transfected with a plasmid encoding *gC* with either an empty vector, a plasmid encoding the mutated versions of HA-UL24 (HA-UL24

E99A/K101A or G121A) or a plasmid encoding the wild type version of HA-UL24. Forty-eight hours post transfection total proteins were isolated and analyzed by immunoblotting (Fig. 3). The results showed that, under these conditions, HA-UL24 is capable of recognizing the *gC* gene and down-regulates its expression similarly to what was observed for the other immediate-early and early viral genes studied. We concluded that UL24 is capable to regulate the expression of several viral genes independent of their kinetic class of expression during lytic infection.

UL24 can down-regulate its own gene

We next investigated if HA-UL24 is capable of recognizing and regulating its own expression. To this end, we use the plasmid encoding HA-UL24 E99A/K101A. This protein migrates slightly faster on a polyacrylamide gel compare to the wild type HA-UL24. We previously showed that UL24 E99A/K101A does not down regulate the expression of viral genes. COS-7 cells were co-transfected with the plasmid encoding HA-UL24 E99A/K101A and either an empty vector or a plasmid encoding the wild type version of HA-UL24. Forty-eight hours post transfection total proteins were isolated and analyzed by immunoblotting (Fig. 4). The results indicated a down-regulation of the expression of HA-UL24 E99A/K101A in the presence of HA-UL24. Thus, we concluded that UL24 is also able to negatively regulate its own expression.

UL24 affects the stability of transfected plasmids

Previously, we established that UL24 reduces the expression of viral genes, and that this reduction does not appear to be due to an effect on the stability of viral transcripts. Therefore, because UL24 contains a DNA endonuclease motif we investigated the possibility that UL24 affects RNA expression indirectly as a consequence of DNA instability. COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding GST-R1, R2 or mCherry with either an empty vector or a plasmid encoding HA-UL24. Twenty-four hours post transfection total DNA was isolated and

analyzed by Slot blot. We found that under these conditions (Fig. 5), expression of UL24 resulted in statistically significant reductions in levels of the plasmids pLBPfl-GST-R1 and pLBPfl-R2 (t-test analysis, $P < 0.0001$). Although we observed a 40% reduction in the levels of plasmids encoding GST-R1 and R2 due to UL24, no such reduction was observed for pLBPfl-mCherry. Taken together these results led us to conclude that UL24 has an impact on the stability of plasmids encoding viral genes but not on those encoding non-viral genes tested this far.

Discussion

The HSV-1 UL24 protein has multiple functions and affects the pathogenesis of the virus (Jacobson et al., 1998; Leiva-Torres et al., 2010; Rochette et al., 2015). In an earlier study, we demonstrated that UL24 specifically regulates viral gene expression, but not the expression of certain non-viral genes (Sanabria-Solano et al., 2016). The viral genes tested in our previous studies were expressed with either immediate early or early kinetics during lytic infection. Herein, we tested whether susceptibility to regulation by UL24 was restricted to immediate early and early genes. We examined if UL24 was capable of recognizing a true late gene under the same conditions. We selected *gC* as a representative of this viral class. We showed that UL24 is capable of recognizing *gC* and down-regulating its expression just as seen for the immediately early and early genes *ICP27*, *R1*, *R2*, and *TK*. Taken together these results show that UL24 is capable of recognizing viral genes independent of their kinetics of expression (Bertrand and Pearson, 2008). Next, we investigated if UL24 could affect its own expression. For this, we exploited the characteristic of the substituted form of UL24 (E99A/K101A), which migrates faster on a polyacrylamide gel than the wild type protein. When co-expressed together, HA-UL24 reduced the expression of HA-UL24 E99A/K101A. Thus, UL24 can down-regulate its own expression. This result also further confirms that UL24 can affect the expression of late

viral genes (Fig. 4). This effect may play a role in previous observations that certain substituted or deleted forms of UL24 are expressed better than the wild type form (Bertrand and Pearson, 2008).

Because the effect of UL24 on viral gene expression does not appear to be mediated through the promoter, and due to the presence of an endonuclease motif in UL24, we considered the possibility that plasmid stability might play a role. The present work aimed at identifying susceptibility elements in viral genes recognized by UL24. Preliminary results from nuclear run-on experiments indicated that transcription from plasmids containing viral genes is reduced by UL24 (data not shown). Using a qRT-PCR we observed that in transient transfection experiments, in the presence of UL24, there is a 50% reduction in the amount of plasmids expressing viral genes, which is not observed for plasmids encoding non-viral genes (Fig. 5). This result suggests that UL24 affects the stability of plasmids containing viral ORFs. The PD-(D/E)-XK endonuclease motif present in the N-terminal part of UL24 was discovered by bioinformatics, however its biological activity has not yet been demonstrated (Knizewski et al., 2006). Restriction enzymes represent a major part of the endonuclease type PD-(D/E)-XK family of proteins (Orlowski and Bujnicki, 2008). One hypothesis is that the endonuclease activity of UL24 might be linked to the reduction in the levels of plasmids encoding viral genes. Similar to a restriction enzyme, UL24 may recognize a specific sequence in the coding region of viral genes. To examine this further, we created a library of plasmids encoding fragments of *R1* attached to a GST-tag (Fig. 1). COS-7 cells were co-transfected with the plasmids encoding the four fragments of *R1* and either the empty vector or the vector encoding HA-UL24. Although bands corresponding to GST-C1, GST-C2, GST-C3 and GST-C4 were detected when the corresponding vector was transfected with the empty vector, the intensity of these bands was greatly reduced when those vectors were co-transfected with the vector expressing HA-UL24. This result suggests that UL24 recognizes more than one element or elements with the *R1*

ORF, or only one element not yet identified, and that such element or elements seem to be present in all 4 fragments tested. To confirm that the susceptibility to down-regulation by UL24 was conferred by the fragments of *R1*, we examined if fragment C1 was sufficient to transfer the recognition by UL24 to an otherwise non-susceptible gene. We created a chimera plasmid that expresses mCherry with a C-terminal fusion of the *R1* fragment C1 (Fig. 2). We observed that the expression of mCherry-C1 was significantly reduced by UL24 just as we observed for GST-C1, while expression of mCherry was not. This result suggests that the element or elements recognized by UL24 present within the first 630 nucleotides of *R1* are transferable to a non-viral gene whose expression is, under normal circumstances, not affected by UL24. Moreover, the structure of the full length *R1* was most likely modified when *R1* was fragmented and sub-cloned. Thus, a modified protein structure does not appear to be sufficient to elude recognition by HA-UL24. These results suggest that the element recognized by UL24 is a DNA sequence. We propose a model whereby UL24 recognizes DNA sequences present primarily in HSV ORFs and cleaves DNA by virtue of a restriction enzyme like endonuclease activity. This model is consistent with our observation that UL24 appears to reduce the stability of plasmids containing HSV-1 ORFs. Further studies would aim at defining the sequences or motif that confers susceptibility to UL24.

References

- Al-Dujaili, L. J., Clerkin, P. P., Clement, C., McFerrin, H. E., Bhattacharjee, P. S., Varnell, E. D., Kaufman, H. E. & Hill, J. M. (2011). Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiology* 6, 877–907.
- Aravind, L. (2000). SURVEY AND SUMMARY: Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Research* 28, 3417–3432.
- Ban, C. (1998). Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *The EMBO Journal* 17, 1526–1534.
- Belfort, M. & Weiner, A. (1997). Another bridge between kingdoms: tRNA splicing in archaea and eukaryotes. *Cell* 89, 1003–1006.
- Ben Abdeljelil, N., Rochette, P.-A. & Pearson, A. (2013). The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* 444, 263–273.
- Bertrand, L. & 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, 1142–1151.
- Bertrand, L., Leiva-Torres, G. A., Hyjazie, H. & Pearson, A. (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, 109–118.
- Chakrabarti, S., Bonneau, F., Schussler, S., Eppinger, E. & Conti, E. (2014). Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5-SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Research* 42, 9447–9460.
- Coen, D. M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L. & Knipe, D. M. (1989). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 86, 4736–4740.
- Dahlroth, S.-L., Gurmu, D., Schmitzberger, F., Engman, H., Haas, J., Erlandsen, H. & Nordlund, P. (2009). Crystal structure of the shutoff and exonuclease protein from the oncogenic Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *FEBS J* 276, 6636–6645.
- Dufour, F., Sasseville, A. M.-J., Chabaud, S., Massie, B., Siegel, R. M. & Langelier, Y. (2011). The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* 16, 256–271.
- Hickman, A. B., Li, Y., Mathew, S. V., May, E. W., Craig, N. L. & Dyda, F. (2000). Unexpected structural diversity in DNA recombination: the restriction endonuclease connection. *Molecular & Cell* 5, 1025–1034.
- Honess, R. W. & Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology* 14, 8–19.

- Jacobson, J. G., Martin, S. L. & 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, 1839–1843.
- Jacobson, J. G., Chen, S. H., Cook, W. J., Kramer, M. F. & Coen, D. M. (1998). Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* 242, 161–169.
- Kim, D. E., Chivian, D. & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research* 32, W526–W531.
- Knizewski, L., Kinch, L., Grishin, N. V., Rychlewski, L. & Ginalski, K. (2006). Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *Journal of Virology* 80, 2575–2577.
- Leiva-Torres, G. A., Rochette, P.-A. & 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, 1109–1116.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. & Lu, P. (1996). Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer. *Science* 271, 1247–1254.
- Lymberopoulos, M. H. & Pearson, A. (2007). Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363, 397–409.
- Lymberopoulos, M. H., Bourget, A., Ben Abdeljelil, N. & Pearson, A. (2011). Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412, 341–348.
- Nascimento, R., Dias, J. D. & 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 in Virology* 154, 1143–1149.
- Orlowski, J. & Bujnicki, J. M. (2008). Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Research* 36, 3552–3569.
- Pearson, A. & Coen, D. M. (2002). Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 76, 10821–10828.
- Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., Kim, D., Kellogg, E., DiMaio, F. & other authors. (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77, 89–99.
- Rochette, P.-A., Bourget, A., Sanabria-Solano, C., Lahmidi, S., Ouellet Lavallée, G. & Pearson, A. (2015). Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of the trigeminal ganglia. *Journal of General Virology*.
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5, 725–738.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, pdb.prot4455–pdb.prot4455.

- Shen, B. W., Xu, D., Chan, S.-H., Zheng, Y., Zhu, Z., Xu, S. -y. & Stoddard, B. L. (2011). Characterization and crystal structure of the type IIG restriction endonuclease RM.BpuSI. *Nucleic Acids Research* 39, 8223–8236.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J. & Baker, D. (2013). High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Structure* 21, 1735–1742.
- Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Knizewski, L., Rychlewski, L. & Ginalski, K. (2012). Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily. *Nucleic Acids Research* 40, 7016–7045.
- Todone, F., Weinzierl, R. O. J., Brick, P. & Onesti, S. (2000). Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6306–6310.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J. L. & Tong, L. (2009). Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* 458, 784–788.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12, 7–8.
- Yang, J., Zhang, W., He, B., Walker, S. E., Zhang, H., Govindarajoo, B., Virtanen, J., Xue, Z., Shen, H.-B. & Zhang, Y. (2015). Template-based protein structure prediction in CASP11 and retrospect of I-TASSER in the last decade: Template-Based Structure Prediction in CASP11. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*.

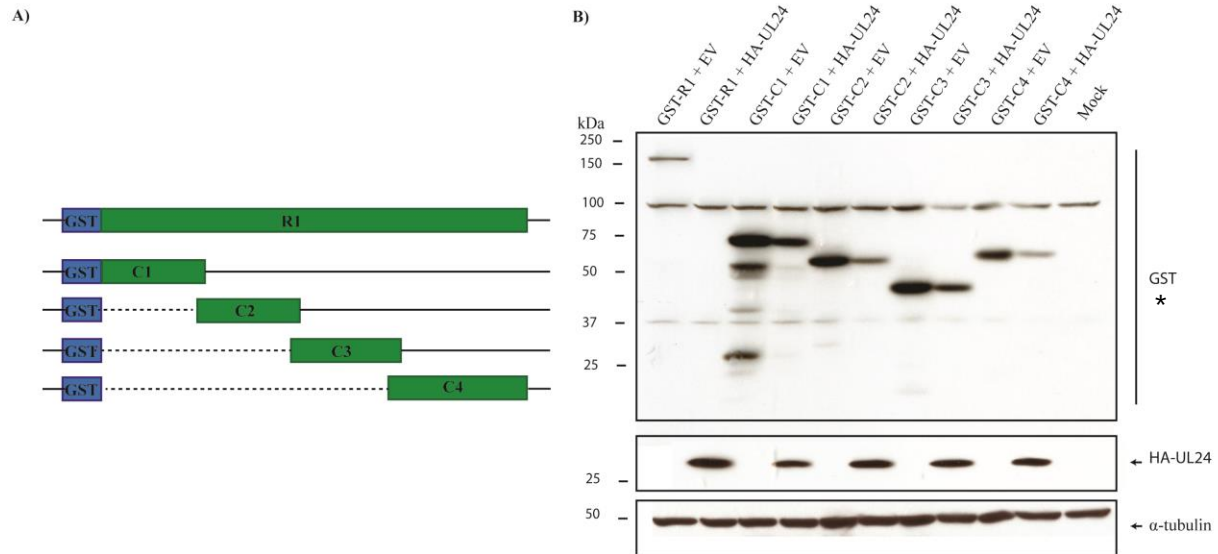


Fig. 1. *R1* contains multiple UL24-susceptibility elements. A) Graphic representation of the four fragments of *R1* (C1, C2, C3 and C4) inserted in the pLBPfl-GST plasmid. B) COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding either GST-R1, GST-C1, GST-C2, GST-C3 or GST-C4, and either the empty vector (EV) or a plasmid coding for HA-UL24. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membranes were immunoblotted for GST, and then stripped and reprobed for HA and α -Tubulin, which served as a loading control. The asterisks represent possible degradation products. Position of molecular weight markers is indicated to the left of the panels. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

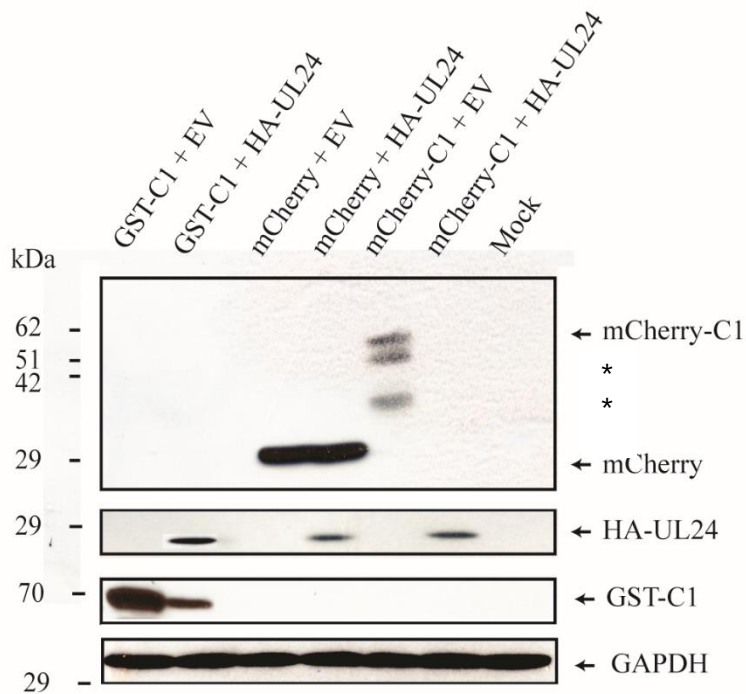


Fig. 2. A UL24 susceptibility element is transferable to a heterologous gene. COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding either GST-C1, mCherry and mCherry-C1, and either the empty vector (EV) or a plasmid coding for HA-UL24. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membranes were immunoblotted for mCherry, and then stripped and reprobed for GST, HA and GAPDH, which served as a loading control. The asterisks represent possible degradation products. Position of molecular weight markers is indicated to the left of the panels. Figures are representative of experiments repeated at least 2 times.

