

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

**IDENTIFICATION D'UL24.5, UNE NOUVELLE PROTÉINE DU VIRUS DE L'HERPES
SIMPLEX DE TYPE-1 IMPLIQUÉE DANS LA NEUROPATHOGENÈSE**

Par
Slimane Dridi

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

Terence Ndongi Bukong
INRS-Institut Armand-Frappier
Institut National de la Recherche
Scientifique

Examineur externe

Carolina Alfieri
Faculté de médecine, Département de
microbiologie, infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Examineur externe

Guy Lemay
Faculté de médecine, Département de
microbiologie, infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier
Institut National de la Recherche
Scientifique

عن أبي الدرداء رضي الله عنه قال النبي صَلَّى اللهُ عَلَيْهِ وَ
سَلَّمَ : من سلك طريقًا يبتغي فيه علمًا سلك الله به طريقًا إلى
الجنة

وإن الملائكة لتضع أجنحتها لطالب العلم وإن العالم ليستغفر
له من في السموات ومن في الأرض حتى الحيتان في الماء
وفضل العالم على العابد كفضل القمر على سائر الكواكب
إن العلماء ورثة الأنبياء و إن الأنبياء لم يورثوا دينارًا ولا
درهمًا إنما ورثوا العلم فمن أخذ به فقد أخذ بحظ وافر

Abou Darda [رضي الله عنه] a dit : « Celui qui emprunte une voie en quête d'un savoir, Dieu lui facilite l'accès au Paradis. Les anges recouvrent de leurs ailes celui qui recherche le savoir en signe de satisfaction pour ce qu'il fait. Ceux qui se trouvent dans les Cieux et sur la Terre ainsi que les poissons dans l'eau demandent pardon pour le savant. La supériorité du savant sur le dévot est comparable à la supériorité de la lune par rapport aux autres astres. Les savants sont les héritiers des prophètes. Or, les prophètes n'ont laissé en héritage ni dinar ni dirham, ils n'ont légué que la science. Celui donc qui s'empare [de cet héritage] recueille une part [de bien] considérable. » (Abou Dawud)

En mémoire de mon défunt oncle Dridi Larbi de Souk-Ahras parti trop tôt.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury, le Professeur Carolina Alfieri, le Professeur Guy Lemay, le Professeur Terence Bukong Ndonyi et enfin ma Directrice de recherche le Professeur Angela Pearson. Je vous remercie pour toutes les corrections apportées à mon manuscrit de thèse, pour vos précieux conseils et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma Directrice de recherche le Professeur Angela Pearson de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour votre supervision, pour votre patience, pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises au cours de toutes ces années de doctorat. Merci de m'avoir "contaminé" avec le souci du détail et de la précision quant à la rédaction de divers textes scientifiques et à la réalisation des expériences. Merci de m'avoir transmis votre passion pour les *Herpesvirus*. Je vous souhaite encore beaucoup de succès à venir dans votre laboratoire.

Je tiens à remercier le Professeur Salah Eddine Bouzoubaa de l'IBMP (Strasbourg) de m'avoir transmis sa passion pour la virologie et de m'avoir encouragé à poursuivre en doctorat.

Je remercie également le Professeur Valérie Geoffroy (UNISTRA), le Professeur Gilles Prévost (Faculté de Médecine de Strasbourg), Monsieur Keller Daniel pour leurs enseignements en microbiologie et pour leurs encouragements au cours de mon parcours de doctorat.

Je remercie l'ensemble de mes collègues de laboratoire ainsi que tous mes amis rencontrés à l'institut.

Je tiens à remercier tout particulièrement Soumia Lahmidi, qui m'a toujours soutenu et ce depuis le tout début de mes études universitaires. Elle qui a été présente à mes côtés durant ces années de doctorat, dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Elle qui m'a donné la force et le courage nécessaire pour surmonter les épreuves que nous avons traversées, qui a toujours su me donner les bons conseils et m'orienter dans la bonne voie.

Je remercie mes deux plus grand Professeurs, mes très chers parents Monsieur Dridi Abdelkader et Madame Dridi Marie-Aline pour leurs enseignements de toute une vie, pour les valeurs qu'ils m'ont transmises. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu tout au long de mes études. Merci pour vos précieux conseils qui m'ont permis d'atteindre de nombreux objectifs. Je vous serai reconnaissant toute ma vie. Je tiens également à remercier mes sœurs Linda, Sonia, Lilia, Amel et mon petit frère Idriss pour leur soutien et encouragement dans ce périple.

RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex (VHS-1) infecte les cellules épithéliales de la muqueuse où celui-ci se réplique. Le virus va ensuite infecter les terminaisons nerveuses et établir sa latence dans les ganglions nerveux sensitifs.

Le gène *ul24* est conservé dans toute la famille des *Herpesviridae* et la protéine pUL24 est importante pour une réplication virale efficace et pour la pathogenèse *in vivo*. Il y a plusieurs transcrits exprimés à partir du gène *ul24*. La présence d'un site d'initiation interne à l'ORF *UL24* dans le cadre de lecture ouvert d'*ul24* et d'un codon d'initiation à la traduction ATG plus en aval dans le même cadre de lecture ouvert nous a fait suspecter qu'une autre protéine pourrait être exprimée à partir du locus *ul24*. Pour tester notre hypothèse, nous avons construit un virus recombinant qui exprime une étiquette d'hémagglutine (HA) à l'extrémité C-terminale de pUL24. L'analyse de l'expression protéique par immunobuvardage de type western a révélé l'expression d'une protéine de 17 kDa qui n'est pas un produit de dégradation de pUL24 pleine longueur. Afin de caractériser le rôle de la protéine nouvellement découverte nommée pUL24.5, nous avons construit un virus mutant codant pour une substitution de la méthionine d'initiation prédite par une valine (M122V). Cette substitution a éliminé l'expression du polypeptide de 17 kDa. Le mutant négatif UL24.5 présentait le même phénotype de réplication *in vitro* que la souche sauvage parentale. En revanche, l'absence de pUL24.5 au cours de l'infection *in vivo* a induit la persistance de maladie périoculaire et une augmentation de l'incidence de sévères troubles neurologiques. L'alignement des séquences d'acides aminés des protéines orthologues de pUL24 à travers les herpesvirus a révélé que le codon d'initiation de la traduction de pUL24.5 est conservée parmi la souche VHS-1 (répertoriées sur NCBI) et, est présente dans de nombreux herpesvirus.

Enfin, nous avons utilisé un modèle de cellules épithéliales polarisées (CEP) pour étudier l'infection apicale (IA) ou basolatérale (IB) suite à l'infection par le VHS-1. Pour ces expériences nous avons utilisé les cellules Caco-2. Les mesures de résistance transépithéliale (TEER) et l'analyse par microscopie électronique ont confirmé la différenciation et la polarisation de la monocouche cellulaire. Pour évaluer le rôle de pUL24 et de pUL24.5 dans la réplication du VHS-1 dans les CEP, nous avons réalisé des IA ou des IB à forte MOI avec différents virus: le virus KOS de type sauvage, ou le virus déficient en UL24 nommé UL24X, ou le virus "Rescue" (vUL24X-Rescue) ou le virus déficient UL24.5 nommé vBAC_UL24.5negHA, ou le virus "Rescue" vBAC_UL24.5negHA-Rescue. Nous avons mesuré les titres viraux dans les différentes chambres suite aux différentes infections (IA ou IB). Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence

significative entre les titres viraux pour les virus KOS, vUL24X, vUL24Xrescue, vBAC_UL24.5negHA et vBAC_UL24.5negHA-Rescue lors de l'IA des CEP. En comparaison, en l'absence de pUL24, nous avons observé jusqu'à 10 fois la réduction des titres viraux par rapport à KOS, ce qui est similaire à la réduction observée pendant l'infection des cellules non polarisées. Fait intéressant, la réduction de 10 fois au cours de l'IB par vUL24X a été observée principalement dans la chambre apicale.

En conclusion, nous avons découvert un rôle pour le site d'initiation à la transcription interne à l'ORF *UL24*, impliqué dans l'expression de la nouvelle protéine découverte, pUL24.5. Des expériences *in vivo* avec vBAC_UL24.5negHA ont montré qu'en l'absence de pUL24.5, il existe une persistance prolongée des signes inflammatoires ainsi qu'une augmentation de l'incidence de troubles neurologiques sévères. Ainsi, pUL24.5 est un nouveau déterminant pour la pathogénèse du VHS-1.

Les expériences d'infection dans les CEP ont montré que, comme dans les cellules épithéliales non-polarisées, pUL24.5 n'était pas important pendant la réplication du VHS-1. En revanche, l'absence de pUL24 semble affecter spécifiquement l'IB par le VHS-1 et en particulier la sortie apicale des virions néo-synthétisés. Cependant, l'impact de la perte de pUL24 était de la même ampleur que celui observé dans les cellules non-polarisées.

Mots clés : VHS-1, UL24.5, UL24, pathogénèse virale, neuropathogénèse virale, cellules épithéliales polarisées

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV-1) infects the host via epithelia and spreads to sensory neurons where latency is established. The *ul24* gene is conserved throughout the *Herpesviridae* family, and the UL24 protein is important for efficient viral replication and in pathogenesis. There are multiple transcripts expressed from the *ul24* gene. The presence of a transcription start site within the open reading frame of *ul24* (ORF UL24) and of a potential start codon ATG further downstream in the same open reading frame led us to suspect that another protein was expressed from the *ul24* locus. To test our hypothesis, we constructed a recombinant virus that expresses a hemagglutinin-tag at the C-terminus of pUL24. Western blot analysis revealed the expression of a 17 kDa protein that is not a degradation product of full-length pUL24. In order to characterize the role of the newly discovered protein referred to as pUL24.5, we constructed a mutant virus encoding a substitution of the predicted initiation methionine to a valine. This substitution eliminated expression of the 17 kDa polypeptide. The UL24.5 negative mutant exhibited the same replication phenotype *in vitro* as the parental strain. In contrast, the absence of UL24.5 during infection *in vivo* led to a prolonged period of periocular disease and an increase in the incidence of severe neurological impairment. Alignment of amino acid sequences for various herpesviruses revealed that the initiation methionine of UL24.5 is conserved among HSV-1 strains and is present in many alphaherpesviruses.

Finally, we used a model of polarized epithelial cells (Caco-2) to study basolateral infection and apical infection by HSV-1. Measurements of transepithelial resistance (TEER) and electron microscopy analysis have confirmed the differentiation and polarization of the cell monolayer. To evaluate the role of pUL24 and pUL24.5 in the replication of HSV-1 in polarized epithelial cells, we carried out apical or basolateral infections at a high MOI with different viruses: the wild-type KOS virus, or the UL24-deficient virus named UL24X, or the "Rescue" virus (vUL24X-Rescue) or the UL24.5 deficient virus named vBAC_UL24.5negHA, or the virus "Rescue" vBAC_UL24.5negHA-Rescue. We measured the viral titers in the different chambers following apical or basolateral infection. The results showed that there was no significant difference between virus titers for KOS, vUL24X, vUL24Xrescue, vBAC_UL24.5negHA and vBAC_UL24.5negHA-Rescue viruses upon apical infection of the polarized cells. In comparison, upon basolateral infection in the absence of pUL24, we observed up to a 10-fold reduction of viral titers as compared to KOS, which is similar to the reduction observed during infection of non-

polarized cells. Interestingly, the 10-fold reduction during basolateral vUL24X infection was observed mainly in the apical chamber.

In conclusion, we have discovered a role for the transcription initiation site within the *ul24* ORF namely the expression of the pUL24.5 protein, which we have recently discovered. *In vivo* experiments with vBAC_UL24.5negHA have shown that in the absence of pUL24.5, there is a prolonged persistence of inflammatory signs as well as an increase in the incidence of severe neurological disorders. Thus, pUL24.5 is a new HSV-1 determinant of pathogenesis.

The infection experiments in polarized cells showed that, just like in non-polarized epithelial cells, pUL24.5 was not important during HSV-1 replication. In contrast, the absence of pUL24 seemed to specifically affect basolateral infection with HSV-1, particularly with regard to apical egress of neo-synthesized virions. However, the impact of the loss of pUL24 was of the same magnitude as that observed in non-polarized cells.

Keywords: HSV-1, UL24.5, UL24, viral pathogenesis, viral neuropathogenesis, polarized epithelial cells

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DE TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	19
1 HISTORIQUE ET DÉFINITION DES VIRUS	20
2 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES VIRUS DE L'ORDRE DES <i>HERPESVIRALES</i>.....	20
3 CLASSIFICATION DES VIRUS DE LA FAMILLE DES <i>HERPESVIRIDAE</i>.....	20
4 DESCRIPTION DES VIRUS HERPÈS HUMAINS	21
5 MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VHS-1	22
5.1 Le génome viral	23
5.2 La capsid	24
5.3 Le tégument.....	24
5.4 L'enveloppe virale.....	26
6 LE CYCLE DE RÉPLICATION DU VHS-1	26
6.1 Adsorption et internalisation du VHS-1.....	27
6.2 Transcription et réplication de l'ADN viral.....	30
6.2.1 Transcription des gènes immédiats précoces (α).....	31
6.2.2 Transcription des gènes précoces (β).....	32
6.2.3 Transcription des gènes tardifs (γ).....	33
6.2.4 Synthèse de l'ADN viral	33
7 MORPHOGÉNÈSE DU VHS-1	36
7.1 Assemblage des capsides et encapsidation du génome viral.....	36
7.2 De la sortie du noyau à la sortie cellulaire.....	37
7.2.1 Différentes théories d'enveloppement des capsides	37
7.2.2 Le primo-enveloppement dans la membrane nucléaire interne	37
7.2.3 Le processus de désenveloppement	39
7.2.4 Enveloppement secondaire et tégumentation du VHS-1.....	40
7.2.5 Enveloppement des capsides dans les cellules neuronales	42
8 LA PATHOGÉNÈSE ET LA NEUROPATHOGÉNÈSE DU VHS.....	44
8.1 Primo-infection et tropisme du VHS-1	44
8.2 Déterminants viraux et cellulaires impliqués dans la pathogénèse du VHS-1	46
8.3 Latence et réactivation du VHS-1	47
8.4 La réponse immunitaire anti-VHS-1	53
8.5 Les traitements contre le VHS	55
9 LE VHS-1 ET LES CELLULES ÉPITHÉLIALES POLARISÉES (CEP)	56
9.1 Organisation des CEP	56
9.1.1 Les desmosomes	57

9.1.2	Structure des jonctions adhérentes	58
9.1.3	Structure des jonctions serrées	59
9.2	Infection des CEP par le VHS-1	60
9.2.1	Modèle d'étude de l'infection par le VHS-1 dans des cellules épithéliales polarisées	60
9.2.2	Entrée du VHS-1 dans les cellules épithéliales polarisées	61
9.2.3	Tri polarisé du VHS-1 dans les CEP	62
9.2.4	Dissémination du VHS-1 dans les cellules épithéliales polarisées	63
10	CARACTÉRISTIQUES DE LA PROTÉINE UL24	64
10.1	Expression du gène <i>ul24</i> du VHS-1	65
10.2	Fonctions de la protéine pUL24	66
10.2.1	Fonctions <i>in vitro</i>	66
10.2.2	Fonctions <i>in vivo</i>	68
10.3	Les orthologues de la protéine pUL24 du VHS-1	69
10.3.1	Les orthologues de la protéine pUL24 dans les virus herpès humains	69
10.3.2	Exemples d'orthologues de la protéine pUL24 dans les virus herpès non-humains	73
11	PROBLÉMATIQUE	75
12	HYPOTHÈSES	76
CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION		78
RÉSUMÉ		79
CONTRIBUTION DES AUTEURS		80
ABSTRACT		82
IMPORTANCE		82
INTRODUCTION		83
MATERIALS AND METHODS		84
Cells		84
Plasmid construction		84
Viruses		84
Transfections		85
Infection and Western blotting		85
Murine model of ocular infection		86
Disease scoring		86
Immunofluorescence microscopy		87
RESULTS		87
Identification of UL24.5, a novel HSV-1-encoded protein		87
UL24.5 is not a degradation product of full-length UL24		88
UL24.5 is a late protein		88
UL24.5 is not required for HSV-1 replication in epithelial cells in cell culture		89
UL24.5 is mainly cytoplasmic and does not alter nucleolin localization		90
Absence of the UL24.5 protein does not affect viral titers in the cornea or TG during acute infection ..		91
Increased clinical signs in mice infected with UL24.5 mutants		91
Conservation of methionine 122 among α -Herpesvirus		92
DISCUSSION		93
ACKNOWLEDGMENTS		95
TABLES AND FIGURES		97

CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION	115
RÉSUMÉ	116
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	117
ABSTRACT.....	119
INTRODUCTION.....	120
MATERIAL AND METHODS.....	120
Cells and cell culture	120
Electron microscopy.....	121
Viruses.....	121
Viral infection.....	121
RESULTS AND DISCUSSION	122
ACKNOWLEDGMENTS	123
FIGURES	124
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	128
1 DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE PROTÉINE DU VHS-1	129
1.1 Mise en évidence de la protéine pUL24.5 du VHS-1	129
1.2 La protéine pUL24.5 a une cinétique d'expression tardive	130
2 FONCTIONS DE LA PROTÉINE PUL24.5 IN VITRO ET IN VIVO.....	131
2.1 Les protéines pUL24 et pUL24.5 du VHS-1 ne partagent pas les mêmes fonctions	131
2.1.1 pUL24.5 n'est pas nécessaire pour la réplication du VHS-1 <i>in vitro</i>	131
2.1.2 pUL24.5 est localisée principalement dans le cytoplasme et n'induit pas la dispersion des protéines nucléolaires	131
2.2 Implication de pUL24.5 dans l'infection par le VHS-1 <i>in vivo</i>	132
2.2.1 L'absence de pUL24.5 n'a pas d'impact sur la réplication du VHS-1 sur le site oculaire et dans les TG	132
2.2.2 L'absence d'UL24.5 induit la persistance des signes cliniques.....	132
3 CONSERVATION DU CODON MÉTHIONINE 122 À TRAVERS LA FAMILLE DES HERPESVIRIDAE.....	136
4 IMPORTANCE DES PROTÉINES UL24 ET UL24.5 DU VHS-1 DANS L'INFECTION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES POLARISÉES	136
4.1 Étude de l'implication des protéines pUL24 et pUL24.5 dans l'infection par VHS-1 des cellules épithéliales polarisées (CEP).....	137
4.2 La protéine pUL24 est impliquée dans le tri apical des particules virales dans les CEP infectées par le VHS-1.....	138
CONCLUSION	139
RÉFÉRENCES.....	141
LISTE DE PUBLICATIONS	165

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 : Structure d'un virion mature de la famille des <i>Herpesviridae</i>	22
Figure 1.2 : Organisation génomique du virus de l'herpès simplex.	23
Figure 1.3 : Représentation schématique de la composition protéique d'un virion mature du VHS-1 extracellulaire.	25
Figure 1.4 : Cycle de réplication du VHS-1.	27
Figure 1.5 : Description des deux principaux modes d'entrée du VHS-1 dans les cellules.	28
Figure 1.6 : Schéma représentatif des glycorotéines virales impliquées dans l'entrée du VHS-1.	29
Figure 1.7 : Schéma représentatif de la fusion entre l'enveloppe virale du VHS-1 et la membrane cytoplasmique.	31
Figure 1.8 : Représentation schématique de la réplication de l'ADN du VHS-1.	35
Figure 1.9 : Encapsidation et sortie de la nucléocapside du noyau vers la membrane plasmique.	38
Figure 1.10 : Représentation du trafic neuronal VHS-1 au cours de l'entrée et de la sortie.	43
Figure 1.11 : Infection lytique et réactivation du VHS-1.	45
Figure 1.12 : Structure de la chromatine.	49
Figure 1.13 : Structure de la chromatine associée à l'ADN viral dans le noyau de la cellule épithéliale. ..	50
Figure 1.14 : Structure de la chromatine associée à l'ADN viral dans le noyau du neurone.	51
Figure 1.15 : Schéma représentatif de l'organisation des cellules épithéliales polarisées.	57
Figure 1.16 : Schéma représentatif de la protéine pUL24 du VHS-1.	65
Figure 1.17 : Diagramme représentatif des ORFs de UL23 à UL26 et de leur direction de transcription. .	66

CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION

Figure 1 : Diagram of the UL24 locus of HSV-1 and vBAC_UL24HA.	99
Figure 2 : Expression of an 18 kDa protein, UL24.5, in HSV-1-infected cells.	100
Figure 3 : UL24.5 is not a degradation product of full length UL24.	101
Figure 4 : UL24.5 is expressed with late kinetics.	102
Figure 5 : UL24.5 is not important for replication in cell culture.	104
Figure 6 : UL24.5 is mainly cytoplasmic and does not alter nucleolin localization.	105
Figure 7 : The absence of UL24.5 protein does not affect viral titers in tear films or in trigeminal ganglia during acute ocular infection of mice.	107
Figure 8 : The absence of UL24.5 protein prolongs the period of periocular disease.	108
Figure 9 : The absence of UL24.5 results in an increased incidence of severe neurological signs.	110
Figure 10 : Methionine 122 of HSV-1, the initiation codon of UL24.5, is conserved among several alpha herpesvirus UL24 orthologs.	111

Figure. Suppl. 1 : Detailed neurological scores. 112

CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION

Figure 1 : Assessment cell culture polarization..... 124

Figure 2 : UL24.5 is not required for replication of HSV-1 in polarized epithelial cells. 125

Figure 3 : Role of UL24 in apical sorting of HSV-1 during basolateral infection in polarized epithelial cells.
..... 126

LISTE DE TABLEAUX

CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION

Table 1. Primers used in this study. Restriction enzyme sites used for cloning are underlined.	97
Table 2. UL24.5 is not required for HSV-1 reactivation <i>ex vivo</i>	98
Table Suppl. 1 : Accession numbers for genomes used in analysis presented in Figure 10	113

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-O-Sts	3-O-sulfotransférases
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNpol	ADN polymérase
AP	Adaptine
ARN	Acide ribonucléique
ARNpol	ARN polymérase
ARNm	ARN messenger
BVH	Herpèsvirus Bovin
CAJ	Complexe apical de jonction
CEP	Cellule épithéliale polarisée
CITV	Comité International de la Taxonomie des Virus
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CLOCK	Modulateur de la chromatine
DLK	Double leucine kinase
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
E (α)	Gène précoce
EBV	Epstein-Barr virus
GAG	Glycoaminoglycanes
GRSF1	G-Rich RNA Sequence Binding Factor 1
HAT	Histone acétyltransférase
hCMV	Human cytomegalovirus
Hcf-1	Facteur 1 de la cellule hôte
HDAC	Histone désacétylase
HHV	Human herpes virus
HIV	Human immunodeficiency virus
hpi	Heure post-infection
HS	Héparane sulfate
HVEM	Herpes virus entry mediator
ICP	Infected cell protein
IE (β)	Gène immédiat précoce
IFN	Interféron

IRF	IFN regulatory factor
IL	Interleukine
JA	Jonction adhérente
JAM	Junctional adhesion molecule
JIP3	JNK-interacting protein 3
JNK	c-Jun N-terminal kinase
jpi	Jour post-infection
KSHV	Kaposi sarcoma associated herpes virus
L (γ)	Gène tardif
LAT	Latency associated transcript
LSD-1	Lysine-specific histone demethylase 1
miARN	Micro ARN
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEH	Méningo-encéphalite herpétique
MHV-68	Murine herpes virus-68
MNE	Membrane nucléaire externe
MNI	Membrane nucléaire interne
MOI	Multiplicity of infection (multiplicité d'infection)
MP	Membrane plasmique
MT	Microtubule
NaB	Butyrate de sodium
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NK	Natural Killer
nm	Nanomètre
Oct-1	Octamer binding protéin-1
ORF	Open Reading Frame
OASL	Oligoadenylate synthetase like
Ori	Origine de réplication
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C

PolyA	Signal de polyadénylation
PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PrV	Pseudorabies virus
RE	Réticulum endoplasmique
R_L	Régions répétées inversées aux extrémités U_L
RLR	(RIG)-I-like receptors
RPE	Cellules épithéliales pigmentaires de la rétine humaine
R_s	Régions répétées inversées aux extrémités U_s
TER	Résistance électrique transépithéliale
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TATA box	Boîte TATA
TBP	TATA binding protein
TE	Tégument externe
TFIIA	Transcription factor IIA
TFIID	Transcription factor IID
TG	Trigeminal ganglia
TGN	Trans-Golgi network
TI	Tégument interne
TK	Thymidine kinase
TLR	Toll-like receptor
TMEM 140	Protéine cellulaire transmembranaire 140
TNF	Tumor necrosis factor
U_L	Région unique longue
U_s	Région unique courte
VHE-1	Virus herpès équin-1
VP	Virion protein
Vhs	Virion host shutoff
VHS-1	Virus de l'herpès simplex 1
VHS-2	Virus de l'herpès simplex 2
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VZV	Varicella zoster virus
ZO	Zonula occludens

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1 HISTORIQUE ET DÉFINITION DES VIRUS

En 1884 à Paris, le scientifique Charles Chamberland collaborateur de Louis Pasteur a élaboré une technique qui a permis de découvrir les virus. En effet, cette invention consistait en un filtre en porcelaine dont la taille des pores variait de 0,1 à 1 micron pouvant éliminer toutes bactéries ou autres cellules connues à cette époque contenues dans une solution. En 1886, le scientifique allemand Adolf Eduard Mayer a montré que la maladie de la mosaïque du tabac pouvait être transmise à d'autres plantes tout simplement en frottant les feuilles d'une plante saine avec un extrait de plante infectée, préalablement filtré à travers du papier. Il en conclut qu'il s'agissait d'une maladie bactérienne. En 1892, le scientifique Russe Dmitrii Ivanovski a dans la continuité des travaux de Charles Chamberland conclu que le filtrat d'un extrait de plante infectée par la maladie de la mosaïque du tabac pouvait garder sa capacité infectieuse grâce à une toxine soluble. En 1898, le chercheur néerlandais Martinus Willem Beijerinck a rapporté des expériences similaires avec des extraits filtrés sans bactérie. Il décrit l'agent infectieux de la maladie de la mosaïque du tabac comme étant un agent fluide vivant également appelé agents filtrables qui deviendront par la suite nommés par le terme de virus. Finalement, cette simple invention a initié une nouvelle science : la virologie (Lustig *et al.*, 1992).

2 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES VIRUS DE L'ORDRE DES *HERPESVIRALES*

La taxonomie a été mise à jour par le Comité International de la Taxonomie des Virus (CITV) en août 2016. L'ordre des *Herpesvirales* est subdivisé en trois familles : (i) la famille des *Herpesviridae* concerne les membres infectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles, (ii) la famille des *Alloherpesviridae* qui comprend les membres infectant les poissons et les amphibiens et enfin (iii), la famille des *Malacoherpesviridae* qui ne contient qu'un membre infectant les mollusques bivalves, l'*Ostreid herpesvirus 1* (Davison *et al.*, 2009).

3 CLASSIFICATION DES VIRUS DE LA FAMILLE DES *HERPESVIRIDAE*

Les herpèsvirus sont capables d'infecter un très large spectre d'êtres vivants vertébrés et invertébrés. Plus de deux cent virus de type herpès ont été dénombrés mais seuls neuf d'entre eux sont capables d'infecter l'être humain (Baines *et al.*, 2007). L'ensemble de ces virus humains

possèdent de nombreuses similitudes dans la structure des particules virales, du génome, du cycle de réplication et dans la capacité du virus d'entrer en latence. Néanmoins, ces virus présentent des différences qui permettent de les répartir en trois sous-familles. En effet, selon le CITV, la famille des *Herpesviridae* est divisée en trois sous-familles telles que les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*.

Parmi les virus humains, la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comprend le genre *Simplexvirus* qui contient les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2) et le genre *Varicellovirus* représenté par le virus de la varicelle ou zona (HHV-3). La sous-famille des *Betaherpesvirinae* comprend le genre *Cytomegalovirus* qui est représenté par le Cytomegalovirus humain (hCMV) ou HHV-5 et le genre *Roseolovirus* représenté par les virus HHV-6 et HHV-7. Le HHV-6 comprend deux variants (HHV-6A et HHV-6B). Enfin, la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* comprend le genre *Lymphocryptovirus* représenté par le virus HHV-4 ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le genre *Rhadinovirus* représenté par le HHV-8 ou virus du sarcome de Kaposi (KSHV).

4 DESCRIPTION DES VIRUS HERPÈS HUMAINS

Les virus VHS-1, VHS-2 et HHV-3 ont été classés dans la même sous-famille en raison d'un large tropisme cellulaire, d'un cycle de réplication court, d'une efficacité de dissémination importante en culture cellulaire, de leur effet cytopathique et cytolytique et enfin, de leur capacité à entrer en latence *in vivo* dans les ganglions neuro-sensitifs. Le VHS-1 est associé à des infections orales, pharyngées, oculaires ou encore du système nerveux central (SNC) et, il est transmis principalement par voie orale. Le VHS-2 est impliqué dans des infections génitales et anales et, il est transmis principalement par voie sexuelle (Fatahzadeh *et al.*, 2007). Comme pour le VHS-2, le VHS-1 a été également décrit comme étant impliqué dans des infections génitales (Nieuwenhuis *et al.*, 2006). Le VZV est associé à la varicelle et sa réactivation sous forme de zona.

La sous-famille des *Betaherpesvirinae* comporte des virus qui possèdent un cycle réplicatif relativement plus long par comparaison aux *Alphaherpesvirinae*. Le tropisme cellulaire semble plus restreint à certaines lignées cellulaires, la dissémination est moins efficace en culture cellulaire avec un faible effet cytopathique et cytolytique. Enfin, la latence virale s'établit dans les tissus épithéliaux ou encore dans les glandes sécrétrices. Le hCMV peut être à l'origine de maladies graves en particulier pour les personnes infectées par le VIH, et pour les patients ayant

subi une transplantation d'organes et/ou un traitement immunosuppresseur. Les infections congénitales peuvent induire de graves handicaps tels que la perte de l'audition, de la vision et des troubles mentaux (Kenneson *et al.*, 2007). Le HHV-6 et HHV-7 sont responsables de la maladie infantile, la roséole.

Enfin, la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* est représentée par des virus au cycle réplicatif relativement long et infectant entre autres les cellules lymphoblastoïdes comme les lymphocytes B et T où la latence s'y établit (Baines *et al.*, 2007).

5 MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VHS-1

La grande taille du génome est caractéristique de la famille des *Herpesviridae*. La taille du génome à ADN double brin linéaire varie de 130 à 250 kb (Liu *et al.*, 2007). Les α -herpèsvirus possèdent une architecture commune et leurs tailles varient de 150 à 300 nm. La particule virale s'organise de la manière suivante : la nucléocapside qui contient le génome, puis le tégument et enfin l'enveloppe lipidique où sont ancrées de nombreuses glycoprotéines virales (**Figure 1.1**) (Heilingloh *et al.*, 2017, Roizman, 2013).

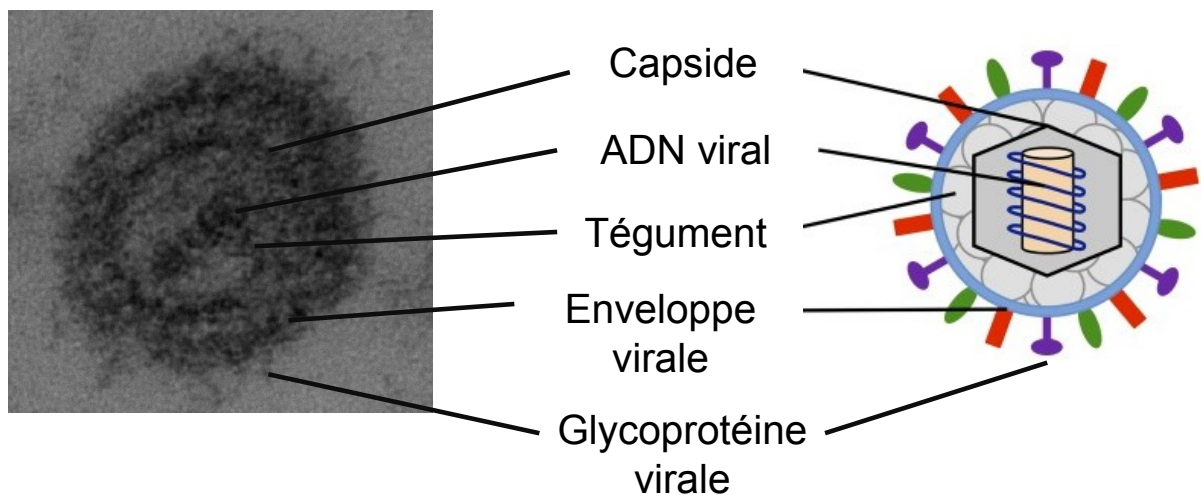


Figure 1.1 : Structure d'un virion mature de la famille des *Herpesviridae*.

À gauche, un virion du VHS-1 observé en microscopie électronique à transmission (©copyright Slimane Dridi, 2018) et à droite sa représentation schématique modifiée à partir de (Heilingloh *et al.*, 2017). Les différents composants du virus sont représentés.

5.1 Le génome viral

La structure la plus interne de la particule virale correspond à la nucléocapside constituée par le génome viral et une capsidie icosaédrique (Roizman, 2013). La taille du génome des α -herpesvirus varie de 125 à 180 kb selon les espèces. Pour le VHS-1, le génome à ADN double brin linéaire possède une taille de 152 kb qui encode pour plus de 80 protéines (Roizman, 2013). La structure du génome est relativement complexe. Celui-ci, contient une séquence unique longue (U_L) et une séquence unique courte (U_S) flanquées par des séquences répétées inversées (**Figure 1.2**) (Baines *et al.*, 2007, Weller *et al.*, 2012). Lors de la réplication du VHS-1, la recombinaison des régions répétées inversées peut inverser les régions uniques (U_L) et (U_S) et donner naissance à quatre isomères du génome viral (Delius *et al.*, 1976, Hayward *et al.*, 1975) en concentration équimolaire (Bataille *et al.*, 1997, Dutch *et al.*, 1992). Il existe 6 types d'organisation génomique à travers la famille *des Herpesviridae* notés de A à F établis selon la distribution des séquences répétées. Le VHS-1 appartient au groupe E dont le génome s'organise avec une séquence U_L et une séquence U_S flanquées de séquences répétées inversées internes et terminales (R_L , R_L' , R_S et R_S').

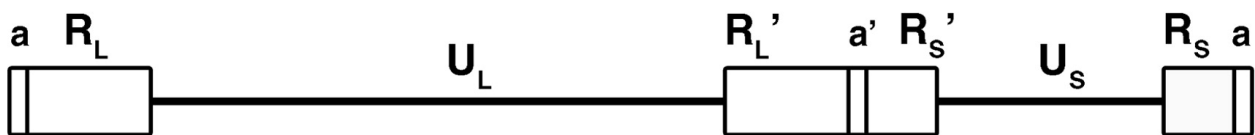


Figure 1.2 : Organisation génomique du virus de l'herpès simplex.

Le génome du VHS est organisé par une séquence unique longue (U_L) et par une séquence unique courte (U_S). On peut également observer des séquences répétées inversées (R_L et R_L') aux extrémités de (U_L), des séquences répétées inversées (R_S et R_S') aux extrémités de (U_S) et enfin, des séquences répétées internes et terminales notées a et a' . Figure modifiée à partir de (Colgrove *et al.*, 2014).

Avant de passer aux autres composantes de la structure du VHS-1, il convient de préciser la nomenclature utilisée pour l'appellation des protéines du VHS-1. La nomenclature des protéines virales fait référence à deux systèmes utilisés. Le premier système, bien plus ancien repose sur le principe de la migration des protéines virales dans un gel SDS-PAGE. Ainsi, les protéines provenant de la purification de virions sont nommées par VP pour « Virion Protein » (ex : VP16). Les protéines virales identifiées suite à la purification protéique à partir de cellules infectées sont nommées par ICP pour « Infected Cell Protein » (ex : ICP4). Le second système, plus récent apparaît après le séquençage du génome et se base sur la position du gène dans le génome. Les gènes localisés dans la séquence U_L sont numérotés en fonction de leur localisation (ex : VP16 correspond à $UL48$ avec ce second système et la protéine encodée par ce gène est notée

pUL48). Il en est de même pour les gènes situés dans la séquence U_S (ex : US9 encode pour la protéine US9). Les protéines identifiées après le séquençage du génome ne sont annotées qu'avec la seconde nomenclature.

5.2 La capsid

La capsid mature est de symétrie icosaédrique et contient 16 faces (T16), 12 sommets et 24 arêtes avec un diamètre d'environ 125 nm (Schrag *et al.*, 1989). La nomenclature d'assemblage et la structure de la capsid des α -herpèsvirus sont valables pour tous les membres de cette sous-famille. Celle-ci se localise dans le tégument et, est composée de 162 capsomères dont 150 hexons et 12 pentons. Des études d'analyse protéomique ont montré que la capsid contenant le génome du VHS-1 se constitue de 8 protéines virales différentes dont la protéine VP5 (pUL19) est majoritairement la plus présente (Knipe *et al.*, 2013). La protéine VP5 aurait une abondance supérieure à 10% du total des protéines du virion et, est présente dans les 150 hexons et dans 11 pentons soit dans 161 capsomères. Le 162^{ème} capsomère se compose d'un dodécamère de la protéine pUL6 qui constitue au niveau structural un portail permettant l'entrée et la sortie de l'ADN viral (Cardone *et al.*, 2012). Les protéines pUL17, pUL6, pUL25, pUL26, pUL38, pUL18, pUL35 constituent les autres protéines structurales de la capsid (Loret *et al.*, 2008).

Au cours de sa maturation, la morphologie de la capsid progresse selon une certaine évolution dans les cellules infectées où quatre types de capsid ont pu être décrits par observation en microscopie électronique. Les premiers assemblages de protéines structurales autour d'une charpente de protéines échafaudages vont donner naissance à une capsid sphérique : la procapsid. La capsid B de forme icosaédrique est une capsid intermédiaire entre la procapsid et la capsid C mature. Celle-ci, contient le génome viral et servira à la formation de la particule virale infectieuse. Quant à la capsid A, celle-ci ne contient ni d'ADN viral, ni protéines échafaudages et résulterait d'un défaut dans l'encapsidation de l'ADN (Cardone *et al.*, 2012).

5.3 Le tégument

Le tégument se situe entre la nucléocapsid et l'enveloppe bi-lipidique et représente jusqu'à environ 40% de la masse protéique du virion (Loret *et al.*, 2008). Le tégument est constitué

de nombreuses protéines virales dont les plus abondantes sont pUL36, pUL41, pUL46, pUL47, pUL48, et pUL49 (Figure 1.3).

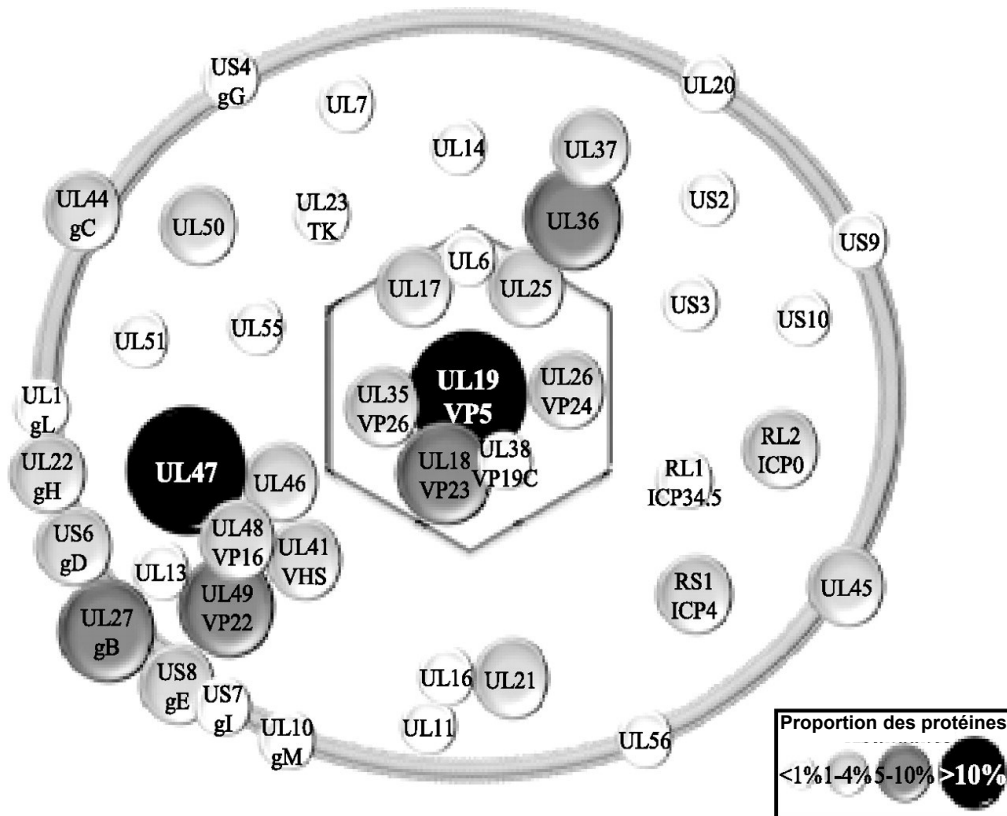


Figure 1.3 : Représentation schématique de la composition protéique d'un virion mature du VHS-1 extracellulaire.

L'abondance relative a été mesurée par spectrométrie de masse à partir de virions extracellulaires purifiés et, est représentée en fonction de la taille des cercles et de leur couleur. Figure modifiée à partir de (Loret *et al.*, 2008).

Les protéines tégmentaires peuvent jouer un rôle avant même que le génome viral ne soit pris en charge dans le noyau cellulaire par la machinerie de réplication (Liu *et al.*, 2007). Certaines de ces protéines vont jouer plusieurs fonctions dès l'internalisation du virus dans la cellule hôte entre autres pour réprimer l'expression des gènes hôtes et réguler la transcription des gènes viraux (Mossman *et al.*, 2000). La protéine vhs « virion host shutoff » (pUL41) est impliquée dans la dégradation des ARNs messagers (ARNm) *via* son activité RNase et réprime l'accumulation des ARNm de la cellule hôte dans le cytoplasme pour faciliter la traduction des ARNm viraux (Everly *et al.*, 2002) comme décrit dans la revue (Smiley, 2004). Le gène *ul48* encode pour la protéine VP16 (ou α -TIF pour α -transinducing factor) un transactivateur de la transcription qui module également mais de manière indirecte l'expression des gènes de la cellule infectée (Smibert *et al.*, 1994).

5.4 L'enveloppe virale

L'enveloppe du VHS-1 est composée d'une double couche lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines virales qui conditionnent le caractère du virion infectieux (Mettenleiter, 2004). L'enveloppe comporte 15 protéines virales. Parmi celles-ci, il y a 11 glycoprotéines virales (gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, gN), ainsi que des protéines virales non-glycosylées comme pUL20 (Ward *et al.*, 1994) qui jouent un rôle essentiel dans la fusion avec la membrane plasmique de la cellule hôte (Foster *et al.*, 2004a, Foster *et al.*, 2004b). Une autre protéine virale non glycosylée retrouvée dans l'enveloppe comme US9 (Brideau *et al.*, 1998) joue un rôle important dans la dissémination du VHS-1 à travers les axones dans le système nerveux, mis en évidence dans un modèle d'infection animal (Snyder *et al.*, 2008) ou dans les chambres de Campenot. La chambre de Campenot se compose de trois compartiments isolés. Des cellules neuronales sontensemencées dans le premier compartiment et après leur différenciation, les axones vont traverser les différents compartiments de la chambre. Ce système est très utilisé pour l'étude de la dissémination virale dans le système nerveux (McGraw *et al.*, 2009a, McGraw *et al.*, 2009b).

6 LE CYCLE DE RÉPLICATION DU VHS-1

Le cycle de réplication du VHS-1 comporte différentes étapes à savoir l'adsorption/internalisation de la particule virale, puis la synthèse de l'ADN viral suite au transport de la capsid vers le noyau de la cellule hôte, et enfin la morphogénèse et la sortie des virions néo-synthétisés. La morphogénèse et la sortie de la particule virale seront traitées dans une section ultérieure (section 1.7 de l'introduction) compte tenu de la complexité de ces étapes (**Figure 1.4**).

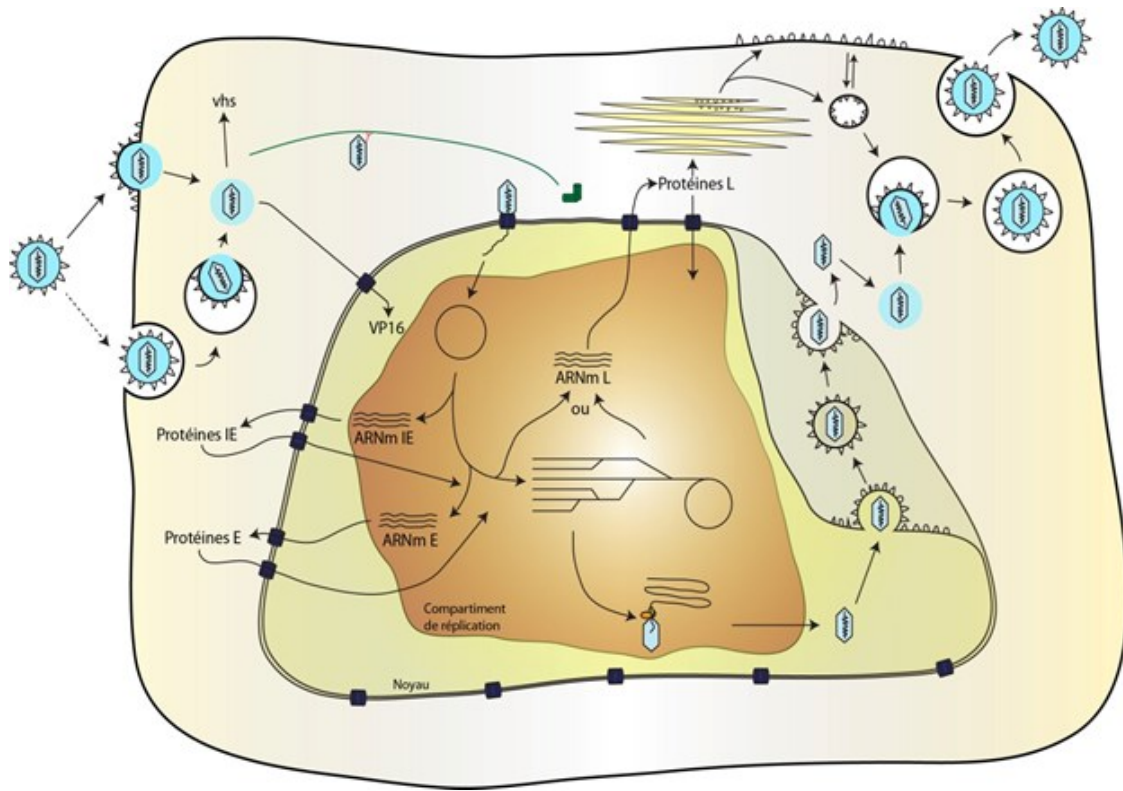


Figure 1.4 : Cycle de réplication du VHS-1.

Suite à l'entrée du virion dans la cellule hôte par un mécanisme de fusion ou d'endocytose dépendamment du type cellulaire, la nucléocapside et les protéines tégmentaires se retrouvent libres dans le cytoplasme de la cellule. La nucléocapside est ensuite véhiculée vers le noyau cellulaire via les microtubules et la coopération d'autres protéines du tégment comme VP16 qui joue un rôle très important dans le transport de la capsidie vers le noyau revue dans (Osterrieder, 2017). Le génome est ensuite injecté dans le noyau à travers les pores nucléaires où il va se circulariser. Trois classes géniques vont s'exprimer de manière séquentielle et ordonnée (IE, E et L). L'encapsidation a lieu dans le noyau. La nucléocapside va subir un primo-enveloppement dans la membrane interne du noyau et un désenveloppement dans la membrane externe du noyau. L'enveloppement final va avoir lieu au niveau du réseau transgolgien. Finalement, la particule virale infectieuse est sécrétée par exocytose de la cellule infectée. D'après la thèse de (Bertrand, 2011).

6.1 Adsorption et internalisation du VHS-1

Le VHS-1 est un virus neurotrope qui infecte principalement les cellules épithéliales et les cellules neuronales. En culture cellulaire, le VHS-1 peut infecter la plupart des lignées cellulaires d'origine vertébrée et donc possède un large tropisme. Il existe plusieurs modes d'entrée du virus dépendamment du type cellulaire. Le virus peut entrer dans la cellule par endocytose pH-dépendante ou -indépendante ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (**Figure 1.5**) (Clement *et al.*, 2006, Krummenacher *et al.*, 2013, Nicola *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2003). Qu'il s'agisse d'une entrée par la fusion ou par endocytose, l'entrée nécessite la fusion de

l'enveloppe du virion avec la membrane plasmique ou avec la membrane d'une vésicule intracellulaire (Akhtar *et al.*, 2009).

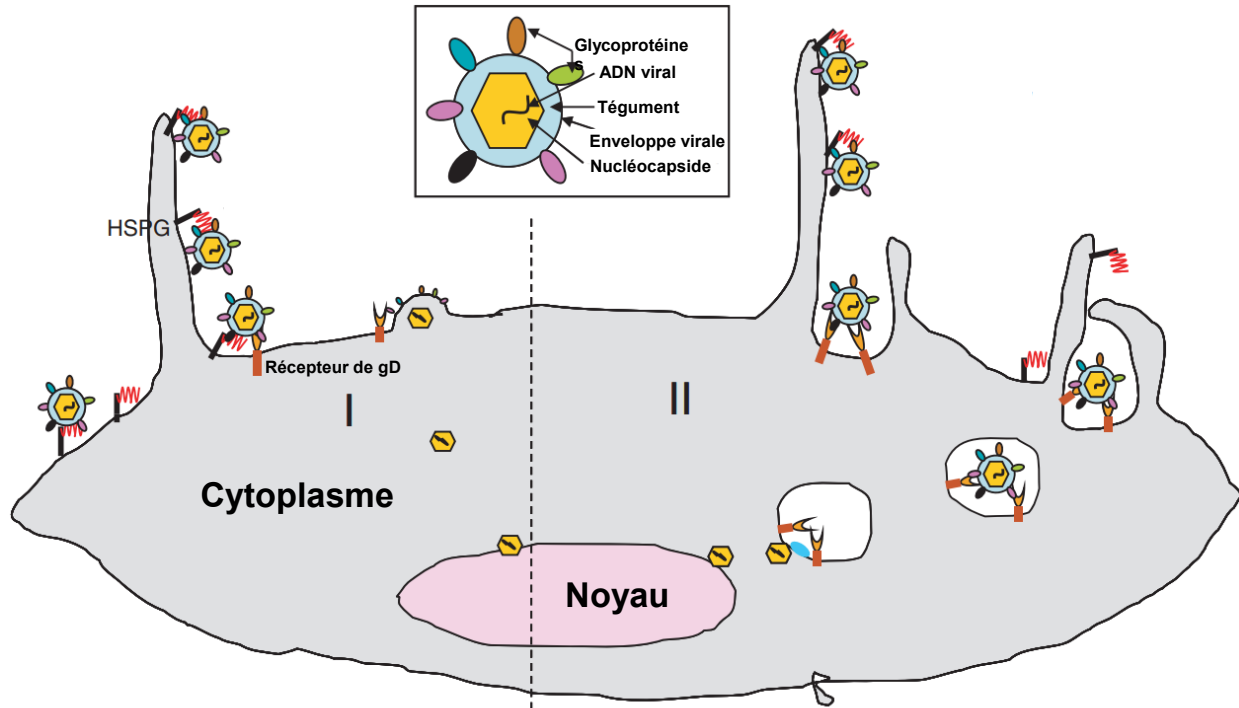


Figure 1.5 : Description des deux principaux modes d'entrée du VHS-1 dans les cellules.

Le VHS-1 peut entrer dans la cellule *via* la fusion indépendante du pH entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique que l'on peut observer à gauche. L'autre alternative d'entrée est l'entrée du virion par endocytose dépendante ou indépendante du pH selon les types cellulaires observée à droite. Dans ce second processus, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome va aboutir au même résultat que dans le premier mode d'entrée, puisque la nucléocapside va se retrouver nue dans le cytoplasme et va être acheminée vers le noyau cellulaire. Figure modifiée à partir de (Akhtar *et al.*, 2009).

La coopération étroite des cinq glycoprotéines virales de l'enveloppe (gB, gC, gD et le complexe hétérodimérique gH/gL) va être nécessaire pour l'adsorption et l'entrée du virus dans la cellule en induisant la fusion avec la membrane cellulaire (**Figure 1.6**) (Knipe *et al.*, 2013, Reske *et al.*, 2007, Sathiyamoorthy *et al.*, 2017).

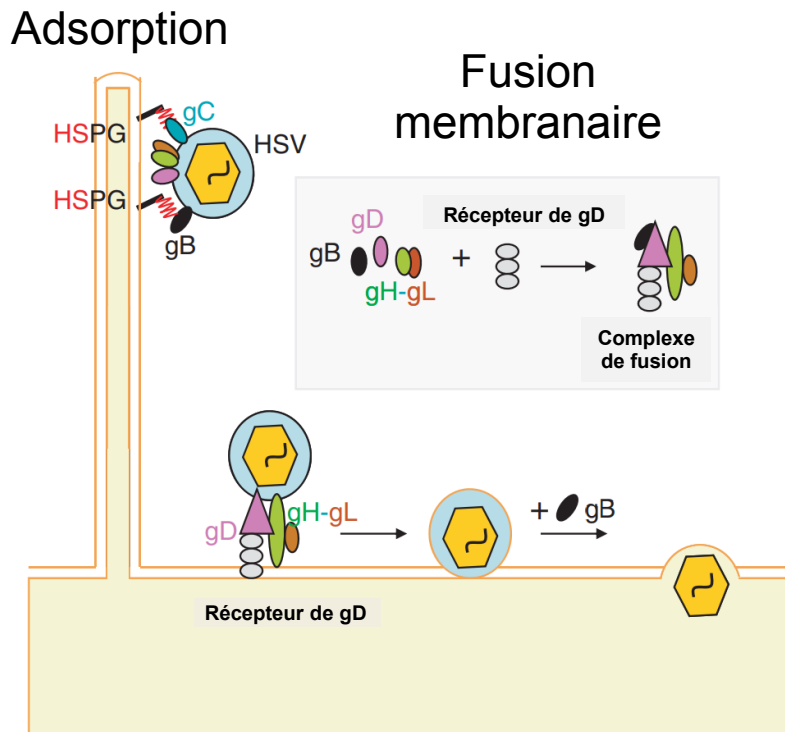


Figure 1.6 : Schéma représentatif des glycoprotéines virales impliquées dans l'entrée du VHS-1.

L'attachement initial du virus se fait au niveau des récepteurs protéoglycanes héparine sulfate (HSPG) avec les glycoprotéines gC et/ou gB. Le processus de fusion va permettre l'internalisation de la nucléocapside dans la cellule hôte. Dans un premier temps, l'interaction entre gD et son récepteur cellulaire avec la coopération du complexe gH-gL vont permettre les premiers changements conformationnels de gD pour déclencher la fusion des membranes virales et cellulaires. Par la suite, gB est requise pour la fusion complète de ces membranes, ce qui va aboutir à l'internalisation du tégument et de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte. Figure modifiée à partir de (Akhtar *et al.*, 2009).

Plus précisément, les glycoprotéines virales gC et gB jouent un rôle important dans l'adsorption du virus à la surface cellulaire. Ces glycoprotéines s'associent de manière réversible avec les sulfates d'héparane (HS) ainsi que les chaînes glycoaminoglycanes (GAG) situées à la surface cellulaire (Shieh *et al.*, 1992, WuDunn *et al.*, 1989). En l'absence de gC, il semble que la glycoprotéine gB soit suffisante pour assurer l'adsorption puisque gB présente un site d'interaction avec GAG (Herold *et al.*, 1994). L'attachement du virion *via* la glycoprotéine gC permet à la glycoprotéine gD d'interagir avec trois types de récepteurs cellulaires : (i) le médiateur d'entrée du virus HVEM pour (HerpesVirus Entry Mediator) qui est un membre de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF) (Montgomery *et al.*, 1996, Rasheed *et al.*, 2018), (ii) la nectine-1 et -2, des molécules d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines et enfin (iii) les glycosaminoglycanes à la surface cellulaire HS et GAG mentionnés ci-dessus (Spear *et al.*, 2000). Une forme de HS modifiée par 3-O-sulfotransférases (3-O-Sts) (Laquerre *et al.*, 1998,

Shukla *et al.*, 1999) peut également se lier à la glycoprotéine gD (Krummenacher *et al.*, 2013). L'interaction de gD aux récepteurs cellulaires va conduire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique à la suite du changement conformationnel de la glycoprotéine gD (Cocchi *et al.*, 2004) et avec la coopération de gB et de gH/gL (Spear, 2004) (**Figure 1.7**). La coopération des glycoprotéines gH et gL dans le processus d'entrée du virus dans la cellule s'effectue *via* l'attachement aux intégrines (Chowdary *et al.*, 2010), toutefois gH/gL ne sont pas essentielles pour l'entrée du virus (Azab *et al.*, 2013). Des études suggèrent que le complexe gH/gL agit comme un régulateur de fusion (Chowdary *et al.*, 2010) en activant la glycoprotéine gB par liaison directe (Böhm *et al.*, 2016).

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire entraîne l'internalisation du virus et donc la libération de la nucléocapside virale et des protéines tégumentaires dans le cytoplasme de la cellule hôte (**Figure 1.5**). La nucléocapside se dissocie des protéines du tégument et lie le moteur moléculaire dynéine des microtubules (MTs). Celle-ci, va ensuite être acheminée *via* les MTs vers la membrane nucléaire où le génome est injecté à travers les pores nucléaires dans le noyau (Dohner *et al.*, 2005, Garber *et al.*, 1993).

6.2 Transcription et réplication de l'ADN viral

Suite à l'injection du génome viral dans le noyau, celui-ci va se circulariser et être pris en charge par la machinerie de réplication et de transcription dans le noyau (Garber *et al.*, 1993, Strang *et al.*, 2005). Au cours de l'infection lytique, plus de 80 protéines virales vont être exprimées et parmi ces protéines exprimées de nombreuses protéines virales vont être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes viraux. Le processus de transcription s'effectue dans le noyau de la cellule infectée et va se faire de manière séquentielle et ordonnée. La transcription des gènes viraux est assurée par l'ARN polymérase II (ARNpol II) et la synthèse des protéines virales a lieu dans le cytoplasme (Honess *et al.*, 1974, Preston *et al.*, 1976). La transcription des gènes viraux va conduire à l'expression de trois classes géniques en fonction de leur cinétique d'expression : (i) les gènes immédiats précoces (α ou IE), (ii) les gènes précoces (β ou E) et enfin (iii) les gènes tardifs (γ ou L) (Honess *et al.*, 1974).

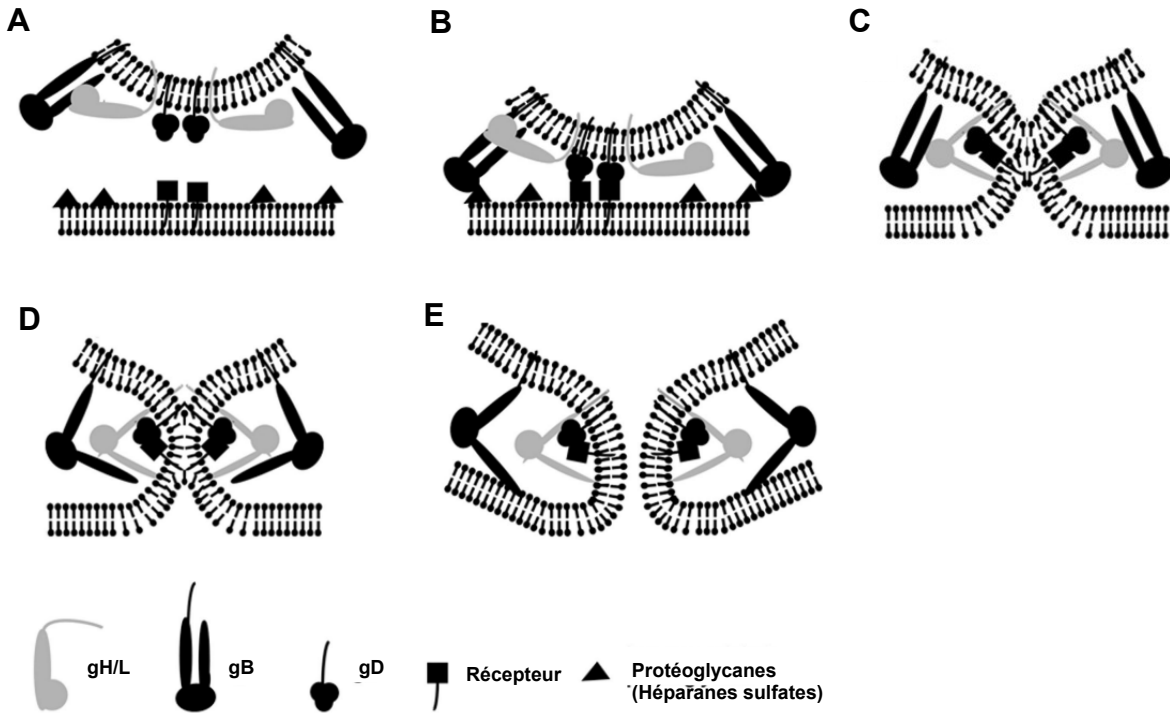


Figure 1.7 : Schéma représentatif de la fusion entre l'enveloppe virale du VHS-1 et la membrane cytoplasmique.

(A) L'environnement stérique doit être propice pour que le contact de la glycoprotéine gD avec son récepteur cellulaire soit possible afin d'initier le processus de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique. (B) La liaison de gD à son récepteur est secondée par des interactions non essentielles de gB avec les protéoglycane héparane sulfate. (C) Suite à la liaison au récepteur, gD subit un changement conformationnel et interagit avec le complexe glycoprotéique gH/gL. Cela induit également un changement de conformation de gH/gL pour pouvoir se lier à la membrane plasmique. Cela permet de relier les deux membranes et le mélange des lipides de ces deux membranes. (D) La glycoprotéine gB est recrutée dans le complexe gD/gH/gL suite au changement conformationnel de gH/gL et se lie à son tour à la membrane plasmique. (E) La fusion des deux membranes induit la formation d'un pore de fusion stabilisée par gB. Figure modifiée à partir de (Maurer *et al.*, 2008).

6.2.1 Transcription des gènes immédiats précoces (α)

Suite à l'infection à forte MOI (de 10 à 20), les gènes IE (gènes α) vont être les premiers à être exprimés entre 2 et 4 heures post-infection (hpi). Leur expression est stimulée par la protéine du tégment VP16. Les promoteurs des gènes α partagent des séquences communes capable d'être reconnues par des facteurs de transcription viraux et cellulaires. En effet, la protéine Oct-1 pour « Octamer binding protein-1 » (Whitlow *et al.*, 2009), le facteur 1 de la cellule hôte « Hcf-1 » (Campbell *et al.*, 1984, LaBoissiere *et al.*, 2000, Nogueira *et al.*, 2004, Post *et al.*, 1981) et la protéine virale du tégment VP16 vont former un complexe qui va permettre la transcription des gènes IE par liaison indirecte de VP16 avec l'ADN viral (Wysocka *et al.*, 2003). Un autre facteur cellulaire LSD-1 pour « lysine spécifique déméthylase » interagit avec Oct-1 et

Hcf-1 pour promouvoir la transcription (Liang *et al.*, 2009). Ainsi, l'ensemble des promoteurs des gènes IE contiennent des sites spécifiques pour la fixation du complexe VP16/Oct-1/Hcf-1/LSD-1 (Kristie *et al.*, 1987, Liang *et al.*, 2009).

Lors de la transcription des gènes α , six protéines vont être exprimées comme ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, et US1.5. Des études ont montré que la synthèse des gènes α , *ICP4*, *ICP22*, *ICP27* et *ICP47* (Honest *et al.*, 1974), va dépendre de l'interaction de leurs promoteurs avec le complexe décrit ci-dessus alors que pour le gène *ICP0*, le recrutement de CLOCK un modulateur de la chromatine de l'ADN viral semble nécessaire (Kalamvoki *et al.*, 2010). L'expression de l'ensemble de ces gènes ne dépend pas de la réplication de l'ADN viral, et ils vont être impliqués dans l'inhibition de mécanismes antiviraux cellulaires ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes viraux précoces β .

De récentes études montrent que la protéine ICP4 est importante pour la régulation des trois classes géniques. En effet, au cours de l'initiation à la transcription, le facteur de transcription TFIID interagit avec la boîte TATA (TATA box) par l'intermédiaire de la sous-unité protéique TBP (TATA binding protein) qui se lie à l'ADN. Le facteur de transcription TFIIA va ensuite s'associer au complexe TBP/ADN pour le stabiliser. La protéine virale ICP4 se colocalise dans les foyers de réplication avec le génome viral dans le noyau de la cellule hôte. Celle-ci est recrutée au niveau de ces sites de réplication pour lier en particulier des séquences promotrices virales mais également la protéine cellulaire TBP. La protéine ICP4 facilite ainsi la capacité de TFIIA à stabiliser la liaison de TBP à la boîte TATA. Son interaction avec les promoteurs viraux lui permet de s'autoréguler mais également de moduler l'expression des gènes α afin de promouvoir l'expression des gènes β et γ (Gruffat *et al.*, 2016).

6.2.2 Transcription des gènes précoces (β)

Comme mentionné ci-dessus, la protéine ICP4 va être importante pour l'expression des gènes β . Ces gènes encodent pour des protéines essentiellement impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans la stimulation de l'expression des gènes tardifs γ . Suite à l'infection à une MOI de 10 à 20, les protéines β sont exprimées entre 4 et 8 hpi. Parmi ces protéines on distingue les protéines pUL30 et pUL42 impliquées dans la formation du complexe d'ADN polymérase virale, les protéines pUL5, pUL52, pUL8 qui forment le complexe hélicase-primase et enfin les protéines de liaison à l'origine de réplication (Ori) comme pUL9 et pUL29 (Muylaert *et al.*, 2011). D'autres protéines virales impliquées dans les processus de synthèse des acides nucléiques ont été identifiées mais elles sont considérées comme non-essentiels pour la

réplication virale comme le gène *tk* qui encode pour la thymidine kinase (pUL23). L'ensemble des fonctions des ces protéines seront détaillées dans la partie de la synthèse de l'ADN viral. L'expression des gènes β peut être subdivisée en deux classes selon leur cinétique d'expression. Les protéines β_1 sont presque synthétisées en même temps que les protéines α et leur expression augmente avec la synthèse de la protéine ICP6. Les protéines β_2 sont exprimées après la synthèse des protéines α et leur synthèse augmente avec l'expression de la protéine TK.

6.2.3 Transcription des gènes tardifs (γ)

Enfin, les gènes tardifs γ vont être la dernière classe génique à être exprimée. L'expression de certains de ces gènes va dépendre partiellement de la réplication de l'ADN viral et sont nommés leaky late ou γ_1 . L'expression des gènes γ_1 est stimulée mais n'est pas strictement dépendante de la réplication de l'ADN viral. Quant à l'expression des gènes γ_2 , elle va dépendre de la réplication de l'ADN viral (Holland *et al.*, 1980) et ils sont nommés true late. Ces gènes vont surtout encoder pour des protéines structurales (Harkness *et al.*, 2014) et des protéines d'encapsidation du génome comme par exemple pUL15, pUL28, pUL33 et pUL25 (Cockrell *et al.*, 2009, Heming *et al.*, 2014, McNab *et al.*, 1998, Ogasawara *et al.*, 2001).

6.2.4 Synthèse de l'ADN viral

Suite à la synthèse des protéines β , l'ADN viral va se répliquer. Différentes protéines conservées à travers tous les herpèsvirus ont été identifiées comme étant nécessaires à la synthèse de l'ADN viral (Weller *et al.*, 2012).

Dans les premières étapes de réplication de l'ADN viral, la protéine pUL9 (origin binding protein) forme un complexe homodimérique et va se lier aux origines de réplication OriS ou OriL au niveau de la séquence CGTTTCGACTT (Fierer *et al.*, 1992, Olivo *et al.*, 1988). Son activité hélicase va lui permettre de commencer le processus de distorsion et d'ouverture de l'ADN double brin pour former la fourche de réplication (Koff *et al.*, 1991, Weir *et al.*, 1990). Concernant les origines de réplication, elles sont au nombre de trois avec deux OriS et une OriL. Ces origines de réplication possèdent une structure palindromique (Wu *et al.*, 1988). OriL représente l'origine pour la région U_L et OriS représente l'origine pour la région U_S .

La protéine ICP8 est recrutée par la protéine pUL9 (Boehmer *et al.*, 1993). ICP8 se localise dans le noyau et cette protéine contient des domaines fonctionnels lui permettant de fixer de manière préférentielle l'ADN simple brin. Cette liaison est essentielle pour la réplication de

l'ADN viral. La coopération de pUL9 et de la protéine ICP8 va également permettre le relâchement de l'ADN et la formation de la fourche de réplication (Boehmer, 1998).

Le complexe hélicase-primase et l'ADN polymérase virale (ADNpol) sont à leur tour recrutés par ICP8 et pUL9. Le complexe hélicase-primase (pUL5, pUL8 et pUL52) (Crute *et al.*, 1989) est recruté à l'Ori au niveau de pUL9 et ICP8 et va permettre les modifications de l'ADN viral double brin afin de le rendre accessible à l'ADNpol viral comme décrit dans la revue (Weller *et al.*, 2012). La protéine pUL8 est une holoenzyme qui permet de promouvoir la localisation du complexe dans le noyau (Sherman *et al.*, 1992). L'ADNpol virale est un complexe hétérodimérique constitué par pUL30 et pUL42 qui va également être recruté au niveau de l'Ori (Weller *et al.*, 2012). La protéine pUL42 se fixe directement sur l'ADN viral et favorise sa synthèse en stabilisant son interaction avec la sous-unité catalytique pUL30 de l'ADNpol. Plus précisément, la structure de pUL42 permet de lier l'extrémité C-terminale de pUL30. L'interaction de ces deux protéines forme un complexe essentiel pour empêcher la dissociation de l'ADNpol au brin matrice de l'ADN (Digard *et al.*, 1993, Gottlieb *et al.*, 1994) et celle-ci est également essentielle pour la réplication de l'ADN viral *in vivo*. Cette interaction est très largement étudiée dans le but de générer un traitement (Loregian *et al.*, 2005) (**Figure 1.8**).

D'autres protéines virales peuvent également être utilisées dans le processus de synthèse de l'ADN comme la protéine TK encodée par *ul23*. Cette protéine est non essentielle pour la réplication du virus dans des cellules en division (Goldstein *et al.*, 1988b) mais elle est très importante dans la synthèse de l'ADN viral dans les neurones. En effet, ces cellules ne se divisent pas et ne présentent pas les éléments nécessaires pour le processus de synthèse d'acides nucléiques (Brandt *et al.*, 1991, Cameron *et al.*, 1988, Goldstein *et al.*, 1988a, Goldstein *et al.*, 1988b, Jacobson *et al.*, 1989a, Jacobson *et al.*, 1989b), ainsi TK va conduire à l'augmentation des résidus désoxythymidine triphosphate (Kosz-Vnenchak *et al.*, 1993).

D'autres protéines mais cellulaires sont également impliquées dans le processus de synthèse de l'ADN comme l'ADN ligase, la topoisomérase II et l' α -primase ADN polymérase qui colocalisent avec la protéine ICP8 dans les compartiments de réplication.

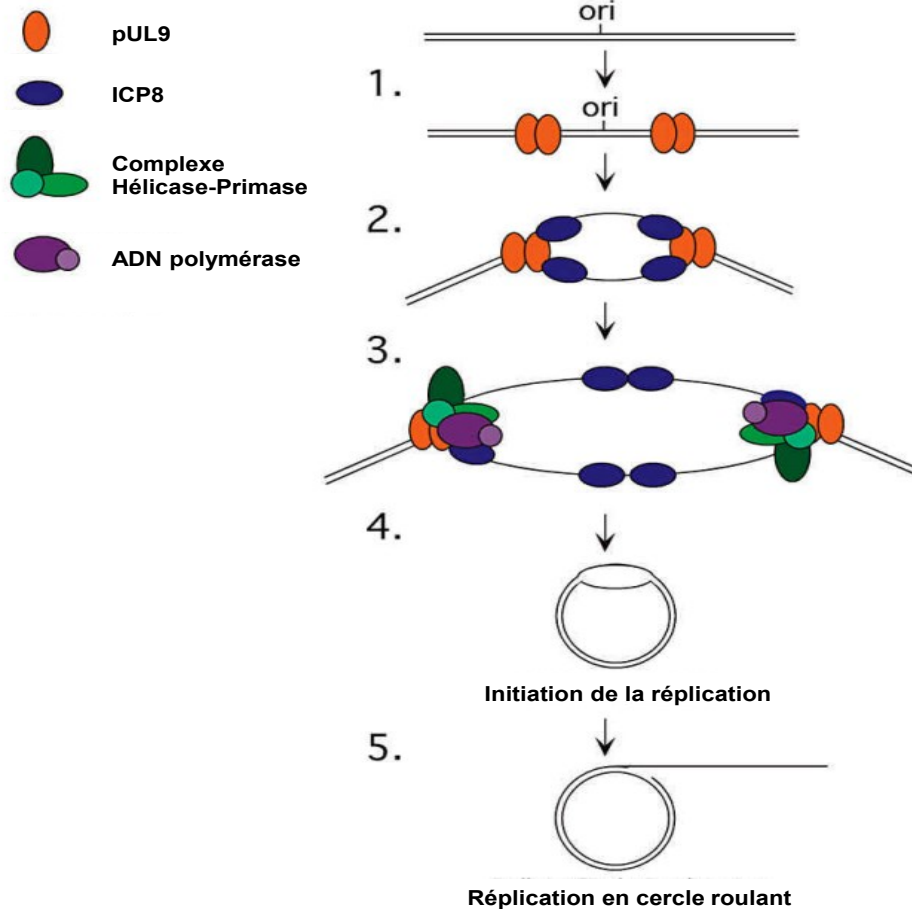


Figure 1.8 : Représentation schématique de la réplication de l'ADN du VHS-1.

1) Le cycle de réplication s'initie suite à la liaison de la protéine pUL9 avec une des origines de réplication (OriL ou S) et va permettre le déroulement de l'ADN. 2) La protéine ICP8 forme un complexe avec pUL9 pour former la fourche de réplication et ensuite ICP8 va pouvoir se lier à l'ADNsb. 3) ICP8 et pUL9 recrutent ensuite le complexe hélicase-primase formé par les protéines pUL5, pUL8 et pUL52 et l'ADN polymérase formée par les protéines pUL30 et pUL42. 4) La formation de la fourche de réplication a donné une forme thêta à l'ADN circulaire. 5) La synthèse de l'ADN viral suit un mécanisme de réplication en cercle roulant. Figure modifiée à partir de (Taylor *et al.*, 2002).

La réplication de l'ADN viral est décrite selon un mécanisme complexe de cercle roulant qui va être à l'origine de la production de concatémères de génome viral comme décrit dans la revue (Weller *et al.*, 2012). La présence des régions U_L et U_S ainsi que de régions terminales et internes répétées inversées va susciter de la recombinaison homologue et être à l'origine de plusieurs isomères du génome viral (Bruckner *et al.*, 1992, Dutch *et al.*, 1992, Hayward *et al.*, 1975, Honess *et al.*, 1980, Sheldrick *et al.*, 1974, Smiley *et al.*, 1990). Des protéines virales comme pUL12 et ICP8 vont stimuler la recombinaison homologue lors de la réplication de l'ADN viral (Muylaert *et al.*, 2011, Schumacher *et al.*, 2012, Wilkinson *et al.*, 2004). Les concatémères

vont être clivés sous forme d'unité monomérique au cours de la phase d'encapsidation de l'ADN viral (Jacob *et al.*, 1979).

7 MORPHOGÉNÈSE DU VHS-1

7.1 Assemblage des capsides et encapsidation du génome viral

L'assemblage de la capside nécessite la synthèse des protéines γ et ce processus s'effectue dans le noyau (**Figure 1.4**). La capside de symétrie icosaédrique se constitue principalement de trois types de protéines virales structurales dont la plus majoritaire est la protéine VP5 (pUL19) et les moins abondante VP19C (pUL38) et VP23 (pUL18). Ces protéines vont être transloquées dans le noyau pour la formation des capsides (Trus *et al.*, 1996). La protéine d'échafaudage pUL26.5 et la protéase pUL26 sont impliquées également dans l'assemblage des capsides (Thomsen *et al.*, 1995). Les protéines VP19C et VP23 vont former des complexes qui en s'assemblant donnent naissance à une capside sphérique, la procapside (Trus *et al.*, 1996). La protéine pUL6 forme également un complexe à l'origine du portail pour l'entrée du génome dans la capside (Newcomb *et al.*, 2001).

La procapside va subir un grand nombre de modifications *via* les protéines d'échafaudage et la protéase pUL26 pour enfin adopter sa forme icosaédrique caractéristique (capside B) (Newcomb *et al.*, 2000). L'étape finale se traduit par la formation d'un complexe terminase formé des protéines pUL15, pUL28 et pUL33 qui se fixe au portail de la capside et qui est réservé à l'entrée et à la sortie de l'ADN viral (Higgs *et al.*, 2008, Sankhala *et al.*, 2016).

L'entrée du génome viral dans la capside va entraîner un changement de la morphologie et donner naissance à la capside finale mature (capside C) (Heming *et al.*, 2017). Le précurseur d'ADN concatémérique va être clivé en unités individuelles monomériques et qui seront introduites *via* un complexe multiprotéique (terminase) alimenté par une ATPase d'encapsidation (Rao *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2015) pour donner la nucléocapside (Higgs *et al.*, 2008). *In fine*, chaque capside vide va contenir une seule copie du génome *via* ce processus de clivage (Conway *et al.*, 2011). Les protéines pUL6, pUL17, pUL25 et pUL32 semblent également importantes dans le processus d'insertion de l'ADN viral dans les néo-capsides (Roizman, 2013) et la protéine VP26 pourrait réguler pUL25 pour favoriser l'entrée du génome viral (Kobayashi *et al.*, 2017).

7.2 De la sortie du noyau à la sortie cellulaire

Une fois le génome encapsidé, les nucléocapsides vont être prises en charge par un ensemble de processus qui donneront *in fine* naissance à une particule virale infectieuse. L'une des étapes primordiales correspond à l'enveloppement de la capsid. Trois grands modèles d'enveloppement des capsides ont été décrits.

7.2.1 Différentes théories d'enveloppement des capsides

Le modèle d'enveloppement (i) par la voie luminale décrit un enveloppement des capsides au niveau de la membrane nucléaire interne (MNI). Celles-ci, sont ensuite transportées à travers le réticulum endoplasmique (RE) rugueux et libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose (Leuzinger *et al.*, 2005).

Le second modèle (ii) repose sur la théorie du double enveloppement qui est décrite par un enveloppement de la capsid dans la MNI suivi d'un désenveloppement dans la membrane externe du noyau (MNE). La capsid est ensuite ré-enveloppée au niveau de l'appareil de Golgi (Granzow *et al.*, 2001, Granzow *et al.*, 2004). On peut noter que dépendamment du modèle, l'acquisition des glycoprotéines d'enveloppe se ferait dans le noyau pour le modèle (i) et au niveau de l'appareil de Golgi dans le modèle (ii).

Le dernier modèle (iii) très controversé est décrit par un processus de pores nucléaires élargis par lesquels les virions pourraient sortir et ensuite acquérir leur enveloppe finale au niveau du réseau trans-golgien (Leuzinger *et al.*, 2005).

La théorie du double enveloppement (ii) semble à ce jour être le modèle le plus soutenu à travers la communauté scientifique (Mettenleiter *et al.*, 2009, Newcomb *et al.*, 2017).

7.2.2 Le primo-enveloppement dans la membrane nucléaire interne

Suivant le modèle (ii) du double enveloppement, les nucléocapsides vont être enveloppées dans la MNI et acquérir une enveloppe primaire ainsi que certaines protéines tégumentaires (**Figure 1.9**).

Les protéines pUL31 et pUL34 sont très conservées à travers la famille des *Herpesviridae* (Mettenleiter, 2002) et semblent indispensables dans ce processus de primo-enveloppement puisqu'en leur absence les capsides s'accumulent dans le noyau (Chang *et al.*, 1997, Roller *et al.*, 2000). Ces protéines forment un complexe pUL31/pUL34 (Fuchs *et al.*, 2002) qui permet à la

membrane nucléaire de changer de conformation permettant ainsi l'enveloppement des particules virales. En effet, la lamina nucléaire doit subir des changements pour que la capsid soit enveloppée (Reynolds *et al.*, 2001, Reynolds *et al.*, 2002, Scott *et al.*, 2001). Pour cela, le complexe pUL31/pUL34 va dans le processus de bourgeonnement recruter la protéine kinase C (PKC), qui à son tour va permettre la phosphorylation des lamines A/C et B pour *in fine* conduire à la désorganisation de la lamina nucléaire (Leach *et al.*, 2007). La co-expression de pUL31/pUL34 suffit pour générer la formation de vésicules à partir de la membrane nucléaire (Klupp *et al.*, 2007). Plus précisément, le complexe pUL31/pUL34 peut faire deux interactions essentielles, la première permet la fixation du complexe protéique à la membrane nucléaire et la seconde induit la courbure de la membrane nucléaire autour de la capsid (Roller *et al.*, 2010). La cellule hôte a développé certaines stratégies pour contrecarrer l'enveloppement des capsides telles que la protéine cellulaire transmembranaire (TMEM 140) qui est capable de se lier à pUL31 pour inhiber la formation du complexe pUL31/pUL34 et donc *in fine* empêche la sortie nucléaire des capsides (Guan *et al.*, 2014).

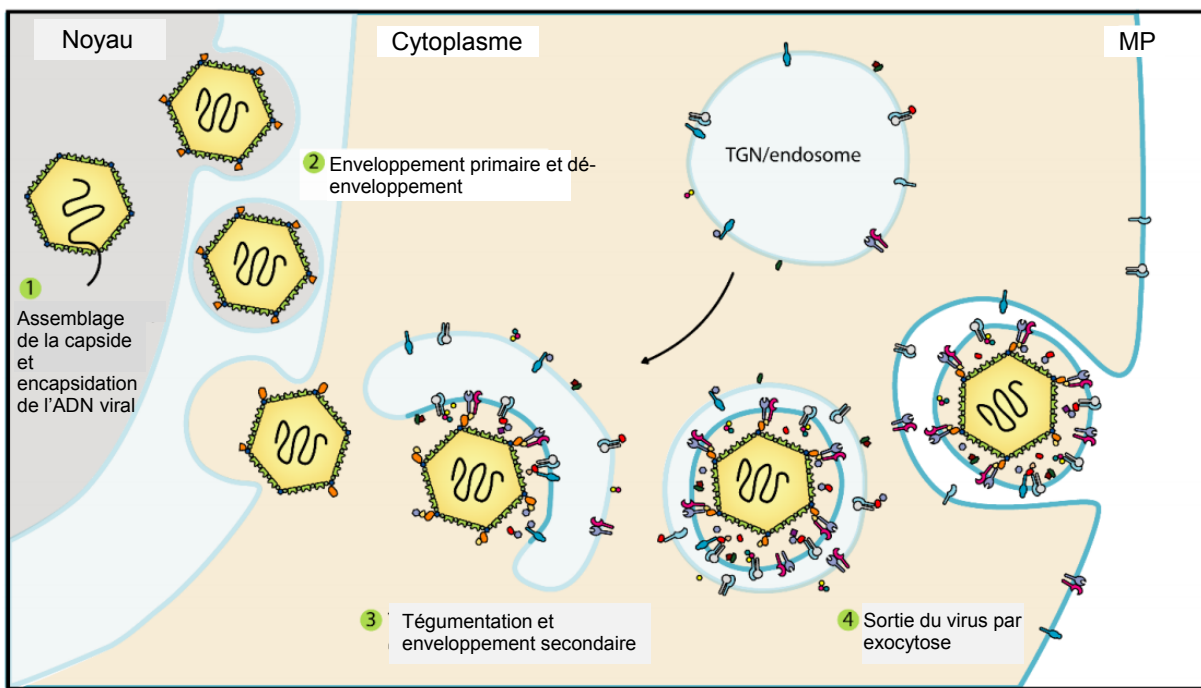


Figure 1.9 : Encapsidation et sortie de la nucléocapsid du noyau vers la membrane plasmique.