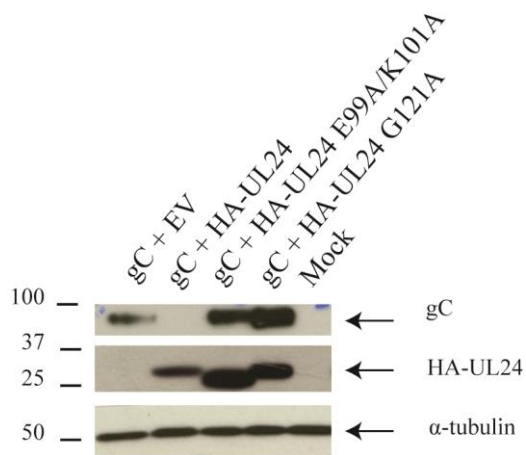


Fig. 3. Downregulation of the true late gene *gC* by UL24. COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding *gC*, and either the empty vector (EV) or a plasmid coding for HA-UL24, HA-UL24 E99A/K101A and HA-UL24 G121A. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for *gC*, HA and α -Tubulin, which served as a loading control. Position of molecular weight markers is indicated to the left of the panels. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

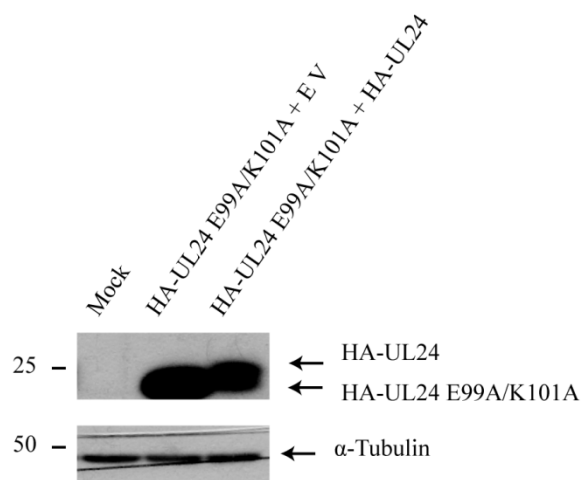


Fig. 4. UL24 can downregulate its own gene. COS-7 cells were co-transfected with a plasmid expressing HA-UL24 with substitution of two residues at the positions E99 and K101, and either the empty vector (EV) or the plasmid expressing HA-UL24 with the wild type sequence. Forty-eight hours post-transfection, total proteins were extracted and analyzed by Western blot. The membrane was successively immunoblotted for HA and α-Tubulin, which serves as a loading control. Positions of molecular weight markers are indicated to the left of the panels. The proteins detected are indicated by arrows. Figures are representative of experiments repeated at least 3 times.

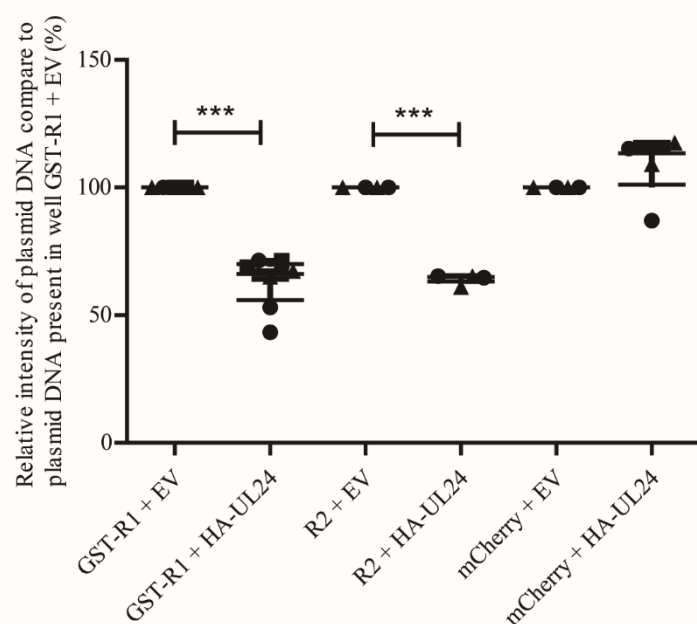


Fig. 5. UL24 affects the stability of plasmids expressing HSV-1 genes. COS-7 cells were co-transfected with plasmids encoding GST-R1, R2 or mCherry, and either the empty vector (EV) or a plasmid coding for HA-UL24. Twenty-four hours post-transfection, total DNA was harvested for each condition. One μg per sample of total DNA, treated with RNase, was analyzed by Slot blot using a probe specific for *pCGPfl*. The graph represents quantification by phosphor imager of the amount of *pCGPfl* DNA in the presence and absence of HA-UL24 (t test with $P < 0.0001$). Figures represent data from three independent experiments.

CHAPITRE 4: DISCUSSION

UL24 est une protéine multifonctionnelle importante pour la pathogénèse du virus (Jacobson et al., 1998; Leiva-Torres et al., 2010; Rochette et al., 2015). Des études dans le laboratoire ont démontré que l'expression de la protéine UL24, à partir d'un vecteur d'expression, corrèle avec une diminution de l'expression d'une autre protéine virale, la grande sous unité de la ribonucléotide réductase R1, en contexte de transfection transitoire (résultats de maîtrise). Des études sur UL76 du cytomégalovirus humain, l'orthologue d'UL24, ont montré une fonction de régulation génique pour cette protéine impliquant des mécanismes encore méconnus (Wang et al., 2000). Dans cette thèse, plusieurs avenues ont été utilisées pour identifier le mécanisme par lequel UL24 affecte l'expression des gènes viraux.

1.1 UL24 affecte l'expression du gène *R1* en contexte de transfection transitoire

Les travaux réalisés sur cette hypothèse ont confirmé que l'expression d'UL24 inhibait l'expression de la protéine R1 à laquelle une étiquette GST avait été ajoutée. L'inhibition de l'accumulation de R1 fut observée dans des cellules humaines (293-T et HeLa) et des cellules de singe (COS-7). De plus, nous avons observé qu'UL24 n'inhibait pas l'accumulation de la protéine GST ce qui suggère que le phénomène observé est indépendant de la présence de cette étiquette sur la protéine R1. Ces résultats suggèrent que la protéine UL24 induit une diminution dans l'expression de R1 par une interaction directe ou indirecte avec sa région codante. Par contre, nos expériences ont été réalisées avec un vecteur d'expression pLBPfl qui contient un promoteur immédiat précoce d'HCMV. Des études sur l'orthologue d'UL24 chez HCMV, UL76, ont démontré une fonction de régulation de l'expression de gènes viraux de cette protéine, par la modulation de promoteurs viraux (Wang et al., 2000). Donc, même si la fonction d'inhibition de

l'expression de R1 observée semble être associée à la région codante de ce gène, on ne peut pas écarter l'hypothèse d'une deuxième fonction au niveau des régions promotrices.

Nous avons observé que l'inhibition de l'expression de R1 était dépendante de la dose du plasmide exprimant UL24. Il est connu qu'UL76 du HCMV, est capable de réguler l'expression de gènes viraux. À de faible concentration, UL76 stimule leur expression et à de haute concentration celle-ci la diminue (Wang et al., 2000, 2004). Nos expériences ont exclusivement été réalisées avec des concentrations d'UL24 relativement élevées et elles nous montrent une diminution dans l'expression de R1. Nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que de faible dose d'UL24, similaire à celle utilisée dans les expériences avec UL76, pourrait stimuler l'expression de R1.

Des expériences avec des versions d'UL24 portant des substitutions des résidus hautement conservés (E99, K101 et G121), particulièrement dans le domaine putatif d'endonucléase PD-(D/E)-XK, ont montré un rétablissement de l'expression de R1. Ces résultats démontrent que ces résidus, et possiblement le domaine d'endonucléase, sont importants pour la diminution de l'expression de R1. Les substitutions des résidus hautement conservés d'UL24 pourraient cibler des résidus importants pour des interactions protéine-protéine, protéine-nucléotide ou affecter le repliement d'UL24 ou la stabilité de l'ADN. Sachant qu'un virus présentant la substitution G121A n'induit pas un effet dans la réplication virale contrairement au virus présentant des mutations dans le site putatif d'endonucléase (E99 et K101), ces observations suggèrent que la régulation de l'expression de R1 par UL24 n'est pas importante pour la réplication virale. Même si avec ce virus nous n'observons pas de différence au niveau de l'efficacité de réplication dans le contexte étudié, nous ne pouvons pas écarter l'importance de cet effet dans d'autres contextes d'infection. Néanmoins, un effet au niveau du maintien de la latence, tout comme

ce qui avait été suggéré pour UL76, peut être envisagé pour UL24 d'HSV-1 (Wang et al., 2004).

1.2 UL24 affecte l'expression de multiple gènes viraux

Pour analyser l'importance de ce rôle régulateur d'UL24, il est primordial de déterminer si cet effet est spécifique à *R1*, aux gènes de la même classe cinétique ou s'il s'étend d'avantage et pourrait même affecter l'expression de gènes cellulaires. Pour étudier cette spécificité, des représentants des gènes viraux et de gènes non-viraux ont été choisis pour quantifier leurs expressions en présence ou en absence d'UL24 dans un contexte de transfection transitoire. La quantification des transcrits a été faite par « Northern blot ». Les quantités de transcrits viraux ont été standardisées par rapport aux quantités de transcrits endogènes de l'ARN ribosomal 18S. L'expression des protéines a été observée par immunobuvardage et leurs expressions ont été comparées à l' α -tubuline, une protéine exprimée de manière constitutive. Les protéines virales choisies sont : ICP27, TK, R2 et gC. ICP27 est une protéine de cinétique immédiat-précoce responsable entre autres du blocage de la terminaison de la transcription des ARNm cellulaires (Rutkowski et al., 2015). TK est une kinase à cinétique précoce capable de phosphoryler les purines et les pyrimidines (Kokoris and Black, 2009). R2 est une protéine à cinétique précoce et elle est la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase (Darling et al., 1989) et gC est une glycoprotéine virale à cinétique tardif (Jennings et al., 1987). Les protéines choisies n'ont pas de similitude de séquences entre elles mais elles sont exprimées à partir du même vecteur d'expression. On observe qu'UL24 affecte l'expression de chacune des protéines virales. Aussi, afin de tester si UL24 pourrait être autorégulée, on a co-transfecté des cellules COS-7 avec le plasmide qui code pour la protéine UL24 avec les substitutions E99 et K101 soit avec le vecteur vide soit avec le

plasmide qui code pour UL24. La version mutée d'UL24 migre plus rapidement que la version UL24 de type sauvage, comme on l'observe dans plusieurs des « blots » présentés dans cette thèse. Cette différence de taille est potentiellement due à l'absence de modification post-traductionnelles dans la protéine mutée. On observe que l'expression de la protéine HA-UL24 E99A/K101A est diminuée en présence de la protéine HA-UL24 de type sauvage. Ce résultat montre que la protéine UL24 est capable de réduire sa propre expression. De plus, nous avons démontré qu'UL24 n'affecte pas l'expression de GST, une protéine non-virale. Tous ces résultats supportent l'hypothèse d'un effet d'UL24 sur l'accumulation de transcrits viraux ou l'ADN viral.

1.3 UL24 n'affecte pas l'expression de mCherry

Les gènes d'HSV-1 se caractérisent par un contenu en guanidine et cytosine (GC) élevé (Brown, 2007) à la différence des gènes cellulaires et du gène qui code pour la protéine GST. Une hypothèse était de savoir si la protéine UL24 affecte l'expression de gènes cellulaires ou viraux qui ont une teneur élevée en GC. Pour ce faire, l'expression de la protéine mCherry a été analysée en présence et en absence d'UL24. mCherry est une protéine non-virale fluorescente qui a une teneur en GC élevé similaire à celle des gènes viraux (62.4%). On a observé que l'expression de la protéine mCherry n'est pas affectée par UL24 en contexte de transfection transitoire. Ces résultats suggèrent qu'UL24 affecte spécifiquement les gènes viraux et qu'un pourcentage de GC élevé dans les gènes n'est pas suffisant pour induire une reconnaissance de la part d'UL24. La reconnaissance de gènes par UL24 pourrait donc être due à la présence d'un ou plusieurs motifs dans les gènes viraux. Si cette hypothèse s'avère correcte, le ou les motifs pourraient se retrouver aussi chez des gènes cellulaires. On sait qu'UL76 du HCMV régule l'expression d'un gène cellulaire, l'IL-8, de manière indirecte via l'activation

de la réponse au dommage de l'ADN (Costa et al., 2013; Murayama et al., 1994). On pourrait donc imaginer qu'UL24 pourrait jouer un rôle dans l'expression de certaines protéines cellulaires.

1.4 UL24 affecte l'accumulation des transcrits de R1 mais pas leur stabilité

Lors d'expériences réalisées pour mon projet de maîtrise, nous avons observé que la diminution de la quantité de R1 était indépendante de la dégradation protéique via le protéasome et le lysosome. Sachant que l'intégrité de la protéine R1 ne semble pas être affecté par UL24, un effet sur l'accumulation des transcrits a été envisagé. Pour étudier cette hypothèse nous avons quantifié les transcrits de *R1* en présence et en absence d'UL24 de type sauvage ou des versions mutées d'UL24 (E99A/K101A et G121A). Des résultats de « Northern blot » montrent une diminution de la quantité de transcrits de *R1* en présence d'UL24. Par contre, cet effet n'est pas observé quand les cellules sont co-transfectées avec des plasmides codant pour des versions mutées d'UL24. Ces résultats nous indiquent que la protéine UL24 affecte l'accumulation des transcrits de *R1* et que ces résidus sont importants pour sa fonction.

On s'est donc intéressé au mécanisme par lequel UL24 affecte l'accumulation des transcrits de *R1*. Nous avons testée si elle affecte la stabilité de ces transcrits. Pour ce faire, nous avons déterminé la demie-vie des transcrits de R1 en présence et en absence d'UL24. Le plasmide qui code pour la protéine UL24 est transfecté 24 heures après le plasmide qui code pour R1 afin de pouvoir évaluer l'effet d'UL24 sur l'expression de l'ARN de *R1*. La transcription des ARNm a été inhibée par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. La protéine UL24 est présente dans les cellules pendant 24 heures avant de faire le traitement avec l'actinomycine D. La stabilité des transcrits ont été évaluée par « Northern Blot ». La demie-vie des transcrits de *R1* est d'approximativement six heures et

nos résultats démontrent que la présence d'UL24 n'a pas d'effet sur cette demie-vie. Nos résultats, à date, suggérant que la protéine UL24 et non ses transcrits est responsable de l'effet sur les transcrits de *R1*. Pour cette raison, l'absence de transcription d'UL24 lors de l'ajout de l'actinomycine D dans cette expérience ne devrait pas impacter le résultat. Néanmoins, la présence de la protéine UL24 n'a pas été directement évaluée dans cette expérience. Des études de « pulse chase » pourrait être entamés afin de vérifier l'hypothèse que la présence de la protéine UL24 pourrait être affectée par l'action de l'actinomycine D. Les résultats obtenus montrent qu'UL24 n'affecte pas la stabilité des transcrits de *R1*.