L'étape (1) correspond à l'étape d'encapsidation de l'ADN au niveau du noyau. L'étape (2) correspond au primo-enveloppement de la nucléocapsid membrane interne du noyau et au dé-enveloppement de celle-ci dans la membrane externe du noyau. L'étape (3) correspond à l'enveloppement secondaire qui a lieu au niveau du réseau transgolgien (TGN) ou dans les endosomes selon les théories proposées. L'étape (4) correspond à la sortie du virion enveloppé mature par exocytose au niveau de la membrane plasmique (MP). Figure modifiée à partir de (Owen *et al.*, 2015).

La protéine kinase pUS3 serait également une protéine impliquée dans le processus d'enveloppement. Celle-ci aurait la capacité de phosphoryler directement les lamines A/C ainsi que les protéines pUL31 et pUL34 (Bjerke *et al.*, 2006, Leach *et al.*, 2007) et son absence aurait pour conséquence l'accumulation des virions primo-enveloppés dans l'espace périnucléaire (Newcomb *et al.*, 2017).

La coopération du complexe protéique pUL31/pUL34 avec la glycoprotéine virale gK serait également importante au niveau de la MNI (Mettenleiter, 2004). La glycoprotéine gK semble importante pour l'acquisition de l'enveloppe primaire. En effet, un virus gK-null se voit dans l'incapacité de quitter le noyau (Jayachandra *et al.*, 1997). Cette glycoprotéine est également importante dans des étapes d'enveloppement plus tardives au niveau du TGN et avec la membrane plasmique lors de l'exocytose des virions matures (Chouljenko *et al.*, 2012).

La glycoprotéine virale gM serait également un modulateur dans la fusion membranaire au niveau de la MNI et de la MNE lors de la sortie des néo-capsides. Aux premiers stades de l'infection, cette glycoprotéine est distribuée au niveau des membranes nucléaires et également lors de la sortie de la capsid virale du noyau cellulaire, toutefois son rôle n'est pas clair dans ce processus. Dans des étapes plus tardives de l'infection, la glycoprotéine gM va se diriger de l'espace péri-nucléaire vers le TGN. Ce processus est régulé dans le temps et dans l'espace et il serait en partie modulé par la glycoprotéine gN (El Kasmi *et al.*, 2015). En effet, des expériences indiquent que les glycoprotéines virales gM et gN interagissent physiquement mais aussi fonctionnellement permettant à gN de moduler l'activité de gM dans le processus de fusion membranaire (El Kasmi *et al.*, 2015).

Ainsi, les protéines virales pUL31, pUL34, pUS3 et la glycoprotéine gK semblent être des acteurs principaux dans ce processus de primo-enveloppement.

7.2.3 Le processus de désenveloppement

Suite à l'étape de primo-enveloppement, l'enveloppe primaire de ces virus va pouvoir fusionner avec la MNE pour permettre aux nucléocapsides d'être libérées dans le cytoplasme (**Figure 1.9**) (Mettenleiter *et al.*, 2009).

L'étape de désenveloppement sollicite de nombreuses protéines virales telles que pUS3, pUL20, VP16 et la glycoprotéine gK (Weed *et al.*, 2017). L'absence du gène *us3* pour les virus VHS-1 et PRV (Herpèsvirus porcin de type-1) induit l'accumulation des virions respectifs dans l'espace périnucléaire (Bjerke *et al.*, 2006, Reynolds *et al.*, 2002).

Les glycoprotéines gB et gH du VHS-1 sont également impliquées dans ce processus de fusion avec la MNE et leurs absences auraient le même effet que l'absence de pUS3 (Farnsworth *et al.*, 2007). Il semblerait également que les glycoprotéines virale gD et gH/gL qui sont impliquées dans la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane plasmique lors de l'entrée virale soient également impliquées dans la fusion avec la MNE et donc seraient requises pour presque la totalité des mécanismes de fusion du VHS (Weed *et al.*, 2017).

Enfin, la glycoprotéine gK serait impliquée dans le processus de désenveloppement au niveau de la MNE et pour le transport du virion néo-synthétisé du site d'enveloppement secondaire vers la membrane cellulaire (Melancon *et al.*, 2007).

7.2.4 Enveloppement secondaire et tégmentation du VHS-1

La fusion de l'enveloppe virale primaire avec la MNE va conduire à la translocation de la nucléocapside dans le cytoplasme qui est plus ou moins revêtue de protéines tégmentaires (Granzow *et al.*, 2001, Granzow *et al.*, 2004). L'acquisition du tégment final a lieu dans ce compartiment cellulaire. Le tégment, une structure composée d'une multitude de protéines virales différentes ainsi que de certaines protéines cellulaires, va permettre de relier la capsidite et l'enveloppe virale. Cette dernière, va être ajoutée à son tour dans des étapes de bourgeonnement à partir de vésicules au niveau du TGN (Mettenleiter, 2006). Des analyses d'immunomarquage en microscopie électronique ont pu mettre en évidence des composants protéiques du tégment interne (TI) et externe (TE). Ainsi, les protéines pUL36 (VP1/2), pUL37 et pUS3 semblent être des protéines de structure du TI et les protéines pUL11, pUL42, pUL46 (VP11/12), pUL47, pUL48 (VP16), et pUL49 (VP22) structurent le TE (Bucks *et al.*, 2007, Granzow *et al.*, 2005).

L'interaction entre la capsidite et le tégment est limitée au niveau des sommets de la capsidite et, elle est assurée par les protéines pUL17 et pUL25 de la capsidite et la protéine pUL36 du TI qui interagissent ensemble (Fan *et al.*, 2015). La stabilisation du TI est assurée par les protéines pUL36 et pUL37 qui forment un complexe (Lee *et al.*, 2008, Vittone *et al.*, 2005). Cette liaison spécifique entre ces deux protéines semble importante pour que l'enveloppement secondaire des nucléocapsides se produise au niveau du réseau golgien et endosomal. De plus, deux motifs tryptophane conservés dans la région centrale de pUL36 sont requis pour cette étape (Ivanova *et al.*, 2016, Kelly *et al.*, 2014). Ainsi, la protéine pUL36 semble être importante pour renforcer les interactions entre la capsidite et le TI mais serait également impliquée dans le processus d'enveloppement secondaire.

De plus, pUL36 est également impliquée dans des interactions avec des protéines du TE. L'interaction directe entre pUL36 et VP16 (pUL48), protéine du TE, est importante pour renforcer les interactions entre le TI et le TE (Svobodova *et al.*, 2012). Il apparaît que la protéine VP16 est un déterminant majeur dans la structure du TE (Ko *et al.*, 2010) et son interaction directe avec les parties cytoplasmiques des glycoprotéines virales gB, gD et gK permettrait de renforcer les liens entre le TE et l'enveloppe virale au cours de l'enveloppement secondaire (Owen *et al.*, 2015). Par ailleurs, il a été montré que le processus d'enveloppement secondaire ne nécessite pas la présence de capsides puisque la présence des glycoprotéines et certaines protéines tégmentaires comme VP16 est suffisante pour enclencher le bourgeonnement (Mossman *et al.*, 2000, von Einem *et al.*, 2006).

La protéine VP22, une protéine de structure du TE, peut également interagir avec la protéine VP16, et avec gE (Bucks *et al.*, 2007) et gD *via* leurs parties cytoplasmiques (Chi *et al.*, 2005). L'interaction entre VP16 et VP22 et certaines glycoprotéines virales confère à VP22 un rôle central dans la formation de virions infectieux pour le VHS-1 (Gross *et al.*, 2003).

Finalement, la tégmentation et l'enveloppement final du virion sont des processus complexes faisant intervenir de nombreuses interactions protéiques (Lee *et al.*, 2008) et l'acquisition du tégment se ferait progressivement depuis l'enveloppement primaire à l'enveloppement secondaire (Vittone *et al.*, 2005).

De nombreuses études suggèrent fortement que le TGN est le site où a lieu l'enveloppement secondaire final et ce, par bourgeonnement par un processus de ré-enveloppement (**Figure 1.9**) (Harley *et al.*, 2001, Mettenleiter, 2002, Mettenleiter, 2004, Turcotte *et al.*, 2005). L'analyse de la composition lipidique de l'enveloppe des virions extracellulaires montre que celle-ci est similaire à celles des membranes golgiennes (van Genderen *et al.*, 1994). Par ailleurs, les glycoprotéines virales du VHS-1 (gB, gD, gE/gI, gH/gL) s'accumulent au niveau du TGN (Mettenleiter, 2004) et ce, de manière indépendante des capsides qui se localisent à proximité (Turcotte *et al.*, 2005).

Au cours de ces étapes finales d'enveloppement, les glycoprotéines gE, gI et gD vont s'avérer très importantes. En effet, leur absence conduit à une accumulation de nucléocapsides non-enveloppés dans le cytoplasme. Enfin, bien que la glycoprotéine gK et la protéine pUL20 ont leur importance dans le processus primaire d'enveloppement, ce duo protéique semble également impliqué dans l'enveloppement secondaire des virions et donc dans la production de virions matures infectieux (Avitabile *et al.*, 1994, Baines *et al.*, 1991, Foster *et al.*, 1999, Fuchs *et al.*, 1997, Johnson *et al.*, 2011). Ces protéines forment un complexe protéique gK/pUL20 capable

d'interagir avec pUL37 afin de promouvoir l'enveloppement final des virions (Jambunathan *et al.*, 2014).

Suite à l'enveloppement dans le TGN, la vésicule contenant le virion infectieux est transportée vers la membrane plasmique comme une vésicule d'exocytose. La fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique libère le virion infectieux dans le milieu extracellulaire (**Figure 1.9**) pour infecter les cellules avoisinantes (Johnson *et al.*, 2011, Mettenleiter *et al.*, 2006). La glycoprotéine gK et pUL20 seraient impliquées dans le transport des particules et dans la fusion des membranes (Foster *et al.*, 2004a, Melancon *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces étapes d'enveloppement des capsides et de transport décrites précédemment semblent quelques peu différentes dans les cellules neuronales.

7.2.5 Enveloppement des capsides dans les cellules neuronales

Il semble que dépendamment du type cellulaire, la morphogénèse du VHS-1 peut être différente à certains niveaux. En effet, dans un contexte d'infection de cellules neuronales, les particules virales néo-synthétisées peuvent être libérées soit à partir (i) du corps cellulaire soit (ii) à partir de l'extrémité axonale au niveau des neurites.

Dans le premier cas (i), l'enveloppement secondaire serait assuré au niveau du TGN et la libération des particules virales par exocytose selon des mécanismes décrit précédemment (Miranda-Saksena *et al.*, 2009, Smith, 2012).

Dans le second cas (ii), les mécanismes pour la libération virale au niveau des neurites semblent plus complexes puisque les particules virales doivent parcourir une plus grande distance à travers l'axone avant d'être libérées. L'ensemble des études permettent de soutenir deux modèles dans la morphogénèse et dans le transport des α -herpèsvirus en contexte d'infection de cellules neuronales : le modèle dit séparé et le modèle dit marié présenté dans la **Figure 1.10** (Kratchmarov *et al.*, 2012, Wisner *et al.*, 2011).

Le modèle dit séparé décrit le transport séparé des capsides non-enveloppées et des vésicules de sécrétions contenant les glycoprotéines virales. L'assemblage de ces deux entités aurait ensuite lieu au niveau de l'extrémité axonale (Kratchmarov *et al.*, 2012). En effet, des études en microscopie électronique et en microscopie confocale soutiennent ce modèle car il a été observé la présence de capsides non-enveloppées au niveau des axones ainsi que des vésicules de sécrétions contenant les glycoprotéines virales pour le VHS-1 (del Rio *et al.*, 2005, Miranda-Saksena *et al.*, 2009, Tomishima *et al.*, 2002). Fait intéressant, les glycoprotéines

apparaissent dans l'axone à 13 hpi alors que les capsides n'apparaissent qu'entre 15 et 17 hpi. Le transport des capsides et des vésicules contenant les glycoprotéines virales s'effectue *via* les MTs puisque l'utilisation de drogue comme le nocodazole, un agent biologique ayant la capacité de dépolymériser les MTs, bloque leur transport. De plus, l'utilisation de la brefeldine A, un composé lipidique d'origine fongique inhibant de façon spécifique le système de sécrétion de protéines dans les cellules animales a permis de bloquer le transport des glycoprotéines et des capsides. Ces différentes expériences permettent de soutenir davantage le modèle dit séparé (Miranda-Saksena *et al.*, 2000, Snyder *et al.*, 2006).

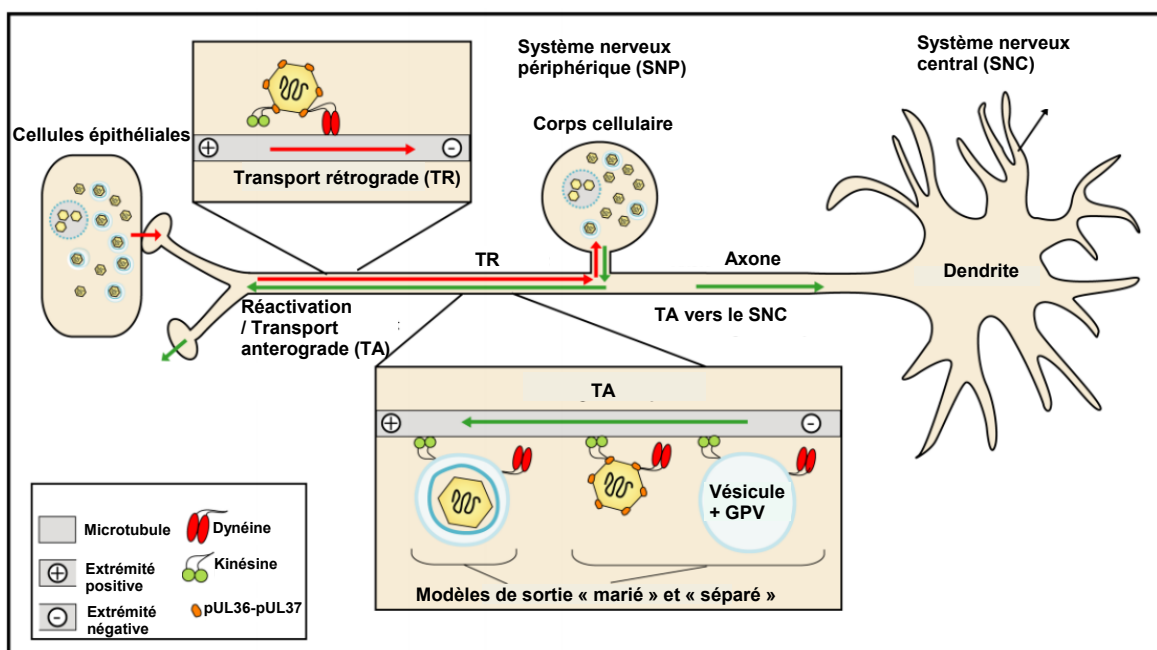


Figure 1.10 : Représentation du trafic neuronal VHS-1 au cours de l'entrée et de la sortie.

À la suite de l'infection des cellules épithéliales par le VHS-1, les virions néo-synthétisés vont infecter les terminaisons nerveuses des neurones innervant la région. Les capsides vont être acheminées par transport antérograde (TA) vers les corps cellulaires du système nerveux périphérique (SNP) où le virus entre en latence. Lors de la réactivation, les virions néo-synthétisés vont être acheminés vers le système nerveux central (SNC) par TA ou vers le site de primo-infection dans la majeure partie des cas. Deux modèles ont été décrits, le modèle séparé et le modèle marié, pour le TA des particules virales vers le site de primo-infection. Figure modifiée à partir de (Owen *et al.*, 2015).

Le modèle marié soutient que la libération des particules virales se fait au niveau du corps cellulaire. L'acquisition de l'enveloppement secondaire se ferait donc au niveau du TGN et les particules virales matures du VHS-1 peuvent éventuellement être véhiculées au niveau de l'axone (**Figure 1.10**) (Kratchmarov *et al.*, 2012).

En conclusion, malgré la complexité des différents modèles de morphogénèse en contexte d'infection neuronale, les deux modèles pourraient être utilisés pour la morphogénèse

et le transport viral, et les différents transports antérograde ou rétrograde seraient assurés *via* les MTs.

8 LA PATHOGÉNÈSE ET LA NEUROPATHOGÉNÈSE DU VHS

Les virus VHS-1 et -2 sont à l'origine des infections virales humaines les plus présentes à travers l'ensemble de la population mondiale. L'infection par ces virus affecte aussi bien des populations de pays développés que celles des pays en voie de développement. Dans le monde entier, ~90% des individus sont porteurs de l'un ou des deux types de virus mais le VHS-1 reste cependant l'infection de type simplex la plus répandue à travers le monde (Xu *et al.*, 2002). La transmission de ces virus est très efficace et se fait d'une personne infectée à une personne susceptible lors de contacts très étroits avec les muqueuses (muqueuses labiales, muqueuses génitales...). De plus, la caractéristique du virus de se présenter dans la majeure partie des cas sous forme latente fait de l'individu infecté un potentiel réservoir de transmission aux individus susceptibles. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'infection par le VHS-1 et augmente sa prévalence. En effet, ces différents facteurs peuvent être associés à l'âge de l'individu, ses origines, sa localisation géographique... Le sexe de l'individu ne semble pas être déterminant puisque les taux d'infections sont similaires chez les individus masculins et féminins. Ces infections herpétiques peuvent se traduire par des infections symptomatiques ou asymptomatiques (Hashido *et al.*, 1999, Mertz *et al.*, 2003).

8.1 Primo-infection et tropisme du VHS-1

Le VHS-1 est un virus neurotrope qui va à la suite de la primo-infection des cellules épithéliales muco-sales infecter les neurones sensitifs du SNP qui innervent la région. Le virus est transporté de manière rétrograde à travers les axones vers les ganglions nerveux du SNP correspondant aux ganglions trigéminaux (TG) (McGraw *et al.*, 2009b) dans le cas d'une infection au niveau du visage (labiale ou oculaire par exemple). C'est au niveau de ces centres nerveux périphériques que le VHS-1 peut entrer soit dans un cycle de réplication lytique soit en latence (**Figure 1.11**) (Efstathiou *et al.*, 2005, Nicoll *et al.*, 2016). Ce virus a également la capacité de se disséminer et de se répliquer dans le SNC et les infections à ce niveau peuvent s'avérer fatales pour l'individu infecté.

Le terme de neurovirulence fait référence à la neuroinvasion des sites périphériques et de la réplication du virus dans les cellules neuronales. En effet, de nombreux gènes viraux sont

impliqués dans la neurovirulence du VHS-1 (Davison *et al.*, 2009). La latence a été très largement décrite dans la littérature depuis le début du siècle (Baringer *et al.*, 1973, Roizman *et al.*, 1987, Roizman *et al.*, 2013, Stevens *et al.*, 1971). Celle-ci, est décrite comme un évènement survenant après l'entrée du virus au niveau de lésions épithéliales par infection des terminaisons nerveuses. Après le transport rétrograde des particules virales vers les ganglions du SNP comme par exemple les TG, le virus se réplique dans une petite partie de cellules neuronales qui seront finalement détruites. Dans la grande majeure partie des neurones sensitifs infectés, le génome viral reste présent toute la vie de l'individu sous forme d'une infection latente au cours de laquelle l'expression des gènes lytiques est absente.

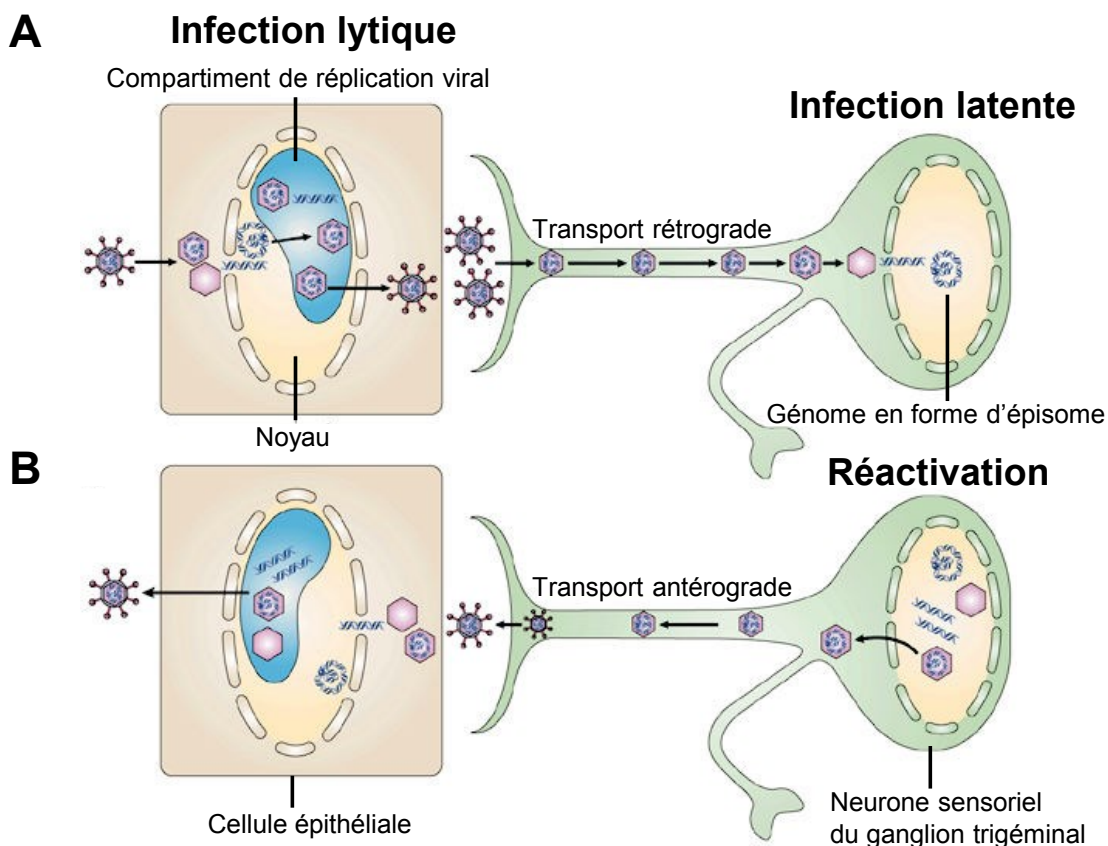


Figure 1.11 : Infection lytique et réactivation du VHS-1.

A) Suite à l'infection lytique des cellules épithéliales par le VHS-1, celui-ci se réplique dans les compartiments de réplication et le virus produit va infecter les terminaisons nerveuses de la région infectée et va être transporté vers le noyau neuronal pour établir sa latence. B) Lors de la réactivation du VHS-1, celui-ci est transporté vers le site de primo-infection pour induire une réinfection asymptomatique ou symptomatique. Figure modifiée à partir de (Knipe *et al.*, 2008).

8.2 Déterminants viraux et cellulaires impliqués dans la pathogénèse du VHS-1

De nombreuses études ont permis l'identification d'une multitude de déterminants viraux et cellulaires impliqués dans la pathogénèse et la neuropathogénèse virales.

Parmi ces déterminant viraux, la phosphoprotéine virale immédiate-précoce (α) ICP0 a été identifiée comme ayant des fonctions importantes dans la réplication aiguë du VHS-1 ainsi que dans les processus de latence et de réactivation. Trois régions spécifiques (Phos 1, Phos 2, Phos 3) de la protéine contenant de nombreux sites de phosphorylation ont été identifiées. En effet, certaines mutations dans la région Phos 1 ont altéré la réplication du virus faisant de la phosphorylation un régulateur important de ICP0 (Davido *et al.*, 2005). Ces mutations dans ICP0 ont affecté la réplication aiguë du VHS-1 au niveau oculaire ainsi que dans les TG. De plus, la capacité du VHS-1 à entrer en latence et à se réactiver a également été perturbée (Mostafa *et al.*, 2011). ICP0 semble être multifonctionnelle, puisque semblerait-il, celle-ci est importante pour contrer les défenses antivirales de la cellule hôte. L'une des particularités de la protéine ICP0 est d'être une ubiquitine ligase, décrite dans la revue (Gu, 2016). Cette caractéristique lui permet de cibler des facteurs cellulaires comme P53 et de les dégrader au niveau du protéasome ce qui va favoriser l'expression de gènes viraux (Boutell *et al.*, 2003, Lomonte, 2006). La protéine ICP0 semble également inhiber la réponse antivirale de la cellule infectée médiée par la voie NF- κ B impliquant la reconnaissance des composants viraux *via* les Toll-like receptor (TLR) et donc jouerait également un rôle dans l'évasion immunitaire du VHS-1 (Smith *et al.*, 2011).

Le génome du VHS-1 encode pour d'autres protéines virales afin de contrer la réponse immunitaire de l'hôte pour assurer une réplication efficace du virus. En effet, la protéine virale γ 34.5 (ICP34.5) peut interférer avec de nombreux mécanismes antiviraux comme l'autophagie, un processus jouant un rôle important dans l'immunité innée antivirale. Une étude montre que la protéine γ 34.5 du VHS-1 interagit avec la protéine Beclin-1 pour inhiber l'autophagie. L'utilisation d'un virus mutant VHS-1 n'exprimant pas le domaine d'interaction de γ 34.5 avec Beclin-1 dans un modèle murin a montré une diminution dans la neurovirulence du VHS-1 *in vivo* (Orvedahl *et al.*, 2007). Par ailleurs, γ 34.5 est impliquée dans la modulation de la protéine nucléolaire NOP53 pour faciliter la déphosphorylation du facteur d'initiation à la transcription eIF2 α pour une traduction virale efficace. En effet, la surexpression de cette protéine nucléolaire permet d'augmenter la production virale en culture cellulaire (Meng *et al.*, 2018).

Des mutations dans le gène *ul39* qui encode pour ICP6, une ribonucléotide réductase, ont également conduit à l'altération de la réplication virale aiguë au niveau de la cornée et des TG ayant des conséquences sur l'établissement de la latence et de la réactivation *ex-vivo* dans un modèle murin d'infection oculaire (Mostafa *et al.*, 2018).

Des études montrent que les glycoprotéines virales sont également des déterminants viraux importants pour la pathogénèse du virus. En effet, l'interaction d'un aptamère d'ADN ayant une forte affinité pour gD-VHS a sérieusement perturbé la liaison de gD aux récepteurs d'entrée dans la cellule ainsi qu'une diminution dans la réplication virale *in vitro* et *in vivo* (Yadavalli *et al.*, 2017). La délétion du gène *us7* qui encode pour la glycoprotéine gI atténue également la réplication virale aiguë dans les TG et le SNC de la souris sans pour autant avoir d'effet sur la production virale en culture cellulaire (Balan *et al.*, 1994, Dingwell *et al.*, 1995).

Enfin depuis de nombreuses années, des études montrent l'importance de la TK encodée par le gène *ul23* dans l'infection par le VHS-1. Comme mentionné précédemment, la protéine TK est indispensable pour la réplication virale dans les cellules neuronales (Wilcox *et al.*, 1992). TK serait également nécessaire pour la réplication virale dans les TG et le SNC de souris immunocompétentes mais pas dans les cellules au niveau du site périphérique. Un virus TK-null présenterait un défaut dans la réactivation au niveau des TG (Chen *et al.*, 2004, Coen *et al.*, 1989). L'apport d'une activité TK par co-infection avec le VHS-1 TK-null a permis au virus de restaurer la réplication virale dans les TG (Chen *et al.*, 2006). Par ailleurs, une étude récente a montré que l'infection de souris déficientes en cellules T a permis à un virus TK-null de se répliquer et de persister au niveau des TG et du SNC. Cette étude met en avant l'importance de TK dans la réplication dans les tissus nerveux et l'importance des cellules T dans le contrôle de l'infection par le VHS-1 (Huang *et al.*, 2017).

L'ensemble de ces études permet d'énoncer certains exemples de déterminants cellulaires ou viraux impliqués dans le cycle de vie du VHS-1. Le ciblage de ces facteurs pourrait contribuer à définir une nouvelle approche thérapeutique anti-VHS comme c'est le cas pour l'aciclovir, un substrat de TK, qui va inhiber l'ADN polymérase virale.

8.3 Latence et réactivation du VHS-1

La période de latence du VHS-1 est caractérisée par l'absence de l'infection lytique. Au cours de cette période, l'expression génique se traduit par l'expression des transcrits (*LAT*) pour « latency associated transcripts » (Spivack *et al.*, 1987, Stevens *et al.*, 1987). La latence se

caractérise donc par une réduction globale de l'expression des gènes lytiques et une absence de production de particules virales infectieuses (Nicoll *et al.*, 2016). Les transcrits primaires *LAT* sont de 8,3 kb, puis après épissage génèrent deux types de transcrits stables introniques de 1,5 kb et de 2 kb (Bloom *et al.*, 2011). Le transcrit *LAT* exonique de 6.3 kb donne naissance à plusieurs microARNs (miARNs). Les transcrits *LAT* et ces miARNs permettent de limiter l'expression des transcrits des gènes lytiques (Kramer *et al.*, 2011, Pan *et al.*, 2014, Peng *et al.*, 2008).

La protéine tégumentaire VP16 semble avoir un rôle important dans les mécanismes d'entrée en latence. En effet, la protéine VP16 en coopération avec les protéines cellulaires Oct-1 et Hcf-1 va permettre d'activer la transcription des gènes viraux α (Liang *et al.*, 2009, Roizman *et al.*, 2011). Lors de l'infection des neurones sensoriels innervant la région infectée, la protéine VP16 semble ne pas être transportée de manière efficace à travers les axones. La présence de VP16 dans le noyau du corps cellulaire semble alors limitée (Pourchet *et al.*, 2017). L'absence de VP16 dans le corps cellulaire va donc conduire à une diminution de l'expression des gènes lytiques comme *ICP0* ce qui va favoriser l'établissement de la latence virale. De plus, les protéines Hcf-1 et Oct-1 semblent importantes dans les modifications de la chromatine pour l'expression des gènes viraux α . Dans les cellules neuronales, ces facteurs sont absents dans le noyau cellulaire rendant impossible leur interaction avec VP16. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le complexe VP16/Oct-1/Hcf-1 ne peut se former dans un contexte d'infection neuronale (Kristie *et al.*, 2010, Thellman *et al.*, 2017) favorisant davantage l'entrée en latence.

Le remodelage de l'ADN viral joue un rôle fondamental dans l'entrée ou la sortie de la latence virale. En effet, la chromatine condensée restreint l'expression des gènes viraux tandis que la chromatine décondensée permet l'expression des gènes viraux. De façon générale, dans les cellules eucaryotes, l'ADN est étroitement associé aux histones et autres protéines pour former la chromatine. La structure de la chromatine est de plus en plus reconnue comme étant hautement importante dans la régulation de l'expression des gènes. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, qui est composé de l'ADN enroulé autour d'un tétramère de protéines d'histone (H2A, H2B, H3 et H4) tel que présenté dans la **Figure 1.12** (Knipe *et al.*, 2008). Comme l'ADN cellulaire, l'ADN viral du VHS-1 s'associe aux histones pendant l'infection lytique dans les cellules épithéliales mais également pendant l'infection latente dans les neurones. La régulation de l'assemblage de la chromatine sur l'ADN viral du VHS-1 va être à l'origine de l'infection lytique ou de l'infection latente.

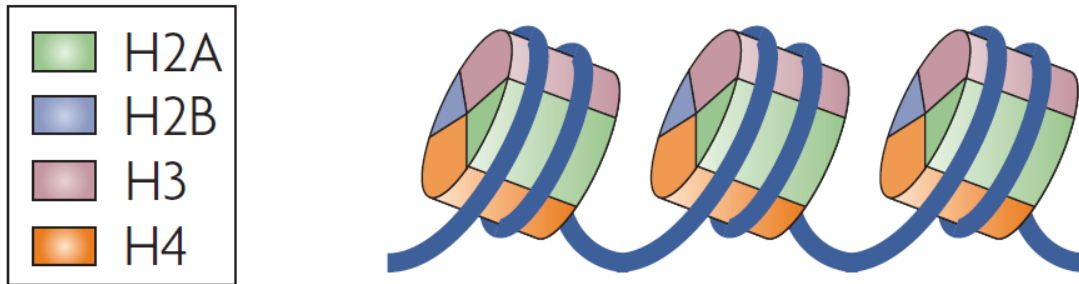


Figure 1.12 : Structure de la chromatine.

Le nucléosome constitue l'unité de base de la chromatine. C'est un complexe qui comporte un segment d'ADN enroulé autour d'un tétramère protéique d'histones (H2A ; H2B ; H3 ; H4). Figure modifiée à partir de (Knipe *et al.*, 2008).

Un modèle a été proposé expliquant comment est modulée la structure de la chromatine associée à l'ADN viral du VHS-1 vers l'état d'euchromatine (état décondensé) ou d'hétérochromatine (état condensé). En effet, les modifications post-traductionnelles des queues d'histones au niveau des nucléosomes ont été directement liées à la régulation de la structure de la chromatine (Wurtele *et al.*, 2009). Ces modifications font références à de l'acétylation, de la méthylation, de l'ubiquitination et de la phosphorylation. L'ensemble de ces modifications va être à l'origine des interactions entre les histones et l'ADN mais également avec d'autres protéines qui peuvent être associées à la chromatine. L'acétylation et la méthylation sont les modifications les mieux caractérisées. L'acétylation des queues d'histones réalisée par les enzymes histone acétyltransférases (HATs), tels que CBP et P300, est principalement associée à l'expression des gènes. Cette modification va entraîner le relâchement de la structure de la chromatine et va servir de sites de liaison pour des complexes protéiques et des activateurs transcriptionnels. La méthylation des queues d'histones peut être trouvée dans l'hétérochromatine et l'euchromatine. Toutefois, la triméthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 9 (H3K9me3) est caractéristique de la condensation de l'ADN et donc de la formation de l'hétérochromatine. Au début de l'infection lytique, la présence de la protéine virion VP16 dans le noyau entraîne le recrutement de facteurs de remodelage des histones, tels que BRG1, BRM et les HATs CBP et P300 au niveau des promoteurs des gènes lytiques α . Les histones associées au génome viral portent des marqueurs actifs de l'euchromatine, telle que l'acétylation de l'histone H3 sur les résidus K9 et K14 (H3K9ac, H3K14ac) mais également sur les résidus K4me2 et K4me3 (**Figure 1.13**). Les protéines virales telle que ICP0 contribuent également au remodelage des histones. Il a été rapporté que ICP0 est nécessaire pour diminuer l'association du génome viral avec l'histone H3, d'augmenter l'acétylation de cette histone (Cliffe *et al.*, 2008), et de réduire la présence de H3K9me3 (Lee *et al.*, 2016) permettant ainsi de promouvoir l'expression des gènes lytiques. Au cours d'une

infection latente, l'ADN génomique du VHS-1 est sous forme épisomique dans le noyau des neurones (Deshmane *et al.*, 1989, Efstathiou *et al.*, 1986) et, est également associé aux histones. Dans ce contexte, l'hétérochromatine restreint l'accès à l'ARN polymérase II (Strahl *et al.*, 2000). Aussi, les promoteurs des gènes lytiques affichent des marqueurs de l'hétérochromatine tels qu'un faible niveau d'acétylation des queues d'histones et des méthylations caractéristiques sur l'histone H3 au niveau des résidus K9 et K27 (H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3) (Knipe *et al.*, 2008).

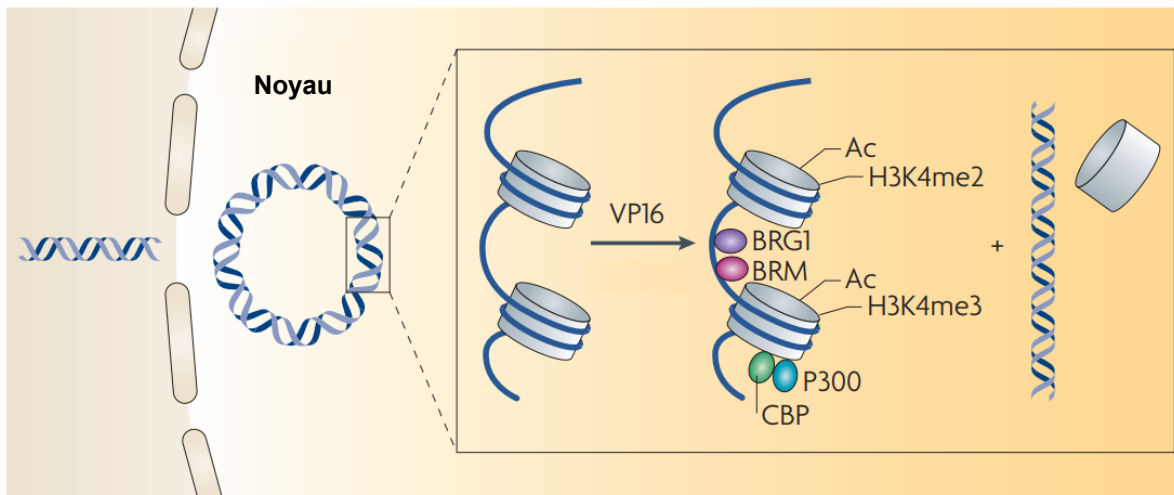


Figure 1.13 : Structure de la chromatine associée à l'ADN viral dans le noyau de la cellule épithéliale. Suite à l'entrée du génome viral dans le noyau de la cellule épithéliale, celui-ci se circularise. Au début de l'infection, seule une proportion de l'ADN viral s'associe aux histones. La présence de la protéine virale VP16 au niveau du noyau va permettre le recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Parmi ces protéines, sont recrutés les facteurs de remodelage BRG1 et BRM et les enzymes acétyltransférases CBP et P300 qui se lient au niveau des promoteurs des gènes IE (α). Les histones associées au génome portent des marqueurs actifs de l'euchromatine comme l'acétylation de l'histone H3 sur les résidus K4me2 et K4me3. D'autres résidus peuvent être également acétylés comme K9 et K14. Figure modifiée à partir de (Knipe *et al.*, 2008).

Tel que mentionné précédemment, l'expression des transcrits *LAT* est une caractéristique de la latence virale. En effet, contrairement aux gènes lytiques, le promoteur *LAT* est accessible puisque la chromatine présente des modifications post-traductionnelles permissives à la transcription (Cliffe *et al.*, 2009, Knipe *et al.*, 2008). Les transcrits *LAT* ont la particularité de participer à la répression de l'expression des gènes lytiques favorisant ainsi l'entrée ou le maintien de la latence du VHS-1. Des études montrent que les transcrits *LATs* sont associés avec le processus de condensation de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes lytiques empêchant ainsi leur expression (Cliffe *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2005) comme observé dans la **Figure 1.14**. Plus précisément, les *LATs* sont associés à la présence de H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes lytiques (Cliffe *et al.*, 2009, Kwiatkowski *et al.*,

2009, Wang *et al.*, 2005). De plus, des auteurs se sont intéressés à la cinétique du recrutement de H3K27me3 sur les promoteurs des gènes lytiques dans les neurones de TG dans un modèle murin d'infection oculaire (Cliffe *et al.*, 2013). Ils ont observé l'association de l'histone H3 aux promoteurs des gènes lytiques dès 7 jpi. Toutefois la triméthylation du résidu K27 sur l'histone H3 n'apparaît qu'à partir de 14 jpi coïncidant avec la résolution de l'infection aiguë et l'établissement de la latence virale (Cliffe *et al.*, 2013).

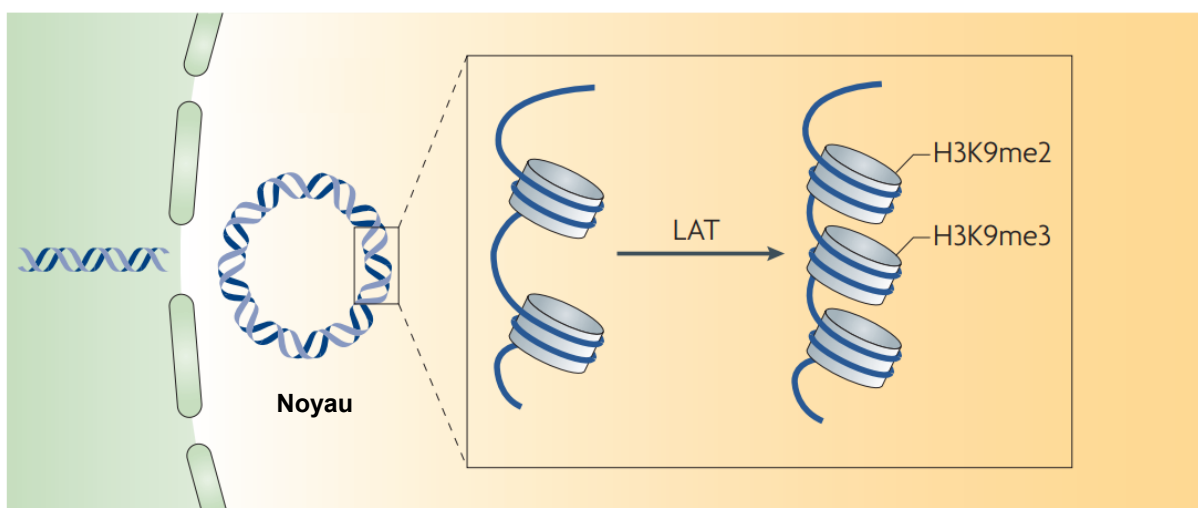


Figure 1.14 : Structure de la chromatine associée à l'ADN viral dans le noyau du neurone.

Lors d'une infection neuronale, le génome se circularise également. La protéine VP16 reste dans le cytoplasme et une proportion élevée de l'ADN viral s'associe aux nucléosomes. Les niveaux d'acétylation au niveau des histones sur les promoteurs des gènes lytiques sont faibles. L'expression des transcrits *LAT* associée à la latence va favoriser l'assemblage de l'hétérochromatine sous forme d'histone H3K9me2 et H3K9me3. Figure modifiée à partir de (Knipe *et al.*, 2008).

D'autres éléments intrinsèques aux cellules neuronales contribuent à l'établissement ou le maintien de la latence virale. Les miARNs miR-H2 et miR-138 (spécifiques aux cellules neuronales) seraient capables d'inhiber l'expression de la protéine virale ICP0 et le miARN miR-H6 serait capable d'inhiber l'expression de la protéine virale ICP4 (Umbach *et al.*, 2008). La régulation à la baisse de ces deux protéines virales permettrait de promouvoir l'établissement de la latence (Pan *et al.*, 2014). En effet, l'utilisation d'un virus mutant VHS-1 exprimant des mutations dans les séquences ciblées d'*ICP0* par le miR-138 a montré une plus grande expression d'*ICP0* ainsi que d'autres protéines lytiques dans les cellules neuronales infectées en culture cellulaire (Pan *et al.*, 2014). Les neurones semblent représenter un environnement favorisant l'état de la latence du VHS-1. Il est fort probable que l'ensemble des miARNs -H2, -138 et -H6 agissent de façon synergique pour la repression d'*ICP0* afin de contribuer à l'infection latente et à la survie de la cellule hôte.

En plus du contrôle intrinsèque de la latence dans les neurones sensitifs, le système immunitaire contribue au maintien de la latence virale. Des études montrent que les ganglions nerveux périphériques infectés par le VHS-1 contiennent des lymphocytes T CD8⁺ étroitement liés aux neurones infectés qui sont impliqués dans le maintien de la latence du VHS-1 (Khan *et al.*, 2017, Leger *et al.*, 2011).

D'une manière périodique, la phase de latence est interrompue par la réactivation de la réplication et donc de la production virale. Ces réactions de réactivation peuvent se faire de manière spontanée et sont régies par une variété de stimuli environnementaux ou systémiques comme un stress, une déficience immunitaire, changements hormonaux.... Celles-ci sont corrélées à une diminution de l'immunité à médiation cellulaire et humorale (Baringer *et al.*, 1973, Glaser *et al.*, 2005, Roizman *et al.*, 1987). Le virus peut se réactiver et causer des lésions récurrentes au niveau du site de primo-infection. Pour la majeure partie des cas de réactivation, le virus réactivé est transporté de manière antérograde vers le site de primo-infection pour induire une réinfection endogène asymptomatique ou symptomatique. Dans des cas plus rare, le virus réactivé peut être acheminé par ce même transport, vers le SNC et provoquer des complications bien plus importantes (Owen *et al.*, 2015).

La réactivation du VHS-1 va nécessiter une stimulation des promoteurs des gènes lytiques. Différents éléments ont été identifiés comme étant impliqués dans la réactivation du VHS-1. Des études montrent que le facteur cellulaire Hcf-1 qui joue un rôle d'activateur de la transcription des gènes α pourrait être impliqué dans le processus de la réactivation. Lors de la phase de la réactivation, ce coactivateur protéique est transloqué vers le noyau. Les analyses par immunoprécipitation de la chromatine montre que Hcf-1 est recruté au niveau des promoteur des gènes α (Kristie *et al.*, 2010).

Les enzymes histone déméthylases sont impliquées dans l'expression des gènes lytiques lors de la latence virale (Hill *et al.*, 2014, Liang *et al.*, 2013a, Liang *et al.*, 2013b, Liang *et al.*, 2009, Messer *et al.*, 2015) En effet, la déméthylation des H3K9me3 et H3K27me3 a été associée à la réactivation du VHS-1.

Une récente étude montre qu'il existe une voie de signalisation neuronale impliquant l'activation de c-Jun N-terminal kinase (JNK) dans la réactivation du VHS-1 dans un modèle de réactivation *ex vivo* (Cliffe *et al.*, 2015). Cette voie est généralement activée en réponse à un stress cellulaire et implique les protéines DLK (double leucine kinase) et JIP3 (JNK-interacting protein 3). L'activation de la voie JNK va conduire à la phosphorylation des résidus sérines au niveau des histones H3 (H3pS10) associées aux promoteurs des gènes lytiques (Cliffe *et al.*,

2015). Cette modification va permettre la première induction de l'expression des gènes lytiques même en présence des méthylations répressives H3K9me3 et H3K27me3 (Cliffe *et al.*, 2015, Cliffe *et al.*, 2017). Ces travaux montrent un lien entre une voie de réponse spécifique au stress neuronal et la réactivation du VHS-1.

La réactivation du VHS-1 peut être déclenchée par différentes formes de stress au niveau des neurones comme par exemple le choc thermique (Miller *et al.*, 2009, Sawtell *et al.*, 1992) ou encore la privation du facteur de croissance nerveux (NGF) résultant en l'inhibition de la voie PI3K (Du *et al.*, 2011). Il a été montré *in vitro* que l'ensemble de ces stimuli entraîne l'activation de la voie de signalisation JNK (Du *et al.*, 2011).

Un autre élément semble être impliqué dans la réactivation du VHS-1, il s'agit des enzymes désacétylases d'histones (HDAC). La fonction de ces enzymes consiste à la désacétylation des queues d'histones et de ce fait la répression de l'expression des gènes. Il a été observé que l'utilisation d'un inhibiteur des HDAC, le butyrate de sodium, a induit la réactivation du VHS-1 dans un modèle murin d'infection oculaire (Neumann *et al.*, 2007). L'importance de l'acétylation des queues d'histones lors de la réactivation virale a été également soulignée dans une étude qui observe l'acétylation des histones H3 (résidus K9 et K14) associées au promoteur d'ICP0 dans des cultures de cellules issues de ganglions nerveux (Amelio *et al.*, 2006). À l'opposé les auteurs observent la désacétylation des histones H3 (K9 et K14) associées aux régions promotrices de *LAT* (Amelio *et al.*, 2006). De plus, ICP0 pourrait participer suite à son expression à l'entrée en phase lytique en inhibant les HDAC (Coleman *et al.*, 2008, Ferenczy *et al.*, 2011). Il a été décrit que ICP0 pourrait perturber le complexe répresseur CoREST/REST de s'associer aux HDAC et de ce fait ICP0 perturbe l'activité des HDAC (Gu *et al.*, 2005). Plus précisément, une étude rapporte que la perturbation de l'activité des HDAC passe par la capacité de ICP0 à interagir avec les HDAC (Lomonte *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données permettent de conclure que l'établissement de la latence et la réactivation du VHS-1 dépendent de nombreux facteurs cellulaires et viraux. La phase de latence permettrait au virus de persister dans l'hôte toute sa vie et la réactivation, le moyen de se propager d'un individu à un autre.

8.4 La réponse immunitaire anti-VHS-1

Le contrôle de l'infection et la clairance du VHS-1 dépendent de l'immunité innée et adaptative. Au cours de la primo-infection par le VHS-1, les cellules épithéliales infectées vont

reconnaître des motifs moléculaires provenant du pathogène (PAMP) *via* les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). De manière générale, la liaison des PAMP aux PRR va aboutir à l'activation de voies de signalisation menant à la production d'interféron de type I (IFN I), de chimiokines, et d'interleukines pro-inflammatoires (Akira *et al.*, 2006). La synthèse en cytokines aura pour effet l'établissement de l'état antiviral au sein de la cellule épithéliale infectée et dans les cellules voisines qui se manifeste par la limitation de la réplication virale.

De nombreux récepteurs PRR sont impliqués dans la reconnaissance du VHS-1 et ils sont localisés soit dans le cytoplasme, à la membrane plasmique, ou dans les endosomes tels que les TLR (pour Toll-like receptors) et les (RIG)-I-like receptors (RLR) (Melchjorsen, 2012, Paludan *et al.*, 2011). Parmi les PRR, de nombreuses études rapportent l'importance du TLR 3 et 9, des récepteurs situés dans les compartiments endosomaux, au cours de l'infection par le VHS-1 révisé dans (Piret *et al.*, 2015). En effet, la déficience en TLR 3 a été associée chez l'homme au développement de l'encéphalite (Casrouge *et al.*, 2006, Guo *et al.*, 2011, Herman *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2014b, Zhang *et al.*, 2007). Quant au TLR 9, des souris C57BL/6 déficientes pour ce récepteur ont présentés des signes d'encéphalite et de paralysie suite à l'infection intranasale par le VHS-1 comparativement aux souris sauvages (Lima *et al.*, 2010). Plus encore, ces souris ont présenté un taux de mortalité de 60% (Lima *et al.*, 2010). La double déficience du TLR 2 et 9 dans les souris a augmenté l'encéphalite et le taux de mortalité atteignant 100%, et diminué davantage la production de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau comme l'IFN- γ (Lima *et al.*, 2010). Ces observations ont ainsi démontré un effet coopératif de ces deux récepteurs dans le contrôle du VHS-1 au niveau du SNC.

Comme mentionné ci-dessus, l'expression de l'IFN-I correspond à l'une des premières lignes de défense contre le VHS-1. La production d'interférons, de chimiokines pro-inflammatoires et des cytokines vont permettre le recrutement de cellules de l'immunité innée (Kurt-Jones *et al.*, 2017). En effet, les cellules dendritiques, les monocytes inflammatoires, les macrophages, les natural killers (NK) vont également être essentiels pour le contrôle de la réplication du VHS-1 en produisant du TNF- α , IFN γ , des nitrites d'oxydes (Lucinda *et al.*, 2017). Les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, et les macrophages vont phagocyter les cellules infectées par le VHS-1 puis migrer dans les organes lymphoïdes secondaires pour présenter *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) l'antigène aux lymphocytes T naïfs aboutissant à leur activation. Les lymphocytes T activés vont ensuite subir une phase d'expansion clonale corrélée avec la diminution de la charge virale. Les lymphocytes T (CD8⁺ et CD4⁺) vont être indispensables pour l'élimination de la réplication virale au cours de

l'infection aiguë, et pour l'établissement et le maintien de la latence virale (Egan *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2017). Notamment, ce sont les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHS-1 qui sont importants dans le maintien de la latence virale dans les TG (Treat *et al.*, 2017). L'importance des lymphocytes T dans le contrôle du VHS-1 a été soulignée dans de nombreuses études où des souris déficientes en cellules T développent des infections au niveau du SNC et ne survivent pas à l'infection (Huang *et al.*, 2017). Plus particulièrement, des études récentes ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'interleukine 17 (IL-17) auraient un rôle neuro-protecteur dans le SNC des souris infectées par le VHS-2 (Peng *et al.*, 2017).

8.5 Les traitements contre le VHS

Actuellement, il n'existe aucun vaccin efficace contre le VHS-1 (Sandgren *et al.*, 2016). De nombreuses études sont activement effectuées dans le but de générer des agents antiviraux pour les infections aux VHS (-1 et -2). Néanmoins quelques difficultés sont rencontrées et elles sont associées à la résistance du VHS aux agents antiviraux. En effet, des mutations répertoriées dans le gène *UL23* codant pour la thymidine kinase (TK) sont responsables de la résistance aux différents traitements antiviraux (Jiang *et al.*, 2016). Les travaux actuels sont axés sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces résistances afin de développer de nouvelles thérapies (Brunnemann *et al.*, 2018). Le traitement actuel le plus connu correspond à l'aciclovir (ACV) pour les infections aux VHS (-1 et -2) mais également pour les infections au VZV et EBV (Britton *et al.*, 2018, Carter-Timofte *et al.*, 2018). Toutefois, l'ACV reste le plus efficace contre les infections aux VHS-1. L'ACV est très efficace aussi bien au niveau du site de primo-infection (muqueuse) qu'au niveau du SNC. L'ACV est un analogue du nucléoside guanosine plus précisément une guanosine modifiée (2'-déoxyguanosine). L'ACV est dans un premier temps monophosphorylé par TK, suivi d'une di et triphosphorylation assurée par des enzymes cellulaires conduisant à la forme active du médicament soit l'ACV-triphosphate. L'ACV-triphosphate va être incorporé à la place de la guanosine naturel au niveau de l'ADN viral au cours de la phase d'élongation et il va finalement inhiber ce processus. Cependant, l'ACV est efficace pour les infections actives herpétiques et non pour les infections sous forme latente. Des dérivés de l'ACV ont été générés afin de contrer d'éventuelles résistances comme le valacyclovir (VACV) (Bastiaans *et al.*, 2018), le famciclovir (FCV) (Shobha *et al.*, 2018), mais également d'autres nucléosides modifiés comme le CDV (cytidine modifié) ou encore le trifluridine (Mahmoud *et al.*, Mercier-Darty *et al.*, 2018).

Par ailleurs, un vaccin contre les infections génitales est en cours de développement. Ce traitement pourrait contrôler la transmission du VHS-2 et la diminution des lésions. Ce vaccin, connu sous le nom de GEN-003 serait capable de stimuler les cellules T spécifiques au VHS-2 dans le but de détruire les cellules infectées. Le vaccin est actuellement en cours d'essais cliniques (Lawrence, 2018).

9 LE VHS-1 ET LES CELLULES ÉPITHÉLIALES POLARISÉES (CEP)

9.1 Organisation des CEP

Les épithélia sont formés par un ensemble de cellules épithéliales jointives *via* des contacts étroits intercellulaires. Ils constituent une barrière cellulaire entre le milieu extérieur et les différents tissus de l'organisme. Ces épithélia jouent un rôle fondamental dans le cadre des échanges de molécules et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la sécrétion, l'absorption, l'homéostasie tissulaire... (Franke, 2009, Niessen, 2007).

Ces étroits contacts intercellulaires sont constitués par les desmosomes, les jonctions adhérentes (JAs) et les jonctions serrées (JSs). L'ensemble de ces protéines forment le complexe apical de jonction (CAJ) (Guttman *et al.*, 2009). Ce CAJ est en étroite communication avec des éléments du cytosquelette pour renforcer les interactions avec les cellules adjacentes (**Figure 1.15**).

Des études montrent que les JAs et les JSs sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation permettant le maintien de l'intégrité de ces épithélia (Matter *et al.*, 2005). Les CEP sont des cellules très spécialisées qui constituent de nombreux épithélia. Elles présentent une organisation polarisée au niveau de la membrane plasmique puisque ces cellules possèdent une membrane plasmique apicale et une membrane plasmique basolatérale. La membrane plasmique délimite un pôle apical et un pôle basolatéral qui repose sur la lame basale (Mostov, 1995). Ce sont les JSs qui forment une ceinture dite la *zonula occludens* qui délimite ces deux pôles. Les JSs, les JAs (formant la *zonula adherens*) et les desmosomes permettent les jonctions entre les cellules adjacentes. L'organisation polarisée de ces cellules suggère que la composition protéique et lipidique de la membrane plasmique de ces deux domaines distincts soit différente. Ainsi, cette composition spécifique suggère un tri polarisé dans ces cellules et, est directement corrélée avec les fonctions de l'épithélium. Le recyclage des protéines et des lipides est donc assuré par un transport polarisé. Ces mécanismes de transport polarisé ont été est très largement

étudié et de ce fait, il a pu être mis en évidence de nombreux signaux impliqués dans le tri polarisé des protéines.

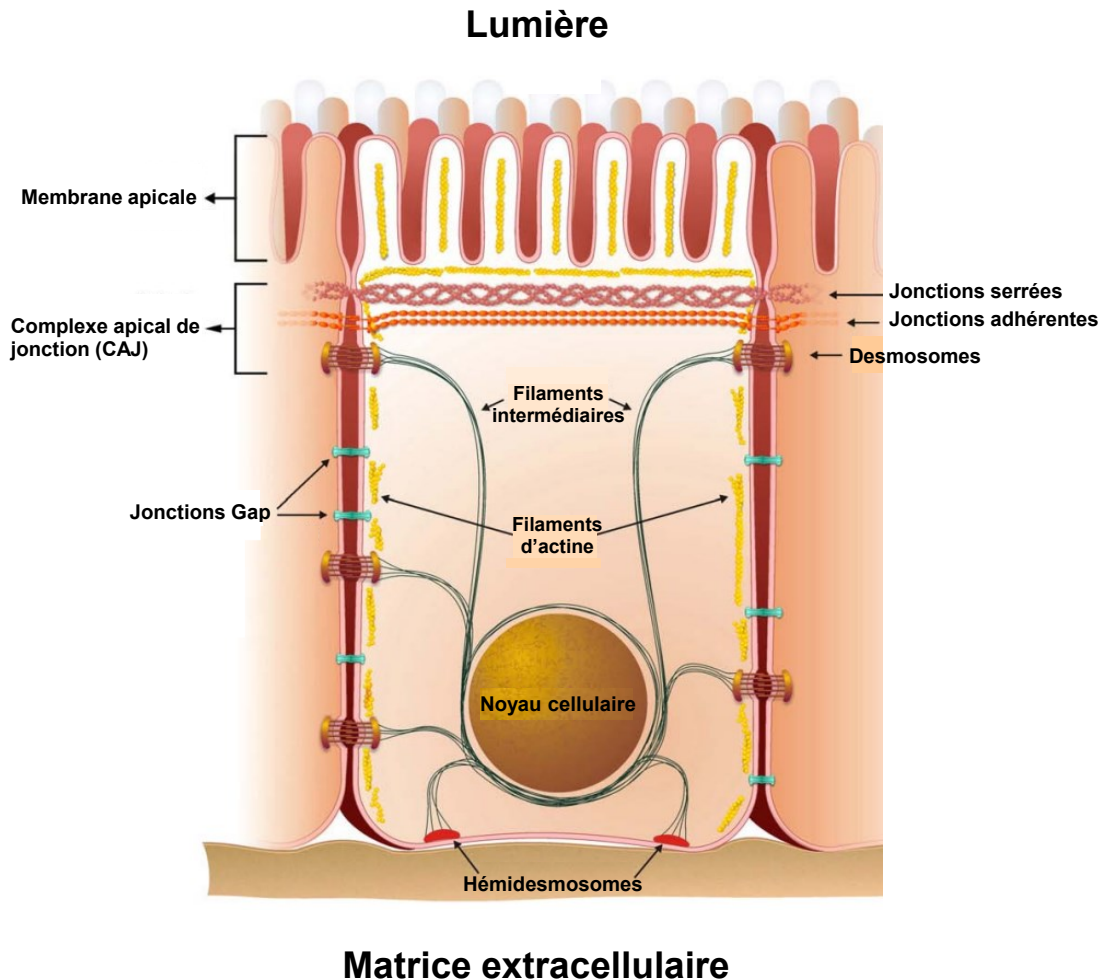


Figure 1.15 : Schéma représentatif de l'organisation des cellules épithéliales polarisées.

Le complexe apical de jonctions (CAJ) est formé par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Latéralement, chaque CAJ interagit avec le CAJ de la cellule voisine. Les hémidesmosomes interagissent avec la lame basale située à la base des cellules. Les CAJs vont également interagir avec le cytosquelette de la cellule (filaments d'actine, filaments intermédiaire...) pour renforcer les interactions cellule à cellule (Guttman *et al.*, 2009).

9.1.1 Les desmosomes

Les desmosomes sont des complexes constitués de nombreuses protéines transmembranaires et d'ancrage (Holthofer *et al.*, 2007). Ils ont un rôle principalement important dans le maintien des tissus épithéliaux entre les cellules adjacentes mais également sont en

étroite communication avec des éléments du cytosquelette comme par exemple avec les filaments intermédiaires (Smith *et al.*, 1998).

9.1.2 Structure des jonctions adhérentes

Les JAs sont également en étroite communication avec le cytosquelette mais exclusivement avec les filaments d'actine ce qui permet de renforcer les interactions intercellulaires. Les JAs sont constituées par deux complexes protéiques : nectine/afadine et cadhérine/caténine (Nelson, 2008, Takai *et al.*, 2003).

Les nectines sont liées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines afadines. Les afadines possèdent de nombreux domaines protéiques qui vont permettre le lien entre les nectines et le cytosquelette d'actine. Les afadines vont également être impliquées dans les voies de signalisation qui permettent la régulation et le maintien des JAs (Choi *et al.*, 2016).

Les protéines cadhérines représentent une composante essentielle pour la stabilité des JAs et jouent un rôle important dans la formation de ces jonctions (Hartsock *et al.*, 2008). La famille des protéines cadhérines compte différents membres comme par exemple la E-cadhérine qui est fortement exprimée dans les épithélia. Tout comme les desmosomes, la E-cadhérine dépend fortement du calcium. Ces protéines vont contenir des domaines protéiques qui permettent l'interaction avec des protéines analogues des cellules adjacentes mais également avec une autre catégorie de protéine, les caténines. L'ensemble de ces interactions va également contribuer à la stabilité des JAs entre les cellules adjacentes. Les caténines vont également compter plusieurs membres dans cette famille dont l' α -caténine et la β -caténine. Il a été mis en évidence l'interaction potentielle avec ces deux membres protéiques et la E-cadhérine et de ce fait, cette interaction va permettre à la E-cadhérine l'ancrage indirect au cytosquelette d'actine *via* ces protéines et consolider les JAs (Buckley *et al.*, 2014, Yamada *et al.*, 2005). De plus, un autre membre de la famille, la p120-caténine peut également interagir avec la E-cadhérine. L'ensemble des ces interactions cadhérine/caténine ainsi que leur implication dans certaines voies de signalisation vont également contribuer au maintien de l'intégrité des JAs. En effet, la p120-caténine peut être phosphorylée à différents niveaux par la protéine kinase C afin de moduler la formation des JAs et donc l'adhésion cellule à cellule (Castaño *et al.*, 2007).

9.1.3 Structure des jonctions serrées

Des analyses en microscopie électronique dans les épithélia ont permis de mettre en évidence les JSs ainsi que ses différents composants (Tsukita *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations a montré que les JSs forment la structure de *zonula occludens* (ZO). La ZO a pour fonction d'imperméabiliser la couche cellulaire afin de contrôler le passage de diverses molécules à travers l'espace paracellulaire. Les JSs sont situées à proximité du pôle apical et séparent le pôle apical du pôle basolatéral. La perturbation des JSs va directement induire la perte de cette polarité apico-basale et avoir de lourdes conséquences sur le caractère imperméable de l'épithélium (Furuse, 2010). Plus précisément, les JSs vont être composées de trois types de protéines transmembranaires, les occludines, les claudines et les JAMs (pour junctional adhesion molecules) (Hartsock *et al.*, 2008).

Les protéines occludines possèdent de nombreux domaines protéiques qui interagissent avec les protéines spécifiques de la ZO au niveau des JSs. Parmi ces protéines, la protéine ZO-1 (zonula occludens-1), la protéine ZO-2 (zonula occludens-2) et enfin la protéine ZO-3 (zonula occludens-3). L'interaction des protéines ZO avec les occludines et le cytosquelette permet de renforcer les JSs (Bauer *et al.*, 2010, Furuse *et al.*, 1993).

La détection des protéines de la ZO par immunofluorescence va souvent être le moyen de confirmer la polarisation des cellules épithéliales (Umeda *et al.*, 2006). La ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont également d'importants composants dans les jonctions des cellules endothéliales (Itoh *et al.*, 1997).

Enfin comme de nombreuses protéines qui composent les jonctions intercellulaires, les occludines vont être également impliquées dans des voies de signalisation qui permettent la régulation des JSs (Hartsock *et al.*, 2008). Il en est de même pour les protéines claudines qui possèdent de nombreux domaines protéiques extracellulaires qui peuvent interagir avec les protéines spécifiques de la ZO pour maintenir l'intégrité des JSs (Furuse *et al.*, 1998). De plus, ces protéines sont capables de recruter les protéines occludines au niveau des JSs et vont être de ce fait, par le recrutement protéique, essentielles pour la formation de ces jonctions (Hartsock *et al.*, 2008).

L'interaction des protéines occludines, claudines avec les différentes protéines de la ZO semble être fondamentale pour le maintien des JSs. En effet, des études montrent que ZO-1 participe au développement des JSs au stade embryonnaire de la souris faisant de ces protéines d'importants acteurs dans le développement de l'organisme (Sheth *et al.*, 1997).

9.2 Infection des CEP par le VHS-1

Les protéines transmembranaires constituant les jonctions intercellulaires des CEP sont les plus exposées au pathogène durant une infection. C'est pourquoi de nombreux virus ont exploité ces protéines comme récepteurs pour leur internalisation (Evans *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2008) et pour leur dissémination à travers les tissus (Dingwell *et al.*, 1998b). Les CEP représentent plusieurs des cellules infectées de manière physiologiquement naturelle par le VHS-1. De nombreuses pathologies faisant référence à l'infection par le VHS-1 de cellules épithéliales polarisées ont été répertoriées comme par exemple les œsophagites, les pancréatites, les rectites, les colites...(Cattan *et al.*, 1999, Quinn *et al.*, 1983, Shintaku *et al.*, 2003).

9.2.1 Modèle d'étude de l'infection par le VHS-1 dans des cellules épithéliales polarisées

L'infection des CEP par le VHS-1 peut se faire en culture cellulaire. Il a été établi un dispositif de différenciation et de polarisation très largement décrit à travers la littérature. En effet, les premières études d'infection polarisée par le VHS-1 ont été effectuées dans des cellules MDCK pour « Madin-Darby Canine Kidney ». Ces cellules cultivées dans des inserts sur membrane poreuse ont la particularité de se polariser et de se différencier pour former une monocouche cellulaire présentant *in-fine* un pôle apical et un pôle basolatéral (Cho *et al.*, 1989). Des analyses complémentaires comme la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TER) ou encore l'observation en microscopie (par immunofluorescence ou électronique) permettent de révéler la présence des structures qui sont caractéristiques de la morphologie des cellules polarisées comme les JAs, les JSs et les desmosomes. Une fois polarisées, ces cellules ont également pour caractéristique d'avoir un système de tri et de sécrétion dirigé des protéines et des lipides qui va être spécifique pour chacun des pôles de la cellule (Cho *et al.*, 1989). L'existence d'un tri polarisé des lipides et des protéines dans ce type cellulaire va impliquer une composition lipidique et protéique bien spécifique pour chacune des membranes cellulaires apicale ou basolatérale (Guttman *et al.*, 2009, Martin-Belmonte *et al.*, 2008, Sears *et al.*, 1991). En effet, l'une des protéines constituant majeur de la membrane basale des cellules épithéliales polarisées est un protéoglycane sulfate héparique qui joue un rôle déterminant dans l'adsorption du VHS-1. Il a été décrit que cette protéine est principalement sécrétée à la surface basolatérale des cellules MDCK (Caplan *et al.*, 1987).

À travers la littérature, d'autres types de cellules polarisées peuvent être utilisés comme modèle d'infection par le VHS-1 comme des cellules pigmentaires de la rétine humaine (RPE) qui

sont des cellules hautement polarisées (Topp *et al.*, 1997, Zinn *et al.*, 1979) ou encore des cellules épithéliales colorectales issues d'un adénocarcinome humain (Caco-2) (Marozin *et al.*, 2004).

9.2.2 Entrée du VHS-1 dans les cellules épithéliales polarisées

Le VHS-1 code pour au moins huit protéines glycosylées qui font partie intégrante de l'enveloppe virale et qui vont être très importantes dans le cycle infectieux. Toutefois, des virus mutants n'exprimant pas les glycoprotéines gC, gE, gG, gI et gJ n'ont pas montré de défaut dans la capacité du virus à infecter et à produire une descendance infectieuse dans des cellules épithéliales non-polarisées de type Vero (Sears *et al.*, 1991). De même, il a été décrit dans de nombreux travaux que la glycoprotéine gC n'est pas indispensable pour l'infection des CEP (Griffiths *et al.*, 1998, Sears *et al.*, 1991). À l'opposé, d'autres études ont révélé que la glycoprotéine gG est spécifiquement requise pour une infection efficace des CEP au niveau de la membrane apicale (Tran *et al.*, 2000). Plus précisément, un virus mutant déficient pour gG a été seulement capable d'infecter la cellule au niveau du pôle basolatéral (Tran *et al.*, 2000). Les études d'infection des cellules polarisées MDCK par le VHS-1 ont révélé que ces cellules présentaient les deux ensembles de récepteurs (HS et nectines) importants pour l'adsorption du VHS-1 (Sears *et al.*, 1991). Ces récepteurs sont répartis de manière asymétrique au niveau des différents pôles apical et basolatéral. La capacité du VHS-1 à reconnaître plusieurs types de récepteurs cellulaires *via* ses glycoprotéines lui permet d'infecter les CEP.

Des études ont également montré que l'infection par le VHS-1 se fait de manière préférentielle et plus efficace au niveau de la membrane apicale en raison de la présence abondantes des nectines au niveau de la membrane apicale dans les cellules MDCK (Hayashi, 1995). La perturbation des jonctions intercellulaires suite à un traitement à l'EGTA (chélateur des ions Ca^{2+}) a induit la redistribution des nectines au niveau du pôle basolatéral et permis l'augmentation de l'efficacité d'infection à ce niveau (Marozin *et al.*, 2004). Le traitement des cellules polarisées avec des ARN interférents spécifiques à la nectine-1 entraîne une diminution significative de l'efficacité d'infection par le VHS-1 au niveau apical mais a très peu d'impact au niveau de l'efficacité d'infection basolatérale. La nectine-1 semble alors être une composante déterminante pour l'infection apicale par le VHS-1 (Galen *et al.*, 2006). Des études similaires ont montré les mêmes résultats concernant l'infection préférentielle apicale par le VHS-2 (Shukla *et al.*, 2009).

D'autres études avec des cellules RPE polarisées permissives à l'infection par le HCMV ont également montré que l'infection était 20 à 30 fois plus efficace au niveau de la membrane

apicale comparativement à l'infection au niveau basolatéral et ce, même si on augmente la MOI d'infection au niveau basolatéral (Tugizov *et al.*, 1996). De la même façon, l'infection apicale pour le VHS-1 est plus efficace que pour l'infection basolatérale. L'augmentation de 67 fois la MOI d'infection basolatérale permet d'atteindre la même efficacité d'infection que pour l'infection apicale pour le VHS-1. La membrane basolatérale des cellules RPE semble être plus susceptible à une infection par le VHS-1 que pour le HCMV (Tugizov *et al.*, 1996). Le pôle préférentiel de l'adsorption et de l'infection de ces virus semblent être en corrélation avec la distribution des récepteurs impliqués dans l'entrée virale (Topp *et al.*, 1997). Des études dans des cellules polarisées MDCK ou encore Caco-2 ont permis d'identifier certains des moteurs moléculaires associés au microtubules impliqués dans l'entrée du VHS-1 (Marozin *et al.*, 2004).

L'utilisation d'un modèle de CEP semble permettre de révéler des fonctions spécifiques et différentes pour le VHS-1 dans un contexte polarisé comparativement à un contexte non-polarisé.

9.2.3 Tri polarisé du VHS-1 dans les CEP

Le modèle d'étude de CEP a également permis de mettre en évidence de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans le tri polarisé suite à l'infection par le VHS-1. En effet, l'infection de cellules MDCK polarisées par le VHS-1 a montré que la sortie des virions néosynthétisés se faisait de manière préférentielle au niveau de la membrane apicale (Hayashi, 1995). Le comportement du virus dans ce type cellulaire a éveillé la curiosité des scientifiques et donc incité à l'investigation des différents mécanismes moléculaires impliqués dans le tri polarisé des virus.

Des études montrent l'implication des glycoprotéines de dissémination gE et gI du VHS-1 dans le tri basolatéral des virions au niveau des jonctions cellulaires dans les CEP. Le complexe protéique AP-1B (adaptine) et plus précisément sa sous-unité μ 1B est étroitement lié au transport basolatéral du VHS-1 *via* gE et gI (Johnson *et al.*, 2001, McMillan *et al.*, 2001). Les interactions entre les domaines cytoplasmiques de gE et gI et le complexe AP-1B permettent le transport dirigé du VHS-1 au niveau des structures des jonctions latérales. Ces interactions avec ces adaptateurs protéiques sont donc fondamentales pour le processus de dissémination du VHS-1 de cellule à cellule. En effet, le complexe AP-1B est un adaptateur protéique spécifique à la cellule épithéliale et facilite le tri basolatérale de diverses protéines transmembranaires. En amont, le facteur ADP-ribosylation 6 (Arf6) serait un régulateur important de cet adaptateur protéique (Shteyn *et al.*, 2011). De nombreuses études ont révélé l'existence de motifs protéiques

spécifiques reconnus comme signal pour le tri basolatéral. Les domaines C-terminaux des glycoprotéines gE et gI du VHS-1 sont détenteurs de ces motifs YXXØ qui peuvent interagir avec la sous-unité μ 1B de l'adaptateur protéique AP-1B (Fölsch *et al.*, 1999, Tirabassi *et al.*, 1999).

D'autres protéines cellulaires comme les RabGTPases ont été identifiées comme étant très utilisées par les virus enveloppés dans les étapes de morphogénèse et de la sortie virale. Des études montrent que le VHS-1 utilise ses protéines à différentes étapes de sa morphogénèse, pour son transport à travers les différents compartiments cellulaires et sa sortie. En effet, la protéine Rab1 est impliquée dans le transport des glycoprotéines virales du RE au Golgi. L'absence de Rab1 se traduit par un défaut dans la glycosylation des glycoprotéines virales et donc par un défaut dans le transport viral dans la cellule. La protéine Rab6A est impliquée dans le transport des glycoprotéines virales du TGN à la membrane plasmique. Son absence réduit fortement l'expression de gE et de gD à la surface cellulaire aux temps tardifs de l'infection et va également induire des conséquences sur le transport du VHS-1 à la membrane plasmique (Johns *et al.*, 2014). Ces protéines Rabs semblent ainsi très impliquées dans le cycle de vie du VHS-1 et en particulier dans le trafic du VHS-1.

9.2.4 Dissémination du VHS-1 dans les cellules épithéliales polarisées

La dissémination directe de cellule à cellule à travers les jonctions intercellulaires de cellules jointives est très complexe et les mécanismes impliqués sont encore mal connus.

La propagation *via* ces jonctions est généralement rapide et efficace et confère au virus une certaine protection contre les anticorps neutralisant ou d'autres acteurs de l'immunité. Comme le VHS-1 *in vivo*, le VZV fait appel à la fusion cellulaire et la formation de syncytia dans le but de se disséminer (Besser *et al.*, 2004, Coleman *et al.*, 2013, Zerboni *et al.*, 2014). Des expériences concernant l'infection par VHS-1 dans un modèle d'infection *in vitro* des CEP a montré que les anticorps neutralisants ont peu d'effet sur la capacité des virions à se propager de cellule à cellule et *in-fine* ces anticorps sont inefficaces pour limiter la progression de la maladie (Johnson *et al.*, 2002).

De nombreuses expériences ont montré que des virions VHS-1 néosynthétisés sont dirigés vers les jonctions cellulaires pour assurer une dissémination efficace à travers une couche cellulaire et que le complexe glycoprotéique gE/gI serait requis (Collins *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 2001, McMillan *et al.*, 2001, Wisner *et al.*, 2000). En effet, le complexe gE/gI serait impliqué dans le tri et donc dans l'orientation des virions néo-synthétisés vers les jonctions cellulaires, mais serait également impliqué dans la formation de sites de sortie

spécialisés dans des cellules épithéliales non-polarisées (Mingo *et al.*, 2012). En effet, des mutants dépourvus de ces glycoprotéines ont vu drastiquement diminuée leur capacité de propagation de cellule à cellule dans les tissus épithéliaux polarisés mais également dans les cellules neuronales où la protéine US9 a également son importance dans ce processus de dissémination (McGraw *et al.*, 2009a, McGraw *et al.*, 2009b). Ces glycoprotéines ne jouant pas un rôle important dans l'entrée du VHS-1 s'avèrent un outil intéressant pour étudier la dissémination du VHS-1 de cellule à cellule (Johnson *et al.*, 2002).

Les JAs sont très importantes dans le processus de dissémination du VHS-1, plus particulièrement les complexes afadine-nectine et caténine-cadhérine (Dingwell *et al.*, 1998b, Johnson *et al.*, 2002). En effet, le complexe glycoprotéique gE-gI colocalise avec la β -caténine, un constituant essentiel des JAs (Sakisaka *et al.*, 2001). De plus, l'inhibition de l'afadine par ARNs interférents a considérablement réduit l'efficacité de dissémination du VHS-1 de cellule à cellule (Sakisaka *et al.*, 2001).

La fonction de gE et gI est différente selon le contexte d'infection de cellules polarisées ou non-polarisées. En effet dans les CEP, le complexe gE/gI joue un rôle dans la dissémination du virus par des mécanismes impliquant les jonctions intercellulaires (Collins *et al.*, 2003, Farnsworth *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 2001, McMillan *et al.*, 2001, Wisner *et al.*, 2000). Alors que dans des cellules non polarisées le complexe gE/gI est impliqué dans des mécanismes de formation de sites de sortie impliquant le cytosquelette (Mingo *et al.*, 2012).

L'étude du rôle de la protéine virale pUL24 dans l'infection des CEP pourrait permettre de révéler des fonctions qui ne seraient pas apparentes dans un modèle de cellule-non polarisées.

10 CARACTÉRISTIQUES DE LA PROTÉINE UL24

La protéine pUL24 du VHS-1 est encodée par le 24^{ème} ORF de la région unique longue du génome viral. Le gène *ul24* est hautement conservé à travers la famille des *herpesviridae*. L'ORF *UL24* et l'ORF *UL23* sont en position tête-bêche et se chevauchent partiellement. Le gène *ul23* code pour l'enzyme thymidine kinase (McGeoch *et al.*, 1988). La protéine pUL24 hautement basique est composée de 269 acides aminés (aa) et possède un poids moléculaire de 29.5 kDa. Celle-ci présente une cinétique d'expression tardive dans le cycle de réplication du VHS-1 et plus précisément appartient à la classe génique " γ 1" dit "leaky late" (Pearson *et al.*, 2002).

La portion N-terminale de la protéine pUL24 du VHS-1 contient cinq régions d'homologie conservées dans toutes les protéines qui lui sont orthologues à travers la famille des

herpesviridae (**Figure 1.16**) (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989b). En effet, ces domaines d'homologie contiennent des résidus protéiques hautement conservés. La partie C-terminale de la protéine est moins conservée à travers la famille des *herpesviridae* mais présente un très haut niveau d'homologie à travers la sous-famille des *alphaherpesvirinae* (Knizewski *et al.*, 2006).

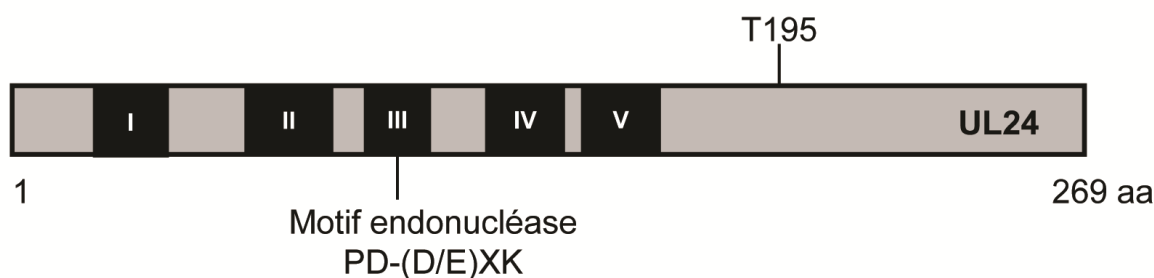


Figure 1.16 : Schéma représentatif de la protéine pUL24 du VHS-1.

Les cinq domaines d'homologie conservés dans toutes les protéines orthologues à pUL24 sont représentés dans les cases noires ainsi que la localisation du motif d'endonucléase PD-(D/E)XK et du site de phosphorylation T195.

Dans les autres herpèsvirus humains (HHV), pUL24 du VHS-1 correspond à **pUL24** pour le virus de l'herpès simplex de type 2 (VHS-2), à l'**ORF35** pour le virus de la varicelle-zona (VZV), à **Bxrf1** pour le virus d'Epstein-Barr (EBV), à **pUL76** pour le cytomégalovirus, **U49** pour les herpèsvirus humains de type -6 et -7, et enfin l'**ORF20** pour le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) (McGeoch *et al.*, 1995, Nascimento *et al.*, 2009)

10.1 Expression du gène *ul24* du VHS-1

Dans son organisation, le gène *UL24* contient trois sites d'initiation à la transcription dont les deux premiers se situent en amont de l'ORF et le troisième interne à l'ORF. De plus, il existe deux sites de polyadénylation pour l'ORF *UL24* (*polyA*). Le premier se situe à la fin de l'ORF *UL24* et le second à la fin de l'ORF *UL26* (**Figure 1.17**). L'ensemble de ces caractéristiques va être à l'origine de la production de six transcrits au cours de l'infection. Les transcrits courts (0,9 ; 1,2 et 1,4 kb) exprimés à des temps précoces et trois transcrits longs (5,2 ; 5,4 ; et 5,6 kb) exprimés à des temps tardifs au court de l'infection (Cook *et al.*, 1996a). Les quatre transcrits (5,6, 5,4, 1,4 et 1,2 kb) sont produits à partir des deux premier sites d'initiation à la transcription et contiennent au complet le cadre de lecture ouvert d'*UL24*. Les transcrits (5,2 et 0,9 kb) pourraient être à l'origine de l'expression d'une forme tronquée de la protéine pUL24 (Pearson *et al.*, 2002). Pour le moment, la fonction des transcrits courts reste inconnue.

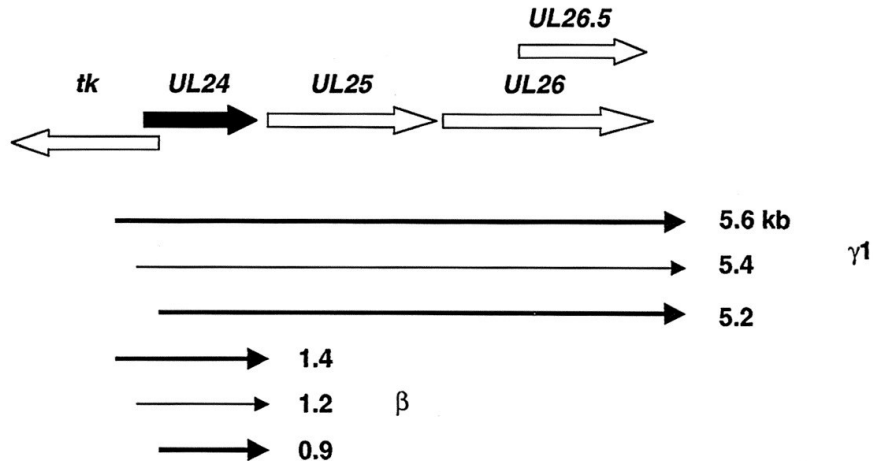


Figure 1.17 : Diagramme représentatif des ORFs de UL23 à UL26 et de leur direction de transcription.