1.5 UL24 affecte la stabilité de l'ADN plasmidique qui code des gènes viraux

UL24 affecte l'accumulation des transcrits de *R1* mais elle n'affecte pas la stabilité de ces transcrits. Nous avons voulu déterminer si l'effet d'UL24 s'accomplissait au niveau de la transcription. Nous avons testée si la protéine UL24 affecte la transcription du gène *R1*. Des analyses préliminaires de nuclear run-on ont été faits pour d'évaluer le taux de synthèse des transcrits de *R1* en présence et en absence d'UL24. Ces résultats démontrent qu'UL24 diminue le taux de synthèse des transcrits de *R1*. Tous ces résultats appuient l'hypothèse d'un effet d'UL24 sur la production des transcrits viraux.

L'effet d'UL24 sur la production de transcrits de *R1* peut être dû à un effet sur le recrutement ou les fonctions de la machinerie de transcription, mais aussi sur la stabilité de l'ADN qui sert de matrix. On sait que la protéine UL76 du HCMV est capable induire des dommages à l'ADN causant ainsi des aberrations chromosomiques (Siew et al., 2009). Nous avons donc débuté par tester si la protéine UL24 affecte l'intégrité de l'ADN. Nous avons évalué, en contexte de transfection transitoire, la quantité d'ADN plasmidique total en présence et en absence d'UL24. Les résultats indiquent qu'UL24 affecte les niveaux d'ADN

plasmidique qui codent pour des gènes viraux, mais elle n'affecte pas l'intégrité de l'ADN plasmidique qui code pour des protéines non virales. Ces résultats suggèrent qu'UL24 affecte spécifiquement l'intégrité de l'ADN viral, potentiellement en utilisant son domaine d'endonucléase. Ces résultats semblent être contradictoires avec les résultats obtenus lors de l'infection avec un virus déficient en UL24. Dans ce contexte, nous avons observé moins d'ADN viral lors de l'infection avec le virus vBAC_UL24neg par rapport au virus de type sauvage ou « rescue ». Cette différence pourrait être due à un retard dans l'entrée du virus vBAC_UL24neg dans la cellule. Dans ces conditions, les résultats obtenus ne semblent pas suffisants pour évaluer l'effet d'UL24 sur l'ADN viral en contexte d'infection. Toutefois, lors de l'infection, la présence des autres protéines virales peut aussi avoir un impact sur l'ADN viral, ce qui rend plus difficile l'étude de l'effet d'UL24 sur l'ADN viral en contexte d'infection par rapport à l'étude en contexte de transfection transitoire. Des études plus approfondies pourront nous permettre de mieux évaluer l'impact d'UL24 sur l'ADN viral en contexte d'infection.

Nonobstant, les résultats ne nous permettent pas d'éliminer la possibilité qu'UL24 puisse aussi avoir un effet au niveau de l'ADN cellulaire comme ce qui a été observé pour UL76 d'HCMV.

1.6 UL24 reconnaît un motif dans la région codante des gènes viraux

Nous avons voulu déterminer le mécanisme par lequel UL24 reconnaît spécifiquement certains gènes viraux. Les résultats obtenus suggèrent un effet au niveau de la stabilité de l'ADN. Afin de déterminer si UL24 est directement responsable de la dégradation de l'ADN plasmidique, nous avons tenté de produire un modèle de la structure tridimensionnelle de la protéine et son annotation. Malgré, l'utilisation de deux programmes différents (I-TASSER et ROBETTA) les résultats obtenus étaient en bas du

seuil de confiance. Les résultats ne nous permettent d'utiliser les modèles prédits pour étudier l'implication d'UL24 sur la régulation de l'expression de gènes viraux.

La reconnaissance des gènes viraux pourrait être due à la présence d'un ou des motifs dans les gènes viraux susceptible à la régulation par UL24, potentiellement lié à un contenu élevé en GC. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons créé une librairie de quatre plasmides codant pour des fragments du transcrit *R1* (C1, C2, C3 et C4) et nous avons testé si UL24 réduit l'expression de ces fragments. Les résultats nous montrent qu'UL24 semble affecter l'expression des quatre fragments de *R1*. Il est hautement probable que la structure de *R1* est affectée sous ces conditions, mais UL24 est tout de même capable de reconnaître les fragments de *R1* de manière indépendante. Par conséquence, l'hypothèse qu'UL24 reconnaîtrait une structure dans les séquences codantes des gènes viraux ne semble plus être plausible, sachant qu'un alignement des 4 fragments de *R1* ne nous a pas permis d'identifier un élément qui induit la susceptibilité d'UL24. Par contre, ces résultats suggèrent la présence de plusieurs motifs dans la séquence d'ADN de *R1* pouvant induire une susceptibilité à UL24. Néanmoins, on ne peut pas éliminer la possibilité qu'un petit élément présent dans chaque fragment puisse être reconnu par UL24.

Par la suite, nous avons testé si un motif reconnu par UL24 peut être transférable à un gène non viral. Nous avons choisi la protéine mCherry pour faire ce transfert. Nous avons créé un plasmide chimère mCherry avec le fragment C1 de *R1* dans sa partie C-terminale (mCherry-C1). Des cellules COS-7 ont été co-transfectées avec le plasmide chimère et un vecteur vide ou le plasmide qui code pour la protéine HA-UL24. Les protéines ont été extraites et analysées par immunobuvardage de type Western. Les résultats nous montrent qu'UL24 affecte l'expression de la protéine chimère mCherry-C1. Le fragment C1 de *R1* est donc suffisant pour induire une reconnaissance de la part

d'UL24. Une sous-fragmentation de C1 pourrait aider à identifier la ou les séquences spécifiques reconnues par UL24.

1.7 UL24 affecte l'accumulation de transcrits viraux lors de l'infection

Les résultats obtenus grâce à des vecteurs d'expression en contexte de transfection suggèrent un nouveau mécanisme de régulation chez HSV-1. Nous avons regardé si l'effet observé en transfection était également constaté en infection, en étudiant l'impact d'UL24 sur l'expression de *TK*, *R2* et *R1* en contexte d'infection. Pour ce faire, des cellules VERO ont été infectés avec les virus suivants: un virus de type sauvage vBAC_KOS, un virus déficient en UL24 (vBAC_UL24neg) et un virus « rescue » (vBAC_UL24neg Rescue). À différents temps post-infection (6, 9, 12, 15 et 18 h.p.i), les protéines, les transcrits et l'ADN viral ont été récoltés et analysés par Western, «Northern» et «Slot» blot. Les quantités de transcrits viraux ont été standardisées par rapport au nombre de génomes viraux présents. Les niveaux des protéines virales testées semblent être inférieurs pour le virus déficient en UL24 par rapport au virus de type sauvage et « rescue » à 9 h.p.i. Ce résultat reflète la réduction dans la réplication virale des virus déficient en UL24. Cependant, à des temps tardif de l'infection la différence entre les trois virus semble être moins prononcée. D'un autre côté, à 9 et 12 h.p.i., lorsque la protéine UL24 se retrouve dans le noyau (Lymberopoulos and Pearson, 2007; Pearson and Coen, 2002), l'on observe une suraccumulation statistiquement significative de la quantité de transcrits de *R1* et *R2* par rapport à la quantité d'ADN viral chez un virus déficient en UL24 relatif aux témoins. Cette tendance est maintenue à 15 et 18 h.p.i mais la différence n'est pas statistiquement significative. Il est intéressant d'observer que l'amplitude de l'impact sur les niveaux de transcrits corrèle avec un changement de localisation de la protéine UL24, qui est transloquée du noyau vers la région péri-

nucléaire lors de l'infection lytique. Ces résultats appuient notre hypothèse que la régulation de l'expression de gènes viraux par UL24 observée en transfection est également constatée en contexte d'infection.

L'homologue d'UL24 chez HCMV, UL76 a été montré comme étant capable de réguler l'expression de son gène adjacent UL77. Les auteurs montrent une régulation à la baisse de l'expression d'UL77 et ils suggèrent que le mécanisme impliqué dans cette diminution est la re-initiation de la traduction (Isomura et al., 2010). Ce mécanisme ne semble pas être responsable de l'effet observé dans les expériences montrées dans cette thèse. Même si UL24 et UL23 se chevauchent de manière partielle, UL24 ne chevauche pas R1, R2 ou ICP27. D'autant plus que nos résultats suggèrent que c'est la protéine UL24 et non les transcrits qui est responsable de l'effet dans l'expression de gènes viraux.

1.8 UL24 du B-virus affecte l'expression de R1

La protéine UL24 est conservée chez les *Herpesviridae*. De plus, un rôle de régulation de l'expression génique a été décrit pour UL76 d'HCMV, un des orthologues d'UL24. Il est donc raisonnable de spéculer que la fonction de régulation décrite dans cette thèse pourrait être conservée chez d'autres Alphaherpesvirus. Afin de vérifier cette hypothèse, un vecteur d'expression contenant l'orthologue d'UL24 chez le B-virus a été créé. La protéine UL24 du virus HSV-1 a une similitude de la séquence d'acide aminé de 78% avec la protéine UL24 du B-virus. Les variations de l'expression de R1 en co-transfection avec ce vecteur ont été évaluées à l'aide des techniques évoquées auparavant. Nous avons observé une diminution de l'expression de GST-R1 en présence d'UL24 du B-virus. Ces résultats appuient l'hypothèse que la fonction de régulation de l'expression de gènes viraux d'UL24 n'est pas spécifique à HSV-1 et semble inclure au moins les membres de la famille des *Alphaherpesvirinae* et un membre de la famille des

Betaherpesvirinae. Des études futures sont en cours dans notre laboratoire afin de décoder le mécanisme par lequel UL24 affecte l'expression de gènes viraux et l'impact de cet effet sur l'hôte.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

En perspective, nous avons voulu déterminer par quel mécanisme UL24 identifie et régule à la baisse l'expression des gènes viraux. Les éléments dont nous disposons jusqu'à présent ne nous permettent pas de décrire précisément ce mécanisme d'action au cours de l'infection. Néanmoins, nous proposons un modèle où UL24 pourrait jouer un rôle de régulation de l'expression de gènes viraux dans les temps tardifs de l'infection afin de promouvoir la traduction de transcrits déjà présents dans le cytoplasme. L'effet d'UL24 sur l'expression de gènes viraux peut s'avérer complémentaire à d'autres fonctions connues et inconnues de la protéine UL24. Des études plus approfondies sur le domaine d'endonucléase d'UL24 et son impact direct sur l'ADN viral pourraient aider à identifier le mécanisme impliqué dans la régulation de l'expression de gènes viraux et même l'impact potentiel sur la réplication et la transcription virale. Aussi, on sait que lors de l'infection, des réactivations spontanées à partir de l'état de latence n'aboutissent pas à la production de virus (Wilson and Mohr, 2012). On propose donc qu'UL24 pourrait contribuer au maintien de la latence en régulant à la baisse l'accumulation de transcrits viraux lytiques dans les neurones. Des études futures pourraient se focaliser sur l'identification de la présence d'UL24 lors de l'infection latente et son impact sur la réactivation.

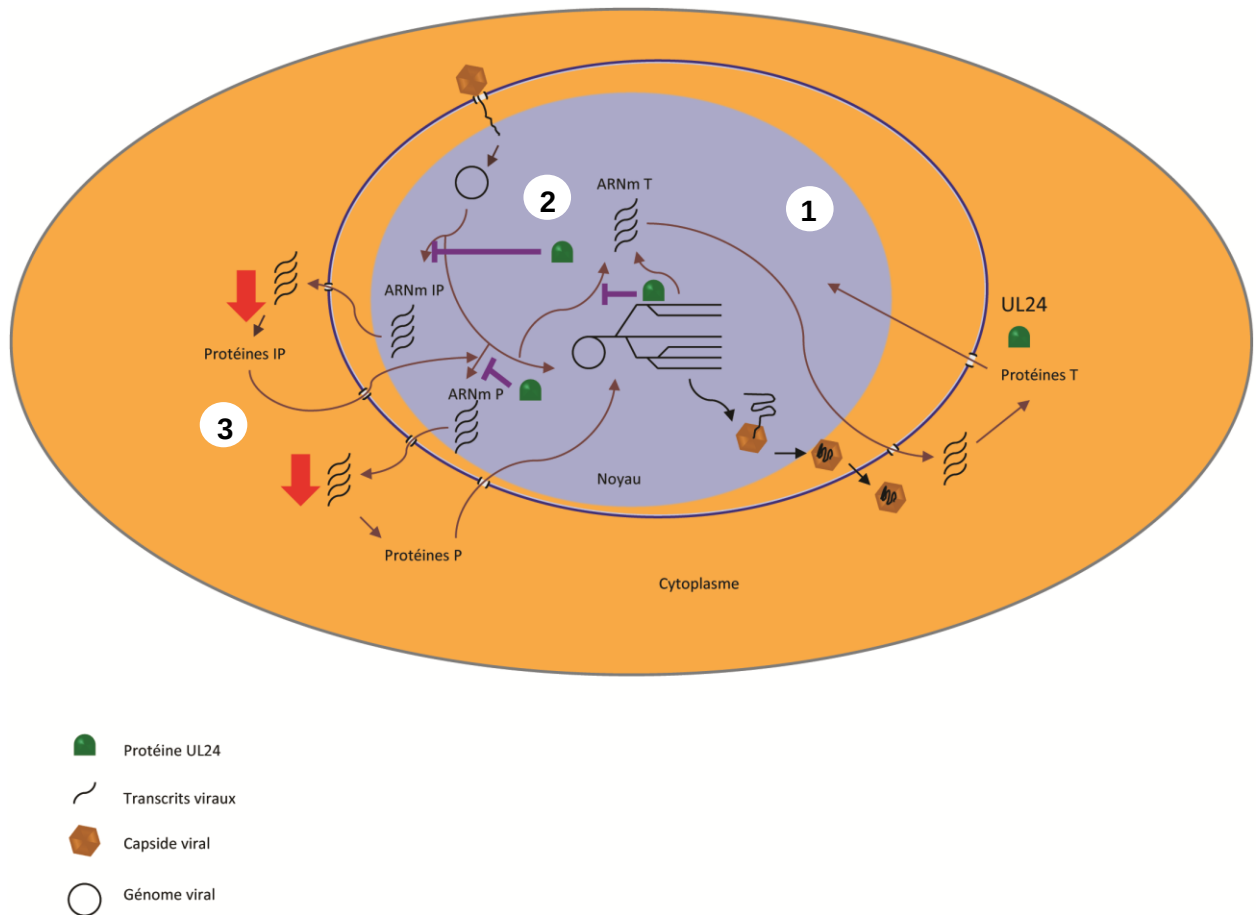


Figure 1 : Modèle de l'effet d'UL24 sur l'expression de gènes viraux lors de l'infection lytique.

Lorsque la protéine UL24 se localise dans le noyau (1) elle induirait une diminution de l'expression de gènes viraux (2) afin de diminuer la quantité de transcrits viraux produits dans les temps tardifs de l'infection. Ainsi, elle favoriserait la traduction des transcrits viraux déjà présents dans le cytoplasme (3). Ensuite, la protéine UL24 se localise majoritairement dans le cytoplasme et la région périnucléaire ce qui pourrait correspondre avec une diminution de l'effet observé sur l'accumulation des transcrits dans les temps «true late» de l'infection.

RÉFÉRENCES

- Aggarwal, A., Miranda-Saksena, M., Boadle, R.A., Kelly, B.J., Diefenbach, R.J., Alam, W., and Cunningham, A.L. (2012). Ultrastructural Visualization of Individual Tegument Protein Dissociation during Entry of Herpes Simplex Virus 1 into Human and Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Virology* 86, 6123–6137.
- Al-Dujaili, L.J., Clerkin, P.P., Clement, C., McFerrin, H.E., Bhattacharjee, P.S., Varnell, E.D., Kaufman, H.E., and Hill, J.M. (2011). Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiology* 6, 877–907.
- Allen, G.P., and Bryans, J.T. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*. 2, 78–144.
- Alwine, J. (1974). Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology* 60, 302–307.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.
- Aravind, L. (2000). SURVEY AND SUMMARY: Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Research* 28, 3417–3432.
- Arduino, P.G., and Porter, S.R. (2007). Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features*: HSV-1 literature review. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 37, 107–121.
- Arias, C., Weisburd, B., Stern-Ginossar, N., Mercier, A., Madrid, A.S., Bellare, P., Holdorf, M., Weissman, J.S., and Ganem, D. (2014). KSHV 2.0: A Comprehensive Annotation of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Using Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genomic and Functional Features. *PLoS Pathogens* 10, e1003847.
- Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Imai, T., Minowa, A., Akashi, H., Arase, H., Kawaoka, Y., et al. (2010). Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467, 859–862.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P., Roizman, B., Whitley, R., and Yamanishi, K. (2007). Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Chapter 9, Initiation of transcription and RNA synthesis, processing and transport in HSV and VZV infected cells. (Cambridge University Press).
- Ashley, R., Mertz, G.J., and Corey, L. (1987). Detection of asymptomatic herpes simplex virus infections after vaccination. *Journal of Virology*. 61, 264–268.
- Aubert, M., Chen, Z., Lang, R., Dang, C.H., Fowler, C., Sloan, D.D., and Jerome, K.R. (2008). The Antiapoptotic Herpes Simplex Virus Glycoprotein J Localizes to Multiple Cellular Organelles and Induces Reactive Oxygen Species Formation. *Journal of Virology* 82, 617–629.

Avitabile, E., Lombardi, G., and Campadelli-Fiume, G. (2003). Herpes Simplex Virus Glycoprotein K, but Not Its Syncytial Allele, Inhibits Cell-Cell Fusion Mediated by the Four Fusogenic Glycoproteins, gD, gB, gH, and gL. *Journal of Virology* 77, 6836–6844.

Avitabile, E., Lombardi, G., Gianni, T., Capri, M., and Campadelli-Fiume, G. (2004). Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *Journal of Virology*. 78, 8015–8025.

Backovic, M., and Jardetzky, T.S. (2011). Class III viral membrane fusion proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 714, 91–101.

Baines, J.D., and Pellet, P.E. (2007). Genetic comparison of human alphaherpesvirus genomes - Human Herpesviruses - Chapter 5 (Cambridge University Press).

Ban, C. (1998). Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *The EMBO Journal* 17, 1526–1534.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

Bastian, T.W., Livingston, C.M., Weller, S.K., and Rice, S.A. (2010). Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP22 Is Required for VICE Domain Formation during Productive Viral Infection. *Journal of Virology* 84, 2384–2394.

Belfort, M., and Weiner, A. (1997). Another bridge between kingdoms: tRNA splicing in archaea and eukaryotes. *Cell* 89, 1003–1006.

Ben Abdeljelil, N., Rochette, P.-A., and Pearson, A. (2013). The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* 444, 263–273.

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, 1142–1151.

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

Besser, J., Ikoma, M., Fabel, K., Sommer, M.H., Zerboni, L., Grose, C., and Arvin, A.M. (2004). Differential requirement for cell fusion and virion formation in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection in skin and T cells. *Journal of Virology*. 78, 13293–13305.

De Bettignies, G., and Coux, O. (2010). Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie* 92, 1530–1545.

Biberstein, H.H., and Jessner, M. (1958). Experiences with herpin in recurrent herpes simplex together with a review and analysis of the literature on the use of CNS-substance as a virus-antigen-carrier. *Dermatologica* 117, 267–287.

- Blakeney, S., Kowalski, J., Tummolo, D., DeStefano, J., Cooper, D., Guo, M., Gangolli, S., Long, D., Zamb, T., Natuk, R.J., et al. (2005a). Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *Journal of Virology*. 79, 10498–10506.
- Blakeney, S., Kowalski, J., Tummolo, D., DeStefano, J., Cooper, D., Guo, M., Gangolli, S., Long, D., Zamb, T., Natuk, R.J., et al. (2005b). Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and guinea pig disease models. *Journal of Virology*. 79, 10498–10506.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 574–585.
- Boukhvalova, M., McKay, J., Mbaye, A., Sanford-Crane, H., Blanco, J.C.G., Huber, A., and Herold, B.C. (2015). Efficacy of the Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Glycoprotein D/AS04 Vaccine against Genital HSV-2 and HSV-1 Infection and Disease in the Cotton Rat *Sigmodon hispidus* Model. *Journal of Virology*. 89, 9825–9840.
- Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R.D. (2002). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *Journal of Virology*. 76, 841–850.
- Boutell, C., Orr, A., and Everett, R.D. (2003). PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *Journal of Virology* 77, 8686–8694.
- Boutell, C., Everett, R., Hilliard, J., Schaffer, P., Orr, A., and Davido, D. (2008). Herpes simplex virus type 1 ICP0 phosphorylation mutants impair the E3 ubiquitin ligase activity of ICP0 in a cell type-dependent manner. *Journal of Virology* 82, 10647–10656.
- Boutell, C., Cuchet-Lourenço, D., Vanni, E., Orr, A., Glass, M., McFarlane, S., and Everett, R.D. (2011). A Viral Ubiquitin Ligase Has Substrate Preferential SUMO Targeted Ubiquitin Ligase Activity that Counteracts Intrinsic Antiviral Defence. *PLoS Pathogens* 7, e1002245.
- Brain, R.T. (1938). BIOLOGICAL THERAPY IN VIRUS DISEASES.*. *British Journal of Dermatology* 48, 21–26.
- Brown, J.C. (2007). High G+C Content of Herpes Simplex Virus DNA: Proposed Role in Protection Against Retrotransposon Insertion. *The Open Biochemistry Journal* 1, 33–42.
- Bryant, H.E., Wadd, S.E., Lamond, A.I., Silverstein, S.J., and Clements, J.B. (2001). Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *Journal of Virology*. 75, 4376–4385.
- Bryant, K.F., Colgrove, R.C., and Knipe, D.M. (2011). Cellular SNF2H chromatin-remodeling factor promotes herpes simplex virus 1 immediate-early gene expression and replication. *MBio* 2, e00330–00310.
- Cai, W.H., Gu, B., and Person, S. (1988). Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *Journal of Virology*. 62, 2596–2604.

- Carvalho, R.F., Spilki, F.R., Cunha, E.M., Stocco, R.C., and Arns, C.W. (2012). Molecular data of UL24 homolog gene (ORF37) from Brazilian isolates of equine herpesvirus type 1. *Research in Veterinary Science* 93, 494–497.
- Chakrabarti, S., Bonneau, F., Schussler, S., Eppinger, E., and Conti, E. (2014). Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5-SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Research* 42, 9447–9460.
- Chayavichitsilp, P., Buckwalter, J.V., Krakowski, A.C., and Friedlander, S.F. (2009). Herpes simplex. *Pediatric Reviews* 30, 119–129; quiz 130.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., and Martignetti, J.A. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 154, 125–169.
- Chen, I.-H.B., Sciabica, K.S., and Sandri-Goldin, R.M. (2002). ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *Journal of Virology*. 76, 12877–12889.
- Chen, I.-H.B., Li, L., Silva, L., and Sandri-Goldin, R.M. (2005). ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *Journal of Virology*. 79, 3949–3961.
- Chowdary, T.K., Cairns, T.M., Atanasiu, D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Heldwein, E.E. (2010). Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 882–888.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y.J.T., and Shukla, D. (2006). A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *The Journal of Cell Biology* 174, 1009–1021.
- 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, 8182–8190.
- C. M., Preston, and S., Efstathiou (2007). Molecular basis of HSV latency and reactivation - Human Herpesviruses - Chapter 33 (Cambridge University Press).
- Cocchi, F., Fusco, D., Menotti, L., Gianni, T., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., and Campadelli-Fiume, G. (2004). The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 101, 7445–7450.
- Cockrell, S.K., Sanchez, M.E., Erazo, A., and Homa, F.L. (2008). Role of the UL25 Protein in Herpes Simplex Virus DNA Encapsidation. *Journal of Virology* 83, 47–57.
- Coen, D.M., Weinheimer, S.P., and McKnight, S.L. (1986). A genetic approach to promoter recognition during trans induction of viral gene expression. *Science* 234, 53–59.

Coen, D.M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J.G., Leib, D.A., Bogard, C.L., Schaffer, P.A., Tyler, K.L., and Knipe, D.M. (1989). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86, 4736–4740.

Cohen, E.A., Gaudreau, P., Brazeau, P., and Langelier, Y. (1986). Neutralization of herpes simplex virus ribonucleotide reductase activity by an oligopeptide-induced antiserum directed against subunit H2. *Journal of Virology*. 60, 1130–1133.

Cole, N.L., and Grose, C. (2003). Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Reviews in Medical Virology* 13, 207–222.

Coleman, J.L., and Shukla, D. (2013). Recent advances in vaccine development for herpes simplex virus types I and II. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9, 729–735.

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

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

Cooper, Geoffrey M., and Hausman, R. E. (2009). *The Cell. Chapter 7 RNA Synthesis and Processing.* (Sinauer Associates Inc).

Corey, L., Adams, H.G., Brown, Z.A., and Holmes, K.K. (1983). Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Annals of Internal Medicine* 98, 958–972.

Costa, H., Nascimento, R., Sinclair, J., and Parkhouse, R.M.E. (2013). Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response. *PLoS Pathogens*. 9, e1003609.

Cotter, C.R., Kim, W.-K., Nguyen, M.L., Yount, J.S., López, C.B., Blaho, J.A., and Moran, T.M. (2011). The Virion Host Shutoff Protein of Herpes Simplex Virus 1 Blocks the Replication-Independent Activation of NF- κ B in Dendritic Cells in the Absence of Type I Interferon Signaling. *Journal of Virology*. 85, 12662–12672.

Cui, C., Griffiths, A., Li, G., Silva, L.M., Kramer, M.F., Gaasterland, T., Wang, X.-J., and Coen, D.M. (2006). Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *Journal of Virology*. 80, 5499–5508.

Cullen, B.R. (2000). Connections between the processing and nuclear export of mRNA: evidence for an export license? *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97, 4–6.

Cun, W., Guo, L., Zhang, Y., Liu, L., Wang, L., Li, J., Dong, C., Wang, J., and Li, Q. (2009). Transcriptional regulation of the Herpes Simplex Virus 1 alpha-gene by the viral immediate-early protein ICP22 in association with VP16. *Science in China Series C-Life Sciences* 52, 344–351.

- Dahlroth, S.-L., Gurmu, D., Schmitzberger, F., Engman, H., Haas, J., Erlandsen, H., and Nordlund, P. (2009). Crystal structure of the shutoff and exonuclease protein from the oncogenic Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *FEBS J.* 276, 6636–6645.
- Darling, A.J., McKay, E.M., Ingemarson, R., and Preston, V.G. (1989). Reconstitution of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase activity from the large and small subunits. *Virus Genes* 2, 187–194.
- Dauber, B., Pelletier, J., and Smiley, J.R. (2011). The Herpes Simplex Virus 1 vhs Protein Enhances Translation of Viral True Late mRNAs and Virus Production in a Cell Type-Dependent Manner. *Journal of Virology* 85, 5363–5373.
- Dauber, B., Saffran, H.A., and Smiley, J.R. (2014). The Herpes Simplex Virus 1 Virion Host Shutoff Protein Enhances Translation of Viral Late mRNAs by Preventing mRNA Overload. *Journal of Virology* 88, 9624–9632.
- Davis, L.E., and McLaren, L.C. (1983). Relapsing herpes simplex encephalitis following antiviral therapy. *Annals of Neurology* 13, 192–195.
- Davison, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology* 143, 52–69.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., and Thiry, E. (2008). The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171–177.
- Dembowski, J.A., and DeLuca, N.A. (2015). Selective recruitment of nuclear factors to productively replicating herpes simplex virus genomes. *PLoS Pathogens*. 11, e1004939.
- Döhner, K., and Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 285, 67–108.
- Dominguez, G., Dambaugh, T.R., Stamey, F.R., Dewhurst, S., Inoue, N., and Pellett, P.E. (1999). Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *Journal of Virology*. 73, 8040–8052.
- 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 U.S.A.* 108, 18820–18824.
- Dufour, F., Sasseville, A.M.-J., Chabaud, S., Massie, B., Siegel, R.M., and Langelier, Y. (2011). The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* 16, 256–271.
- Dundarov, S., Andonov, P., Bakalov, B., Nechev, K., and Tomov, C. (1982). Immunotherapy with inactivated polyvalent herpes vaccines. *Developments in Biological Standardization* . 52, 351–358.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 14223–14228.

- Elgadi, M.M., Hayes, C.E., and Smiley, J.R. (1999). The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts. *Journal of Virology*. 73, 7153–7164.
- Enquist, L.W., Husak, P.J., Banfield, B.W., and Smith, G.A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances in Virus Research*. 51, 237–347.
- Everett, R.D., Boutell, C., Pheasant, K., Cuchet-Lourenço, D., and Orr, A. (2014). Sequences related to SUMO interaction motifs in herpes simplex virus 1 protein ICP0 act cooperatively to stimulate virus infection. *Journal of Virology*. 88, 2763–2774.
- Everly, D.N., Jr, Feng, P., Mian, I.S., and Read, G.S. (2002). mRNA degradation by the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: genetic and biochemical evidence that Vhs is a nuclease. *Journal of Virology*. 76, 8560–8571.
- Fatahzadeh, M., and Schwartz, R. (2007). Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57, 737–763.
- Feldman, E.R., and Tibbetts, S.A. (2015). Emerging Roles of Herpesvirus microRNAs During In Vivo Infection and Pathogenesis. *Current Pathobiology Reports* 3, 209–217.
- Flore, O., Rafii, S., Ely, S., O’Leary, J.J., Hyjek, E.M., and Cesarman, E. (1998). Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus. *Nature* 394, 588–592.
- Foster, T.P., Melancon, J.M., Baines, J.D., and Kousoulas, K.G. (2004). The Herpes Simplex Virus Type 1 UL20 Protein Modulates Membrane Fusion Events during Cytoplasmic Virion Morphogenesis and Virus-Induced Cell Fusion. *Journal of Virology* 78, 5347–5357.
- Foster, T.P., Chouljenko, V.N., and Kousoulas, K.G. (2008). Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *Journal of Virology*. 82, 6310–6323.
- Frank, S.B. (1938). Formolized Herpes Virus Therapy and the Neutralizing Substance in Herpes Simplex¹¹From the Dermatology Department, Vanderbilt Clinic (Professor J. Gardner Hopkins); the Bacteriology Department) College of Physicians and Surgeons, (Professor Frederick P. Gay), and the New York Post-Graduate Medical School and Hospital, Skin and Cancer Unit, (George M. MacKee, Director), of Columbia University. *Journal of Investigative Dermatology* 1, 267–282.
- Frith, M.C., Saunders, N.F.W., Kobe, B., and Bailey, T.L. (2008). Discovering Sequence Motifs with Arbitrary Insertions and Deletions. *PLoS Computational Biology* 4, e1000071.
- Gaglia, M.M., Covarrubias, S., Wong, W., and Glaunsinger, B.A. (2012). A common strategy for host RNA degradation by divergent viruses. *Journal of Virology*. 86, 9527–9530.
- Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2002). REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *The Journal of Cell Biology* 159, 579–588.
- Geiss, B.J., Smith, T.J., Leib, D.A., and Morrison, L.A. (2000). Disruption of virion host shutoff activity improves the immunogenicity and protective capacity of a replication-incompetent herpes simplex virus type 1 vaccine strain. *Journal of Virology*. 74, 11137–11144.