Les six transcrits d'*UL24* représentés sont à l'origine de trois sites d'initiation à la transcription différents et se terminent au niveau des sites *polyA* situés à la fin d'*UL24* et d'*UL26* (Pearson *et al.*, 2002).

10.2 Fonctions de la protéine pUL24

10.2.1 Fonctions *in vitro*

Des études au sein de notre laboratoire ont montré que la protéine pUL24 se localise dans différents compartiments cellulaires au cours de l'infection *in vitro*. En effet, la protéine pUL24 se localise dans le noyau à des temps précoces de l'infection pour se retrouver à la périphérie nucléaire et dispersée dans le cytoplasme à des temps plus tardifs de l'infection (Lymberopoulos *et al.*, 2007, Pearson *et al.*, 2002). La localisation de la protéine pUL24 au niveau nucléaire et cytoplasmique semble lui conférer un rôle au niveau de ces différents compartiments.

Des travaux ont montré l'implication de pUL24 dans la dispersion de la nucléoline et de B23 en contexte d'infection par le VHS-1 (Lymberopoulos *et al.*, 2011, Lymberopoulos *et al.*, 2007) et la partie N-terminale de la protéine semble suffisante pour induire cette dispersion (Bertrand *et al.*, 2008). Des expériences de mutagenèse dirigée contre des résidus hautement conservés de la protéine pUL24 notamment au niveau du motif d'endonucléase de type PD-(D/E)XK (Knizewski *et al.*, 2006) ont montrés leur importance dans ce phénomène de dispersion nucléolaire (Bertrand *et al.*, 2010, Lymberopoulos *et al.*, 2011).

La protéine pUL24 est importante pour une réplication efficace du virus en culture cellulaire, d'autant plus que le motif d'endonucléase semble être impliqué. En effet, les

substitutions des acides aminés E99 et K101 conduisent à un virus vUL24-E99A/K101A) qui présente un phénotype de syncytia ainsi qu'un défaut dans sa réplication. Ces résidus appartiennent au domaine catalytique hypothétique prédit de manière bio-informatique (Bertrand *et al.*, 2010).

Pour l'analyse des rôles de la protéine pUL24, un virus déficient en pUL24 (vUL24X) a été construit (Jacobson *et al.*, 1998) par l'insertion de trois codons stop (afin d'induire l'arrêt de la traduction) et ce dans les trois cadres de lecture ouvert. Des expériences d'infection *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle de pUL24 dans la réplication. De manière théorique, il est possible qu'une forme tronquée de la protéine pUL24 de 46 aa soit produite. Considérant le chevauchement de l'ORF *UL23* et de l'ORF *UL24*, il a fallu utiliser une stratégie de mutagenèse dans *ul24* sans changer la séquence d'*ul23* (*TK*).

La mutagenèse dirigée dans l'ORF *UL23* plus précisément dans la portion génique qui chevauche avec l'ORF *UL24* a été à l'origine de virus qui présentaient des plages de lyse nettement plus petites que celles produites par un virus de type sauvage (Jacobson *et al.*, 1989b). Des études avec le virus vUL24X ont démontré la formation de plages de lyse plus petites que celles observées avec un virus de type sauvage. Ces plages de lyse présentaient également un phénotype syncytiale, c'est-à-dire que l'absence de pUL24 induit la fusion des cellules infectées. Les syncytia semblent être plus importants à la température de 39°C qu'à 37°C (Jacobson *et al.*, 1989b). Des mutations dans les gènes encodant pour les glycoprotéines gB, gK, gN et la protéine pUL20 du VHS-1 sont également associées à ce phénotype de syncytia. (Avitabile *et al.*, 2004, El Kasmi *et al.*, 2015, Foster *et al.*, 2008, Foster *et al.*, 2004a, Ruyechan *et al.*, 1979). Des études au sein de notre laboratoire ont montré l'importance des microfilaments d'actine dans la formation des syncytia. L'inhibition de la polymérisation de l'actine avec un ensemble de drogues a conduit à l'inhibition de la formation de syncytia en contexte d'infection par le virus vUL24X (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Ces mêmes études montrent que l'absence de la protéine pUL24 a un impact sur la localisation des glycoprotéines virales (gB, gD, gH/gL) impliquées dans les mécanismes de fusion membranaire (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013).

Des études en microscopie électronique montrent également l'implication de la protéine pUL24 dans la sortie nucléaire des nucléocapsides puisque l'absence de la protéine pUL24 conduit à l'augmentation du ratio des capsides nucléaires comparativement aux capsides localisées dans le cytoplasme (Lymberopoulos *et al.*, 2011). Des études récentes au sein de notre laboratoire ont montré que la protéine pUL24 pourrait jouer un rôle de régulation sur la transcription des gènes viraux. En effet, en l'absence d'UL24 suite à l'infection avec le virus

vUL24X il a été détecté des niveaux de transcrits plus élevés pour les protéines virales R1 et R2 comparativement à une infection avec un virus de type sauvage (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). Ces résultats ont pu être extrapolés avec les transcrits d'autres gènes viraux du VHS-1 en contexte de transfection transitoire où l'effet s'est également avéré similaire pour l'orthologue UL24 de l'herpès virus B.

La protéine UL24 du VHS-1 est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en inhibant le complexe mitotique Cdc2-cycline B en contexte de transfection transitoire dans des cellules humaines et de souris. D'autres protéines qui lui sont homologues à travers les α - β - γ -herpèsvirus humains auraient également ce rôle en commun (Nascimento *et al.*, 2012, Nascimento *et al.*, 2009).

Enfin, des travaux montrent pour la première fois une implication potentielle de la protéine pUL24 dans la régulation négative de l'immunité innée puisque pUL24 peut inhiber la production de l'interféron- β (INF- β) et de l'interleukine-6 (IL-6) en empêchant la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau cellulaire (Xu *et al.*, 2017). Une étude antérieure montre que la protéine pUL76-HCMV orthologue à UL24-VHS régule l'expression de l'interleukine-8 (IL-8) par la voie de signalisation NF- κ B ce qui confère à cette protéine un rôle dans la régulation de l'immunité innée (Costa *et al.*, 2013, Murayama *et al.*, 1994).

10.2.2 Fonctions *in vivo*

La protéine pUL24 joue également un rôle dans la neuropathogénèse du VHS-1. Dans un modèle murin d'infection oculaire, un virus déficient pour pUL24 a montré un défaut de réplication d'environ 10 fois au niveau des cellules épithéliales des muqueuses oculaires. Ce défaut est d'autant plus important au niveau des TG puisque les titres viraux sont diminués jusqu'à 10 000 comparativement au virus de type sauvage. De plus, la quantification de l'ADN viral et des transcrits *LAT* dans les TG a été évaluée suite à l'infection par vUL24X. Leurs taux étaient faibles comparativement aux résultats obtenus suite à l'infection avec un virus sauvage (KOS) (Jacobson *et al.*, 1998). Ces résultats seraient corrélés avec une diminution du nombre de neurones infectés (Rochette *et al.*, 2015). Ce mutant UL24-null (vUL24X) a également montré une réduction dans la réactivation *ex-vivo* à partir de la latence (Jacobson *et al.*, 1998, Rochette *et al.*, 2015). L'évaluation des signes cliniques au cours du temps a montré que la pathologie associée à l'infection est réduite pour les souris ayant été infectées par le virus déficient pour UL24 (vUL24X) (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Des études de mutagenèse dirigée au niveau du motif endonucléase PD-(D/E)XK ont été effectuées. En effet, deux virus mutants ont été construits, le virus vUL24-

E99A/K101A et le virus vUL24-G121A. Le virus vUL24-G121A s'est comporté comme le virus de type sauvage *in vivo* alors que le virus vUL24-E99A/K101A a présenté de grande similarité avec les différents phénotypes vUL24X observés au cours d'une infection *in vivo*. Le motif d'endonucléase est donc important pour le rôle d'UL24 dans la pathogénèse (Bertrand *et al.*, 2010, Leiva-Torres *et al.*, 2010).

Ainsi, le gène *ul24* semble être un important déterminant pour la neuropathogénèse du VHS-1.

10.3 Les orthologues de la protéine pUL24 du VHS-1

De nombreuses études ont montré que les homologues d'*ul24* sont importants pour la pathogénèse dans d'autres virus herpès. On peut trouver des protéines orthologues à la protéine pUL24 du VHS-1 à travers toute la famille des *Herpesviridae* c'est-à-dire dans toutes les sous-familles (i) *Alpha*, (ii) *Beta*, (iii) *Gamma-herpesvirinae* humains et non-humains. Quelques exemples : (i) pUL24 pour le VHS-2 (Blakeney *et al.*, 2005, Hong-Yan *et al.*, 2001) et pour le virus herpès bovin de type-1 (VHBo-1) (Whitbeck *et al.*, 1994), l'ORF35 pour le VZV (Dotzler *et al.*, Gray *et al.*, 2001) ; (ii) pU49 pour les virus humains HHV-6 et -7 (Kosuge *et al.*, 1999); (iii) Bxrf1 pour EBV (Griffin *et al.*, 1990), l'ORF20 pour le KSHV (Bussey *et al.*, 2018, Nascimento *et al.*, 2009) et pour le virus herpès murin 68 (MHV-68) (Nascimento *et al.*, 2009), l'ORF37 pour le virus herpès équin de type-1 (VHE-1) (Kasem *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces données suggèrent que la conservation de la protéine pUL24 à travers la famille des *Herpesviridae* reflète de son importance dans la pathogénèse virale.

10.3.1 Les orthologues de la protéine pUL24 dans les virus herpès humains

10.3.1.1 La protéine pUL24 du virus de l'herpès simplex de type-2 (VHS-2)

La protéine pUL24 du VHS-2 est composée de 282 aa avec un poids moléculaire de 32 kDa (McGeoch *et al.*, 1991). La protéine pUL24 du VHS-2 (pUL24-2) présente une homologie de séquence de près de 75% avec la protéine orthologue pUL24 du VHS-1, (pUL24-1). Comme pUL24-1, celle-ci présente une cinétique d'expression tardive dans le cycle de réplication du VHS-2 et l'ORF *UL24* appartient plus précisément à la classe génique " γ 2" dit "true late". Son expression est donc strictement dépendante de la réplication virale. La protéine pUL24-2 se

localise au niveau de la périphérie du noyau à des étapes précoces de l'infection pour rejoindre le noyau à des étapes plus tardives. La protéine pUL24-2 semble être une composante de la capsidie dans les virions néo-synthétisés (Hong-Yan *et al.*, 2001) alors que la protéine pUL24-1 n'a jamais pu être détectée au niveau du virion (Loret *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2002). Pour l'étude de la pUL24-2, un virus UL24-null a été construit. L'insertion d'une cassette de β -glucuronidase (vUL24- β gluc) dans l'ORF *UL24-2* au niveau du site de restriction BglII a permis l'expression d'une protéine tronquée et dépourvue des 100 derniers aa de la partie C-terminale de protéine pUL24 sauvage (Blakeney *et al.*, 2005). En culture cellulaire, comme pour le virus déficient en pUL24-1, l'absence de la protéine pUL24-2 a conduit à la formation de syncytia pour le VHS-2 mais les particules virales infectieuses produites ont été comparable à la production virale de type sauvage. *In vivo*, dans un modèle murin d'infection intra-vaginale, il a été observé une diminution importante des titres viraux, du nombre de lésions et de la sévérité de la pathologie comparativement au virus sauvage.

Ces études ont également montrées que le virus mutant vUL24- β gluc a été capable d'établir sa latence dans les ganglions sacrés de la racine dorsale au cours de l'infection par le VHS-1 et de se réactiver dans un modèle d'infection vaginale de cochon d'inde où la réactivation virale peut se faire de manière spontanée (Blakeney *et al.*, 2005). Il semble également pour le virus déficient en UL24 pour le VHS-1 (vUL24X), dans un modèle murin d'infection oculaire que pUL24-1 soit impliqué dans l'établissement de la latence et dans la réactivation *ex-vivo* dans les ganglions trigéminaux (Jacobson *et al.*, 1998, Rochette *et al.*, 2015).

10.3.1.2 La protéine ORF35 du virus de la varicelle-zona (VZV)

L'*ORF35* du virus de la varicelle-zona (VZV) correspond à l'orthologue *ul24* pour le VHS-1. Celui-ci encode pour une protéine de 285 aa, avec plus de 30% d'identité avec pUL24 VHS-1 (Ito *et al.*, 2005). Comme pour le VHS-1 et le VHS-2, l'*ORF35* et le gène *tK* se retrouvent en position tête-bêche mais les cadres de lecture ouverts ne se chevauchent pas. La protéine ORF35 se localise au niveau du noyau et la délétion du gène codant dans un virus mutant induit la formation de petite plage de lyse en culture cellulaire. Le VZV est connu pour former des plaques syncytiales ou polycaryocytes pour se disséminer au cours de l'infection (Besser *et al.*, 2004, Coleman *et al.*, 2013, Zerboni *et al.*, 2014). Un virus VZV déficient pour l'*ORF35* induit la formation de polycaryocytes différents du type sauvage. En effet, le noyau ainsi que l'appareil de Golgi semblent être affectés dans les cellules infectées. La glycoprotéine gE-VZV est impliquée

dans la formation des syncytia et sa distribution semble être altérée comparativement à sa localisation de type sauvage (Ito *et al.*, 2005). L'absence de pUL24 pour le VHS-1 a conduit à ce même phénomène impliquant une redistribution des glycoprotéines virales impliquées dans la fusion (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Il ne serait pas étonnant que la localisation de gE soit elle aussi perturbée en l'absence de pUL24. *In vitro*, un virus déficient pour l'ORF35-VZV montre un défaut de répllication dans des cellules épithéliales MeWo immortalisées humaines dérivées de ganglions lymphatiques (Ito *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2010).

Des expériences avec un virus VZV déficient pour l'ORF35 dans un modèle d'infection murin de xéno greffe humaine ont été effectuées. Des greffes de peau humaine ou de cellules T infectées par ce virus ont été effectuées dans des souris SCIDhu. La production de particules virales en l'absence de l'ORF35 a été inférieure à celle produite par le virus de type sauvage dans la peau et les cellules T xéno greffées (Ito *et al.*, 2005).

10.3.1.3 La protéine U49 des virus herpès humains HHV-6 et -7

Les virus humains HHV-6 et -7 appartiennent à la sous-famille des *Betaherpesvirinae* et au genre *roseolovirus*. *U49* est l'homologue d'*ul24* VHS-1 et encode pour une protéine de 252 aa (29,3 kDa) pour HHV-6 et de 239 aa (28,6 kDa) pour HHV-7. Ces protéines semblent avoir une identité d'homologie d'au moins 25% avec *ul24* VHS-1 (Dominguez *et al.*, 1999). Concernant la disposition des gènes, *U49* est en position tête-bêche avec *U48* qui encode pour une glycoprotéine virale (gH). Les cadres de lectures ouverts ne se chevauchent pas pour ces deux gènes (Megaw *et al.*, 1998).

10.3.1.4 La protéine pUL76 du cytomegalovirus humain (HCMV)

Le virus HCMV appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. *ul76*-HCMV est l'homologue d'*ul24* VHS-1 et encode pour une protéine de 325 aa (38 kDa). Leurs séquences protéiques respectives possèdent une identité d'au moins 30%. Comme pour *ul24* VHS-1 le motif d'endonucléase de type PD-(D/E) XK prédit par analyses bioinformatiques est aussi présent dans *ul76* (Knizewski *et al.*, 2006). Au cours de la transcription, deux transcrits de 4,5 et 5,5 kb sont générés à partir de deux sites d'initiation à la transcription. Le transcrit polycistronique de 5,5 kb contient l'ORF *ul76*, *ul77* et *ul78* et le transcrit de 4,2 kb contient l'ORF *ul76*. La protéine UL76 est une protéine à cinétique tardive et présente pour caractéristique de se localiser au niveau

nucléaire au cours de l'infection (Wang *et al.*, 2004). Des études protéomique montrent également que la pUL76 pourrait se retrouver dans les virions néo-synthétisés associée au tégument. Sa composition protéique riche en résidus chargés positivement ainsi que sa présence au niveau du tégument du virion pourrait impliquer pUL76 dans la formation structurale du virion. Il faut noter que de nombreuses protéines du tégument sont chargées négativement (Wang *et al.*, 2004).

Une étude récente montre que la protéine pUL76-HCMV régule l'expression de l'interleukine-8 (IL-8) au niveau de la transcription et au niveau protéique. La régulation positive de l'IL-8 se fait par la voie de signalisation NF- κ B. En effet, pUL76 induit la translocation de la sous-unité p65 de NF- κ B dans le compartiment nucléaire afin de s'associer avec le promoteur de l'IL-8. La production de cette interleukine pro-inflammatoire a un effet attracteur sur les neutrophiles au niveau des cellules infectées principalement pour augmenter l'efficacité de dissémination virale en infectant les neutrophiles (Costa *et al.*, 2013, Murayama *et al.*, 1994).

10.3.1.5 La protéine ORF20 du virus du sarcome de Kaposi (KSVH/HHV-8)

Le HHV-8 est un virus humain impliqué dans les cancers. En effet, ce virus oncogénique est associé au Sarcome de Kaposi (KSHV) et se développe plus particulièrement chez les individus immunodéprimés. L'*ORF20* du KSVH est l'homologue du gène *uI24-VHS*. Comme pour les protéines UL24-VHS, UL76-HCMV, l'ORF20-MHV-68, l'expression transitoire de l'ORF20-KSVH affecte la mitose au niveau du complexe cdc2/cycline B en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Nascimento *et al.*, 2009).

Des études de l'interactome protéique avec la protéine ORF20-KSVH montrent l'identification de 89 partenaires protéiques. Parmi ces partenaires, les plus représentés sont les protéines ribosomiques 40S et 60S mais également la protéine OASL (oligoadenylate synthetase-like). L'interaction entre l'ORF20-KSVH et les protéines ribosomiques 40S et 60S pourrait contribuer à la formation de complexe ribosomique pour faciliter l'expression des protéines virales. L'interaction entre l'ORF20-KSVH et OASL est conservée avec les autres membres homologues pUL24 dans d'autres herpèsvirus comme pour le VHS-1, HCMV et le MHV-68 (Bussey *et al.*, 2018). La protéine OASL est impliquée dans l'activation de la RNase L qui dégrade les ARNs viraux et cellulaires (Bowie *et al.*, 2008). La synthèse de la protéine OASL est initiée suite à la transcription des gènes ISGs (Interferon Stimulated Genes). En effet, lors de la reconnaissance des transcrits viraux par RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), le facteur de transcription IRF3 est transloqué dans le noyau pour induire la transcription des gènes qui

encodent pour l'IFN- β . L'IFN- β va permettre à son tour l'induction de voies de signalisation impliquées dans la transcription des gènes ISGs qui sont à l'origine de la synthèse de nombreuses protéines antivirales dont l'OASL (Bowie *et al.*, 2008). Des études montrent que la protéine OASL a un rôle antiviral au cours de l'infection par le virus de Sendai, le virus de l'Influenza (Melchjorsen *et al.*, 2009) ou encore par le virus de la stomatite vésiculaire (Bussey *et al.*, 2018). Toutefois, l'impact de l'OASL sur la réplication du VHS-1 est controversé. En effet, une étude suggère que la protéine OASL n'a aucun effet sur la réplication du VHS-1 (Marques *et al.*, 2008a) tandis qu'une autre étude suggère que la protéine OASL a un rôle antiviral lors de l'infection par le VHS-1 (Zhu *et al.*, 2014). Dans le cas du KSVH ou encore MHV-68 deux gammaherpèsvirus, la protéine OASL a un effet proviral sur la réplication virale. En effet, l'utilisation de cellules déficientes en OASL a montré que l'expression transitoire de la protéine OASL a favorisé la réplication virale pour le MHV-68 et le KSVH (Bussey *et al.*, 2018). Dans le cas du KSVH, cet effet était dépendant de l'expression de l'ORF20 puisque son absence par l'insertion d'un codon stop en position 69 abolissant son expression a contrecarré l'effet proviral de l'OASL. De plus, l'expression transitoire de l'ORF20-KSVH a été corrélée avec l'augmentation des ARNm de OASL. Ainsi, cette étude suggère que le KSVH pourrait stimuler l'expression de la protéine OASL pour favoriser l'infection mais les mécanismes restent à ce jour encore inconnus (Bussey *et al.*, 2018).

10.3.2 Exemples d'orthologues de la protéine pUL24 dans les virus herpès non-humains

10.3.2.1 La protéine pUL24 de l'herpès bovin de type-1 et -2 (BHV-1 et -2)

Les virus de l'herpès bovin de type-1 et -2 appartiennent comme le VHS-1 et -2 et le VZV à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ces deux virus non-humains possèdent également un gène homologue à *ul24* VHS-1. Les gènes *ul24* BHV-1 et -2 et le gène *tK* sont en position tête-bêche et se chevauchent au niveau des cadres de lecture ouverts. L'absence de pUL24 n'a aucun impact sur la réplication de ces virus ou sur la morphologie des plages de lyse en culture cellulaire (Whitbeck *et al.*, 1994).

10.3.2.2 La protéine ORF37 du virus équin de type-1 (VHE-1)

Le virus de l'herpès équin de type-1 (VHE-1) est à l'origine de maladies respiratoires, avortements et de troubles neurologiques chez le cheval (Allen *et al.*, 1986). Depuis ces dernières années, on voit une augmentation des cas de maladies neurologiques en Europe et aux États-Unis comme la myéloencéphalopathie équine herpétique (MEH) (Kasem *et al.*, 2010). Les symptômes peuvent se traduire par de l'ataxie légère à de la paraplégie pour des cas plus graves (Kohn *et al.*, 1987). Ce virus appartient à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* au genre *varicellovirus*. L'*ORF37* homologue du gène *ul24* VHS-1 est également en position tête-bêche du gène *tK* et leur cadres de lecture ouvert ne se chevauchent pas (Carvalho *et al.*, 2012). L'*ORF37* encode pour une protéine de 272 aa de 29.2 kDa. En culture cellulaire, l'absence de l'*ORF37* n'a pas d'impact sur la réplication du virus ainsi que sur la morphologie des plages de lyse comparativement au virus sauvage. *In vivo*, dans un modèle d'infection murin, l'infection par un virus déficient pour ce gène a conduit à une diminution des troubles neurologiques et des signes cliniques comparativement à la pathogénèse du virus sauvage (Kasem *et al.*, 2010).

10.3.2.3 La protéine ORF20 du γ -herpès virus murin 68 (MuHV-68)

Le Gamma-herpès virus murin 68 (MuHV) est un excellent modèle d'étude pour les gamma-herpèsvirus comme EBV ou encore KSHV. En effet, ces trois virus présentent de très fortes similitudes (McGeoch *et al.*, 1995). L'*ORF20* orthologue d'*ul24* VHS-1 encode pour une protéine de 28 kDa de localisation nucléaire dans les cellules infectées. *In vitro*, l'infection avec un virus mutant déficient pour l'*ORF20* ne conduit pas à une différence dans la production des particules virales infectieuses comparativement au virus sauvage. *In vivo*, dans un modèle murin d'infection intranasale, l'absence de l'*ORF20* a conduit à un retard de 4 jours dans l'élimination du virus au niveau des poumons comparativement au virus sauvage (Nascimento *et al.*, 2011a).

L'ensemble de ces données montrent un rôle dans la pathogénèse voir dans la neuropathogénèse pour les protéines orthologues de pUL24 à travers les herpèsvirus non-humains mentionnés ci-dessus.

11 PROBLÉMATIQUE

Le gène *ul24* est hautement conservé à travers la famille des *Herpesviridae* et encode pour une protéine de 269 aa pour le VHS-1. Il y a six transcrits *UL24* débutant au niveau de trois sites d'initiation de transcription différents et qui se terminent à deux sites de polyadénylation différents, celui du gène *ul24* et celui du gène *ul26*. Il semble que les transcrits *UL24* générés par l'utilisation du signal *polyA* de *UL26* soient importants pour l'expression de la protéine pUL24. La présence d'un troisième site d'initiation à la transcription interne à l'ORF d'*UL24* dans le même cadre de lecture a suscité notre curiosité et mené à l'hypothèse que ces transcrits pourraient être à l'origine de l'expression de protéines virales non identifiées à ce jour.

12 HYPOTHÈSES

- La présence d'un site de transcription interne à l'ORF *ul24*-VHS-1 ainsi que la présence de trois sites d'initiation à la traduction dans le même cadre de lecture ouvert est à l'origine de la production de protéines jusqu'à ce jour inconnues.
- L'étude du rôle d'*ul24* dans l'infection des cellules épithéliales polarisées par le VHS-1 révèle des fonctions pour la protéine pUL24 non apparentes dans un modèle d'infection de cellules non-polarisées.

CHAPITRE 2 :
PREMIÈRE PUBLICATION

PREMIÈRE PUBLICATION

Résumé de la première publication

Manuscrit en révision pour **Journal of Virology**

Titre : Une mutation dans *ul24* abolit l'expression de la protéine pUL24.5 nouvellement identifiée du virus de l'herpès simplex 1, et conduit à une augmentation de la pathogénicité chez la souris.

Le virus de l'herpès simplex (VHS-1) infecte l'hôte *via* les cellules épithéliales de la muqueuse et établit sa latence dans les neurones sensitifs du système nerveux périphérique (SNP). Le gène *ul24* est conservé dans toute la famille des *Herpesviridae* et la protéine pUL24 est importante pour une réplication virale efficace et dans la pathogénèse. Il y a plusieurs transcrits exprimés à partir du gène *ul24*. La présence d'un site d'initiation à la transcription interne à l'ORF *UL24* et d'un codon d'initiation à la traduction (ATG) dans le même cadre de lecture ouvert a permis de suspecter qu'une autre protéine pourrait être exprimée à partir du locus *ul24*. Pour tester notre hypothèse, nous avons construit un virus recombinant qui exprime une étiquette d'hémagglutine (HA) à l'extrémité C-terminale de pUL24. L'analyse par immunobuvardage de type western a révélé l'expression d'une protéine de 18 kDa qui n'est pas un produit de dégradation de pUL24 pleine longueur. Nous avons nommée cette protéine pUL24.5. L'expression de la protéine pUL24.5 en contexte de transfection transitoire n'a pas induit la dispersion des protéines nucléolaires comme on le voit pour pUL24. Afin de caractériser le rôle de pUL24.5, nous avons construit un virus mutant codant pour une substitution de la méthionine 122 par une valine (M122V). Cette substitution a éliminé l'expression de pUL24.5. Contrairement au mutant null-UL24 (vUL24X), qui présente une diminution des titres viraux, le mutant UL24.5-null présente le même phénotype de réplication en culture cellulaire que la souche sauvage parentale. Cependant, dans un modèle murin d'infection oculaire, nous avons observé la persistance de la maladie périoculaire ainsi qu'une augmentation statistiquement significative de l'incidence des troubles neurologiques pour le mutant UL24.5-null. L'alignement des séquences d'acides aminés des orthologues pUL24 à travers les herpesvirus a révélé que le site d'initiation de pUL24.5 est conservé parmi les souches de VHS-1 (répertoriées sur NCBI) et il est également présent dans de nombreux herpesvirus.

Contribution des auteurs

Slimane Dridi :

- ✓ Construction des virus recombinants vBAC_UL24.5negHA (1) et (2) et vBAC_UL24.5negHARescue (1) et (2).
- ✓ Conception et réalisation des manipulations pour les expériences représentées dans les figures 4 ; 5 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; Table 2 et data not shown concernant l'analyse de l'impact de pUL24.5 sur la distribution de B23 en contexte de transfection.
- ✓ Préparation de toutes les figures de l'article.
- ✓ Rédaction du manuscrit.

Nicolas Richerieux :

- ✓ Construction des plasmides pCGPFI-HSV1UL24HA-1,2GTG et pCGPFI-HSV1UL24- Δ 5'-HA.
- ✓ Conception originale de la figure 1
- ✓ Conception et réalisation des expériences de la figure 2 et 6.
- ✓ Contribution à la rédaction du manuscrit

Carmen Elena Gonzalez Suarez :

- ✓ Construction des virus vBAC_UL24HA (1) et (2) et contribution pour les expériences de la figure 2.

Marion Vanharen :

- ✓ Participation dans la réalisation des expériences (data not shown) concernant l'analyse de l'impact de pUL24.5 sur la distribution de B23 en contexte de transfection.

Carolina Sanabria-Solano :

- ✓ Construction du virus vUL24X-HA.
- ✓ Conception et réalisation des expériences de la figure 3.
- ✓ Contribution à la révision du manuscrit.

Angela Pearson :

- ✓ Conception de l'ensemble des expériences, révision et correction du manuscrit.

A mutation in *UL24* abolishes expression of the newly identified *UL24.5* protein of herpes simplex virus 1, and leads to an increase in pathogenicity in mice

Slimane Dridi ^{a*}, Nicolas Richerieux ^{a*}, Carmen Elena Gonzalez Suarez ^a, Marion Vanharen ^a,
Carolina Sanabria-Solano ^a, Angela Pearson ^{a#}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, CANADA

Running title: HSV-1 UL24.5 affects pathogenesis

Keywords: HSV-1, UL24.5, viral pathogenesis, viral neuropathogenesis

Abstract : 250

Significance : 150 words

Text : 5529 words

*Slimane Dridi and Nicolas Richerieux are co-first authors

Corresponding author

Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7 CANADA; email:
angela.pearson@iaf.inrs.ca

Tel: (1) 450 687 5010 Fax: (1) 450 686-5501

Abstract

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infects the host via epithelia and establishes latency in sensory neurons. *ul24* is conserved throughout the Herpesviridae family, and the UL24 protein is important for efficient viral replication and pathogenesis. Multiple transcripts are expressed from the *ul24* gene. The presence of a transcription initiation site inside the open reading frame of *ul24* (ORF UL24) and an ATG start codon in the same open reading frame led us to suspect that another protein was expressed from the *ul24* locus. To test our hypothesis, we constructed a recombinant virus that expresses a hemagglutinin tag at the C-terminus of UL24. Western blot analysis revealed the expression of an 18 kDa protein that is not a degradation product of the full-length UL24, which we refer to as UL24.5. Ectopically expressed UL24.5 did not induce the dispersal of nucleolar proteins as seen for UL24. In order to characterize the role of UL24.5, we constructed a mutant virus encoding a substitution of the predicted initiation methionine to a valine. This substitution eliminated the expression of the 18 kDa polypeptide. Unlike the UL24-null mutant (UL24X), which exhibits reduced viral yields, the UL24.5-null mutant exhibited the same replication phenotype in cell culture as the parental strain. However, in a murine ocular infection model, we observed an increase in the incidence of neurological disorders with the UL24.5 mutant. Alignment of amino acid sequences for various herpesviruses revealed that the initiation site of UL24.5 is conserved among HSV-1 strains and is present in many herpesviruses.

Importance

We discovered a new HSV-1 protein, UL24.5, which corresponds to the C-terminal portion of UL24. In contrast to the replication defects observed with HSV-1 strains that do not express full length UL24, the absence of UL24.5 did not affect viral replication in cell culture. Moreover, in mice, the absence of UL24.5 did not affect viral titers in epithelia or trigeminal ganglia during acute infection; however, it was associated with a prolonged persistence of signs of inflammation. Strikingly, the absence of UL24.5 also led to an increase in the incidence of severe neurological impairment compared to results for wild-type control viruses. This increase in pathogenicity is in stark contrast to the reduction in clinical signs associated with the absence of full length UL24. Bioinformatic analyses suggest that UL24.5 is conserved among all human α -herpesviruses and in some non-human α -herpesviruses. Thus, we have identified UL24.5 as a new HSV-1 determinant of pathogenesis.

Introduction

The genome of herpes simplex virus 1 (HSV-1) encodes at least 84 different proteins (Whitley *et al.*, 2001), including one known as UL24. The *ul24* gene is conserved throughout all three subfamilies of *Herpesviridae* (Davison, 1993), suggesting an important role for UL24 in infection. Notably, UL24 of HSV-1 is required for efficient virus replication *in vitro* (Jacobson *et al.*, 1989b) and *in vivo* (Jacobson *et al.*, 1998). Moreover, in a mouse model of ocular infection, a UL24-deficient HSV-1 strain (UL24X) exhibits a reduced capacity for the infection to spread from the eye to neurons of the trigeminal ganglia (TG) (Rochette *et al.*, 2015), few if any clinical signs (Leiva-Torres *et al.*, 2010) and reduced incidence of reactivating TG in *ex vivo* assays (Jacobson *et al.*, 1998). Thus UL24 is a determinant of HSV-1 pathogenesis.

UL24 is a highly basic protein of 269 amino acids which is expressed with leaky-late kinetics (Pearson *et al.*, 2002). In infected cells, UL24 protein is detected in the nucleus, where it transiently localizes to nucleoli, and in the cytoplasm (Lymberopoulos *et al.*, 2007). UL24 is involved in dispersal of nucleolin and B23 during infection (Lymberopoulos *et al.*, 2011, Lymberopoulos *et al.*, 2007), and the N-terminus of UL24 is sufficient to induce the redistribution of these proteins throughout the nucleoplasm when transiently expressed in transfection experiments (Bertrand *et al.*, 2008). Some UL24 mutant viruses have a syncytial plaque phenotype suggesting a role for UL24 in events at the cell membrane. We previously found that the absence of UL24 leads to an altered subcellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). More recently we discovered that HSV-1 UL24 negatively affects viral gene expression during infection (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). Consistent with the link between UL24 and pathogenesis, Xu *et al.* recently found that UL24 inhibits signaling via the stimulator of interferon genes (STING) pathway at the level of NFκB (Xu *et al.*, 2017).

The *UL24* transcription unit is complex. There are multiple transcripts expressed from the *ul24* gene during infection, and the reason for this degree of complexity is unclear (Pearson *et al.*, 2002). Among the six *UL24* transcripts expressed in infected cells, four transcripts (5.6, 5.4, 1.4 and 1.2 kb) are produced from the first two transcription initiation sites for *UL24* and contain the entire open reading frame (ORF). The third set of transcripts (5.2 and 0.9 kb) originates from a transcription start site within the UL24 ORF. Furthermore, several ATG codons are present downstream of this third transcription start site. These features prompted us to test the hypothesis that there is at least one other polypeptide expressed from the *UL24* locus, which would be

encoded by the 3' portion of *UL24*, and thus explain the reason for the third transcription start site in *UL24*.

Materials and methods

Cells

Vero cells (an African green monkey kidney epithelial cell line) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 4.5 g/L glucose, supplemented with 5% newborn calf serum (NCS), 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin. Cells were maintained in an incubator at 37°C with 5% CO₂.

Plasmid construction

All oligonucleotide sequences are listed in Table 1. The *UL24*-HA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers 419 and 420. The resulting PCR product flanked by BglIII and BamHI restriction sites was then sub-cloned into the pBlueScript II SK+ vector. The sequence of interest was excised with BglIII and BamHI, and then inserted in place of the corresponding 3' end of the *UL24* gene contained in the mammalian expression vector pCGPfl-*UL24* (Bertrand *et al.*, 2008). The resulting vector is named pCGPfl-*UL24*-HA. The pCGPfl-*UL24*-Δ5'-HA vector was constructed as follows: amplification of the last 504 nucleotides of the *UL24* gene was carried out using primers 543 and 420. The resulting PCR product flanked by two BamHI restriction sites was then sub-cloned into the pBlueScript II SK+ vector. The resulting DNA sequence of interest, i.e. a fragment of *UL24* lacking the first 306 nucleotides, was then ligated into the pCGPfl vector using BamHI restriction sites. To generate the vector pCGPfl-*UL24*-HA-1,2GTG, site-directed mutagenesis using overlap extension PCR was carried out on pCGPfl-*UL24*-HA with primers 420, 440, 487 and 489 to change the second in-frame ATG of *UL24* to GTG. The resulting plasmid, pCGPfl-*UL24*-HA-2GTG, was then used as a template for the second site-directed mutagenesis step to change the first ATG of *UL24* to GTG using the primers 542 and 420. The resulting PCR product was then digested with BamHI and ligated into the pCGPfl vector using BamHI restriction sites. The pCGPfl-*UL24*-HA vector has been described previously (Bertrand *et al.*, 2008). All intermediate and final constructs were confirmed by sequencing, which was carried out by McGill University and Genome Innovation Center sequencing service.

Viruses

The HSV-1 strains KOS and UL24X (Jacobson *et al.*, 1998) were originally provided by D.M Coen (*Harvard Medical School*, Boston). vBAC_KOS HSV-1 was described previously (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). vUL24X-Rescue was generated by homologous recombination as described previously (Bertrand *et al.*, 2010). The viral strains vBAC_UL24.5negHA and vBAC_UL24.5negHA-Rescue were created using the Red recombination system as we have done previously (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). The primers used to create the viruses are listed in Table 1. Mutations were confirmed by DNA sequencing. In contrast to vBAC_KOS HSV-1, which expresses untagged forms of UL24 and UL24.5, vBAC_UL24.5negHA and vBAC_UL24.5negHA-Rescue express UL24 or UL24.5 proteins with a hemagglutinin (HA) epitope tag fused at the C-terminus.

Transfections

2.5×10^4 Vero cells/well were plated in twenty-four-well plates. Twenty-four hours later, cells were co-transfected with 1 μ g of total plasmid DNA per well, as indicated using Lipofectamine transfection reagent (Life technologies).

Infection and Western blotting

To assess expression of the HA-tagged UL24 proteins, 1×10^6 Vero cells were seeded per well in six-well plates. The following day, cells were infected with the indicated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 5 and lysed at 5, 10 or 15 hours post-infection (hpi) in 150 μ l of RIPA lysis buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 500 mM NaCl). Cellular debris and lysates were collected, insoluble cellular debris was pelleted using a microcentrifuge, and the supernatant was retained. Protein samples were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis on a denaturing sodium dodecyl sulfate 12.5% gel. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) and analyzed by western blotting. The primary antibodies were used under the following conditions: a monoclonal mouse antibody (mAb) directed against HA (Covance) (1:250) for 1 hour, an anti- γ -tubulin polyclonal rabbit antibody (Sigma) (1:2000) for 1 hour, and an HSV-1 gC mAb (Fitzgerald) (1:150) overnight. Incubation with the indicated peroxidase-conjugated secondary antibodies was carried out at room temperature for 1 hour. An anti-mouse secondary antibody was used to detect the expression of HA (1:1000) and gC HSV-1 protein (1:5000) (Jackson Immuno Research), and an anti-rabbit secondary antibody was used for the detection of the expression of γ -tubulin (Jackson

Immuno Research) (1:5000). Detection was done by enhanced chemiluminescence using ECL Plus reagent (GE-Amersham).

Murine model of ocular infection

Experiments to test HSV-1 mutants *in vivo* were conducted using an ocular model of HSV-1 infection essentially as described previously (Coen *et al.*, 1989, Leib *et al.*, 1989). Six- to 8-week- old CD-1 males were deeply anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (75 mg/kg; Bioniche) and xylazine (10 mg/kg; Bajer) in saline solution. Corneas of anesthetized mice were infected as described previously with 1×10^6 pfu per eye (Leiva-Torres *et al.*, 2010). For strains vBAC_UL24.5negHA, vBAC_UL24.5negHA-Rescue, and vBAC_KOS, viral titers in the eye and in TG were determined for at least three mice each. For strains vUL24X and vUL24X-Rescue, viral titers in the eye and in TG were determined for at least two mice each. For ex vivo reactivation assays, TG were removed immediately post-mortem, dissociated enzymatically, and overlaid on a monolayer of Vero cells. Reactivation was detected by observing the monolayer daily for 10 days, with the presence of the cytopathic effect of the Vero cells used to establish that viral reactivation had occurred. Backtiters of inocula were verified following infection of the mice. All animal experiments were performed at the INRS-Center for Experimental Biology in accordance with institutional good animal care practices. Data points below the level of detection in the experiments were treated as the limit values for calculation of means.

Disease scoring

Inflammation: Periocular disease was assessed visually on a daily basis and in a blind manner over the indicated period of time, and scored on a scale of 0-4: 0, no change; 1, mild inflammation (swelling); 2, moderate inflammation and mild periocular hair loss; 3, severe inflammation, moderate periocular hair loss, and mild skin lesions; 4, severe inflammation, severe periocular hair loss, and severe skin lesions.

Neurological impairment: Neurological signs were assessed visually on a daily basis and in a blind manner over the indicated period of time. Neurological signs were scored on a scale of 0-4 as follows: 0, no neurological signs; 1, slow, creeping movement; 2, slow movement, mild hemiataxia on the left or right side; 3, difficulty moving, severe hemiataxia on the left or right side leading to circular movement; 4, hemiplegia on the left or right side, pronounced difficulty moving, difficulty breathing.

Immunofluorescence microscopy

Vero cells (5×10^4) were seeded on glass coverslips 24 h before transfection with expression plasmids using Lipofectamine transfection reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection (hpt), cells were fixed, permeabilized, and immunostained as described previously (Lymberopoulos et al., 2007). Anti-HA high affinity (1:100; Roche) and anti-nucleolin (1:200; Abcam) were used as primary antibodies, and anti-rat or anti-rabbit polyclonals coupled to Alexa-488 or Alexa-568 (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Following immunostaining, coverslips were incubated for 1 min with Hoechst 33342 (Molecular Probes) diluted 1:2000 in PBS. The coverslips were then washed three times in PBS, and mounted onto glass slides using Prolong Gold Anti-Fade reagent (Invitrogen). The slides were visualized using a Zeiss LSM780 confocal system equipped with a diode laser at 405 nm, an argon multi-line laser at 458/488/514 nm, a DPSS laser at 561 nm, and a HeNe laser at 633 nm mounted on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (63X objective, N.A. 1.4), and operated with ZEN 2011 software (Zeiss). Images were prepared using Adobe Illustrator CS5 software.

Results

Identification of UL24.5, a novel HSV-1-encoded protein

UL24 is contained within the UL region of the HSV-1 genome (Fig. 1A). Previous studies identified three transcription start sites, two located upstream of the *UL24* ORF while the third start site is located within the *UL24* ORF (Fig. 1B) (Pearson et al., 2002). Thus, the first and second transcription start sites result in mRNAs that can be translated into full-length UL24 protein; however, no proteins have been shown to be expressed from the transcripts originating from the third start site. Analysis of the *UL24* ORF revealed the presence of four in-frame start codons in addition to the initiating MET codon, as well as three out of frame ATG sequences. Interestingly, the third in-frame ATG is located 25 nucleotides downstream from the third transcription start site (Fig. 1B). These data raise the possibility that mRNA originating from the last transcription start site could lead to the production of a new HSV-1 protein (Fig. 1C).

In our previous studies on HSV-1 UL24, we detected the protein using an antiserum directed against the N-terminal third of the protein, or due to a hemagglutinin (HA) epitope tag fused to the N-terminus of UL24 (Lymberopoulos et al., 2007, Pearson et al., 2002). Therefore, in order to test the hypothesis that a protein is expressed from transcripts originating at the third

transcription start site, we constructed a recombinant virus where the HA tag is encoded at the C-terminus of UL24 (Fig. 1D). We used the BAC system to generate recombinant viruses based on the « red recombination » system as described by Tischer *et al.* (Tischer *et al.*, 2010, Tischer *et al.*, 2006). Because UL24 and the potential new protein we call UL24.5 share the same ORF, the resulting virus, vBAC_UL24HA, would ensure an HA tag on all proteins in frame and co-terminal with full length UL24.

Two independent isolates of vBAC_UL24HA were constructed. Vero cells were infected in duplicate, and cell lysates were prepared 10 hpi. In addition to detecting the 29 kDa UL24-HA protein, Western blot analysis using a primary antibody directed against the HA epitope revealed expression of an 18 kDa protein that we named UL24.5 (Fig. 2). We also detected a fainter band of approximately 16 kDa. These data support the hypothesis that smaller polypeptides co-terminal with full length UL24 are present in HSV-1-infected cells.

UL24.5 is not a degradation product of full-length UL24

To test if the UL24.5 protein was a degradation product of full length UL24 and not a separate translation product, we analyzed the expression of UL24.5 from a UL24-null strain. The UL24-null strain UL24X (Jacobson *et al.*, 1998) contains stop codons in all three reading frame at codon 43 of HSV-1 *UL24*. We inserted a C-terminal HA epitope tag in-frame at the end of the UL24 ORF generating the strain vUL24X-HA. We then compared proteins from cells infected for 12 hours with vHA-UL24 (where the HA tag is located at the N-terminus of UL24) or with vUL24X-HA (where the HA tag is located at the C-terminus of UL24). Western blot analysis revealed that even in the absence of expression of full length UL24 protein, we detected the 18 kDa UL24.5 protein (Fig. 3). At this exposure, we also noted the presence of a band just above UL24.5, the nature of which is presently unclear. The expression of the UL24.5 protein in the absence of full length UL24 protein demonstrates that UL24.5 is not a degradation product of full length UL24.

UL24.5 is a late protein

Based on the estimated size of UL24.5 as determined by its migration in SDS-PAGE, and on the amino acid sequence of UL24, we predicted that the initiation codon for UL24.5 corresponds to the MET ATG codon 122. In order to verify if M122 was indeed the initiation codon for the UL24.5 protein, we introduced a substitution mutation leading to the ATG 122 codon being replaced by a GTG codon for valine (Fig. 4A) in the context of a *UL24* gene encoding a C-terminal HA epitope tag. The corresponding rescue virus was also produced. Recombinant viruses were

generated using the BAC system (Tischer *et al.*, 2010, Tischer *et al.*, 2006). DNA sequencing confirmed that the desired mutations or restored wild type sequences in *UL24* were present in the recombinant viruses. We also verified that there were no major genomic rearrangements in the new recombinant viruses. The EcoRV restriction digest pattern of the different viral genomes did not reveal any major genomic alterations (Fig. 4B).

Analysis of UL24-related proteins expressed from the UL24.5 negative strain was carried out by western blot (Fig. 4C). Vero cells were either mock-infected or infected with vBAC_UL24.5negHA or vBAC_UL24.5negHARescue. In order to determine the kinetics of expression of UL24.5, cells were infected in parallel in the presence of 400 µg/mL of phosphonoacetic acid (PAA), an inhibitor of viral DNA replication. At the indicated times p.i, total cell lysates were harvested, subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with an anti-HA mAb. As predicted, for vBAC_UL24.5negHA, we detected expression of the full length UL24 protein (10 and 15 hpi) but not of the 18 kDa UL24.5 protein. Expression of UL24.5 was restored with the vBAC_UL24.5negHARescue virus. Similar to UL24, UL24.5 was detected at 10 and 15 hpi. We also detected a faster migrating band a few kDa smaller than UL24.5. We suspect that this UL24-related polypeptide is due to translation from the second ATG downstream of the third *UL24* transcription start site (Fig. 1), which would be favored in the context of mutating M122. The intensity of this band varied somewhat between experiments. The blocking of viral DNA replication by PAA treatment resulted in a decrease in steady-state levels of full length UL24, which is consistent with the previously characterized leaky-late kinetics of this protein (Pearson *et al.*, 2002). Treatment with PAA abolished detection of UL24.5. As a control, the membrane was incubated with antibody directed against gC, product of a true late gene whose expression is strictly dependent on viral DNA replication. We concluded that UL24.5 protein expression is largely dependent on viral replication, which is consistent with late kinetics.

UL24.5 is not required for HSV-1 replication in epithelial cells in cell culture

The ability of the UL24.5-null virus to replicate in cell culture was tested in a multi-step replication assay. Vero cells were infected with vBAC-KOS, the UL24-deficient virus (vUL24X), vBAC_UL24.5negHA, or vBAC_UL24.5negHA-Rescue at an MOI of 0.01 (Fig. 5A). We found that viral yields were not affected by the absence of UL24.5 in contrast to the reduction in viral titers observed for vUL24X (Jacobson *et al.*, 1998). In cell culture, HSV-1 strains that do not express UL24 exhibit a syncytial plaque phenotype that is more pronounced at high temperatures (Jacobson *et al.*, 1989b). Vero cells were infected with the indicated viruses, and incubated at

37°C or at 39°C for 48 hours. In contrast to vUL24X, we found that vUL24.5negHA produced non-syncytial plaques at both 37°C and 39°C similar to vBAC-KOS and the rescue virus (Fig. 5B). Thus, UL24.5 does not affect viral yield or plaque morphology in cell culture. Moreover, these results suggest that the M122V substitution used to block expression of UL24.5 does not block the function of full length UL24.

UL24.5 is mainly cytoplasmic and does not alter nucleolin localization

UL24 is sufficient to induce the redistribution of the major nucleolar proteins nucleolin and B23 (Bertrand *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2011). To test if UL24.5 shares this function with UL24, we constructed mammalian expression plasmids using two different strategies to express UL24.5 with a C-terminal HA epitope tag (Fig. 6A). In the first, the initiating ATG of full length UL24, as well as the second ATG in the same frame were mutated to GTG. In the second strategy, we deleted the 5' sequence of *UL24* up to and including the A residue of the second UL24 in-frame ATG, thus ensuring that for this construct the first ATG encountered by the scanning ribosome is the predicted UL24.5 ATG. Lysates from cells transfected with the vectors pCGPfl-UL24-HA-1,2GTG and pCGPfl-UL24-Δ5'-HA were harvested, analyzed by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with anti-HA mAb. In both cases we were able to detect the expression of the 18 kDa UL24.5 (Fig. 6B). Expression from pCGPfl-UL24-HA-1,2GTG was weaker than from the construct containing a 5' deletion of *UL24*. This difference may be due the CMV promoter in the plasmid being stronger than the endogenous *UL24* promoter for the third transcription start site, if indeed the endogenous promoter is used for pCGPfl-UL24-HA-1,2GTG. Moreover, the shorter 5' untranslated region of the deletion construct should reduce the possibility of extensive secondary structure hindering scanning by the ribosome. Two faster migrating bands were also detected, one corresponding to approximately 15 kDa, and another corresponding to 10 kDa. The 15 kDa protein may be due to translation from one of the two other in-frame ATG codons within the UL24.5 coding region. At present, the exact nature of these smaller proteins is unclear. We compared the localization of ectopically expressed UL24.5 to that of UL24 by confocal microscopy. As we have seen previously (Bertrand *et al.*, 2008), UL24 was distributed throughout the nucleoplasm and in the cytoplasmic compartment. In contrast, UL24.5 was mainly cytoplasmic, although we did detect a small amount of UL24.5 in nucleoli, which was similar to the minor staining pattern we have seen previously for full length UL24 (Bertrand *et al.*, 2008). Moreover, we found that strong foci of nucleolar staining for nucleolin remained in cells expressing UL24.5, indicating that the latter did not lead to the dispersal of nucleolin. We quantified the effect of UL24 and UL24.5 on the staining pattern for nucleolin. In order to validate that the position of

HA-tag does not impact UL24 function, we also created a plasmid, pCGPfl-UL24-HA, in which the HA-tag is fused to the C-terminus of UL24. We found that at 24 hpt, expression of either HA-UL24 or UL24-HA led to a similar altered distribution pattern of nucleolin in the majority of transfected cells (Fig. 6C). In contrast, in cells transiently expressing UL24.5 (expressed from the plasmid pCGPfl-UL24- Δ 5'-HA), nucleolin remained in distinct foci—we observed no significant difference in the nucleolin distribution compared to that seen in mock-transfected cells. UL24 also induces the redistribution of the nucleolar protein B23 (Lymberopoulos *et al.*, 2011). In similar experiments, we found that UL24.5 did not induce the redistribution of B23 either (data not shown). Thus, although a small portion of UL24.5 accumulates in nucleoli, it appears that unlike UL24, UL24.5 does not alter the localization of nucleolar proteins.

Absence of the UL24.5 protein does not affect viral titers in the cornea or TG during acute infection

We tested the importance of UL24.5 *in vivo* in a murine model of HSV-1 ocular infection that we have used previously (Coen *et al.*, 1989, Leib *et al.*, 1989, Leiva-Torres *et al.*, 2010). Mice were infected with 1×10^6 plaque forming units (PFU) per eye with the wild-type vBAC_KOS virus, vBAC_UL24.5negHA, vBAC_UL24.5negHA-Rescue, UL24X and vUL24X-Rescue. Viral titers in tear films were measured for days 1, 2 and 3 post-infection (Fig. 7A). We found that viral titers were similar for all the viruses tested except for UL24X, which exhibited an approximate 10-fold reduction, consistent with previous reports (Jacobson *et al.*, 1998). Viral titers in TG were evaluated at 3 dpi (Fig. 7B). Here again we found that viral titers were similar for all the viruses tested except for UL24X, which exhibited the previously described drastic reduction (upto $4 \log_{10}$) of viral titers in TG (Jacobson *et al.*, 1998). Likewise, we found that vBAC_UL24.5negHA was able to reactivate from latency *ex vivo*, and there was no statistical difference between the numbers of TG that were positive for viral reactivation when comparing the UL24.5 mutant to the wildtype or rescue viruses (Table 2). We concluded that UL24.5 does not play an important role early during acute infection in the cornea and TG, nor is it required for reactivation *ex vivo*.

Increased clinical signs in mice infected with UL24.5 mutants

During our *in vivo* analyses, we observed a striking difference in the ability of vUL24.5negHA to cause disease. Because of the unexpected results, we included an independent isolate of the UL24.5neg virus in these experiments. The two strains are referred to as vBAC_UL24.5negHA(1) and vBAC_UL24.5negHA(2), and each have their respective rescue

strain. To assess the impact of the absence of UL24.5 on disease, we infected mice with the wild type virus vBAC_KOS, two independent isolates of the vBAC_UL24.5negHA, the corresponding rescue viruses, UL24X or vUL24X-Rescue. We scored for the severity of disease by daily visual inspection up to 25 dpi. Assessment of disease was done in a blinded manner. As expected, we observed little periocular disease in mice infected with UL24X, while we observed periocular disease characterized by inflammation, hair loss and lesions beginning at 4 dpi for the wildtype virus and rescue strains (Fig. 8) consistent with our previous results (Leiva-Torres *et al.*, 2010). We observed similar signs in mice infected with the vUL24.5negHA strains. From approximately 13 dpi, we observed a decrease in periocular disease for the wild-type virus and for the respective rescue viruses. Surprisingly, pronounced signs of periocular disease persisted several days longer for mice infected with either of the two independent UL24.5-null strains, and were not completely resolved by 25 dpi. We also assessed signs of neurological impairment in a blinded manner (Fig. 9). We observed similar trends for both isolates of the UL24.5-deficient virus. For vBAC_UL24.5negHA(1), 8 out of 9 mice exhibited severe neurological impairment, a difference which was significant compared to the value for the parental strain KOS or for the rescue virus. For the second isolate, 2 out of 6 mice also exhibited signs of severe neurological impairment. In these experiments, for all other viruses tested we did not observe any signs of neurological problems. As expected, UL24X did not cause neurological symptoms in infected mice (Leiva-Torres *et al.*, 2010). A description of the daily neurological scores for all animals in the study is presented in Fig. Suppl. 1. Thus, our results demonstrate that the absence of UL24.5 during infection *in vivo* leads to a prolonged period of periocular disease and an increase in the incidence of severe neurological impairment.

Conservation of methionine 122 among α -Herpesvirus

To determine if it is likely that *UL24.5* orthologs are present in other herpes viruses, we undertook a bioinformatic analysis to assess the degree of conservation of the M122 codon. We aligned the UL24 amino acid sequences of eight HSV-1 strains whose full genome sequences are in NCBI (Fig. 10A, Suppl. Table 1). The results revealed that the M122 codon is present in all the HSV-1 UL24 protein sequences studied. These results support the notion that UL24.5 is a genuine HSV-1 protein and not specific to the strain KOS. We noted that M180, an inframe methionine codon downstream of M122, is conserved among the HSV-1 UL24 sequences, while M191, another in-frame methionine codon was found in 5 of 8 of the strains. When we analyzed UL24 homologs of all human alpha herpes viruses, we found that M122 was also conserved for HSV-2 and for varicella zoster virus (VZV), and in several non-human alpha herpes viruses (Fig.

10B). In contrast, in the beta and gamma herpes viruses M122 is not conserved. In most instances, a leucine is present in the place of M122. Because leucine codons can serve as initiation codons, their presence is not incompatible with the expression of UL24.5. For a small number of viruses, no equivalent was found for M122 (e.g. Epstein Barr virus). In conclusion, our results suggest that UL24.5 is a *bona fide* HSV-1 protein, and likely is also expressed by other alpha herpesviruses. Expression in beta and gamma herpes viruses would necessarily imply translation initiation from an alternative initiation codon.

Discussion

In this study, we investigated the possibility that the third transcription initiation site for *UL24*, which is located within the UL24 ORF, leads to the expression of a new HSV-1 protein. By generating a virus and expression constructs designed to fuse an HA epitope to the C-terminus of UL24 we identified a protein, UL24.5, which is coded in-frame with the carboxy end of UL24, and whose N-terminus corresponds to M122 of full length UL24. There are sets of both early and late *UL24* transcripts. We found that like full length UL24 (Pearson *et al.*, 2002), UL24.5 is expressed with late kinetics, thus the function of the early *UL24* transcripts remains a mystery. Our findings are consistent with early reports describing HSV-1 gene expression where Northern blot analysis of polysome-associated RNAs from infected cells identified 5.6 and 5.2 kb transcripts corresponding to the *UL24* locus (Holland *et al.*, 1984), the 5.2 kb species likely originating from the third transcription start site of *UL24* (Cook *et al.*, 1996b). Consistent with the late kinetics of the 5.2 kb *UL24* transcript, there is a TATA box located 26 nucleotides upstream of the start site of initiation. The leader sequence for the 5.4/1.2 kb UL24 transcripts is predicted to be only 25 nucleotides. Although this length is relatively short, there are examples in infected cells where leader sequences have been shown to have little impact on translation. Namely in Alonso-Caplen *et al.* (Alonso-Caplen *et al.*, 1988), they created recombinant adenoviruses engineered to express the influenza NP gene under control of a late adeno promoter, in which they inserted various lengths of the NP tripartite leader sequence (from 0-200 nts). In this context, the leader sequence was not required for efficient translation, though it did affect transcript accumulation. Thus, it may be that in the context of viral infection certain translation regulatory sequences are less important than they are in un-infected cells.

There have been other reports of sets of co-terminal polypeptides expressed from HSV-1 genes. For example, HSV-1 *Us1* encodes the immediate-early protein ICP22 as well as the N-terminally truncated form US1.5 (Carter *et al.*, 1996). Interestingly, ICP22 and US1.5 share certain

functions in cell culture, but only ICP22 appears to affect viral infection *in vivo* (Mostafa *et al.*, 2013). Thus, both in the case of UL24/UL24.5 and ICP22/US1.5, the additional coding capacity of the viral genome has an impact on pathogenicity.

In addition to the UL24.5 protein, we detected two other smaller proteins coded in-frame with full length UL24, a protein of approximately 15-16 kDa and one of 10 kDa (Fig. 5). These proteins likely arise from the use of M180 and M191 as initiating methionines (Fig. 10). Mutagenesis experiments targeting these potential initiation codons would be required to confirm that they function as such. Very recently, several different isoforms of the UL24 homolog in HHV-8 (ORF20) were identified (Bussey *et al.*, 2018). The shortest of the isoforms, ORF20B (257 aa) corresponds to full length UL24 in HSV-1, no equivalent of UL24.5 is described. Their finding is consistent with our bioinformatics analysis. We found that the initiation MET codon for UL24.5 was conserved in all HSV-1 strains analyzed, as well as in HSV-2 and VZV reference strains, and a subset of non-human alpha herpesviruses. In contrast, there was no equivalent MET codon for any beta or gamma herpesviruses we analyzed. Thus, we propose that UL24.5 is important specifically for members of the *alphaherpesvirinae* subfamily.

The primary sequence of UL24.5 begins within the 4th homology domain of UL24, and thus has an intact 5th homology domain and contains the entirety of the less well-conserved C-terminal domain (Fig. 1). The N-terminal portion of UL24 (aa 1-190) is sufficient to induce the dispersal of nucleolin, and furthermore, deletion of any one of the homology domains abrogates this activity (Bertrand *et al.*, 2008). Thus, it was not surprising to find that ectopically expressed UL24.5 did not induce the redistribution of either nucleolin or B23. Nevertheless, we found that UL24.5 was still able to accumulate in the nucleolus to some degree, even though the protein was mainly cytoplasmic. This result may be related to the predicted nuclear localization signal in the C-terminus that has been described, but not yet validated. A sequence capable of targeting a heterologous protein to nucleoli has been located in the first 60 aa of HSV-1 UL24 (Bertrand *et al.*, 2008). The expression of UL24.5 may explain the presence of nuclear/nucleolar targeting sequences in both the N- and C-terminal domains of the UL24 ORF. Instead of simple redundancy in the full length UL24 protein, the nuclear targeting signal near the C-terminus may be there as a requirement for the proper localization of UL24.5.

We found that the absence of UL24.5 during infection in cell culture had no effect on viral yield or on plaque morphology. Moreover, in a mouse model of ocular infection, no reduction in viral titers was found in the eye or in TG during acute infection. This result is in stark contrast to the impact of the absence of full length UL24 on HSV-1 replication *in vivo*, which results in a

decrease in viral titers of 1 log₁₀ in epithelial cells of the cornea and of up to 4 log₁₀ reduction of viral titers in TG (Jacobson *et al.*, 1998, Leiva-Torres *et al.*, 2010). These results are further evidence that UL24 and UL24.5 have distinct roles in the host cell.

Where we did observe an impact of the loss of UL24.5 during infection was with regard to pathogenesis. A blind assessment of periocular disease carried out between 4 and 25 days post-infection revealed that signs of disease persisted longer in mice infected with either of the two vUL24.5negHA independent isolates compared to the parental strain or the rescue viruses. It will be important to determine if the prolonged period of periocular disease reflects a prolonged period of viral replication in the eye or TG, or a delay in the adaptive immune response necessary to ultimately clear the infection. The M122V substitution mutation that blocked expression of UL24.5 also necessarily introduced the M122V substitution in full length UL24. Although we cannot formally rule out that this substitution is the cause of the *in vivo* phenotypes we observed, it is unlikely that the substitution has a negative impact on the function of full length UL24 because no replication defect was detected in cell culture or during acute infection of mice 1-3 dpi. Interestingly, a previous report found that the absence of ORF20, the homolog of HSV-1 UL24 in MHV-68, resulted in prolonged persistence of viremia in the lungs following intranasal infection (Nascimento *et al.*, 2011b), which is similar to our observations with vUL24.5negHA. However, there is no M122 equivalent in MHV-68, suggesting that if there is a similar mechanism at play, that perhaps in some herpesviruses full length UL24 itself is responsible for the functions dedicated to UL24.5 in other viruses. In addition to prolonged periocular disease, we observed an increase in the incidence of severe neurological disorders in mice infected with UL24.5 deficient viruses. Presently, it is unclear if these symptoms are due to increased viral titers in the brain at late times in infection, or due to some form of dysregulation of the immune response to infection leading to neurological damage. Regardless, our results point to UL24.5 involvement in limiting neurological disease during acute infection.

To conclude, we have discovered a new HSV-1 protein, UL24.5. UL24.5 appears to have different functions during infection than UL24. Although a virus deficient in UL24.5 did not exhibit any replication defects in cell culture, *in vivo*, such a mutant exhibited a more severe pathology, namely prolonged signs of periocular disease, and an increased incidence of severe neurological disorders. Further studies are required to elucidate the role of UL24.5 *in vivo* and to determine if it affects the host immune response.

Acknowledgments

CSS and CEGS were recipients of scholarships from the Fondation Armand-Frappier (FAF). This work was funded by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research to AP (MOP 82924).

Tables and Figures

Table 1. Primers used in this study. Restriction enzyme sites used for cloning are underlined.

Primer	Sequence 5' to 3'
419 BglII5'UL24top	ccc <u>aga tct</u> gcg gca cgc tg
420 BamHI_UL24c-HAbot	ccc <u>gga tcc</u> tca agc gta atc tgg aac atc gta tgg gta ttc gga ggc ggc tcg
543 HSVUL24_without306nuc5'	ata <u>gga tcc</u> tgc aaa tat att tct tcc ggg gac
602 BAC_KOS_UL24.5negHA_Rescue_F	caa ata tatttc ttc cgg gga cac cgc cag caa acg cga gca acg ggc cac ggg gat gaa gca gct gcg cca ctc cct gaa gga tga cga cga taa gta
603 BAC_KOS_UL24.5negHA_Rescue_R	cac ccg gag gcg cga ggg act gca gga gct tca ggg agt ggc gca gct gct tca tcc ccg tgg ccc gtt gct cgc gtt tgc aac caa tta acc aat tct ga
592 BAC_KOS_UL24.5negHA_F	caa ata tat ttc ttc cgg gga cac cgc cag caa acg cga gca acg ggc cac ggg ggt gaa gca gct gcg cca ctc cct gaa gga tga cga cga taa gta
593 BAC_KOS_UL24.5negHA_R	cac ccg gag gcg cga ggg act gca gga gct tca ggg agt ggc gca gct gct tca ccc ccg tgg ccc gtt gct cgc gtt tgc aac caa tta acc aat tct ga

Table 2. UL24.5 is not required for HSV-1 reactivation *ex vivo*

Virus	No. Reactivated TG/Total TG (%)
vBAC_KOS	10/10 (100)
vBAC_UL24.5negHA	10/11 (90.9)
vBAC_UL24.5negHA-Rescue	14/14 (100)
vUL24X	2/4 (50)
vUL24X-Rescue	4/4 (100)
Mock	0/8 (0)

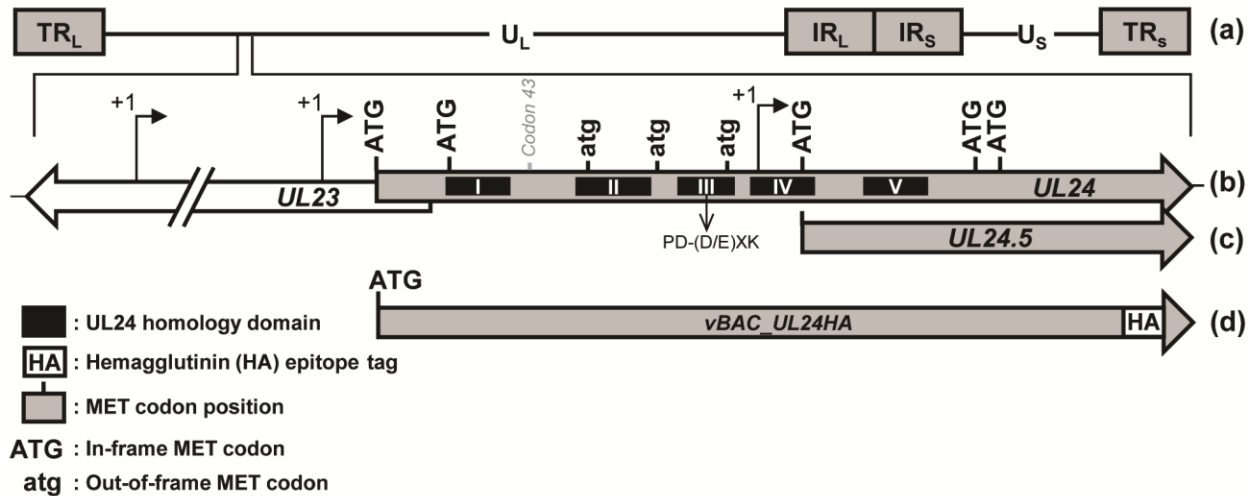


Figure 1 : Diagram of the UL24 locus of HSV-1 and vBAC_UL24HA.

(a) Schematic representation of the HSV-1 genome showing the unique long (UL) and the unique short (US) regions each flanked by terminal and internal repeats (TRL, IRL and IRS, TRS respectively). (b) UL24 ORF with the in-frame ATG (upper case) and out-of-frame atg (lower case) methionine codons indicated. Arrows above the UL23 and UL24 ORFs represent the transcription start sites previously identified for UL24. The position of the previously described PD-(D/E)XK endonuclease motif is indicated below the thick arrow. The position of codon 43 in which the UL24X mutation is located is indicated above the thick arrow. (c) Predicted UL24.5 ORF, starting at the third in-frame ATG within UL24 and ending co-terminal with full length UL24. (d) UL24 ORF of vBAC_UL24HA where the HA epitope tag has been added at C-terminus of UL24.

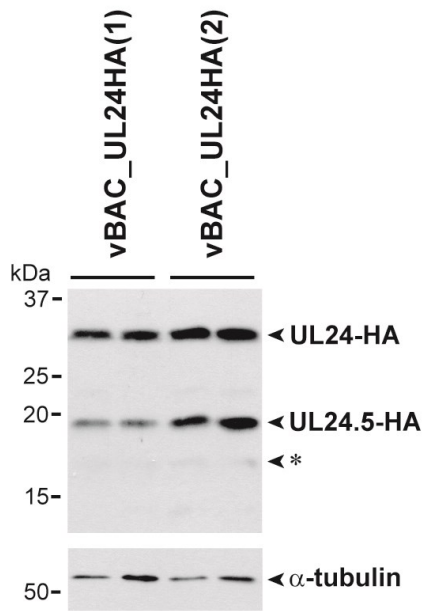


Figure 2 : Expression of an 18 kDa protein, UL24.5, in HSV-1-infected cells.

Lysates from Vero cells infected with one or the other of two independent isolates of vBAC_UL24HA were harvested 10 hours post-infection (hpi). Lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using anti-HA mAbs. The positions of HA-reactive polypeptides are indicated to the right of the panel, including a 16 kDa polypeptide identified by an asterisk. α -tubulin served as a loading control.

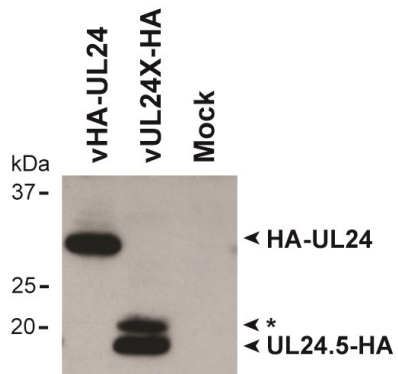


Figure 3 : UL24.5 is not a degradation product of full length UL24.

Lysates from mock-infected cells, or cells infected with either vHA-UL24 (that expresses an HA epitope tag at the N-terminus of UL24) or vUL24X-HA (that expresses an HA tag at the C-terminus of UL24) were prepared from cells harvested 12 hpi. Lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-HA mAbs. The positions of HA-reactive polypeptides are indicated to the right of the panel. The asterisk indicates a minor band migrating slightly above UL24.5.

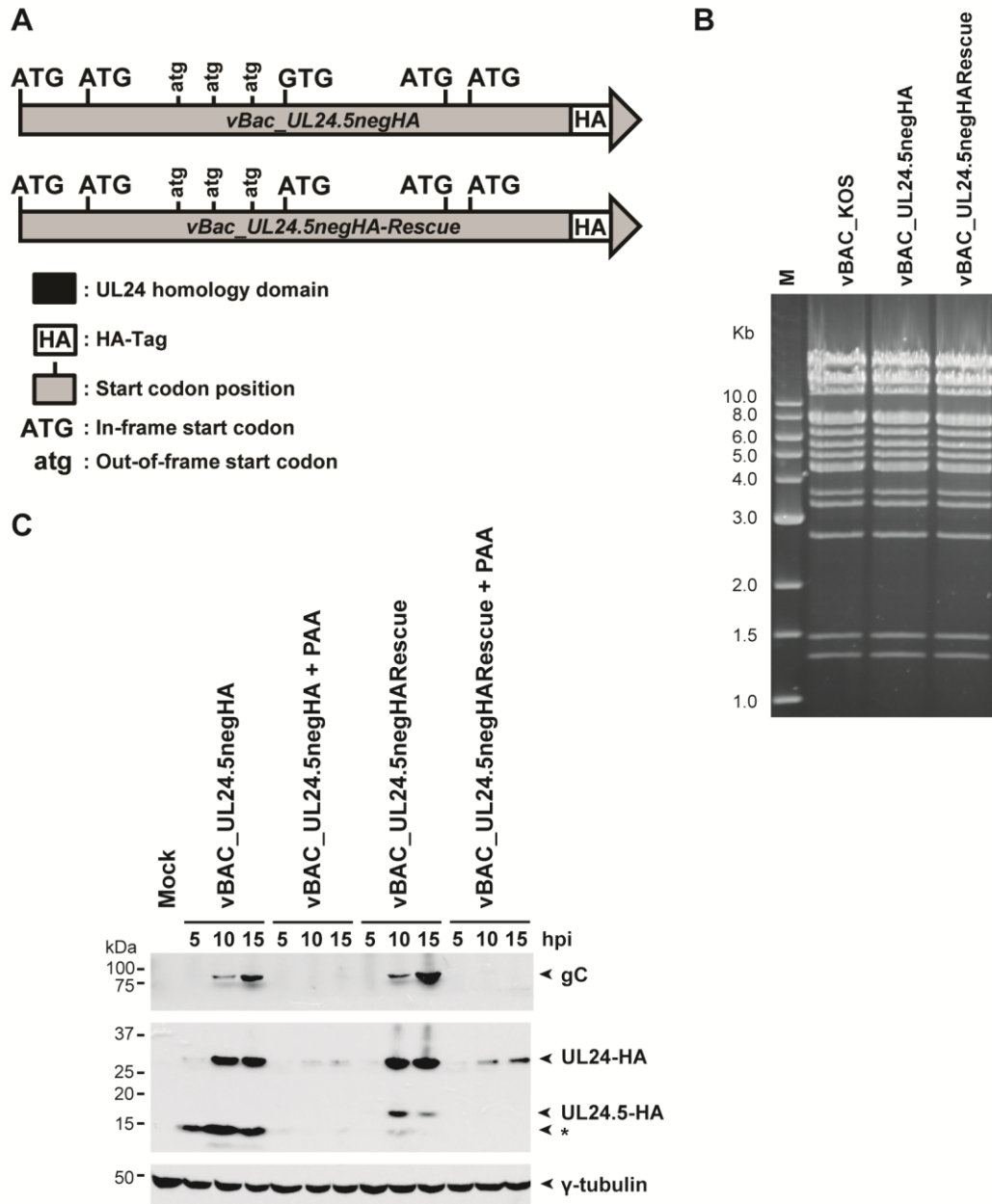


Figure 4 : UL24.5 is expressed with late kinetics.

(A) Diagram of the UL24 gene of the vBAC_UL24.5negHA mutant and rescue virus. The HA-tag is located immediately before the stop codon. The third in-frame ATG of UL24 was mutated to GTG to inhibit expression of the UL24.5 protein. (B) EcoRV digestion patterns of the indicated viral genomes. The digestion products were resolved on a 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. (C) Mock-, vBAC_KOS-, vBAC_UL24.5negHA-, or vBAC_UL24.5negHA-Rescue-infected cells were infected in parallel either in the presence or in the absence of 400 μ g/ml of the viral DNA replication inhibitor PAA. Cell lysates harvested at 5, 10 and 15 hpi, were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-HA mAb. The blot was then stripped and

reprobed with anti-gC pAbs, or anti- γ -tubulin pAbs. Positions of the various proteins are indicated to the right of the panels by arrows. An asterisk marks the position of a 15 kDa polypeptide whose identity remains to be determined. The true late viral protein gC served as a late gene control for the inhibition of viral DNA synthesis. γ -tubulin served as a loading control.

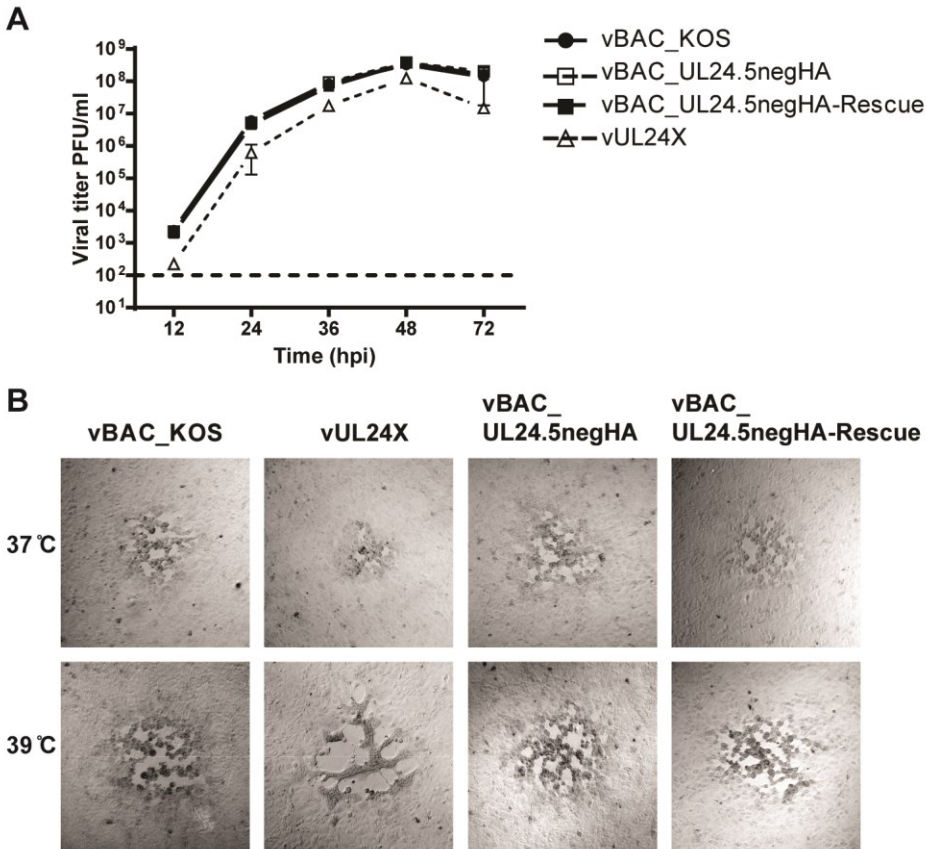


Figure 5 : UL24.5 is not important for replication in cell culture

(A) The impact of the absence of UL24.5 was assessed in a multi-step replication assay. Vero cells were infected in duplicate with the indicated viruses at an MOI of 0.01. At the indicated times post-infection, cells and supernatant were harvested to determine the total production of infectious particles. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). (B) Comparison of plaque morphology for the indicated viruses on Vero cells at 2 days post-infection (dpi) at 37 °C and 39 °C.

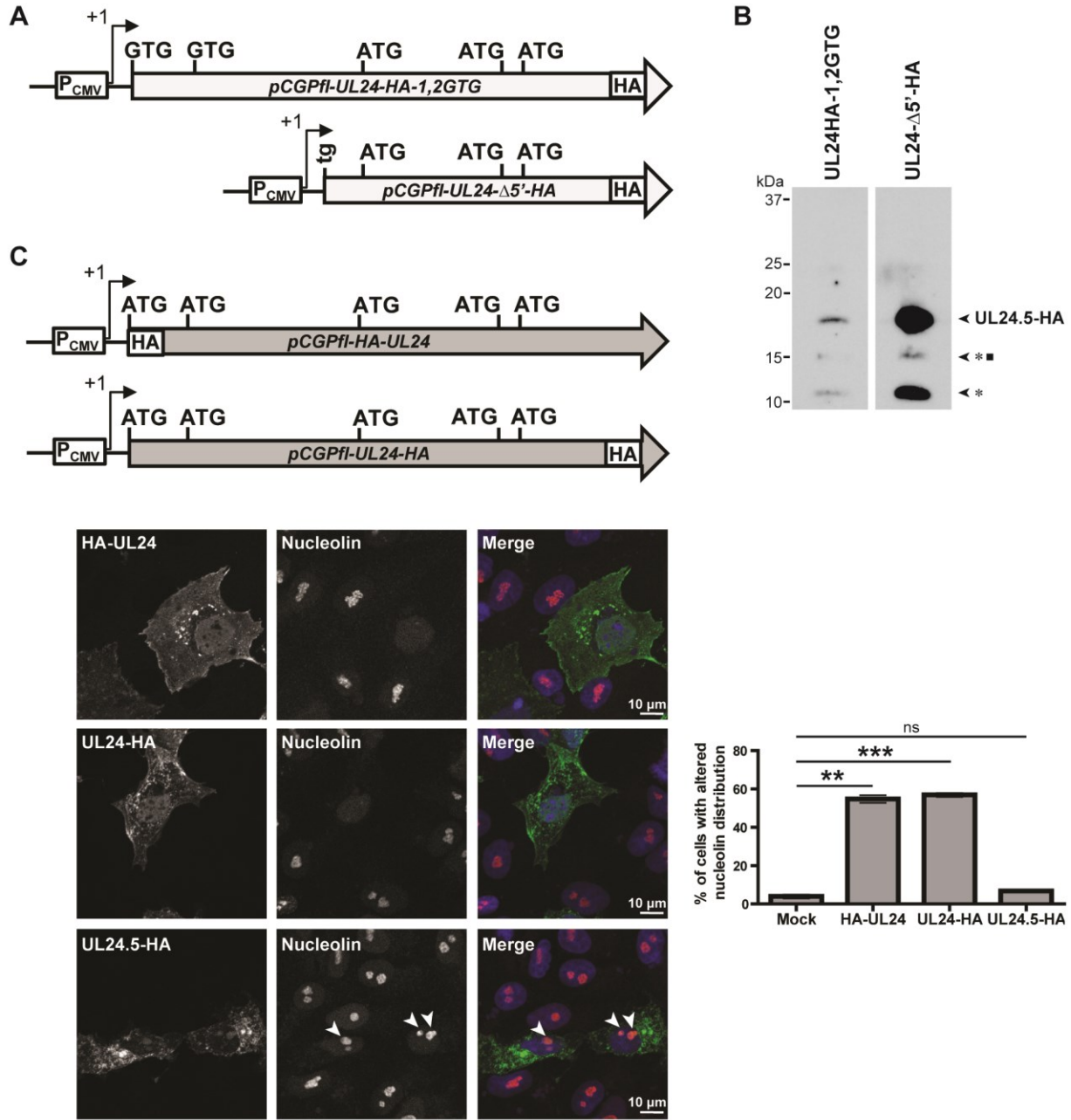


Figure 6 : UL24.5 is mainly cytoplasmic and does not alter nucleolin localization.

(A) Diagram of the *UL24.5* gene from the pCGPfl-UL24-HA-1,2GTG (top) and pCGPfl-UL24-Δ5'-HA (bottom) vectors. *UL24.5* transcription is under control of a CMV promoter (P_{CMV}). (B) Lysates from cells transfected with the indicated *UL24.5* expression vector were prepared at 24 hours post-transfection, subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-HA mAbs. Positions of the various proteins are indicated to the right of the panels by arrows. The positions of polypeptides smaller than *UL24.5* are indicated by asterisks. (C) Confocal images of Vero cells transiently expressing the full-length *UL24* protein with either an N-terminal (HA-*UL24*) or C-terminal (*UL24*-HA) HA epitope tag, or *UL24.5* with a C-terminal HA tag (*UL24.5*-HA). Twenty-

four hours post-transfection, cells were co-immunostained for HA (green) and nucleolin (red). DNA was stained with Hoechst 33342 (blue). Arrowheads show the foci of nucleolin that persist in cells expressing UL24.5. Scale bars correspond to 10 μ m. To the right of the confocal images is a graph quantifying the distribution of nucleolin in transfected cells expressing HA-UL24, UL24-HA, UL24.5-HA, or in mock-transfected cells. The graph shows the percentage of cells expressing UL24 or UL24.5 that exhibited altered nucleolin staining. In the case of mock-transfected cells, the value was determined for cells from within a random field of view. Each result represents the average of two experiments where more than 100 cells were analyzed for each condition. Error bars represent the standard errors of the means. (***, $p < 0.001$; **, $0.001 < p < 0.01$; ns, non significant difference in Student's t-test comparisons with mock-transfected cells).