Grose, C., Buckingham, E.M., Jackson, W., and Carpenter, J.E. (2015). The pros and cons of autophagic flux among herpesviruses. *Autophagy* 11, 716–717.

Grunewald, K. (2003). Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* 302, 1396–1398.

Gu, H., and Roizman, B. (2009). The Two Functions of Herpes Simplex Virus 1 ICP0, Inhibition of Silencing by the CoREST/REST/HDAC Complex and Degradation of PML, Are Executed in Tandem. *Journal of Virology* 83, 181–187.

Gu, H., Liang, Y., Mandel, G., and Roizman, B. (2005). Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 102, 7571–7576.

Gu, H., Zheng, Y., and Roizman, B. (2013). Interaction of Herpes Simplex Virus ICP0 with ND10 Bodies: a Sequential Process of Adhesion, Fusion, and Retention. *Journal of Virology* 87, 10244–10254.

Guo, L., Wu, W., Liu, L., Wang, L., Zhang, Y., Wu, L., Guan, Y., and Li, Q. (2012). Herpes simplex virus 1 ICP22 inhibits the transcription of viral gene promoters by binding to and blocking the recruitment of P-TEFb. *PLoS ONE* 7, e45749.

Hagglund, R., and Roizman, B. (2002). Characterization of the novel E3 ubiquitin ligase encoded in exon 3 of herpes simplex virus-1-infected cell protein 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99, 7889–7894.

Hagglund, R., and Roizman, B. (2004). Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*. 78, 2169–2178.

Hancock, M.H., Cliffe, A.R., Knipe, D.M., and Smiley, J.R. (2010). Herpes Simplex Virus VP16, but Not ICP0, Is Required To Reduce Histone Occupancy and Enhance Histone Acetylation on Viral Genomes in U2OS Osteosarcoma Cells. *Journal of Virology* 84, 1366–1375.

Hann, L.E., Cook, W.J., Uprichard, S.L., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (1998). The role of herpes simplex virus ICP27 in the regulation of UL24 gene expression by differential polyadenylation. *Journal of Virology*. 72, 7709–7714.

Hargett, D., McLean, T., and Bachenheimer, S.L. (2005). Herpes Simplex Virus ICP27 Activation of Stress Kinases JNK and p38. *Journal of Virology* 79, 8348–8360.

Hay, J., and Ruyechan, W.T. (2007). Alphaherpesvirus DNA replication. -Human herpesvirus-Chapter 10. (Cambridge University Press).

He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94, 843–848.

Henaff, D., Remillard-Labrosse, G., Loret, S., and Lippe, R. (2013). Analysis of the Early Steps of Herpes Simplex Virus 1 Capsid Tegumentation. *Journal of Virology* 87, 4895–4906.

- Herrera, F.J., and Triezenberg, S.J. (2004). VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *Journal of Virology*. 78, 9689–9696.
- Hickman, A.B., Li, Y., Mathew, S.V., May, E.W., Craig, N.L., and Dyda, F. (2000). Unexpected structural diversity in DNA recombination: the restriction endonuclease connection. *Molecular Cell* 5, 1025–1034.
- Hill, J.M., Zhao, Y., Clement, C., Neumann, D.M., and Lukiw, W.J. (2009). HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling. *Neuroreport* 20, 1500–1505.
- Holm, C.K., Jensen, S.B., Jakobsen, M.R., Cheshenko, N., Horan, K.A., Moeller, H.B., Gonzalez-Dosal, R., Rasmussen, S.B., Christensen, M.H., Yarovinsky, T.O., et al. (2012). Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING. *Nature Immunology* 13, 737–743.
- Honess, R.W., and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology*. 14, 8–19.
- Honess, R.W., and Roizman, B. (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 72, 1276–1280.
- Hong-Yan, Z., Murata, T., Goshima, F., Takakuwa, H., Koshizuka, T., Yamauchi, Y., and Nishiyama, Y. (2001). Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* 22, 321–327.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal* 30, 3481–3500.
- Huszar, D., and Bacchetti, S. (1981). Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. *Journal of Virology* 37, 580–588.
- Isomura, H., Stinski, M.F., Murata, T., Nakayama, S., Chiba, S., Akatsuka, Y., Kanda, T., and Tsurumi, T. (2010). The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PLoS ONE* 5, e11901.
- Ito, H., Sommer, M.H., Zerboni, L., Baiker, A., Sato, B., Liang, R., Hay, J., Ruyechan, W., and Arvin, A.M. (2005). Role of the varicella-zoster virus gene product encoded by open reading frame 35 in viral replication in vitro and in differentiated human skin and T cells in vivo. *Journal of Virology*. 79, 4819–4827.
- Jacobson, J.G., Martin, S.L., and Coen, D.M. (1989a). 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, 1839–1843.
- Jacobson, J.G., Martin, S.L., and Coen, D.M. (1989b). 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, 1839–1843.

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

Jahedi, S., Markovitz, N.S., Filatov, F., and Roizman, B. (1999). Colocalization of the herpes simplex virus 1 UL4 protein with infected cell protein 22 in small, dense nuclear structures formed prior to onset of DNA synthesis. *Journal of Virology*. 73, 5132–5138.

Jarvis, M.A., and Nelson, J.A. (2002). Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Current Opinion in Microbiology* 5, 403–407.

Jelic, I., and May, J.T. (2003). The UL24 consensus regions of bovine herpesvirus 2 isolate 554 and clinical isolates of herpes simplex viruses 1 and 2. *The Journal of General and Applied Microbiology* . 49, 363–366.

Jennings, S.R., Lippe, P.A., Pauza, K.J., Spear, P.G., Pereira, L., and Tevethia, S.S. (1987). Kinetics of expression of herpes simplex virus type 1-specific glycoprotein species on the surfaces of infected murine, simian, and human cells: flow cytometric analysis. *Journal of Virology*. 61, 104–112.

Jiang, X., Brown, D., Osorio, N., Hsiang, C., Li, L., Chan, L., BenMohamed, L., and Wechsler, S.L. (2015). A herpes simplex virus type 1 mutant disrupted for microRNA H2 with increased neurovirulence and rate of reactivation. *Journal of NeuroVirology* 21, 199–209.

Johnson, D.C., and Baines, J.D. (2011). Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature Reviews Microbiology*. 9, 382–394.

Johnson, D.C., and Spear, P.G. (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *Journal of Virology*. 43, 1102–1112.

Jones, F.E., Smibert, C.A., and Smiley, J.R. (1995). Mutational analysis of the herpes simplex virus virion host shutoff protein: evidence that vhs functions in the absence of other viral proteins. *Journal of Virology*. 69, 4863–4871.

Jurak, I., Kramer, M.F., Mellor, J.C., van Lint, A.L., Roth, F.P., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2010). Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2. *Journal of Virology*. 84, 4659–4672.

Jurak, I., Silverstein, L.B., Sharma, M., and Coen, D.M. (2012). Herpes simplex virus is equipped with RNA- and protein-based mechanisms to repress expression of ATRX, an effector of intrinsic immunity. *Journal of Virology*. 86, 10093–10102.

Kalamvoki, M., and Roizman, B. (2014). HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 111, E611–E617.

Karr, B.M., and Read, G.S. (1999). The virion host shutoff function of herpes simplex virus degrades the 5' end of a target mRNA before the 3' end. *Virology* 264, 195–204.

Kasem, S., Yu, M.H.H., Yamada, S., Kodaira, A., Matsumura, T., Tsujimura, K., Madbouly, H., Yamaguchi, T., Ohya, K., and Fukushi, H. (2010). The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity

determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400, 259–270.

Kasmi, I. El, and Lippé, R. (2015). Herpes Simplex Virus 1 gN Partners with gM To Modulate the Viral Fusion Machinery. *Journal of Virology* 89, 2313–2323.

Kelly, B.J., Fraefel, C., Cunningham, A.L., and Diefenbach, R.J. (2009). Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research*. 145, 173–186.

Kemp, M.G., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. (2011). The DNA damage response kinases DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and ataxia telangiectasia mutated (ATM) Are stimulated by bulky adduct-containing DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 19237–19246.

Kim, D.-B., Zabierowski, S., and DeLuca, N.A. (2002). The Initiator Element in a Herpes Simplex Virus Type 1 Late-Gene Promoter Enhances Activation by ICP4, Resulting in Abundant Late-Gene Expression. *Journal of Virology* 76, 1548–1558.

Kim, D.E., Chivian, D., and Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research* 32, W526–W531.

Kleymann, G. (2003). Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12, 165–183.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields virology* (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health).

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

Knizewski, Ł., Kinch, L., Grishin, N.V., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2006b). Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease. *Journal of Virology* 80, 2575–2577.

Kokoris, M.S., and Black, M.E. (2009). Characterization of Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity. *Protein Science* 11, 2267–2272.

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

Kramer, M.F., Jurak, I., Pesola, J.M., Boissel, S., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2011). Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia. *Virology* 417, 239–247.

Kristie, T.M., and Roizman, B. (1988). Differentiation and DNA contact points of host proteins binding at the cis site for virion-mediated induction of α genes of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 62, 1145–1157.

Kubat, N.J., Amelio, A.L., Giordani, N.V., and Bloom, D.C. (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, 12508–12518.

- Laganeckas, M., Margelevicius, M., and Venclovas, C. (2011). Identification of new homologs of PD-(D/E)XK nucleases by support vector machines trained on data derived from profile-profile alignments. *Nucleic Acids Research* 39, 1187–1196.
- Lakowski, B., Roelens, I., and Jacob, S. (2006). CoREST-like complexes regulate chromatin modification and neuronal gene expression. *Journal of Molecular Neuroscience* 29, 227–239.
- Lam, Q., Smibert, C.A., Koop, K.E., Lavery, C., Capone, J.P., Weinheimer, S.P., and Smiley, J.R. (1996). Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J.* 15, 2575–2581.
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi, R., and Glorioso, J.C. (1998). Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of Virology*. 72, 6119–6130.
- 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, 1109–1116.
- Leopardi, R., Ward, P.L., Ogle, W.O., and Roizman, B. (1997). Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the UL13 protein kinase. *Journal of Virology*. 71, 1133–1139.
- Leuzinger, H., Ziegler, U., Schraner, E.M., Fraefel, C., Glauser, D.L., Heid, I., Ackermann, M., Mueller, M., and Wild, P. (2005). Herpes Simplex Virus 1 Envelopment Follows Two Diverse Pathways. *Journal of Virology* 79, 13047–13059.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N.C., Kercher, M.A., Pace, H.C., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lu, P. (1996). Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer. *Science* 271, 1247–1254.
- Lin, S.-R., Jiang, M.J., Wang, H.-H., Hu, C.-H., Hsu, M.-S., Hsi, E., Duh, C.-Y., and Wang, S.-K. (2013). Human Cytomegalovirus UL76 Elicits Novel Aggresome Formation via Interaction with S5a of the Ubiquitin Proteasome System. *Journal of Virology* 87, 11562–11578.
- Liu, M., Rakowski, B., Gershburg, E., Weisend, C.M., Lucas, O., Schmidt, E.E., and Halford, W.P. (2010). ICP0 Antagonizes ICP4-Dependent Silencing of the Herpes Simplex Virus ICP0 Gene. *PLoS ONE* 5, e8837.
- Lomonte, P., Sullivan, K.F., and Everett, R.D. (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 5829–5835.
- Longman, D., Johnstone, I.L., and Cáceres, J.F. (2003). The Ref/Aly proteins are dispensable for mRNA export and development in *Caenorhabditis elegans*. *RNA* 9, 881–891.
- Lopez, P., Van Sant, C., and Roizman, B. (2001). Requirements for the nuclear-cytoplasmic translocation of infected-cell protein 0 of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*. 75, 3832–3840.

- Loret, S., Guay, G., and Lippe, R. (2008a). Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *Journal of Virology* 82, 8605–8618.
- Lu, P., Jones, F.E., Saffran, H.A., and Smiley, J.R. (2001). Herpes simplex virus virion host shutoff protein requires a mammalian factor for efficient in vitro endoribonuclease activity. *Journal of Virology*. 75, 1172–1185.
- Lukashchuk, V., and Everett, R.D. (2010). Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx. *Journal of Virology* 84, 4026–4040.
- Lymberopoulos, M.H., and Pearson, A. (2007). Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363, 397–409.
- Lymberopoulos, M.H., Bourget, A., Ben Abdeljelil, N., and Pearson, A. (2011). Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412, 341–348.
- Mackem, S., and Roizman, B. (1982). Structural features of the herpes simplex virus α gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer α regulation on chimeric thymidine kinase genes. *Journal of Virology* 44, 939–949.
- Maruzuru, Y., Shindo, K., Liu, Z., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Aii, J., Kato, A., and Kawaguchi, Y. (2014). Role of Herpes Simplex Virus 1 Immediate Early Protein ICP22 in Viral Nuclear Egress. *Journal of Virology* 88, 7445–7454.
- Matthews, R.E. (1979). Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 12, 129–296.
- McGeoch, D. (1995). Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* 247, 443–458.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., and Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* 69, 1531–1574.
- McGeoch, D.J., Cunningham, C., McIntyre, G., and Dolan, A. (1991). Comparative sequence analysis of the long repeat regions and adjoining parts of the long unique regions in the genomes of herpes simplex viruses types 1 and 2. *Journal of General Virology* 72 (Pt 12), 3057–3075.
- McGeoch, D.J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F.E., and Telford, E.A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* 247, 443–458.
- McGregor, F., Phelan, A., Dunlop, J., and Clements, J.B. (1996). Regulation of herpes simplex virus poly (A) site usage and the action of immediate-early protein IE63 in the early-late switch. *Journal of Virology*. 70, 1931–1940.
- Megaw, A.G., Rapaport, D., Avidor, B., Frenkel, N., and Davison, A.J. (1998). The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* 244, 119–132.

- Meng, L. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 10403–10408.
- Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology*. 76, 1537–1547.
- Milne, R.S.B., Nicola, A.V., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H. (2005). Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*. 79, 6655–6663.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427–436.
- Mostafa, H.H., and Davido, D.J. (2013). Herpes Simplex Virus 1 ICP22 but Not US1.5 Is Required for Efficient Acute Replication in Mice and VICE Domain Formation. *Journal of Virology* 87, 13510–13519.
- Mulik, S., Xu, J., Reddy, P.B.J., Rajasagi, N.K., Gimenez, F., Sharma, S., Lu, P.Y., and Rouse, B.T. (2012). Role of miR-132 in Angiogenesis after Ocular Infection with Herpes Simplex Virus. *The American Journal of Pathology* 181, 525–534.
- Mulvey, M., Arias, C., and Mohr, I. (2007). Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *Journal of Virology*. 81, 3377–3390.
- Murayama, T., Kuno, K., Jisaki, F., Obuchi, M., Sakamuro, D., Furukawa, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994). Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *Journal of Virology*. 68, 7582–7585.
- Nascimento, R., and Parkhouse, R.M.E. (2007). Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *Journal of General Virology* 88, 1446–1453.
- Nascimento, R., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2009a). 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, 1143–1149.
- Nascimento, R., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2009b). 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, 1143–1149.
- Nascimento, R., Costa, H., Dias, J.D., and Parkhouse, R.M.E. (2011). MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Archives of Virology* 156, 375–386.
- Nasemann, T., and Schaeg, G. (1973). [Herpes simplex virus, type II: microbiology and clinical experiences with attenuated vaccine]. *Hautarzt* 24, 133–139.
- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W.M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antonny, B., and Melia, T.J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature Cell Biology* 16, 415–424.

- Nicoll, M.P., Proença, J.T., and Efsthathiou, S. (2012). The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 684–705.
- Nojima, T., Oshiro-Ideue, T., Nakanoya, H., Kawamura, H., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Kataoka, N., and Hagiwara, M. (2009). Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* 37, 6515–6527.
- Olesky, M., McNamee, E.E., Zhou, C., Taylor, T.J., and Knipe, D.M. (2005). Evidence for a direct interaction between HSV-1 ICP27 and ICP8 proteins. *Virology* 331, 94–105.
- Orlowski, J., and Bujnicki, J.M. (2008). Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Research* 36, 3552–3569.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein. *Cell Host and Microbe* 1, 23–35.
- 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 U.S.A.* 109, E3008–E3017.
- Ou, M., and Sandri-Goldin, R.M. (2013). Inhibition of cdk9 during herpes simplex virus 1 infection impedes viral transcription. *PLoS ONE* 8, e79007.
- Pan, D., Flores, O., Umbach, J.L., Pesola, J.M., Bentley, P., Rosato, P.C., Leib, D.A., Cullen, B.R., and Coen, D.M. (2014). A Neuron-Specific Host MicroRNA Targets Herpes Simplex Virus-1 ICP0 Expression and Promotes Latency. *Cell Host & Microbe* 15, 446–456.
- Parkinson, J., Lees-Miller, S.P., and Everett, R.D. (1999). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Journal of Virology*. 73, 650–657.
- 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, 10821–10828.
- Pearson, A., Knipe, D.M., and Coen, D.M. (2004). ICP27 selectively regulates the cytoplasmic localization of a subset of viral transcripts in herpes simplex virus type 1-infected cells. *Journal of Virology*. 78, 23–32.
- Pertel, P.E., Fridberg, A., Parish, M.L., and Spear, P.G. (2001). Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279, 313–324.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods* 2, 269–276.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & Development* 20, 2922–2936.

- Pizer, L.I., Everett, R.D., Tedder, D.G., Elliott, M., and Litman, B. (1991). Nucleotides within both proximal and distal parts of the consensus sequence are important for specific DNA recognition by the herpes simplex virus regulatory protein ICP4. *Nucleic Acids Research*. 19, 477–483.
- Poon, A.P.W., Silverstein, S.J., and Roizman, B. (2002). An early regulatory function required in a cell type-dependent manner is expressed by the genomic but not the cDNA copy of the herpes simplex virus 1 gene encoding infected cell protein 0. *Journal of Virology*. 76, 9744–9755.
- Pozhidaeva, A.K., Mohni, K.N., Dhe-Paganon, S., Arrowsmith, C.H., Weller, S.K., Korzhnev, D.M., and Bezsonova, I. (2015). Structural Characterization of Interaction between Human Ubiquitin Specific Protease 7 and Immediate Early Protein ICP0 of Herpes Simplex Virus-1. *Journal of Biological Chemistry jbc.M115.664805*.
- Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., Kim, D., Kellogg, E., DiMaio, F., Lange, O., et al. (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77, 89–99.
- Read, G.S., and Frenkel, N. (1983). Herpes simplex virus mutants defective in the virion-associated shutoff of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of alpha (immediate early) viral polypeptides. *Journal of Virology*. 46, 498–512.
- Read, G.S., Karr, B.M., and Knight, K. (1993). Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion in the virion host shutoff gene and identification of multiple forms of the vhs (UL41) polypeptide. *Journal of Virology*. 67, 7149–7160.
- Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*. 15, 326–331.
- Rochette, P.-A., Bourget, A., Sanabria-Solano, C., Lahmidi, S., Ouellet Lavallée, G., and Pearson, A. (2015). Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of the trigeminal ganglia. *Journal of General Virology*
- Roizman, B., and Zhou, G. (2015). The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry. *Virology* 479-480, 562–567.
- Roizman, B., Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P., Whitley, R., Yamanishi, K., and Taddeo, B. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Chapter 13, The strategy of the herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. (Cambridge University Press).
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., and Studdert, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology* 123, 425–449.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5, 725–738.
- Rutkowski, A.J., Erhard, F., L'Hernault, A., Bonfert, T., Schilhabel, M., Crump, C., Rosenstiel, P., Efsthathiou, S., Zimmer, R., Friedel, C.C., et al. (2015). Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. *Nature Communications* 6, 7126.

- Ruyechan, W.T., Morse, L.S., Knipe, D.M., and Roizman, B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *Journal of Virology*. 29, 677–697.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols 2006*, pdb.prot4455 – pdb.prot4455.
- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L., and Renne, R. (2005). Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology*. 79, 9301–9305.
- Sanabria-Solano, C., Rochette, P.-A., Pearson, A., Lavallée, G.O., Lahmidi, S., and Bourget, A. (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, 2794–2805.
- Sandri-Goldin, R.M. (2008). The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection. *Frontiers in Bioscience* 13, 5241–5256.
- Sandri-Goldin, R.M. (2011). The many roles of the highly interactive HSV protein ICP27, a key regulator of infection. *Future Microbiology* 6, 1261–1277.
- Sandri-Goldin, R.M., Hibbard, M.K., and Hardwicke, M.A. (1995). The C-terminal repressor region of herpes simplex virus type 1 ICP27 is required for the redistribution of small nuclear ribonucleoprotein particles and splicing factor SC35; however, these alterations are not sufficient to inhibit host cell splicing. *Journal of Virology*. 69, 6063–6076.
- Santana, S., Bullido, M.J., Recuero, M., Valdivieso, F., and Aldudo, J. (2012). Herpes simplex virus type I induces an incomplete autophagic response in human neuroblastoma cells. *Journal of Alzheimer's Disease* . 30, 815–831.
- Sciabica, K.S., Dai, Q.J., and Sandri-Goldin, R.M. (2003). ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J*. 22, 1608–1619.
- Shen, B.W., Xu, D., Chan, S.-H., Zheng, Y., Zhu, Z., Xu, S. -y., and Stoddard, B.L. (2011). Characterization and crystal structure of the type IIG restriction endonuclease RM.BpuSI. *Nucleic Acids Research* 39, 8223–8236.
- Shieh, M.T., WuDunn, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D., and Spear, P.G. (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Cell Biology* 116, 1273–1281.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., and Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13–22.
- Siew, V.-K., Duh, C.-Y., and Wang, S.-K. (2009). Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *Journal of Biomedical Science* 16, 107.
- Siminoff, P., and Menefee, M.G. (1966). Normal and 5-bromodeoxyuridine-inhibited development of herpes simplex virus. An electron microscope study. *Experimental Cell Research* 44, 241–255.

- Sloan, E., Tatham, M.H., Gros Lambert, M., Glass, M., Orr, A., Hay, R.T., and Everett, R.D. (2015). Analysis of the SUMO2 Proteome during HSV-1 Infection. *PLoS Pathogens*. *11*, e1005059.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R.Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., and Baker, D. (2013). High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Structure* *21*, 1735–1742.
- Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Knizewski, L., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2012). Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily. *Nucleic Acids Research* *40*, 7016–7045.
- Steiner, I., Kennedy, P.G., and Pachner, A.R. (2007). The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *The Lancet Neurology* *6*, 1015–1028.
- Strom, T., and Frenkel, N. (1987). Effects of herpes simplex virus on mRNA stability. *Journal of Virology*. *61*, 2198–2207.
- Suenaga, T., Satoh, T., Somboonthum, P., Kawaguchi, Y., Mori, Y., and Arase, H. (2010). Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* *107*, 866–871.
- Summers, B.C., and Leib, D.A. (2002). Herpes Simplex Virus Type 1 Origins of DNA Replication Play No Role in the Regulation of Flanking Promoters. *Journal of Virology* *76*, 7020–7029.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* *41*, 105–178.
- Tian, X., Devi-Rao, G., Golovanov, A.P., and Sandri-Goldin, R.M. (2013). The Interaction of the Cellular Export Adaptor Protein Aly/REF with ICP27 Contributes to the Efficiency of Herpes Simplex Virus 1 mRNA Export. *Journal of Virology* *87*, 7210–7217.
- Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., and Osterrieder, N. (2006). Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* *40*, 191–197.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods in Molecular Biology* . *634*, 421–430.
- Todone, F., Weinzierl, R.O.J., Brick, P., and Onesti, S. (2000). Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 6306–6310.
- Turcotte, S., Letellier, J., and Lippe, R. (2005). Herpes Simplex Virus Type 1 Capsids Transit by the trans-Golgi Network, Where Viral Glycoproteins Accumulate Independently of Capsid Egress. *Journal of Virology* *79*, 8847–8860.
- Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M., and Cullen, B.R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* *454*, 780–783.

- Visalli, R.J., Natuk, R.J., Kowalski, J., Guo, M., Blakeney, S., Gangolli, S., and Cooper, D. (2014). Vaccination with a HSV-2 UL24 mutant induces a protective immune response in murine and guinea pig vaginal infection models. *Vaccine* 32, 1398–1406.
- Wagner, L.M., and DeLuca, N.A. (2013). Temporal Association of Herpes Simplex Virus ICP4 with Cellular Complexes Functioning at Multiple Steps in PolII Transcription. *PLoS ONE* 8, e78242.
- Wagner, E.K., Guzowski, J.F., and Singh, J. (1995). Transcription of the herpes simplex virus genome during productive and latent infection. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 51, 123–165.
- Walsh, D., and Mohr, I. (2004). Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes & Development* 18, 660–672.
- Walsh, D., and Mohr, I. (2006). Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes & Development* 20, 461–472.
- Wang, S.K., Duh, C.Y., and Chang, T.T. (2000). Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* 81, 2407–2416.
- Wang, S.-K., Duh, C.-Y., and Wu, C.-W. (2004). Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *Journal of Virology* 78, 9750–9762.
- Weir, J.P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 271, 117–130.
- Weller, S.K. (2010). Herpes simplex virus reorganizes the cellular DNA repair and protein quality control machinery. *PLoS Pathogens* 6, e1001105.
- Wen, K.W., and Damania, B. (2010). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Letters* 289, 140–150.
- Whitbeck, J.C., Lawrence, W.C., and Bello, L.J. (1994). Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* 200, 263–270.
- Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357, 1513–1518.
- Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E.M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M., and Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *Journal of Virology* 79, 1071–1083.
- Wilson, A.C., and Mohr, I. (2012). A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends in Microbiology* 20, 604–611.
- Wysocka, J., and Herr, W. (2003). The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 294–304.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J.L., and Tong, L. (2009). Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* 458, 784–788.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12, 7–8.

Yang, J., Zhang, W., He, B., Walker, S.E., Zhang, H., Govindarajoo, B., Virtanen, J., Xue, Z., Shen, H.-B., and Zhang, Y. (2015). Template-based protein structure prediction in CASP11 and retrospect of I-TASSER in the last decade: Template-Based Structure Prediction in CASP11. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*.

Zabierowski, S.E., and Deluca, N.A. (2008). Stabilized binding of TBP to the TATA box of herpes simplex virus type 1 early (tk) and late (gC) promoters by TFIIA and ICP4. *Journal of Virology*. 82, 3546–3554.

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

Zaborowska, J., Baumli, S., Laitem, C., O'Reilly, D., Thomas, P.H., O'Hare, P., and Murphy, S. (2014). Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) ICP22 Protein Directly Interacts with Cyclin-Dependent Kinase (CDK)9 to Inhibit RNA Polymerase II Transcription Elongation. *PLoS ONE* 9, e107654.

Zarling, J.M., Moran, P.A., Brewer, L., Ashley, R., and Corey, L. (1988). Herpes simplex virus (HSV)-specific proliferative and cytotoxic T-cell responses in humans immunized with an HSV type 2 glycoprotein subunit vaccine. *Journal of Virology*. 62, 4481–4485.

Zenkhusen, D., and Stutz, F. (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Letters*. 498, 150–156.

Zerboni, L., Sen, N., Oliver, S.L., and Arvin, A.M. (2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 12, 197–210.

Zhang, Z., Selariu, A., Warden, C., Huang, G., Huang, Y., Zaccheus, O., Cheng, T., Xia, N., and Zhu, H. (2010). Genome-Wide Mutagenesis Reveals That ORF7 Is a Novel VZV Skin-Tropic Factor. *PLoS Pathogens* 6, e1000971.

Zheng, Y., and Gu, H. (2015). Identification of three redundant segments responsible for herpes simplex virus 1 ICP0 to fuse with ND10 nuclear bodies. *Journal of Virology*. 89, 4214–4226.

Zheng, S., Li, Y., Zhang, Y., Li, X., and Tang, H. (2011). MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B. *Antiviral Research*. 89, 219–226.

Zhou, C., and Knipe, D.M. (2002). Association of Herpes Simplex Virus Type 1 ICP8 and ICP27 Proteins with Cellular RNA Polymerase II Holoenzyme. *Journal of Virology* 76, 5893–5904.

ANNEXE

PUBLICATIONS PRÉSENTÉES

Rochette, P.-A., Bourget, A., Sanabria-Solano, C., Lahmidi, S., Ouellet Lavallée, G., and Pearson, A. (2015). Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of the trigeminal ganglia. *Journal of General Virology*

Sanabria-Solano C., Elena Gonzalez C., Richerieux N., Bertrand L., Dridi S., Griffiths A., Langelier Y., and Pearson A. (2015). Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein. *Virology*.

Sanabria-Solano C., Oppong A., and Pearson A. (2016). The Herpes Simplex Virus type-1 R1 gene contains multiple UL24 susceptibility elements. Article en préparation

ÉTUDE VISANT L'IDENTIFICATION DE MOTIF RECONNU PAR UL24 DANS LES RÉGIONS CODANTES DES GÈNES VIRAUX

L'étude de la structure tridimensionnelle d'UL24 pourrait aider à l'analyse de la fonction de cette protéine, ce qui nous permettrait d'évaluer si UL24 est directement responsable de la dégradation d'ADN viral. On a sélectionné deux programmes qui font des prédictions de structure tridimensionnelle de structure afin d'analyser UL24. Le programme I-TASSER permet d'utiliser des algorithmes de « threading » et des simulations itératives d'assemblage de structure pour prédire la structure tridimensionnelle d'une séquence d'acides aminés. La prédiction est fondée sur l'utilisation de sous-fragments de structures protéiques retrouvés dans une base de données de structures. (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014). Les modèles de protéines valides vont scorés de manière consistante chez CASP11 (Yang et al., 2015). Le deuxième programme sélectionné est ROBETTA. La méthode de prédiction de ce programme combine la prédiction *de novo* de structure et la prédiction par homologie (Raman et al., 2009; Song et al., 2013).

Les résultats obtenus avec I-TASSER montre que 4UM2 est le meilleur modèle statistiquement semblable à UL24. 4UM2 est la structure cristallographique du domaine de la tetratricopeptide (TPR) de SMG6, une protéine de liaison de télomerase (Chakrabarti et al., 2014). Néanmoins, chaque prédiction a été évaluée contre la métrique d'I-TASSER et aucun des modèles avaient des niveaux standards acceptables (Table 1). Le C-score était proche du pointage le plus bas possible pour le programme (-4.53 dans le range de [-5, 2] ou les valeurs de C-scores plus basses correspondent à des modèles moins confiant) et les valeurs de TM-scores avec un RMSD relative à 4UM2, était trop élevé par rapport aux valeurs de confiance entre 2-3 Å ($17.3 \pm 2.6 \text{Å}$). Ainsi, les modèles prédis à travers de I-TASSER sont d'une basse qualité.