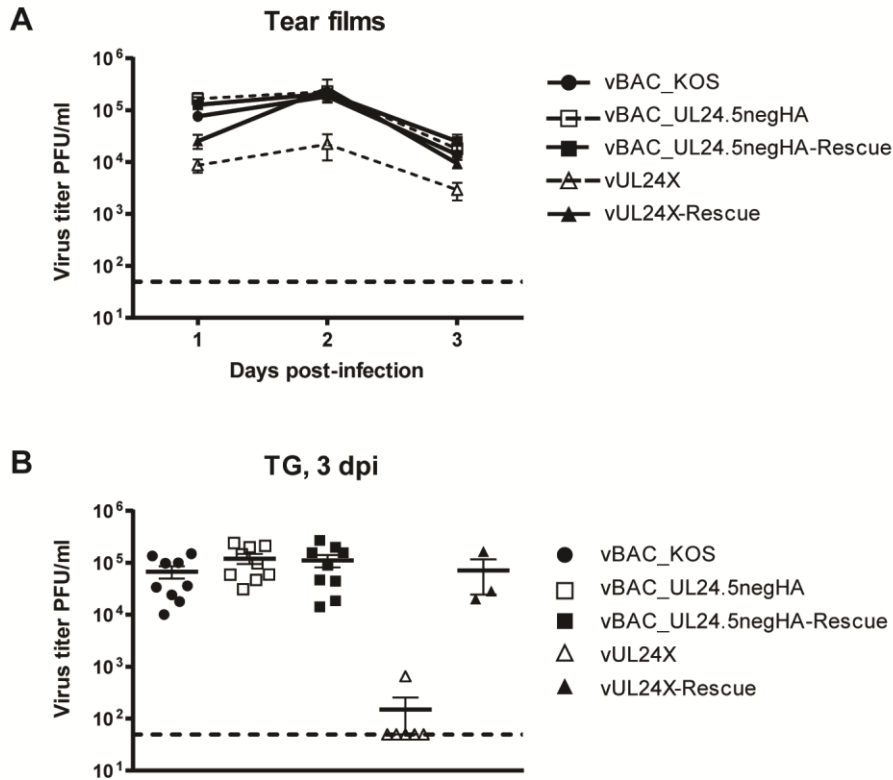


Figure 7 : The absence of UL24.5 protein does not affect viral titers in tear films or in trigeminal ganglia during acute ocular infection of mice.

Quantification of viral titers during acute infection in vBAC_KOS-, vBAC_UL24.5negHA-, vBAC_UL24.5negHA-Rescue-, vUL24X-, vUL24X-Rescue- infected mice. (A) Titers of infectious virus present in tear films of mice at 1, 2 and 3 dpi. Data shown are pooled from four independent experiments. (B) Titers of infectious virus present in the trigeminal ganglia (TG) at 3 dpi. Data shown are pooled from three independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. The mid-bars in the graph represent the means. All error bars represent the standard error of the mean (SEM).

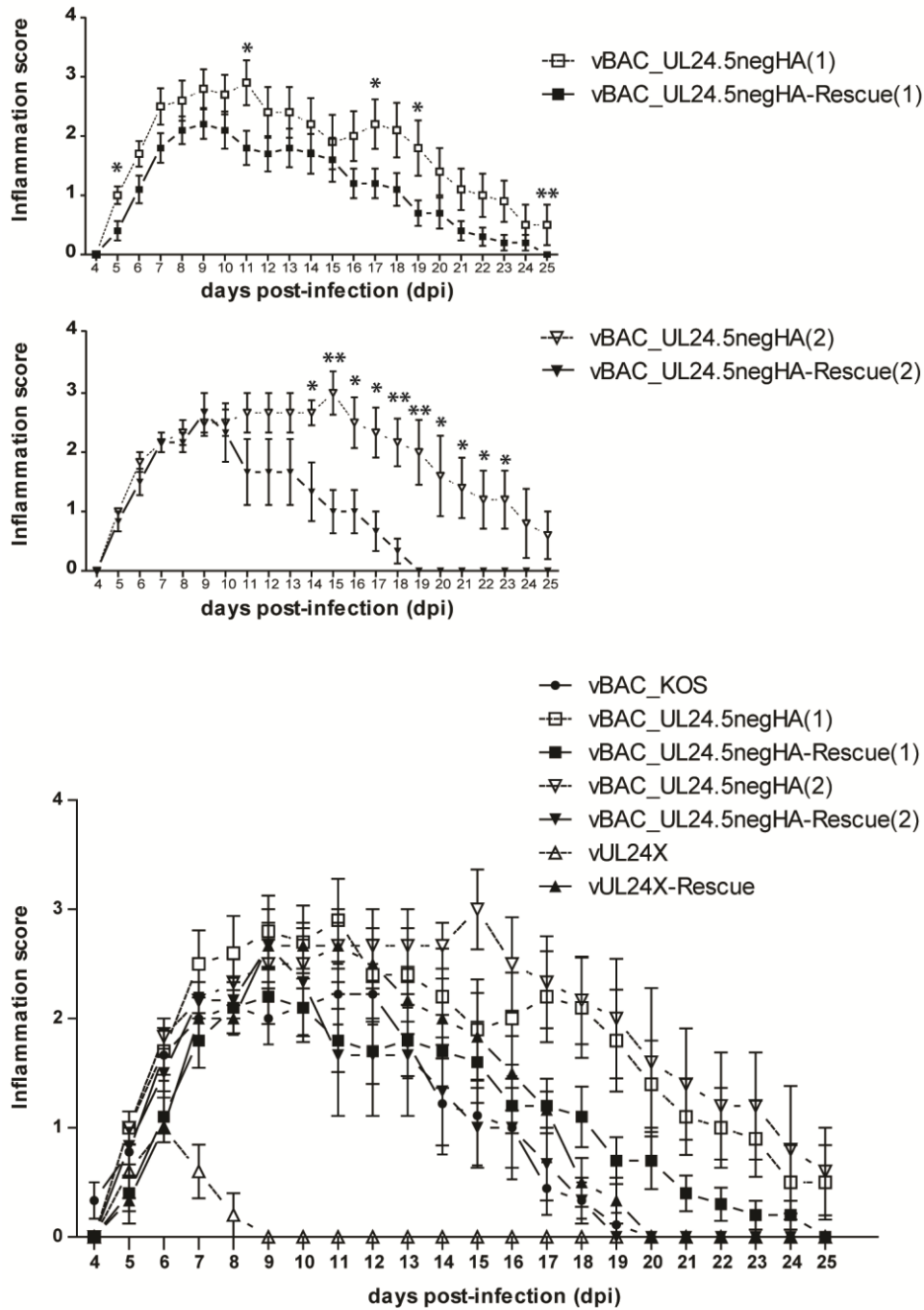


Figure 8 : The absence of UL24.5 protein prolongs the period of periocular disease.

Following infection of mice with the indicated viruses, the mean disease score, as determined on a scale of 0-4, was assessed each day from 4 to 25 dpi. The graph shows the average scores for data pooled from three independent experiments (n=9 for vBAC_KOS, vBAC_UL24.5negHA(1), vBAC_UL24.5negHA-Rescue(1) and n=6 for vBAC_UL24.5negHA(2), vBAC_UL24.5negHA-Rescue(2), vUL24X and vUL24X-Rescue), where (1) and (2) represent independent isolates of the indicated strain. The value indicated for each day is the mean of the values obtained for each animal analyzed on that day post-infection. Statistical significance was evaluated using the non-

parametric Mann-Whitney test. For the purposes of statistical analyses values of 0 were replaced by values of 0.1. Clinical scores were assessed in a blinded manner.

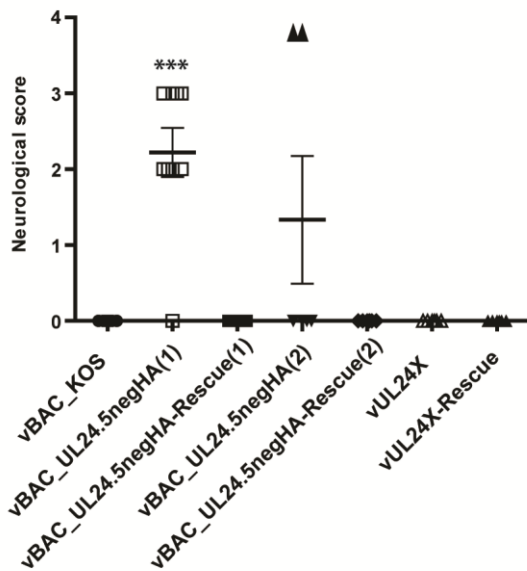


Figure 9 : The absence of UL24.5 results in an increased incidence of severe neurological signs.

Following infection of mice with the indicated viruses, the mean neurological score, as determined on a scale of 0-4, was assessed each day from 4 to 25 dpi. The graph shows the maximum score reached by each mouse over that time period. Data shown were pooled from two or three independent experiments (n=9 for vBAC_KOS, vBAC_UL24.5negHA(1), vBAC_UL24.5negHA-Rescue(1) and n=6 for vBAC_UL24.5negHA(2), vBAC_UL24.5negHA-Rescue(2), vUL24X and vUL24X-Rescue). Clinical scores were assessed in a blinded manner. The mid-bars in the graph represent the means. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was carried out using a non-parametric Mann-Whitney test (***, P<0.001). For the second isolate of the UL24.5-deficient virus, the increase in the mean compared to that of controls was not significant. Scores of 0 were replaced by 0.1 for the purpose of the statistical analyses.

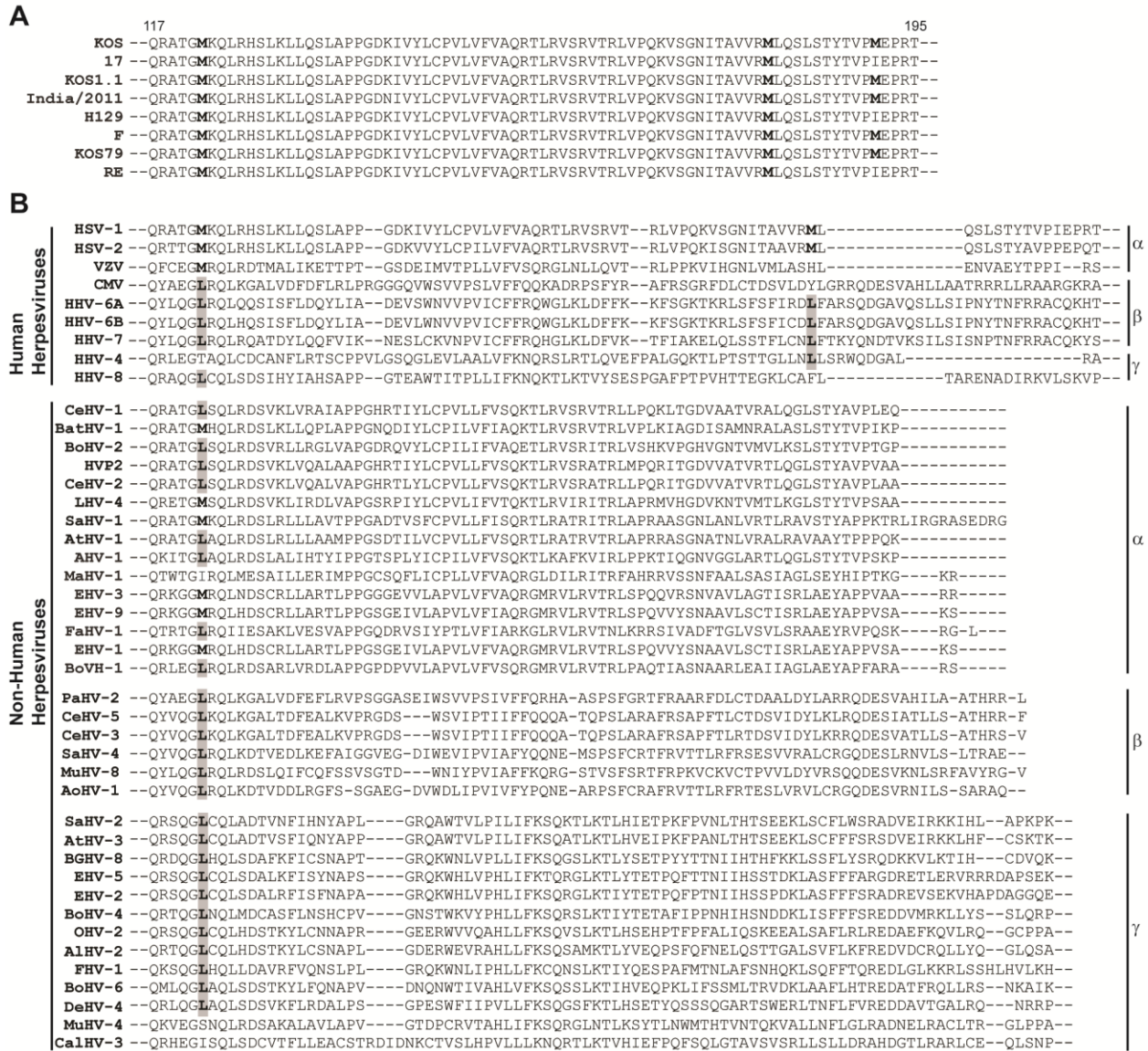


Figure 10 : Methionine 122 of HSV-1, the initiation codon of UL24.5, is conserved among several alpha herpesvirus UL24 orthologs.

(A) Analysis of UL24 protein sequences among the human α , β and γ herpesviruses. The in-frame methionines of HSV-1 UL24 and the equivalent residues in the other herpesviruses are indicated in bold, including leucine residues, which may function as alternative initiation codons. (B) Analysis of UL24 protein sequences among several non-human α , β and γ herpesviruses.

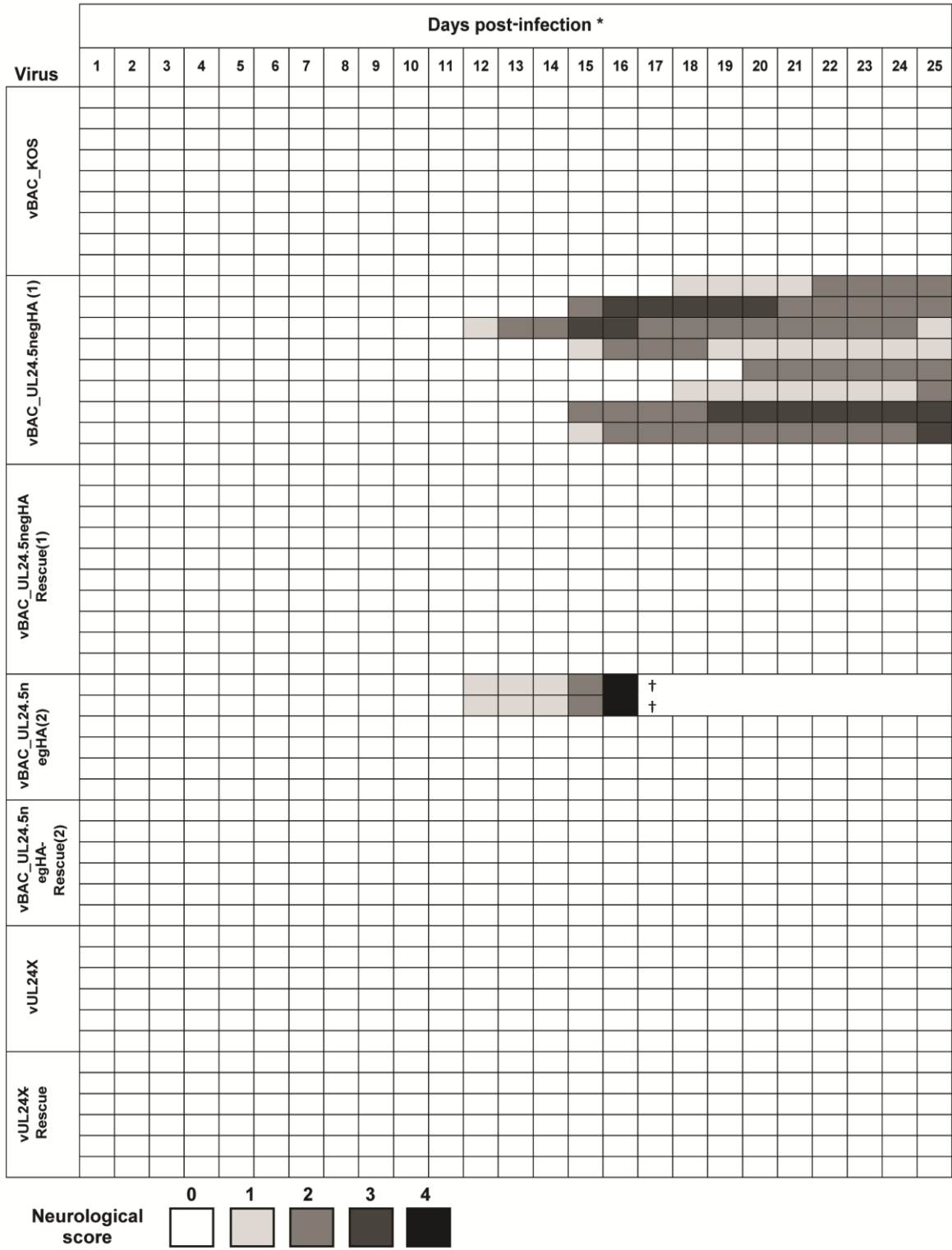


Figure. Suppl. 1 : Detailed neurological scores.

Daily neurological scores for each animal in the study are shown. The results were used to create Fig. 9.

Table Suppl. 1 : Accession numbers for genomes used in analysis presented in Figure 10

Strain	Accession
KOS	ALO18620.1
17	YP_009137098.1
KOS1.1	ALO18696.1
India/2011	AKE48602.1
H129	ADD60106.1
F	ADD60029.1
KOS79	ALM22740.1
RE	AGZ01885.1
HSV-1	SBS69330.1
HSV-2	YP_009137175.1
VZV	NP_040158.1
CMV	ACZ72819.1
HHV-6A	NP_042942.1
HHV-6B	NP_050230.1
HHV-7	AGV28674.1
HHV-4	YP_001129498.1
HHV-8	AFQ99150.1
CeHV-1	ARS01810.1
BatHV-1	YP_009042086.1
BoHV-2	AAL03943.1
HVP-2	AHM96072.1
CeHV-2	YP_164466.1
LHV-4	YP_009230155.1
SaHV-1	YP_003933816.
AtHV-1	YP_009361914.1
AHV-1	YP_003084398.1
MaHV-1	YP_009227257.1
EHV-3	YP_009054941.1
EHV-9	YP_002333519.1
FaHV-1	YP_009046522.1
EHV-1	AI181212.1
BoHV-1	NP_045335.1
PaHV-2	NP_612709.1
CeHV-5	YP_004936042.1
CeHV-3	YP_068198.1
SaHV-4	YP_004940239.1
MuHV-8	YP_007016474.1
AoHV-1	YP_004940093.1
SaHV-2	NP_040222.1
AtHV-3	NP_047991.1
BGHV-8	YP_009229854.1
EHV-5	YP_009118410.1
EHV-2	NP_042616.2
BoHV-4	NP_076512.1
OHV-2	YP_438144.1
AIHV-2	YP_009044403.1
FHV-1	YP_009173896.1
BoHV-6	YP_009041999.1
DeHV-4	YP_009388521.1
MuHV-4	NP_044858.1
CalHV-3	NP_733865.1

CHAPITRE 3 :
DEUXIÈME PUBLICATION

SECONDE PUBLICATION

Résumé de la deuxième publication

Article en préparation et en perspective de soumission dans le **Journal Plos One**.

Titre : Le rôle de pUL24 et pUL24.5 dans l'infection par le virus de l'herpès simplex de type 1 dans les cellules épithéliales polarisées.

La protéine pUL24 du virus de l'herpès simplex de type 1 (VHS-1) est conservée à travers toute la famille des *Herpesviridae*. pUL24 a des fonctions dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule infectée. De plus, nous avons récemment découvert une nouvelle protéine pour le VHS-1, pUL24.5, qui est produite à partir de l'ORF *UL24* et qui correspond à une plus petite protéine co-terminale avec l'extrémité C-terminale de pUL24. L'infection par le VHS-1 est associée à plusieurs pathologies directement liées à l'infection de cellules épithéliales polarisées (CEP). Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer l'importance de pUL24 et de pUL24.5 au cours de l'infection des CEP. Nous avons utilisé des cellules colorectales humaine (Caco-2) qui ont été différenciées en CEP sur des inserts microporeux de culture cellulaire. La polarisation des cellules a été confirmée par analyse en microscopie électronique pour confirmer la présence des différents composants structuraux spécifiques aux jonctions intercellulaires dans les CEP. Nous avons réalisé des infections apicales (IA) ou basolatérales (IB) des CEP par les virus VHS mutants déficients pour l'expression de pUL24 ou pUL24.5, les virus "rescue" respectifs et la souche parentale sauvage. La quantification des particules virales infectieuses a révélé que dans les expériences d'IA, l'absence de pUL24 ou de pUL24.5 n'avait pas d'impact significatif sur les titres viraux dans les compartiments de culture cellulaire apicale ou basale ainsi que sur les titres obtenus à partir de la monocouche cellulaire. Par contre, nous avons observé une diminution significative des titres viraux de près de 1 log₁₀ dans le compartiment apical lors de l'IB des CEP avec la souche déficiente en pUL24. En revanche, aucune réduction des titres viraux n'a été observée pour la souche déficiente en pUL24.5. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de pUL24 dans le tri apical des particules virales dans les CEP.

Contribution des auteurs

Slimane Dridi :

- ✓ Conception et réalisation des manipulations pour les expériences des figures 1 ; 2 ; 3 et 4.
- ✓ Préparation de l'ensemble des figures et de la rédaction de la première version du manuscrit.

Angela Pearson :

- ✓ Conception de l'ensemble des expériences, révision et correction du manuscrit en préparation.

The role of UL24 and UL24.5 in Herpes Simplex Virus 1 infection of polarized epithelial cells

Slimane Dridi¹, Angela Pearson^{1*}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, CANADA

* Corresponding author

Angela Pearson, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 blvd des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7 CANADA; email: angela.pearson@iaf.inrs.ca, Tel: (1) 450 687 5010 Fax: (1) 450 686-5501

Abstract: 263 words

Abstract

The UL24 protein (pUL24) of HSV-1 is conserved throughout the *Herpesviridae* family. pUL24 has functions in the nucleus and the cytoplasm of the infected cell. Moreover, we recently discovered a new HSV-1 protein, pUL24.5, which is produced from the *UL24* ORF and corresponds to a smaller protein in frame and co-terminal with the C-terminus of pUL24. HSV-1 infection is associated with several pathologies directly related to infection of polarized cells. In this study, we aimed to determine the importance of pUL24 and pUL24.5 during infection of polarized cultures. We used human colon colorectal Caco-2 cells that were differentiated to form polarized cells on tissue culture well inserts. Polarization of the cells was confirmed by electron microscopy analysis to confirm the presence of structural components specific to intercellular junctions in polarized cells. We carried out apical or basolateral infections of the polarized epithelial cells comparing mutant HSV viruses deficient for either pUL24 or pUL24.5 expression to the respective rescue virus or the parental wild type strain. Quantification of infectious virus produced revealed that in apical infection experiments, the absence of either pUL24 or pUL24.5 had no significant impact on viral titers in either the apical or basal cell culture compartments or on titers obtained for the cell monolayer. In contrast, we observed a significant decrease in viral titers of nearly 1 log₁₀ in the apical compartment during basolateral infection of polarized cells with the pUL24-deficient strain. In contrast, no reduction in viral titers was observed for the pUL24.5-deficient strain. These results suggest a potential role of pUL24 in the apical sorting of viral particles in polarized cells.

Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infects human mucosa, including polarized epithelia (Cattan *et al.*, 1999, Goodell *et al.*, 1983, Quinn *et al.*, 1983, Shintaku *et al.*, 2003). During primary HSV-1 infection, following infection of epithelial cells, the virus goes on to infect the endings of sensory neurons innervating the mucosa. From there, the infection spreads into the trigeminal ganglia (TG), the site of HSV-1 latency. The *UL24* gene of HSV-1 is highly conserved throughout all subfamilies of *Herpesviridae*. In particular, five homology domains in the N-terminal portion of the protein are widely conserved (Jacobson *et al.*, 1989b). *In vitro*, UL24 is important for efficient virus replication in cell culture (Jacobson *et al.*, 1989b), and in a mouse model of ocular infection (Jacobson *et al.*, 1998, Rochette *et al.*, 2015). UL24 localizes both to the nucleus and the cytoplasmic compartment (Lymberopoulos *et al.*, 2007, Pearson *et al.*, 2002). In cell culture, UL24 is implicated in the dispersal of nucleolin and B23 during infection (Lymberopoulos *et al.*, 2011, Lymberopoulos *et al.*, 2007), and the N-terminal domain is sufficient to induce the redistribution of nucleolin in transient transfection experiments (Bertrand *et al.*, 2008). Our earlier studies showed that UL24 promotes viral spread between the corneal epithelium and neurons of the TG (Rochette *et al.*, 2015). Moreover, the protein affects the subcellular distribution of viral glycoproteins implicated in membrane fusion (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Recently, we discovered a second protein expressed from *UL24* that is translated from mRNA originating at a transcription site within the *UL24* open reading frame (ORF) of full length UL24. UL24.5 corresponds to the C-terminal portion of UL24 (Kniżewski *et al.*, 2006). *In vitro* and *in vivo* experiments show that the UL24 and UL24.5 proteins do not share the same functions. In a mouse model of ocular infection, the absence of UL24.5 is associated with prolonged persistence of inflammatory signs and an increased incidence of neurological disorders during infection (Dridi *et al.*, under revision). This phenotype is in stark contrast to the impact of losing expression of pUL24, which leads to reduced pathogenesis. Several studies have shown that the viral glycoproteins gE/gI, which are involved in the dissemination of HSV-1, have functions that become especially apparent in a model of polarized cells (Johnson *et al.*, 2001, Mingo *et al.*, 2012). We propose that studying HSV-1 infection of polarized epithelial cells may provide insights into functions of UL24 and UL24.5 that may not be evident during infection of non-polarized cells.

Material and Methods

Cells and cell culture

The Caco-2 cell line (human colorectal adenocarcinoma) was obtained from ATCC (HTB-37). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with sodium pyruvate, without glutamine, and with 4.5 g/L glucose added (Life Technology Gibco #21969-035), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-Glutamine, penicillin 10,000 u/mL, streptomycin 10,000 u/mL, and 1 x Lonza Biowhittaker #DE17-602E non essential amino acids (NEAA). Monolayers of polarized Caco-2 cells were prepared on 4.67 cm² polycarbonate filters with 3 µm pore size (Corning-Costar). Filters were seeded with 9 × 10⁶ cells. The medium was changed three times a week. At various times after seeding, the permeability of the tight junctions was evaluated by measuring the trans-epithelial electrical resistance (TEER) using an epithelial voltohmmeter (EVOM). Resistance reached a maximum 15 days after seeding. Cells were maintained in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

Electron microscopy

Our cell polarization protocol was confirmed using transmission electron microscopy (TEM). Fifteen days after seeding, monolayers of Caco-2 cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 20 minutes. Inserts were washed in sodium cacodylate buffer, 0.05M, pH 7.4 supplemented with 3% sucrose to eliminate residual medium and the samples were then processed conventionally for observation by TEM at the INRS-Institut Armand-Frappier Electron Microscopy Facility.

Viruses

The HSV-1 strains KOS and UL24X (Jacobson *et al.*, 1998) were originally provided by D.M Coen (*Harvard Medical School*, Boston). vUL24X-Rescue has been described previously (Sanabria-Solano *et al.*, 2016). The viral strains vBAC_KOS HSV-1, vBAC_UL24.5negHA and vBAC_UL24.5negHA-Rescue were generated with the Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) system, and mutagenesis was carried out using red recombination (Tischer *et al.*, 2006). They are described elsewhere (Dridi *et al.*, under revision).

Viral infection

Fifteen days after seeding, polarized cells were infected with the indicated virus at an MOI of 10. For cells infected from the basolateral chamber, the inoculum was in a total volume of 500 µl, and for cells infected from the apical chamber, the inoculum was in a total volume of 200 µl. Infections were carried out for 1h in standard culture conditions. One h.p.i, the inoculum was

removed and inserts were washed three times with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS 1X). At 24 h.p.i, supernatants from the apical and basolateral chambers were collected separately. The cell monolayer was acid washed with 500 µl citrate buffer, pH 3.0, both from the apical and basolateral chambers, for 1 min to inactivate extracellular virus (McGraw *et al.*, 2009b). Infectious virus in all three compartment apical, basolateral and intracellular was quantified by plaque assay.

Results and discussion

To test the importance of pUL24 and pUL24.5 during infection of polarized epithelial cells, we used the Caco-2 (colorectal cells derived from a human adenocarcinoma) model of polarized cell infection widely described throughout the literature (Griffiths *et al.*, 1998, Hayashi, 1995, Marozin *et al.*, 2004). We used inserts with a pore size of 3 µm to increase basolateral infection efficiency with HSV-1 (Marozin *et al.*, 2004). After the seeding of Caco-2 cells on permeable filters, we measured the transepithelial electrical resistance (TEER) to evaluate the degree of polarization and differentiation of the cells in culture (Natoli *et al.*, 2012). After 15 days of cell culture, the TEER reached a plateau (Fig 1A), which indicated polarization of the cells. To further confirm the differentiated state of the cells, at 15 days post-seeding we visualized the cells by electron microscopy (Fig 1B). We observed several architectural components specific to polarized epithelial cells such as tight junctions, adherens junctions, and desmosomes (Cichon *et al.*, 2014). Following confirmation of the polarized state of the cells under our conditions, we proceeded to test the impact of the absence of pUL24 and pUL24.5 during infection using recombinant HSV-1 mutant strains and controls.

To determine the role of the newly identified pUL24.5 protein in polarized cells, 15 days post-seeding, Caco-2 cells were infected at an MOI of 10 either apically (Fig 2A) or basolaterally (Fig 2B) with either the wild-type virus (vBAC_KOS), the pUL24.5-deficient virus (vBAC_UL24.5negHA) or the rescue virus (vBAC_UL24.5negHA-Rescue). At 24 h.p.i, supernatants from the apical and basolateral chambers, as well the cell monolayer were collected separately, and analyzed by plaque assays to quantify the infectious virus produced. Consistent with previous reports (Hayashi, 1995), we observed the preferential release of HSV-1 at the apical membrane, with little virus detected in the basolateral chamber following apical infection (Fig 2A). Our results show that there is no significant difference between viral titers for KOS, vBAC_UL24.5negHA and vBAC_UL24.5negHARescue viruses for either apical or basolateral infections (Fig 2A and 2B). Thus, the UL24.5 protein does not appear to play a role in the

replication of HSV-1 in polarized epithelial cells. These results are consistent with results obtained for infection of non-polarized cells with vBAC_UL24.5negHA (Dridi *et al.*, under revision).

The absence of pUL24 leads to a 5-10 fold reduction in viral yield in non-polarized cells (Jacobson *et al.*, 1989b). Unexpectedly, in the context of an apical infection, we did not detect a significant difference in viral titers produced for vKOS, vUL24X, VUL24X-Rescue, in any of the three compartments (Fig 3A). In contrast, following basolateral infection, we observed a significant decrease in viral titers of nearly 1 log₁₀ in the apical chamber (Fig 3B). This defect is of the same magnitude seen for vUL24X in non-polarized cells, indicating that UL24 does not impact viral titers in polarized cells to a greater degree than non-polarized cells. Nevertheless, these results suggest a potential role of pUL24 in the apical sorting of viral particles in polarized cells. It is known that N-glycosylation plays an important role in sorting apical membrane proteins in polarized cells (Vagin *et al.*, 2009). N-glycans can be used as an apical sorting signal (Cao *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2014a), and the HSV-1 envelope contains many N-glycosylated proteins that are used in the apical sorting of the viral particle (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1994, Spear, 1993). One hypothesis is that UL24 affects N-glycosylation of viral glycoproteins. Several studies have shown that glycoproteins gE and gI are involved in the polarized sorting of nascent HSV-1 virions and their transport at intercellular junctions in polarized epithelial cells. These glycoproteins are an important factor in the spread of HSV-1 (Collins *et al.*, 2003, Dingwell *et al.*, 1998a, Johnson *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 2001, McMillan *et al.*, 2001, Polcicova *et al.*, 2005, Wisner *et al.*, 2000). Interestingly, studies in our laboratory have shown that UL24 affects the subcellular distribution of glycoproteins involved in fusion (gB, gD, gH-gL), and this alteration appears to be related to the actin cytoskeleton (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Thus, it is plausible that UL24 also modulates the distribution of viral glycoproteins involved in cell-to-cell dissemination (gE, gI), and thus affects the localization of viral particles during infection of polarized epithelial cells. Future analyses should aim to identify the mechanism through which UL24 selectively affects the apical pool of virus produced in polarized cells.

Acknowledgments

The electronic microscopy analyses were carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier electron microscopy facility. We thank Micheline Letarte for technical assistance with the electron microscopy experiments. This work was supported by operating funds from the Canadian Institutes for Health Research to AP (MOP 82924).

Figures

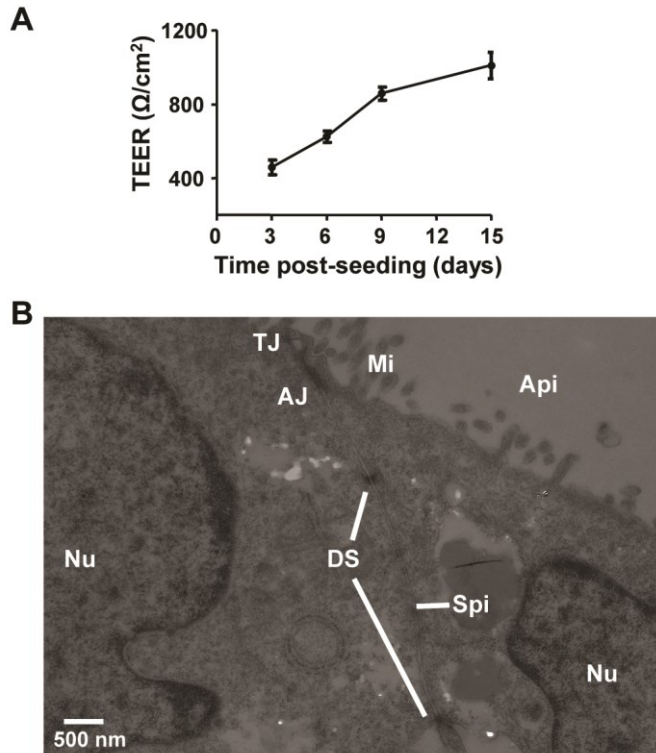


Figure 1 : Assessment cell culture polarization.

Caco-2 cells were seeded onto polycarbonate microporous membranes in transwell 12 mm inserts that were placed in 12-well plates. (A) At various times after seeding, transepithelial electrical resistance (TEER) across the membranes was measured using an epithelial voltohmmeter (EVOM). Results are expressed as Ω/cm^2 , and each point represents the mean value obtained from six independent experiments. Resistance reached a maximum 15 days after seeding. (B) Transmission electron microscopy (TEM) of an apical junctional complex in a Caco-2 cell monolayer 15 days post-seeding showing the tight junctions (TJ), the adherens junctions (AJ) and desmosomes (DS). As one follows along the intercellular space (Spi), one can observe the DS. The apical membrane (Api) of the cell with microvilli (Mi) is also visible. The nucleus (Nu) of each adjacent polarized epithelial cell is also identified. (Scale bar = 500 nm).

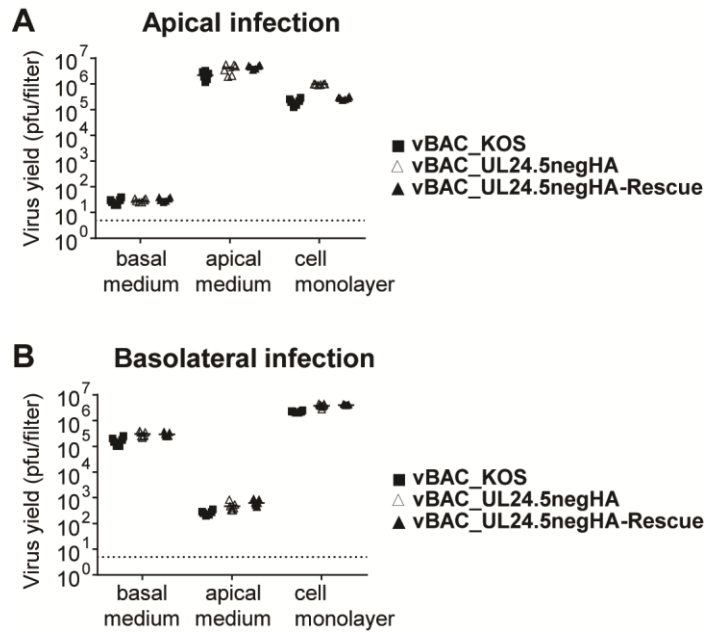


Figure 2 : UL24.5 is not required for replication of HSV-1 in polarized epithelial cells.

Caco-2 cells differentiated as shown in Figure 1 were infected apically or basolaterally at an MOI of 10 with either the wild type HSV-1 strain (vBAC_KOS), the UL24.5-null virus (vBAC_UL24.5negHA), or the UL24.5-Rescue virus (vBAC_UL24.5negHA-Rescue). At 24 h.p.i, supernatants from the apical and basolateral chambers, as well the cell monolayer were collected separately and analyzed by plaque assay to quantify the infectious virus produced. (A) Results shown represent the average of two independent apical infections done in triplicate. (B) Results shown represent the average of two independent basolateral infections done in triplicate. Mean titers were calculated and expressed as PFU/filter.

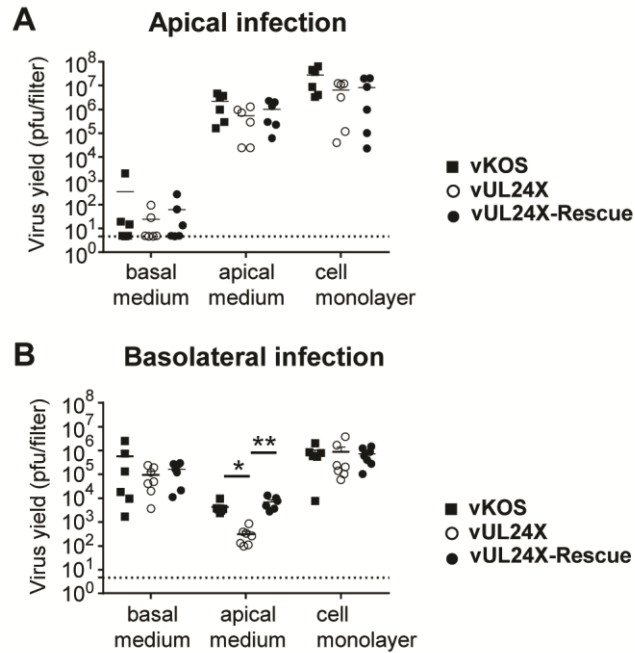


Figure 3 : Role of UL24 in apical sorting of HSV-1 during basolateral infection in polarized epithelial cells.

Caco-2 cells, differentiated as described above, were infected apically or basolaterally at an MOI of 10 with either the wild-type HSV-1 strain (KOS), the UL24-null virus (vUL24X), or the UL24X-Rescue virus. At 24 h.p.i, supernatants from the apical and basolateral chambers, as well the cell monolayer were collected separately and analyzed by plaque assays to quantify the infectious virus produced. (A) Results shown represent the average of two independent infections done in triplicate. Mean titers were calculated and expressed as PFU/filter. (B) Results shown represent the average of three independent infections done in triplicate. Mean titers were calculated and expressed as PFU/filter. Statistical analyses were done using a one way ANOVA (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$).

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

1 DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE PROTÉINE DU VHS-1

1.1 Mise en évidence de la protéine pUL24.5 du VHS-1

L'organisation du gène *UL24* du VHS-1 est très complexe et montre qu'il existe trois sites d'initiation de la transcription ainsi que deux signaux de polyadénylation (*polyA*), le premier se situant à la fin d'*UL24* et le second à la fin d'*UL26*. Considérant les trois sites d'initiation à la transcription ainsi que les deux signaux *polyA*, il y a une possibilité de production de six transcrits pour le gène *ul24* dont trois longs et trois courts. Les trois transcrits long (γ 1) ont une cinétique tardive et des transcrits long seraient probablement à l'origine de l'expression de la protéine pUL24 (Pearson *et al.*, 2002). La présence du troisième site d'initiation de la transcription interne à l'ORF ainsi que la présence de trois codons méthionines (MET122, MET180, et MET191) dans le même cadre de lecture ouvert a éveillé notre curiosité. Nous avons émis l'hypothèse que le site d'initiation interne à l'ORF d'*UL24* pouvait être impliqué dans l'expression de protéines correspondant à une forme tronquée de la protéine pUL24. De plus, le rôle des transcrits courts (β) exprimés à des temps précoces de l'infection par le VHS-1 reste encore inconnu (Pearson *et al.*, 2002).

La construction d'un virus VHS-1 (vBAC_UL24HA) qui encode une étiquette d'hémagglutinine-(HA) à l'extrémité C-terminale d'*UL24* nous a permis de valider notre hypothèse de départ. L'analyse de l'expression de la protéine pUL24 en contexte d'infection par le virus vBAC_UL24HA nous a permis de détecter la co-expression de la protéine pUL24 (~29 kDa) avec une autre protéine à ~18 kDa. Nous avons nommé cette protéine de 18 kDa, pUL24.5, selon la nomenclature établie pour les protéines du VHS-1.

Nous avons exclu la possibilité que la protéine pUL24.5 soit un produit de dégradation de la protéine pUL24 par l'utilisation d'un virus déficient pour pUL24 contenant une étiquette-HA en position C-terminale du gène *ul24* (vUL24X-HA). En effet, l'analyse des protéines issues de l'ORF *UL24* en contexte d'infection par vUL24X-HA nous a quand même permis de détecter la protéine pUL24.5. Nous avons pu également noter l'expression d'une protéine à ~20 kDa. Nous pensons que cette protéine pourrait correspondre à une modification post-traductionnelle de la protéine pUL24.5 et plus précisément à sa phosphorylation. En effet, pUL24.5 correspond à une forme tronquée de pUL24. La protéine pUL24 contient un résidu thréonine en position 195 qui pourrait faire l'objet de phosphorylation. Le résidu thréonine est conservé dans la protéine pUL24.5 puisque celle-ci représente la partie C-terminale de pUL24 (allant de 122 à 269 acides aminés).