Un deuxième programme (ROBETTA) a été utilisé afin d'essayer de prédire la structure tridimensionnelle d'UL24. Ce programme est capable de produire un modèle pour la séquence

d'une protéine complète en présence ou absence de séquences homologues. UL24 semble être une protéine qui n'a pas de structure homologues connues ce qui rend cette méthode plus approprié pour la prédiction. Le programme va diviser la séquence protéique en domaines et va créer des prédiction de structure en comparant ces domaines avec des structures connues ou va créer des structures *de novo* pour les domaines qui n'ont pas d'homologie (Kim et al., 2004). Le programme ROBETTA a identifié deux domaines chez UL24, le premier est basé sur l'homologie avec la structure 3S1S (structure cristallographique de *BpusI*, une endonucléase de restriction de type II appartenant à la superfamille PD-(D/E)-XK (Shen et al., 2011)); cette structure a été annoté comme une hydrolase/transférase. La deuxième structure est basée sur la structure cristallographique 1lbg (un répresseur de l'opéron de lactose qui se lie avec l'ADN pour la régulation génique (Lewis et al., 1996)). Cependant, les niveaux de confiance des domaines sont 0.150500 et 0.190200 respectivement. La confiance est calculée à partir de l'équation $-\log(e\text{-val})$, ou e-val est la valeur obtenue à partir du programme PSI-BLAST. PSI-BLAST utilise la base de données des séquences protéiques non-redondante pour trouver des séquences à faible similitude (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on). Un niveau de confiance 3 est considéré un niveau de détection fort. Néanmoins, les modèles prédits par ROBETTA sont en bas du niveau de confiance. Même si le domaine prédit correspond à une endonucléase de la famille PD-(D/E) XK, tout comme pour le programme I-TASSER, aucun des modèles proposés à des niveaux de confiances qui permettraient de les utiliser pour le reste des études.

Dans cette thèse, nous avons montré que la protéine UL24 du virus HSV-1, reconnaît les régions codantes de certains gènes viraux et réduit son expression. En contexte de transfection transitoire, UL24 dégrade spécifiquement les vecteurs qui codent pour des protéines virales. La présence d'un motif endonucléase de type PD-(D/E) XK dans la partie N-

terminale de la protéine (Knizewski et al., 2006), la similitude avec l'endonucléase *BpuSI* dans une prédiction de modèle tridimensionnelle de la protéine et l'effet d'UL24 sur la stabilité de l'ADN plasmidique codant pour des gènes viraux nous ont poussé à considérer une fonction endonucléase de la protéine UL24. Cette fonction aurait une spécificité pour les gènes viraux. Pour étudier cette spécificité, des représentants des gènes viraux (α , β et γ) et de gènes cellulaires ont été choisis pour quantifier leurs expressions en présence ou en absence d'UL24 dans un contexte de transfection transitoire. Les protéines virales choisies étaient : ICP27, TK, R1, R2, UL24 et gC et les protéines non virales testées étaient la protéine Glutathion-S Transférase (GST) et la protéine mCherry. Les protéines choisies n'ont pas de similitude de séquences entre elles mais elles sont exprimées à partir du même vecteur d'expression. On a observé qu'UL24 affecte l'expression des protéines virales ICP27, TK, R1, R2, et gC ainsi que sa propre expression. En plus, UL24 n'affecte pas l'expression des gènes non-viraux testés. (Sanabria-Solano et al., 2016).

Afin de déterminer si un motif ou motifs présent dans les régions codantes des gènes viraux est identifiable par bioinformatique, nous avons utilisé le programme GLAM2 (Frith et al., 2008). Ce programme permet de trouver des motifs à partir des séquences d'ADN choisis et il permet aussi d'exclure des séquences. Ce programme trouve des motifs même s'il y a des espaces dans la séquence d'ADN. Les régions codantes des gènes *ICP27*, *R1*, *R2* et *TK* ont été choisies pour faire la recherche du ou des motifs, les séquences des gènes qui codent pour GST, mCherry, GAPDH et α -tubuline ont été utilisées comme témoins négatifs. On a utilisés les paramètres de base du programme. Un motif a été identifié qui correspond aux paramètres préétablis.

Le motif est C[CG][TA]GG[TC]GG[TAG][CG][CA][TA][GT][ATG][TA][CG][CG][AC][CGA][AG][TA] avec un score de 45.35. Ce motif a été ensuite comparé avec le génome de la souche KOS d'HSV-1 afin de trouver quels gènes viraux auraient ce motif dans leurs régions codantes. Une liste des

gènes présentant le motif est présenté dans les tables 1 et 2 de l'annexe. La protéine virale R1 possède cinq fois le motif dans sa séquence codante et une fois dans le brin négatif de l'ADN. Ce motif est présent au moins une fois dans chaque fragment crée dans la librairie de plasmides (C1 à C4) (chapitre 3). Ces résultats pourraient expliquer l'effet d'UL24 sur l'expression des 4 fragments de R1.

L'effet d'UL24 sur l'expression de gC, TK, R1, R2, ICP27 et UL24 ainsi que la présence d'au moins une fois le motif retrouvé par bio-informatique dans la région codante ou dans le brin complémentaire de ces gènes suggèrent que ce motif pourrait représenter le site de reconnaissance d'UL24. Néanmoins, des résultats préliminaires avec le vecteur pLB-Pfl-GST qui exprime le motif obtenu par bioinformatique ne semble pas être affecté par UL24 (résultats non-montrés). Malgré que la séquence testée n'ait pas fonctionnée comme attendu, l'hypothèse de la présence d'une telle séquence demeure valide.

Un effet sur l'intégrité de l'ADN induirait une diminution de l'expression de ce gène même si ce dommage est infligé dans le brin complémentaire. On pourrait donc penser qu'une réponse au dommage à l'ADN affecterait la capacité de la machinerie de transcription de fonctionner correctement et donc induirait de manière indirecte un effet sur l'expression des gènes.

Table 1 Annexe: Score de confiance pour UL24 HSV-1 avec I-tasser.

Model	C-score	TM-score	RMSD (root-mean square deviation in angstroms)
Model 1	-4.53	0.24± 0.07	17.3± 2.6Å

Table 2 annexe. Gènes viraux possédant le motif potentiel de reconnaissance par UL24.

Quantification de la présence du motif dans les séquences codantes des gènes viraux (brin positif) et dans le brin complémentaire d'ADN de ces mêmes gènes (brin négatif).

	Position dans l'ADN viral	
Gène	Brin positif	Brin négatif
Région Répétée	2	4
ICP0	3	3
UL5	3	0
UL6	3	0
UL7	1	0
UL8	0	2
UL9	0	2
UL10	1	0
UL11	1	0
UL12	0	2
UL13	0	1
UL15	2	2
UL17	1	1
UL18	1	0
UL19	7	5
UL20	1	0
UL21	1	0
UL22	0	1
UL23	3	1
UL24	0	1
UL25	3	1
UL26	3	1
UL27	0	6
UL28	1	4
UL29	4	3
UL30	8	1
UL31	1	0
UL32	2	1
UL34	1	0
UL35	1	0
UL36	11	3
UL37	4	2
UL38	2	2
UL39	6	1
UL40	4	1
UL41	2	1
UL42	0	3
UL43	0	1

UL44	1	1
UL45	0	1
UL47	1	2
UL48	0	1
UL49	0	1
UL50	1	0
UL51	1	0
UL52	0	1
UL54	1	1
UL55	4	2
UL56	0	1
ICP4	4	4
US3	0	1
US4	1	1
US5	0	1
US6	1	2
US7	2	1
US8	1	2
US9	1	0
US8A	1	0
US10	0	1
US11	0	1

Table 3 annexe. Présence du motif potentiel reconnue par UL24 dans le génome d'HSV-1 souche KOS. Séquences identifiées comme le motif putatif de reconnaissance par UL24. La colonne de gauche représente le brin d'ADN où le motif est présent. Ensuite, de gauche à droite, on retrouve la position dans le génome où le motif commence et finit, les valeurs de similitudes entre la séquence et le motif, la séquence reconnue et finalement le nom du gène viral.

Brin	Début	Fin	p-value	q-value	Séquences	Gènes
-	473	493	5.05e-05	0.105	CGGGGTGGTAGAGTTTGACAG	Repeat region (RR)
-	3508	3528	2.66e-05	0.0887	CGGGATGGTGCTGAACGACCC	ICP0/exon2/repeat region
+	5170	5190	7.09e-05	0.118	CGGGGCGTACGTGGTCCTGGT	ICP0/exon3/repeat region
+	5185	5205	2.04e-05	0.0819	CCTGGTGGACCAGACGGGAAA	ICP0/exon3/repeat region
+	6363	6383	1.63e-07	0.00472	CCAGGTGGGCCCGGTACCCCAT	RR
+	13610	13630	6.63e-05	0.115	CGTTGCGGGCCACGACCAGCT	UL5 primase helicase
+	14265	14285	5.99e-05	0.112	CAGGGCGTTAATCATCCACCA	UL5 primase helicase

+	14600	14620	1.75e-05	0.0773	CCAGTTGGGCCTGGACGTGAT	UL5 primase helicase /UL6 3' UTR
+	16047	16067	7.09e-05	0.118	CAAGGTGTTGGGGGAGGACGA	UL6 capsid portal protein
+	16272	16292	4.39e-05	0.102	CCAGGGGGGGCGGGCGCCGCA	UL6 capsid portal protein
+	17006	17026	4.55e-05	0.102	GGGGCCGGTCCAGATCGCGGT	UL6 capsid portal protein/UL7 3'UTR
+	17392	17412	1.5e-05	0.0722	GGTGGCGGTCCTGACGGCCAA	UL7 tegument protein
-	18571	18591	2.66e-05	0.0887	CGTGCCGGAGGAGGACGCACT	UL8 helicase primase subunit
-	19156	19176	4.75e-06	0.0442	CCTGGCGGCCCTGGCCGACCT	UL8 helicase primase subunit
-	20770	20790	8.93e-05	0.13	CGTGGGGGCGCTGTTTGCGCA	UL9 DNA replication origin binding helicase
-	23550	23570	9.18e-06	0.0567	CGTGGCGTGCGGCATGGCCAT	UL9 DNA replication origin binding helicase/UL10 3'UTR
+	23918	23938	2.38e-05	0.086	CCTGACCGTGCTGTTCGCCCT	UL10 glycoprotein M
+	25203	25223	1.56e-05	0.0725	CCAGGCGGAACGTTACGCCCT	UL11 3'UTR/UL12 deoxiribonuclease
-	27075	27095	7.33e-05	0.119	CCTGGCGTATGACGTCCCAGA	UL12 3'UTR/UL13 tegument serine/threonine protein kinase
-	27111	27131	5.79e-05	0.112	CCTGTTTGTCAACTCGGCCGA	UL12 3'UTR/UL13 tegument serine/threonine protein kinase
-	28400	28420	3.31e-05	0.093	CCTGCTGGTCATGTGGCAGCT	UL13 tegument serine/threonine protein kinase/UL14 tegument protein
-	29524	29544	1.98e-06	0.0272	CGTGGGTGGCCACGTCCACCT	UL15 DNA packaging terminase subunit1/exon1
+	29558	29578	5.6e-05	0.11	CACGCTGGAGCTGTTCCAAAA	UL15 DNA packaging terminase subunit1/exon1
+	29843	29863	6.2e-05	0.112	CGAGCCGGTGTGAGGAGAT	UL15 DNA packaging terminase subunit1/exon1
-	29967	29987	5.05e-05	0.105	TGTGTTGTGGCTGGAGGCAAA	UL15 DNA packaging terminase subunit1/exon1
-	31603	31623	9.84e-05	0.136	CGTGGCGATGGATGGTGACGT	UL17 DNA packaging tegument protein
+	32543	32563	4.39e-05	0.102	CCTGGTGAACCAGGGCGCCCT	UL17 DNA packaging tegument protein
-	34871	34891	5.6e-05	0.11	GGGGGTGGTACTGGTGCCGGT	Région intergénique (IR)
+	35648	35668	3.19e-05	0.093	CGAGGCTGATGGGGTCCCCGT	UL18 capsid triplex subunit 2
+	37498	37518	4.55e-05	0.102	CCGGGGGGACAGGGGGACCT	UL19 major capsid protein
-	37509	37529	4.55e-05	0.102	CCTGTCGCGGCAGGTCCCCCT	UL19 major capsid protein
+	37697	37717	6.22e-06	0.0523	CATGTTGGTGGTGGACGCGGT	UL19 major capsid protein
-	38184	38204	5.6e-05	0.11	CGCGGGGGGCCACGACCCCGT	UL19 major capsid protein
+	38498	38518	7.09e-05	0.118	CGTGTGTTCCAGTAGCTGGT	UL19 major capsid protein

+	38857	38877	8.64e-05	0.13	CCAGGTTGGCGTTGTCGGGCT	UL19 major capsid protein
+	39130	39150	7.1e-06	0.0537	CCTGGCGGTCCTTCCCCAAA	UL19 major capsid protein
-	39276	39296	2.86e-05	0.092	CCTGGTGGGCGCCATGGACCT	UL19 major capsid protein
+	39427	39447	7.1e-06	0.0537	TCTGCCGGTTCAGGTCGAGCT	UL19 major capsid protein
-	39810	39830	6.2e-05	0.112	CCGGGCGACCCTGGTCGCCGA	UL19 major capsid protein
+	39844	39864	8.43e-06	0.0567	CCAGGCGGCCGTTGTCCAGGT	UL19 major capsid protein
-	39873	39893	5.05e-05	0.105	CCTGGCTTTGTTGTTGCCGAT	UL19 major capsid protein
+	40784	40804	3.68e-05	0.0932	CAAGATGGCCCTGGTCCAAAA	UL20 envelope protein
-	41515	41535	2.76e-05	0.0909	CCGGGTGGTGTGTTGTGCAAGA	IR
-	41651	41671	7.33e-05	0.119	CGGGGGGGGGGTTACCTACCT	IR
+	43358	43378	1.28e-05	0.0665	CGGGGGGGTGATCTCCCCGA	UL21 tegument protein
-	44504	44524	1.89e-05	0.0808	CGTGTTTATCCTGGACGCGCT	UL22 envelope glycoprotein H
-	46689	46709	8.59e-08	0.0032	CGGGATGGTCCAGACCCACGT	UL23 thymidine kinase
+	47188	47208	3.68e-05	0.0932	CCTGGGGGGTCATGCTGCCCA	UL23 thymidine kinase
+	47435	47455	2.55e-06	0.0309	TGTGGTGTAGATGTTGCGGAT	UL23 thymidine kinase
+	47546	47566	4.91e-09	0.000639	CGTGGTGGTGGTTTTCCCAT	UL23 thymidine kinase
-	47889	47909	3.43e-05	0.093	CGGGGCGGCGCGGTCCAGGT	UL24
+	49562	49582	9.88e-07	0.0161	CCTGGCGTGCTGGCCGCGGT	UL25 DNA packaging tegument protein
+	49787	49807	1.75e-05	0.0773	CGTGCGCACCACGACGACAT	UL25 DNA packaging tegument protein
-	49939	49959	8.09e-05	0.127	TGAGGCGGTCCGCGTACACGT	UL25 DNA packaging tegument protein
+	50300	50320	9.57e-06	0.0567	CGTGGGGGAGGTTATCCACGC	UL25 DNA packaging tegument protein
+	50813	50833	9.53e-05	0.135	CGTGGCTGGGTTTTTGCCCT	UL26 capsid maturation protease
+	51095	51115	2.2e-05	0.0844	CCTGTTGTACCTGATCACCAA	UL26 capsid maturation protease
+	51149	51169	8.93e-05	0.13	CCTGGGGGGCGAGGCGCACCC	UL26 capsid maturation protease
-	52060	52080	3.43e-05	0.093	CCGGTTCGTCTGGTCGCACT	UL26 capsid maturation protease/ 3' UTR UL26.5
-	53374	53394	4.24e-05	0.102	TCTGTTGGTCTGGCCGGCCT	UL27 envelope glycoprotein B
-	53746	53766	2.2e-05	0.0844	CCAGCTGAGCCGCGCCGACAT	UL27 envelope glycoprotein B
-	54160	54180	5.23e-05	0.108	TATGTTGGGCCGCGTTGCCAT	UL27 envelope glycoprotein B
-	55100	55120	7.83e-05	0.124	TCTGTCGGTCCACGGCCAAGT	UL27 envelope glycoprotein B
-	55351	55371	3.68e-05	0.0932	CACGGTGGTGCAGTTCGAGCA	UL27 envelope glycoprotein B
-	55417	55437	5.79e-05	0.112	CCTGCGGGACATCAAGGCGGA	UL27 envelope glycoprotein B
+	55574	55594	6.41e-05	0.114	CCGGAGTGGCAGGGCCCCCGT	UL28 DNA packaging terminase
-	55829	55849	4.39e-05	0.102	CCGGTCGGTCGTGGTCTACGA	UL28 DNA packaging terminase
-	56174	56194	9.84e-05	0.136	CCTGCCGCACCTGAAGGAGGA	UL28 DNA packaging

						terminase
-	56741	56761	8.64e-05	0.13	CGACGGGGACCGTGTCCCGT	UL28 DNA packaging terminase
-	57683	57703	7.09e-05	0.118	CGGGACCGTCCATATGGAGCT	UL28 DNA packaging terminase
-	59165	59185	5.6e-05	0.11	CGGGGCGGGCCTGGAGGCCGG	UL29 single stranded DNA binding protein
-	59834	59854	3.68e-05	0.0932	CGTGATGGACATGTTTAACAA	UL29 single stranded DNA binding protein
+	60039	60059	3.08e-05	0.093	CGTGGTTGGCCTCGCCCAGAC	UL29 single stranded DNA binding protein
+	60129	60149	2.97e-05	0.093	CCTGCCTGACGTTGTTCACCA	UL29 single stranded DNA binding protein
-	60197	60217	2.56e-05	0.0887	CCAGGCGGTCCCCACGGCCAT	UL29 single stranded DNA binding protein
+	60370	60390	8.8e-06	0.0567	CATGCTGTTCATGGTCCCGAA	UL29 single stranded DNA binding protein
+	61603	61623	4.88e-05	0.105	CCGGGGGGTGTAGTCCGAAAA	UL29 single stranded DNA binding protein
+	62984	63004	6.63e-05	0.115	CCCGCGGGTGCTGGACGAGGA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	63134	63154	6.41e-05	0.114	CCTGTGGGGCGGCGTGGACCA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	63503	63523	4.71e-05	0.104	GGTGGTGGAGCGCACCGACGT	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	63806	63826	2.2e-05	0.0844	CGAGGGGGGCATGAGCGACCT	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	63863	63883	5.41e-05	0.11	CAAGGCGGGGGGGGAGGACGA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
-	64108	64128	4.39e-05	0.102	CGGGGCCGTACTGTTTCACAA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	64304	64324	4.39e-05	0.102	CGGCATGGTGAACATCGACAT	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	64622	64642	7.09e-05	0.118	CCTGCTGCGCCTGGCCGACCA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	65543	65563	6.63e-05	0.115	CAAGCTGCTGCTGATCGCCAA	UL30 DNA polymerase catalytic subunit
+	66275	66295	7.41e-06	0.0537	CCTGTTTGGGAATAACGCCAA	UL31 nuclear egress lamina protein
+	67507	67527	1.97e-05	0.0819	CCAGCTTGGCCTTGTGGAGCA	UL32 DNA packaging protein
+	67891	67911	7.33e-05	0.119	TCAGAGGGCCCCAGGTCGAGGT	UL32 DNA packaging protein
-	68109	68129	7.83e-05	0.124	CGAGCCGGAGGAGTCGCCGGA	UL32 DNA packaging protein
+	69849	69869	2.04e-05	0.0819	CGTGTCGGTGCTGTTTCAGGG	UL34 nuclear egress membrane protein
+	70293	70313	6.22e-06	0.0523	CCTGCGGGGTCTTAAGCACCT	UL35 small capsid protein
-	71099	71119	3.43e-05	0.093	CCTGGCGGTGCTGATCCGCGC	UL36 large tegument protein

-	73043	73063	2.97e-05	0.093	TGTGGCGGGCGGCGAGGACGT	UL36 large tegument protein
+	74663	74683	7.57e-05	0.122	CCGGGTGGGGCGGACGCCCGG	UL36 large tegument protein
-	74870	74890	8.33e-07	0.0145	CCTGGGGGGCCTGTTGGCGGA	UL36 large tegument protein
-	75188	75208	7.83e-05	0.124	CGAGGCGGAGTGGGACGAGGT	UL36 large tegument protein
-	75395	75415	3.59e-06	0.036	TCTGTTGGACCAGACGGAGAA	UL36 large tegument protein
-	75485	75505	6.8e-06	0.0537	CCTGCTGAAGGTGGTCGCCGT	UL36 large tegument protein
-	76352	76372	9.18e-06	0.0567	CGAGTTTGACGTGGTCGAGCT	UL36 large tegument protein
-	76691	76711	7.09e-05	0.118	CCAGGTGCGCCGGGCCGCAA	UL36 large tegument protein
-	77057	77077	5.2e-06	0.0468	CGTGGTGGTGCTGAAGAACCT	UL36 large tegument protein
+	78145	78165	6.2e-05	0.112	CGGGGCGGGCATTACGCCGAG	UL36 large tegument protein
+	78540	78560	3.55e-05	0.0932	CGTGCTGGACGAGGGGCAGAT	UL36 large tegument protein
-	78986	79006	4.39e-05	0.102	CGAGGCGGGCGAGGACGACGG	UL36 large tegument protein
-	79610	79630	8.93e-05	0.13	CCTGCGGGGCGAGATCGCGGG	UL36 large tegument protein
+	80961	80981	3.08e-05	0.093	CCTGGCGAGACAGATCCACGG	UL37 tegument protein
-	81758	81778	2.66e-05	0.0887	CCGGGGGGTGCTGCAGGACCT	UL37 tegument protein
-	82115	82135	9.98e-06	0.0578	CCTGGTGGTTGGGGACGCGCT	UL37 tegument protein
-	82766	82786	5.05e-05	0.105	CGTGGTGATCAACACCCTGAT	UL37 tegument protein
-	83126	83146	5.99e-05	0.112	CCTGTTGGCGCAGTTTCAGCA	UL37 tegument protein
+	83353	83373	1.08e-05	0.0588	CGGGGTGGTAAGGTTCCGCT	UL37 tegument protein
-	84005	84025	5.99e-05	0.112	CGAGCCGGGCGTCATGGCAGA	UL38 capsid triplex subunit
-	84324	84344	3.68e-05	0.0932	CCGGTGGGTTGTGTTGGCCGA	UL38 capsid triplex subunit
+	84600	84620	8.43e-06	0.0567	CCAGGGGGTCTGGGACCCCGGA	UL38 capsid triplex subunit
+	85060	85080	8.64e-05	0.13	CGATGCGGTACGGGCCACGT	UL38 capsid triplex subunit
+	85570	85590	1.89e-05	0.0808	CCTCGCGGGCCTGGCCGCAA	RI
+	85774	85794	1.38e-05	0.0693	TGGGGCGGTCAGCGTCCCCGT	RI
+	86516	86536	8.59e-08	0.0032	CGTGATGGTGCTTCCGACAA	UL39 R1
+	86888	86908	3.43e-05	0.093	CGGGGGGGAGGGGGATCCCGT	UL39 R1
+	87641	87661	2.61e-07	0.00617	CCTGGGGGTTCTGGTGACCT	UL39 R1
+	87997	88017	2.96e-06	0.0309	CGTGGTGGGAAATGTTCAAGT	UL39 R1
-	88027	88047	8.36e-05	0.13	TCTGGTGGTCGTAGAGGCGGT	UL39 R1
+	88583	88603	4.71e-05	0.104	CATGGGGTTCGGCGAGCAGAT	UL39 R1
+	89531	89551	2.56e-05	0.0887	CCAGAAGTTGCTGATCGACCT	UL39 R1
+	89914	89934	1.37e-06	0.021	CCTGGCGATCCAGATTCCAAA	UL40 R2
+	90040	90060	1.53e-06	0.0221	CGTGGGGGACGAGGAGGACGT	UL40 R2
-	90129	90149	2.96e-06	0.0309	CCAGGTTTTCCGTAACCAGGT	UL40 R2
+	90163	90183	8.33e-07	0.0145	CCTGTTTGAGCAGAAGGACAT	UL40 R2
+	90247	90267	3.83e-07	0.00831	CCAGCTGGTGCTTTTTCACAA	UL40 R2
+	90601	90621	1.24e-08	0.00105	CCAGGCGGTTCGAGATCGAGAT	RI
+	90718	90738	4.18e-10	0.000109	CCTGTTGGGCCTTATCCACAT	UL41 tegument host shutoff protein
+	90844	90864	6.2e-05	0.112	CGGGGCGGTCGTCAACGATCT	UL41 tegument host shutoff protein

-	91446	91466	4.55e-05	0.102	CGAGCTCGTCCAGGTCCCGAA	UL41 tegument host shutoff protein
-	92526	92546	9.84e-05	0.136	CGGGATGATGAAGTTTGCCCA	UL42 DNA polymerase processivity subunit
-	93526	93546	2.86e-05	0.092	CCTGGGGAACCAGCACCAAA	UL42 DNA polymerase processivity subunit
-	94108	94128	3.95e-05	0.0991	CGAGGTCTTCCGGATCGCCGT	UL42 DNA polymerase processivity subunit/UL43
-	95291	95311	5.41e-05	0.11	CCTGGCGGTGGTCGCCCCGG	UL43 envelope protein
+	96138	96158	3.43e-05	0.093	TCCGGTGGTCCGTGTGGAGGT	UL44 envelope glycoprotein C
-	96505	96525	1.23e-05	0.0652	CGTGGGGGGGCTTTTGGGCGT	UL44 envelope glycoprotein C
-	97875	97895	3.43e-05	0.093	TGTGTCGTTCCGGATCGACCA	UL45 membrane protein
+	101683	101703	3.68e-05	0.0932	CGGGGTGGTGACGTGCGGGT	UL47 tegument protein
-	101757	101777	1.38e-05	0.0693	CGTGCTGGATGTGTTGGCGGT	UL47 tegument protein
-	102087	102107	2.38e-05	0.086	CGGGTCGGACCTGGACGACAG	UL47 tegument protein
-	103723	103743	9.53e-05	0.135	CCTGGGGGACGAGCTCCACTT	UL48 transactivator protein VP16
+	104420	104440	1.56e-05	0.0725	CCTGGCGGTGCAGTGCCGGA	UL48 transactivator protein VP16
-	105971	105991	9.22e-05	0.132	CCGGAGGGGCCGGACGCACAC	UL49 tegument protein VP22
+	106949	106969	4.55e-05	0.102	CGGGGCGATCCTTGTCAGCC	UL50 deoxyuridine triphosphatase
+	108227	108247	2.29e-05	0.086	CGAGATGGGCCAGGGCGAGGT	UL51 tegument protein
-	108800	108820	2.14e-07	0.00557	CCTGGTGGTCGTAAACGCGCT	UL52 helicase-primase primase subunit
+	113054	113074	2.96e-06	0.0309	CGGGGTGGTGCTCGTGCGCT	UL54 ICP27
-	113711	113731	5.9e-08	0.00308	CGGGGGGGTCCTCGTCCAGAT	UL54 ICP27
+	114873	114893	8.93e-05	0.13	CCTGTGCGGCCTGGACGAAT	UL55 nuclear protein
+	114909	114929	4.61e-07	0.00924	TCTGGCGACATTAAGGACAT	UL55 nuclear protein
-	114944	114964	1.44e-05	0.0707	CGAGCCTGGCCAGAATGACAA	UL55 nuclear protein
+	114975	114995	8.64e-05	0.13	CGAGCGTGGCGTCGCGGAGAT	UL55 nuclear protein
+	115059	115079	1.61e-08	0.00105	CATGGCGGGCCTGATCGAAAT	UL55 nuclear protein
-	115079	115099	1.75e-05	0.0773	CCTGGCGGTGCGTGTCTAGGA	UL55 nuclear protein
-	115680	115700	2.55e-06	0.0309	CCGGCGGGTGGTTAACCAGGT	RI
-	116158	116178	2.38e-05	0.086	TGTGGTGGTCATTATTCTGGT	UL56 membrane protein
-	119858	119878	1.63e-07	0.00472	CCAGGTGGGCCGGTACCCCAT	Repeat region
-	121036	121056	2.04e-05	0.0819	CCTGGTGGACCAGACGGGAAA	ICP0/exon1/repeat region
-	121051	121071	7.09e-05	0.118	CGGGGCGTACGTGGTCTGGT	ICP0/exon1/repeat region
+	122713	122733	2.66e-05	0.0887	CGGGATGGTGCTGAACGACCC	ICP0/exon2/repeat region
+	125748	125768	5.05e-05	0.105	CGGGGTGGTAGAGTTTGACAG	Repeat region
+	128319	128339	6.2e-05	0.112	CGTGGGGGTGGGGGTCTCGT	RR ICP4
+	129345	129365	9.22e-05	0.132	CGTGGCGGGCGGCGTCGGGGT	RR ICP4

-	129359	129379	1.08e-05	0.0588	CGTGGGGGGCGACGACCCCGA	RR ICP4
+	130809	130829	8.93e-05	0.13	CCCGCCGGGCGTCGTCGAGGT	RR
-	135366	135386	9.57e-06	0.0567	CCGGGGCGTCCTCGTCGACAT	US3 threonise serine protein kinase
+	135741	135761	9.57e-06	0.0567	CGGGGTGGTACACGAGCACGA	US4 envelope glycoprotein G
-	135780	135800	8.36e-05	0.13	CCGGGTGGTCCAGTCGCCTCA	US4 envelope glycoprotein G
-	136779	136799	5.6e-05	0.11	CGTGGTAAGGCTGATGGCGGT	US5 glycoprotein J
-	138088	138108	8.93e-05	0.13	CGGTGTGGTCGGTATGGACGA	US6 glycoprotein D
+	138416	138436	3.19e-05	0.093	CCTCCGGTCCTGGACCAGCT	US6 glycoprotein D
-	138418	138438	9.84e-05	0.136	TCAGCTGGTCCAGGACCGGAA	US6 glycoprotein D
+	138797	138817	7.41e-06	0.0537	CCTGGGGTTCCTGATGCACGC	US7 glycoprotein I
+	139820	139840	4.13e-06	0.0399	TGTGGGGGACCAGGTCCCCCA	US7 glycoprotein I
-	139822	139842	2.68e-06	0.0309	TGTGGGGGACCTGGTCCCCCA	US7 glycoprotein I
-	140011	140031	3.31e-05	0.093	GCTGTTGGGCCAGATTCAGCT	US8 glycoprotein E
-	140277	140297	7.33e-05	0.119	CGAGGGGGTGGAGGTGGTGGT	US8 glycoprotein E
+	141134	141154	6.63e-05	0.115	CGTGCTTGCGGGGAACGCCCA	US8 glycoprotein E
+	142161	142181	3.19e-05	0.093	TGTGGTGTACGTCAACGACCA	US9/US8A
-	144062	144082	5.05e-05	0.105	CGGGGCTGTACTCGACCCACT	US10/US11
-	147028	147048	8.93e-05	0.13	CCCGCCGGGCGTCGTCGAGGT	RR ICP4
+	148478	148498	1.08e-05	0.0588	CGTGGGGGGCGACGACCCCGA	RR ICP4
-	148492	148512	9.22e-05	0.132	CGTGGCGGGCGGCGTCGGGGT	RR ICP4
-	149518	149538	6.2e-05	0.112	CGTGGGGGTGGGGGTCTCGT	RR ICP4