Afin de valider que le MET122 est à l'origine de l'expression de pUL24.5, nous avons construit un virus où nous avons substitué le résidu méthionine par une valine (vBAC_UL24.5negHA). Le choix de la MET122 et non des MET180 et MET191 a été fait en prenant en considération une plus grande probabilité que les ribosomes de synthèse protéique lors du processus de scanning rencontre le premier méthionine. L'analyse de l'expression protéique par immunomarquage suite à l'infection par le virus vBAC_UL24.5negHA a révélé que cette mutation a aboli l'expression de pUL24.5. De plus, nous avons observé l'expression de pUL24.5 suite à l'infection par le virus où la MET122 a été restaurée (vBAC_UL24.5negHA-Rescue). Ainsi, ces expériences nous ont permis de confirmer que la MET122 est à l'origine de l'expression de cette protéine.

Une étude récente *in vitro* a montré que l'*ORF20-KSVH*, homologue du gène *ul24-VHS-1*, encode pour trois protéines isoformes (Bussey *et al.*, 2018). En effet, l'*ORF20-KSVH* encode pour la protéine pleine longueur ORF20FL de 320 aa (35 kDa), la protéine ORF20A de 297 aa (32 kDa) et enfin la protéine ORF20B de 257 aa (28 kDa). La traduction des protéines ORF20FL et de l'ORF20B est initiée par un codon ATG (méthionine) alors que pour l'isoforme protéique ORF20A identifiée récemment, sa traduction est initiée par un codon CTG (leucine). Les trois isoformes se localisent dans le noyau et le nucléole en contexte de transfection transitoire (Bussey *et al.*, 2018). Ces travaux appuient nos résultats que plusieurs protéines peuvent être produites à partir du gène *ul24* du VHS-1.

1.2 La protéine pUL24.5 a une cinétique d'expression tardive

Afin de caractériser l'expression de cette nouvelle protéine virale découverte, la cinétique d'expression de la protéine pUL24.5 a été évaluée en contexte d'infection. L'utilisation d'acide phosphonoacétique (PAA) un inhibiteur chimique de la réplication de l'ADN viral pour les virus à ADN (Honest *et al.*, 1977) nous a permis d'évaluer que pUL24.5 a une cinétique d'expression tardive comme la protéine pUL24. En présence de PAA, nous notons l'expression de pUL24 confirmant la cinétique « leaky-late » concordant avec de précédentes études (Pearson *et al.*, 2002). En présence de PAA, nous n'avons pas pu détecter l'expression de pUL24.5 et également de la glycoprotéine gC (true late), un contrôle utilisé dans nos expériences. Toutefois nous ne pouvons pas affirmer que l'expression de pUL24.5 dépend strictement de la réplication de l'ADN viral comme l'expression de gC. Est-ce que l'expression de pUL24.5 dépend de la réplication de l'ADN viral? En présence de PAA, sommes nous en dessous du seuil de détection pour pUL24.5?

Des expériences complémentaires seraient nécessaire afin de confirmer si pUL24.5 est une protéine à cinétique tardive γ 1 ou γ 2.

2 FONCTIONS DE LA PROTÉINE PUL24.5 *IN VITRO* ET *IN VIVO*

2.1 Les protéines pUL24 et pUL24.5 du VHS-1 ne partagent pas les mêmes fonctions

2.1.1 pUL24.5 n'est pas nécessaire pour la réplication du VHS-1 *in vitro*

Nous avons ensuite voulu évaluer le rôle de la protéine pUL24.5 en culture cellulaire et surtout voir si celle-ci présentait des fonctions communes à pUL24. Il a été rapporté que l'infection de cellules *in vitro* avec un virus déficient en UL24 (vUL24X) produit des titres viraux 5 à 10 fois moins élevés que le virus KOS dans les lignées épithéliales (Jacobson *et al.*, 1998). À l'opposé, l'infection par vBAC_UL24.5negHA a permis d'évaluer *in vitro* une production virale comparable à celle d'un virus sauvage (KOS) au cours du temps. Ainsi pUL24.5 n'est pas nécessaire pour la réplication du VHS-1 dans les cellules épithéliales *in vitro*.

2.1.2 pUL24.5 est localisée principalement dans le cytoplasme et n'induit pas la dispersion des protéines nucléolaires

La localisation de la protéine pUL24 évolue dans la cellule au cours de l'infection. En effet, la protéine pUL24 se localise dans le noyau à des temps précoces de l'infection pour se retrouver à la périphérie nucléaire et dispersée dans le cytoplasme à des temps plus tardif (Lymberopoulos *et al.*, 2007, Pearson *et al.*, 2002). Nous avons observé que pUL24.5 se localise principalement dans le cytoplasme. Nous notons également une localisation moins marquée dans le nucléole. Toutefois nos observations ont été faites dans un contexte de transfection et nous ne pouvons pas exclure qu'elle se localise dans d'autres compartiments cellulaires en contexte d'infection. pUL24 se localise également au niveau du nucléole. Il a été identifié un signal nucléolaire (NoLS) au niveau de l'extrémité N-terminale de cette dernière. Considérant la localisation de pUL24.5, il serait intéressant de vérifier si pUL24.5 possède un NoLS.

La protéine pUL24 induit la dispersion de protéines nucléolaires (la nucléoline et B23) au cours de l'infection par le VHS-1 (Lymberopoulos *et al.*, 2007) et la portion N-terminale de la protéine est suffisante pour induire cette dispersion (Bertrand *et al.*, 2010, Bertrand *et al.*, 2008). Comme nous l'avons prédit, la protéine pUL24.5 n'a pas eu d'impact sur la dispersion de ces

protéines nucléolaires étant donné que pUL24.5 correspond à la portion C-terminale de pUL24. De plus, au cours de l'infection *in vitro*, en l'absence de la protéine pUL24.5 nous n'avons pas observé de plages syncytiales au cours de l'infection comme c'est le cas en l'absence de pUL24 (Jacobson *et al.*, 1989b).

L'ensemble de nos observations indiquent que les protéines pUL24 et pUL24.5 ne semblent pas partager les mêmes fonctions au cours de l'infection par le VHS-1.

2.2 Implication de pUL24.5 dans l'infection par le VHS-1 *in vivo*

2.2.1 L'absence de pUL24.5 n'a pas d'impact sur la réplication du VHS-1 sur le site oculaire et dans les TG

Des expériences ont montré dans un modèle murin d'infection oculaire par le virus déficient en pUL24 une diminution de la réplication virale dans les yeux, une diminution sévère des titres viraux dans les ganglions trigéminaux (TG) ainsi qu'une diminution de l'incidence de réactivation virale à partir de la latence (Jacobson *et al.*, 1998, Rochette *et al.*, 2015). À l'opposé, notre analyse a montré que l'absence de pUL24.5 n'a eu aucun effet dans les titres viraux mesurés sur le site oculaire entre 1 et 3 jours post-infection (jpi) et dans les TG à 3 jpi. De plus, l'absence de pUL24.5 n'a pas eu d'impact sur la réactivation du VHS-1 évaluée *ex vivo*. Ces observations appuient davantage l'idée que pUL24 et pUL24.5 ne semblent pas partager de fonctions communes.

2.2.2 L'absence d'UL24.5 induit la persistance des signes cliniques

Il est connu que la protéine pUL24 est un déterminant de la pathogénèse puisqu'en son absence, très peu de signes inflammatoires sont observés (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Nous avons donc évalué les signes inflammatoires à l'aveugle suite à l'infection par le virus de type sauvage (vBAC_KOS), déficient en UL24 (vUL24X) ou déficient en UL24.5 (vBAC_UL24.5negHA) au cours du temps entre 4 et 25 jpi. Comme décrit dans la littérature, les souris infectées avec vUL24X ont présenté une faible voir pas d'inflammation et elles se sont complètement rétablies dès 9 jpi. Les souris infectées avec vBAC_KOS n'ont plus présenté de signes inflammatoires à partir de 19 jpi. À notre grande surprise, les souris infectées par le virus vBAC_UL24.5negHA ont présenté une persistance dans les signes inflammatoires puisque qu'ils apparaissaient encore à 25 jpi. Cette persistance a pu être observée suite à l'infection avec deux isolats indépendants

pour le virus vBAC_UL24.5negHA. L'absence de pUL24.5 a donc entraîné un retard dans la résorption de la maladie péri-oculaire.

En plus de la persistance des signes inflammatoires, nous avons observé une augmentation de l'incidence des troubles neurologiques sévères pour les souris infectées par le virus vBAC_UL24.5negHA et ce, pour les deux isolats. Il faut noter que le virus VHS-1 de type sauvage peut être parfois à l'origine de désordre neurologique dans ce modèle murin d'infection. Néanmoins dans nos expériences, seules les souris infectées par les virus recombinants déficients pour pUL24.5 ont présenté des signes neurologiques qui se traduisent par de la légère hémiparésie à l'hémiplégie de l'animal. Il semble donc que la protéine pUL24.5 soit impliquée dans le contrôle des troubles neurologiques suite à l'infection. Nous avons conclu que la protéine pUL24.5 est un déterminant important dans la neuropathogénèse comme la protéine pUL24. En effet, un virus déficient pour pUL24 est presque incapable de se rendre vers le système nerveux périphérique (TG) (Jacobson *et al.*, 1998, Rochette *et al.*, 2015). Il a été rapporté que le virus α -herpès équin de type-1 (VHE-1) est à l'origine de troubles neurologiques comme les myéloencéphalopathies et ces pathologies semblent être en recrudescence depuis ces dernières années (Borchers *et al.*, 2006). Les signes neurologiques se manifestent à divers degrés, à savoir de l'ataxie légère à la paraplégie (Jackson *et al.*, 1977). De manière intéressante, il semble que l'ORF37 du VHE qui correspond à l'orthologue d'*ul24* du VHS est également impliqué dans la neuropathogénèse. De plus, l'absence de l'ORF37 a montré une diminution significative des troubles neurologiques dans un modèle murin d'infection encéphalique. Dans cette étude, le virus déficient pour l'ORF37 a été construit suite à la substitution de l'ORF37 par un gène de sélection positif encodant pour la streptomycine. Notre analyse bioinformatique nous indique que pour ce virus, une protéine comme pUL24.5 pourrait être exprimée. Ainsi, cette construction pour le virus déficient pour l'ORF37 dans ces travaux pourrait correspondre à un virus qui n'exprime aucune forme de la protéine ORF37 (Kasem *et al.*, 2010). Par analogie, on pourrait imaginer qu'en l'absence de pUL24 et de pUL24.5, il n'y aurait pas ou peu de signes inflammatoires et pas de troubles neurologiques. Il serait intéressant de construire un virus qui n'exprime ni pUL24, ni pUL24.5 pour vérifier notre hypothèse.

La présence d'une virémie au niveau du SNC pourrait expliquer l'apparition des troubles neurologiques ou la persistance de l'inflammation péri-oculaire. Pour nos études, la quantification des particules virales produites a été évaluée sur le site oculaire entre 1 et 3 jpi ainsi qu'au niveau des TG à 3 jpi. Il serait donc intéressant d'aller évaluer si le virus déficient pour pUL24.5 est capable de persister dans l'animal au niveau du site de primo-infection, au niveau du SNC et du

SNC après 3 jpi. En effet, une étude rapporte que la déficience de l'ORF20 qui correspond au gène orthologue d'*ul24-VHS* a induit un retard significatif de 4 jours dans la clairance du virus dans les poumons dans un modèle murin d'infection intranasale par un γ -herpèsvirus murin (MHV-68) (Nascimento *et al.*, 2011a). De plus, ce retard dans la clairance virale a été associée à un délai dans la réponse immunitaire cytotoxique. Dans ces expériences, deux mutants déficients pour l'ORF20 ont été construits suivant deux stratégies différentes. Le premier virus mutant noté « FR20 MHV-68 » a été construit par l'insertion d'une thymidine qui a induit un codon stop en aval du site d'initiation à la transcription. Le second virus mutant noté « Stop20 MHV » a été construit par la substitution d'une adénine par une thymidine introduisant directement un codon stop en aval du site d'initiation à la transcription. Notre analyse bioinformatique suggère que pour le MHV-68, la MET122 n'est pas présente évoquant alors que la protéine pUL24.5 n'est pas exprimée par ce virus. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'absence de pUL24.5 soit associée à une persistance de la virémie. Il est possible que pour certains virus les fonctions assurées par pUL24.5 soient assurées par pUL24 pleine longueur comme pour le MHV-68.

Des études immunologiques complémentaires pourraient également apporter des réponses par rapport à la persistance des signes inflammatoires et la présence de signes neurologiques. Nous pourrions analyser la possible infiltration de cellules immunitaires dans la cornée, les TG et le cerveau comme les monocytes inflammatoires, les neutrophiles, les lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ dans des coupes histologiques ou par cytométrie. Le profil cytokinique pro-inflammatoire au niveau de ces sites pourrait également apporter des informations intéressantes (Kasem *et al.*, 2010). En effet, des études montrent que les microglies (macrophages du SNC) sont capables d'exprimer les CMH I et II et permettent donc la présentation d'antigène aux lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ (Marques *et al.*, 2008b, Marques *et al.*, 2006). L'inflammation au niveau de ces sites pourrait avoir pour conséquences la neurodégénérescence à l'origine de l'augmentation de l'incidence du désordre neurologique.

Par ailleurs, le virus vUL24X a été construit par l'insertion de trois codons stop dans les trois cadres de lecture ouvert de l'ORF d'*ul24* (Jacobson *et al.*, 1998) ce qui fait que la protéine pUL24.5 est exprimée étant donné que le codon-MET 122 est conservé dans l'ORF24 de ce virus mutant. En récapitulant, l'infection avec le virus vUL24X (absence de pUL24 pleine longueur et présence de pUL24.5), le virus est presque incapable de se rendre vers le SNP (Rochette *et al.*, 2015). Suivant l'infection par vBAC_UL24.5negHA (présence de pUL24 et absence de pUL24.5), le virus est capable de se rendre vers le SNP et entraîne l'augmentation de l'apparition de troubles neurologiques. Pour le virus de type sauvage (co-expression des deux formes protéiques) le virus

se rend vers le SNP et l'apparition des troubles neurologiques est plus rare. Ainsi pUL24.5 régule la neurovirulence induite par pUL24. On pourrait penser à une possible régulation négative de l'activité de pUL24 par la protéine pUL24.5 au cours de l'infection *in vivo*. Il serait intéressant d'analyser la possibilité d'interaction de ces protéines dans des expériences *in vitro* et tenter de déterminer le mécanisme par lequel pUL24.5 régule la pathogénèse induite par pUL24.

D'autre part, il a été montré que le dérèglement de l'autophagie peut contribuer à un certain nombre de maladies neurodégénératives (Shintani *et al.*, 2004). Le lien entre l'infection au VHS-1 et l'autophagie a été fait depuis très longtemps (Smith *et al.*, 1978). Des études intéressantes montrent que la protéine virale ICP34.5 du VHS-1 est capable d'inhiber l'autophagie par interaction avec la protéine Beclin-1 (Orvedahl *et al.*, 2007). Il serait intéressant dans le cadre de nos expériences d'analyser si la protéine pUL24.5 est en lien avec la régulation de mécanismes autophagiques tels qu'observés pour d'autres virus tels que pour le virus de l'hépatite C (Fahmy *et al.*, 2017).

Il faut préciser que la construction du virus déficient pour la protéine pUL24.5 (vBAC_UL24.5negHA) a été effectuée par la substitution du codon-MET 122 par un codon-VAL 122. Pour ce virus, seule la protéine pUL24 pleine longueur est produite mais avec l'expression d'une valine en position 122 comparativement à la protéine sauvage pUL24 qui exprime une méthionine à cette position. Cet inconvénient représente la limite de notre stratégie de construction pour le virus vBAC_UL24.5negHA. Ces résidus valine et méthionine ont les mêmes propriétés à savoir que ce sont des résidus non-polaires. Suivant ce raisonnement, nous ne pensons pas que cette substitution en position 122 soit responsable du phénotype observé *in vivo* lors de l'infection par le virus vBAC_UL24.5negHA mais nous ne pouvons pas en exclure la possibilité. Cette vérification pourrait être effectuée suite à l'utilisation d'un système viral qui nous permettrait d'exprimer pUL24 possédant un codon-VAL122 et pUL24.5 dans un contexte d'infection de notre modèle murin. Ce système nous permettrait de vérifier si le codon-VAL122 est responsable du phénotype observé ou si l'absence de pUL24.5 en est responsable.

Considérant, la détection de bandes protéiques à ~15kDa et ~10kDa en immunobuvardage de type western suite à une infection avec vBAC_UL24.5neg HA et vBAC_UL24.5negHARescue, il serait intéressant de vérifier si le codon-MET180 et le codon-MET191 sont impliqués dans l'expression de ces protéines et finalement impliqués dans le phénotype observé *in vivo* au cours de l'infection par un vBAC_UL24.5negHA. Ainsi, la construction d'un virus mutant pour le ATG180, d'un virus mutant pour le ATG191 et d'un virus

n'exprimant aucune forme de pUL24.5 serait nécessaire pour une meilleure compréhension de la pathogénèse du virus impliquant *ul24*.

3 CONSERVATION DU CODON MÉTHIONINE 122 À TRAVERS LA FAMILLE DES *HERPESVIRIDAE*

Finalement, une analyse bioinformatique nous a permis de comparer les séquences protéiques des orthologues de pUL24-VHS à travers la famille des *Herpesviridae*.

La première analyse nous a permis de constater que les codons méthionines (codon-MET) 122 et 180 sont conservés à travers toutes les séquences protéiques pUL24 de huit séquences de virus sauvage VHS-1 séquencées sur NCBI. Le dernier codon-MET 191 semble également être conservé dans au moins cinq de ces souches sauvages.

La seconde analyse a montré que le codon-MET 122 est conservé à travers les α -herpèsvirus-humains c'est-à-dire pour les virus herpès-simplex de type-1 et -2 ainsi que pour le virus de la varicelle-zona (VZV). Plus encore, nous avons ensuite élargi notre étude à travers les herpèsvirus non-humains. Nous avons pu remarquer que le codon-MET 122 semble être conservé dans certains α -herpèsvirus non-humains. Toutefois ce codon n'est pas conservé à travers les β - et γ - herpèsvirus. À partir de ces analyses, il semble que la protéine pUL24.5 pourrait être conservée à travers les α -herpèsvirus-humains mais également pour certains α -herpèsvirus-non-humains. Ainsi la pUL24.5 semble être conservée pour les virus neurotropes.

Pour conclure, nous avons découvert une nouvelle protéine du VHS-1 nommée pUL24.5. Celle-ci pourrait avoir une fonction de régulation dans la neurovirulence de pUL24. Son rôle dans la neuropathogénèse et/ou dans la régulation de l'immunité reste cependant à élucider.

4 IMPORTANCE DES PROTÉINES UL24 ET UL24.5 DU VHS-1 DANS L'INFECTION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES POLARISÉES

Le VHS-1 est à l'origine de nombreuses pathologies ciblant les cellules épithéliales polarisées (CEP) (Dray *et al.*, 2006). De plus, de nouveaux rôles pour certaines protéines virales du VHS-1 ont pu être identifiés dans le contexte d'infection des CEP, comme les glycoprotéines gE et gI (Mingo *et al.*, 2012).

L'étude du rôle des protéines pUL24 et pUL24.5 dans l'infection des CEP pourrait permettre de révéler des fonctions qui ne seraient pas apparentes dans un modèle de cellules non-polarisées.

4.1 Étude de l'implication des protéines pUL24 et pUL24.5 dans l'infection par VHS-1 des cellules épithéliales polarisées (CEP)

Pour évaluer le rôle de pUL24.5 et de pUL24 dans la réplication du VHS-1 dans les CEP, nous avons procédé à l'infection apicale ou basolatérale à forte MOI de CEP de type caco-2 par le virus sauvage KOS, ou le virus déficient en UL24 nommé vUL24X, ou le virus déficient en UL24.5 nommé vBAC_UL24.5negHA ou les virus « rescue » respectifs à chaque virus mutant. Nous avons ensuite mesuré les titres viraux obtenus dans les différentes chambres, en infection apicale ou en infection basolatérale. Ces résultats permettent d'observer qu'en infection apicale le VHS-1 sort préférentiellement en milieu apical où l'on mesure jusqu'à 10^7 particules virales à 24 heures post-infection (hpi), alors qu'on ne détecte peu ou pas de particules virales dans le milieu basal pour le virus KOS. En infection basale, nous avons observé que la sortie du VHS-1 se fait en milieu apical où l'on mesure jusqu'à 10^3 particules virales, mais également au niveau basal où l'on mesure jusqu'à 10^5 particules virales pour le virus KOS à 24 hpi. Ces résultats ont été également rapportés dans un autre type cellulaire de CEP à savoir les cellules MDCK (Hayashi, 1995).

Toutefois nous n'avons pas observé de différences significatives entre les titres viraux pour les virus KOS, vUL24X, UL24Xrescue, vBAC_UL24.5negHA et vBAC_UL24.5negHARescue pour les expériences d'infections apicales. En comparant l'infection de ces cellules par ces différents virus, nous avons déterminé que pUL24 n'a pas de rôle plus important dans l'infection des CEP comparativement aux cellules non-polarisées et ce dans l'infection apicale ou basolatérale (Jacobson *et al.*, 1989b). Par contre, nous avons observé une diminution significative des titres viraux de près de 1 \log_{10} dans le milieu apical lors d'une infection basolatérale des CEP par le virus vUL24X à 24 hpi. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de pUL24 dans le tri apical des particules virales dans les CEP.

Des études au sein de notre laboratoire ont montré que pUL24 aurait un rôle modulateur du trafic intracellulaire des glycoprotéines virales de fusion (gB,gD,gH-gL) en utilisant le cytosquelette d'actine par un mécanisme d'action restant encore à ce jour inconnu (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Puisque les glycoprotéines gE et gI sont impliquées dans le tri polarisé des virions

néo-synthétisés et dans leur transport vers les jonctions intercellulaires dans les CEP (Collins *et al.*, 2003, Dingwell *et al.*, 1998b, Farnsworth *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 2001, Polcicova *et al.*, 2005, Wisner *et al.*, 2000), il est possible que pUL24 puisse également moduler la distribution des glycoprotéines virales de dissémination (gE, gI) et donc *in-fine* affecter la localisation des particules virales au cours de l'infection des CEP. Il serait donc intéressant d'analyser la distribution des GP (gE et gI) en l'absence de pUL24 au cours de l'infection par le VHS-1.

Compte tenu que l'absence de pUL24.5 n'a pas eu d'impact lors de l'infection apicale ou basolatérale des CEP, ces travaux appuient davantage l'hypothèse que pUL24 et UL24.5 ne partagent pas des fonctions communes et suggèrent un rôle différent et supplémentaire de la protéine pUL24 dans l'infection des CEP.

4.2 La protéine pUL24 est impliquée dans le tri apical des particules virales dans les CEP infectées par le VHS-1

Parmi les nombreux acteurs cellulaires participant au trafic intracellulaire, les protéines RabGTPases sont de véritables modulateurs du trafic vésiculaire (Seabra *et al.*, 2004). Il a été décrit que de nombreuses RabGTPases sont impliquées dans le trafic des glycoprotéines virales du VHS-1 et que le virus peut induire la redistribution de Rab 6 au niveau de la membrane plasmique normalement localisée dans le réseau trans-golgien (Johns *et al.*, 2014, Stegen *et al.*, 2013). Par ailleurs les protéines adaptines (APs), participant au transport polarisé des vésicules de sécrétion (Bonifacino, 2014, Robinson *et al.*, 2001), sont utilisées par de nombreux virus. En effet, la protéine d'enveloppe gp41 du VIH est capable d'interagir avec le complexe AP-2 pour son internalisation (Byland *et al.*, 2007) ou encore le tri basolatéral de la protéine G du VSV se faisant par l'intermédiaire de l'isoforme AP-1B également utilisé pour le tri apical de la protéine HA du virus de la grippe A (Carvajal-Gonzalez *et al.*, 2012). Plus encore, il a été démontré que le complexe AP-1B *via* la sous-unité μ 1B est utilisé pour diriger les particules virales du PRV et du VHS-1 au niveau des jonctions cellulaires dans les CEP (Johnson *et al.*, 2001, McMillan *et al.*, 2001). La protéine ARF6 GTPase serait impliquée dans la régulation du complexe AP-1B dans le tri basolatéral (Shteyn *et al.*, 2011). Considérant de nombreuses données dans la littérature, l'activité endogène de certaines protéines (RabGTPases et ARFGTPases) pourrait être modifiée en l'absence de pUL24 lors de l'infection par le VHS-1. Il serait intéressant d'aller investiguer ces pistes cellulaires pour expliquer nos observations, à savoir la diminution des particules virales dans le compartiment apical suivant l'infection basolatérale par le virus vUL24X.

CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux nous a permis de découvrir un rôle pour le site d'initiation à la transcription interne à l'ORF d'UL24 à savoir dans l'expression d'une nouvelle protéine du VHS-1, pUL24.5.

Cette protéine à cinétique tardive, ne semble pas partager les mêmes rôles que la protéine pUL24. En effet, les expériences *in vitro* dans un modèle d'infection de cellules épithéliales polarisées ou non-polarisées ont montré que les protéines pUL24.5 et pUL24 ne partagent pas les mêmes fonctions.

Les expériences d'infection *in vivo* dans un modèle murin oculaire avec un virus déficient pour la protéine pUL24.5 (vBAC_UL24.5negHA) ont permis de découvrir un rôle pour pUL24.5 dans la neuropathogénèse. Au cours de l'infection, l'absence de la protéine pUL24.5 a conduit à une persistance des signes inflammatoires au cours du temps corrélée à une augmentation de l'incidence des troubles neurologiques sévères. La protéine pUL24.5 pourrait être impliquée dans la régulation de la neurovirulence de pUL24. La persistance des signes inflammatoires pourrait être liée à la persistance de l'infection aiguë qui pourrait atteindre le SNC. La réponse inflammatoire au niveau de certains sites nerveux pourrait être à l'origine des troubles neurologiques observés. Le rôle de la protéine pUL24.5 dans la régulation de la neuropathogénèse et dans la réponse immunitaire reste toutefois à investiguer.

RÉFÉRENCES

- Akhtar & Shukla (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *The FEBS journal* 276(24):7228-7236.
- Akira, Uematsu & Takeuchi (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Allen & Bryans (1986) Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 2:78-144.
- Alonso-Caplen, Katze & Krug (1988) Efficient transcription, not translation, is dependent on adenovirus tripartite leader sequences at late times of infection. *Journal of Virology* 62(5):1606-1616.
- Amelio, Giordani, Kubat, O'Neil & Bloom (2006) Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant. *Journal of Virology* 80(4):2063-2068.
- Avitabile, Lombardi, Gianni, Capri & Campadelli-Fiume (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(15):8015-8025.
- Avitabile, Ward, Di Lazzaro, Torrisi, Roizman & Campadelli-Fiume (1994) The herpes simplex virus UL20 protein compensates for the differential disruption of exocytosis of virions and viral membrane glycoproteins associated with fragmentation of the Golgi apparatus. *Journal of Virology* 68(11):7397-7405.
- Azab, Lehmann & Osterrieder (2013) Glycoprotein H and $\alpha 4\beta 1$ integrins determine the entry pathway of alphaherpesviruses. *Journal of Virology* 87(10):5937-5948.
- Baines & Pellett (2007) Genetic comparison of human alphaherpesvirus genomes. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R & Yamanishi K (Édit.) Cambridge University Press 2007., Cambridge.
- Baines, Ward, Campadelli-Fiume & Roizman (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *Journal of Virology* 65(12):6414-6424.
- Balan, Davis-Poynter, Bell, Atkinson, Browne & Minson (1994) An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *Journal of General Virology* 75(6):1245-1258.
- Baringer & Swoveland (1973) Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med* 288(13):648-650.
- Bastiaans, Immohr, Zeinstra, Bartels-Wilmer, Smeets, Flier, Strik-Albers, Pein, Colbers, Burger & Warris (2018) The VALID-project: Development of a new paediatric formulation of valaciclovir. *International Journal of Pharmaceutics* 536(2):496-497.
- Bataille & Epstein (1997) Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *Journal of Virology* 71(10):7736-7743.
- Bauer, Zweimueller-Mayer, Steinbacher, Lametschwandtner & Bauer (2010) The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010:402593.

- Ben Abdeljelil, Rochette & Pearson (2013) The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion. *Virology* 444(1-2):263-273.
- Bertrand (2011) *Identification et caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1*. (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Bertrand, Leiva-Torres, Hyjazie & Pearson (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J Virol* 84(1):109-118.
- Bertrand & Pearson (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(Pt 5):1142-1151.
- Besser, Ikoma, Fabel, Sommer, Zerboni, Grose & Arvin (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(23):13293-13305.
- Bjerke & Roller (2006) Roles for herpes simplex virus type 1 U L 34 and U S 3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* 347(2):261-276.
- Blakeney, Kowalski, Tummolo, DeStefano, Cooper, Guo, Gangolli, Long, Zamb, Natuk & Visalli (2005) Herpes Simplex Virus Type 2 UL24 Gene Is a Virulence Determinant in Murine and Guinea Pig Disease Models. *Journal of Virology* 79(16):10498-10506.
- Bloom & Kwiatkowski (2011) HSV-1 latency and the roles of the LATs. *Alphaherpesviruses. Molecular virology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK:295-316.
- Boehmer (1998) The herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein, ICP8, increases the processivity of the UL9 protein DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry* 273(5):2676-2683.
- Boehmer & Lehman (1993) Physical interaction between the herpes simplex virus 1 origin-binding protein and single-stranded DNA-binding protein ICP8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(18):8444-8448.
- Böhm, Backovic, Klupp, Rey, Mettenleiter & Fuchs (2016) Functional characterization of glycoprotein H chimeras composed of conserved domains of the pseudorabies virus and herpes simplex virus 1 homologs. *Journal of Virology* 90(1):421-432.
- Bonifacino (2014) Adaptor proteins involved in polarized sorting. *Journal of Cell Biology* 204(1):7-17.
- Borchers, Thein & Sterner-Kock (2006) Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation. *Equine Veterinary Journal* 38(3):283-287.
- Boutell & Everett (2003) The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and ubiquitinates p53. *Journal of Biological Chemistry* 278(38):36596-36602.
- Bowie & Unterholzner (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 8(12):911.
- Brandt, Kintner, Pumfery, Visalli & Grau (1991) The herpes simplex virus ribonucleotide reductase is required for ocular virulence. *Journal of General Virology* 72 (Pt 9):2043-2049.

- Brideau, Banfield & Enquist (1998) The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *Journal of Virology* 72(6):4560-4570.
- Britton & Jones (2018) Central nervous system herpesvirus infections. *Paediatrics and Child Health* 28(6):270-276.
- Bruckner, Dutch, Zemelman, Mocarski & Lehman (1992) Recombination in vitro between herpes simplex virus type 1 a sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(22):10950-10954.
- Brunnemann, Hoffmann, Deinhardt-Emmer, Nagel, Rose, Fickenschner, Sauerbrei & Krumbholz (2018) Relevance of non-synonymous thymidine kinase mutations for antiviral resistance of recombinant herpes simplex virus type 2 strains. *Antiviral Research* 152:53-57.
- Buckley, Tan, Anderson, Hanein, Volkmann, Weis, Nelson & Dunn (2014) The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science (New York, N.Y.)* 346(6209):1254211-1254211.
- Bucks, O'Regan, Murphy, Wills & Courtney (2007) Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology* 361(2):316-324.
- Bussey, Lau, Schumann, Gallo, Osbelt, Stempel, Arnold, Wissing, Gad & Hartmann (2018) The interferon-stimulated gene product oligoadenylate synthetase-like protein enhances replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and interacts with the KSHV ORF20 protein. *PLoS Pathogens* 14(3):e1006937.
- Byland, Vance, Hoxie & Marsh (2007) A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. *Molecular Biology of the Cell* 18(2):414-425.
- Cameron, McDougall, Marsden, Preston, Ryan & Subak-Sharpe (1988) Ribonucleotide reductase encoded by herpes simplex virus is a determinant of the pathogenicity of the virus in mice and a valid antiviral target. *Journal of General Virology* 69 (Pt 10):2607-2612.
- Campbell, Palfreyman & Preston (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *Journal of Molecular Biology* 180(1):1-19.
- Cao, Surma & Simons (2012) Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Research* 22(5):793-805.
- Caplan, Stow, Newman, Madri, Anderson, Farquhar, Palade & Jamieson (1987) Dependence on pH of polarized sorting of secreted proteins. *Nature* 329(6140):632.
- Cardone, Heymann, Cheng, Trus & Steven (2012) Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv Exp Med Biol* 726:423-439.
- Carter-Timofté, Hansen, Mardahl, Fribourg, Rapaport, Zhang, Casanova, Paludan, Christiansen & Larsen (2018) Varicella-zoster virus CNS vasculitis and RNA polymerase III gene mutation in identical twins. *bioRxiv*:244848.
- Carter & Roizman (1996) The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 alpha gene are contained in, and encode a protein in frame with, the open reading frame of the alpha 22 gene. *Journal of Virology* 70(1):172-178.
- Carvajal-Gonzalez, Gravotta, Mattera, Diaz, Perez Bay, Roman, Schreiner, Thuenauer, Bonifacino & Rodriguez-Boulan (2012) Basolateral sorting of the coxsackie and adenovirus receptor through interaction of a canonical YXXPhi motif with the clathrin adaptors AP-1A and

- AP-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(10):3820-3825.
- Carvalho, Spilki, Cunha, Stocco & Arns (2012) Molecular data of UL24 homolog gene (ORF37) from Brazilian isolates of equine herpesvirus type 1. *Research in Veterinary Science* 93(1):494-497.
- Casrouge, Zhang, Eidenschenk, Jouanguy, Puel, Yang, Alcais, Picard, Mahfoufi, Nicolas, Lorenzo, Plancoulaine, Senechal, Geissmann, Tabeta, Hoebe, Du, Miller, Heron, Mignot, de Villemeur, Lebon, Dulac, Rozenberg, Beutler, Tardieu, Abel & Casanova (2006) Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314(5797):308-312.
- Castaño, Solanas, Casagolda, Raurell, Villagrasa, Bustelo, García de Herreros & Duñach (2007) Specific Phosphorylation of p120-Catenin Regulatory Domain Differently Modulates Its Binding to RhoA. *Molecular and Cellular Biology* 27(5):1745-1757.
- Cattan, Cuillerier, Cellier, Carnot, Landi, Dusoleil & Barbier (1999) Black esophagus associated with herpes esophagitis. *Gastrointestinal Endoscopy* 49(1):105-107.
- Chang, Van Sant, Krug, Sears & Roizman (1997) The null mutant of the U (L) 31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *Journal of Virology* 71(11):8307-8315.
- Chen, Lin, Griffiths, Huang & Chen (2006) Competition and complementation between thymidine kinase-negative and wild-type herpes simplex virus during co-infection of mouse trigeminal ganglia. *Journal of General Virology* 87(12):3495-3502.
- Chen, Pearson & Coen (2004) Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. *Journal of Virology* 78(1):520-523.
- Chi, Harley, Mukhopadhyay & Wilson (2005) The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids. *Journal of General Virology* 86(2):253-261.
- Cho, Thompson, Cramer, Vidmar & Scieszka (1989) The Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharmaceutical Research* 6(1):71-77.
- Choi, Acharya, Peyret, Fardin, Mege, Ladoux, Yap, Fanning & Peifer (2016) Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this response. *J Cell Biol* 213(2):243-260.
- Chouljenko, Kim, Chouljenko, Subramanian, Walker & Kousoulas (2012) Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *Journal of Virology* 86(8):4262-4270.
- Chowdary, Cairns, Atanasiu, Cohen, Eisenberg & Heldwein (2010) Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(7):882-888.
- Cichon, Sabharwal, Rüter & Schmidt (2014) MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. *Tissue Barriers* 2(4):e944446.
- Clement, Tiwari, Scanlan, Valyi-Nagy, Yue & Shukla (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *Journal of Cell Biology* 174(7):1009-1021.
- Cliffe, Arbuckle, Vogel, Geden, Rothbart, Cusack, Strahl, Kristie & Deshmukh (2015) Neuronal stress pathway mediating a histone methyl/phospho switch is required for herpes simplex virus reactivation. *Cell Host & Microbe* 18(6):649-658.

- Cliffe, Coen & Knipe (2013) Kinetics of facultative heterochromatin and polycomb group protein association with the herpes simplex viral genome during establishment of latent infection. *MBio* 4(1):e00590-00512.
- Cliffe, Garber & Knipe (2009) Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of Virology* 83(16):8182-8190.
- Cliffe & Knipe (2008) Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. *Journal of Virology* 82(24):12030-12038.
- Cliffe & Wilson (2017) Restarting lytic gene transcription at the onset of herpes simplex virus reactivation. *Journal of Virology* 91(2):e01419-01416.
- Cocchi, Fusco, Menotti, Gianni, Eisenberg, Cohen & Campadelli-Fiume (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 of the United States of America* 101(19):7445-7450.
- Cockrell, Sanchez, Erazo & Homa (2009) Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *Journal of Virology* 83(1):47-57.
- Coen, Kosz-Vnenchak, Jacobson, Leib, Bogard, Schaffer, Tyler & Knipe (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 of the United States of America* 86(12):4736-4740.
- Coleman, Connor, Cheng, Grey, Preston & Efstathiou (2008) Histone modifications associated with herpes simplex virus type 1 genomes during quiescence and following ICP0-mediated de-repression. *Journal of General Virology* 89(1):68-77.
- Coleman & Shukla (2013) Recent advances in vaccine development for herpes simplex virus types I and II. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9(4):729-735.
- Colgrove, Diaz, Newman, Saif, Shea, Young, Henn & Knipe (2014) Genomic sequences of a low passage herpes simplex virus 2 clinical isolate and its plaque-purified derivative strain. *Virology* 450:140-145.
- Collins & Johnson (2003) Herpes Simplex Virus gE/gI Expressed in Epithelial Cells Interferes with Cell-to-Cell Spread. *Journal of Virology* 77(4):2686-2695.
- Conway & Homa (2011) Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of herpes simplex virus. *Alphaherpesviruses. Caister Academic Press, Norwich, United Kingdom*:175-193.
- Cook & COEN (1996a) Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1UL24mRNA Expression via Differential Polyadenylation. *Virology* 218(1):204-213.
- Cook, Wobbe, Boni & Coen (1996b) Regulation of Neighboring Gene Expression by the Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene. *Virology* 218(1):193-203.
- Costa, Nascimento, Sinclair & Parkhouse (2013) Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response. *PLoS Pathogens* 9(9):e1003609.
- Crute, Tsurumi, Zhu, Weller, Olivo, Challberg, Mocarski & Lehman (1989) Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(7):2186-2189.
- Davido, von Zagorski, Lane & Schaffer (2005) Phosphorylation site mutations affect herpes simplex virus type 1 ICP0 function. *Journal of Virology* 79(2):1232-1243.
- Davison (1993) Herpesvirus genes. *Reviews in Medical Virology* 3(4):237-244.

- Davison, Eberle, Ehlers, Hayward, McGeoch, Minson, Pellett, Roizman, Studdert & Thiry (2009) The Order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154(1):171-177.
- del Rio, Ch'ng, Flood, Gross & Enquist (2005) Heterogeneity of a Fluorescent Tegument Component in Single Pseudorabies Virus Virions and Enveloped Axonal Assemblies. *Journal of Virology* 79(7):3903-3919.
- Delius & Clements (1976) A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: evidence for inversions of the unique DNA regions. *Journal of General Virology* 33(1):125-133.
- Deshmane & Fraser (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of Virology* 63(2):943-947.
- Digard, Chow, Pirrit & Coen (1993) Functional analysis of the herpes simplex virus UL42 protein. *Journal of Virology* 67(3):1159-1168.
- Dingwell, Doering & Johnson (1995) Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *Journal of Virology* 69(11):7087-7098.
- Dingwell & Johnson (1998a) The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J Virol* 72(11):8933-8942.
- Dingwell & Johnson (1998b) The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions. *Journal of Virology* 72(11):8933-8942.
- Dohner, Nagel & Sodeik (2005) Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends in Microbiology* 13(7):320-327.
- Dominguez, Dambaugh, Stamey, Dewhurst, Inoue & Pellett (1999) Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *Journal of Virology* 73(10):8040-8052.
- Dotzler & Grose (Varicella Zoster: Virus and Disease. *eLS*.
- Dray, Treton, Mazon, Lavergne-Slove, Joly, Mimram, Attar, Tobelem & Bouhnik (2006) Herpes simplex virus type 1 colitis in a patient with common variable immunodeficiency syndrome. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 18(5):541-544.
- Du, Zhou & Roizman (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* 108(46):18820-18824.
- Dutch, Bruckner, Mocarski & Lehman (1992) Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral a sequences. *Journal of Virology* 66(1):277-285.
- Efstathiou, Minson, Field, Anderson & Wildy (1986) Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *Journal of Virology* 57(2):446-455.
- Efstathiou & Preston (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* 111(2):108-119.
- Egan, Wu, Wigdahl & Jennings (2013) Immunological control of herpes simplex virus infections. *Journal of Neurovirology* 19(4):328-345.
- El Kasmi & Lippe (2015) Herpes simplex virus 1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery. *Journal of Virology* 89(4):2313-2323.
- Evans, von Hahn, Tschern, Syder, Panis, Wölk, Hatzioannou, McKeating, Bieniasz & Rice (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137):801.

- Everly, Feng, Mian & Read (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(17):8560-8571.
- Fahmy & Labonté (2017) The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wild-type membranous web formation. *Scientific Reports* 7:40351.
- Fan, Roberts, McElwee, Bhella, Rixon & Lauder (2015) The large tegument protein pUL36 is essential for formation of the capsid vertex-specific component at the capsid-tegument interface of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 89(3):1502-1511.
- Farnsworth, Goldsmith & Johnson (2003) Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *Journal of Virology* 77(15):8481-8494.
- Farnsworth & Johnson (2006) Herpes Simplex Virus gE/gI Must Accumulate in the trans-Golgi Network at Early Times and Then Redistribute to Cell Junctions To Promote Cell-Cell Spread. *Journal of Virology* 80(7):3167-3179.
- Farnsworth, Wisner, Webb, Roller, Cohen, Eisenberg & Johnson (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(24):10187-10192.
- Fatahzadeh & Schwartz (2007) Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57(5):737-763; quiz 764-736.
- Ferenczy, Ranayhossaini & DeLuca (2011) Activities of ICP0 involved in the reversal of silencing of quiescent herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 85(10):4993-5002.
- Fierer & Challberg (1992) Purification and characterization of UL9, the herpes simplex virus type 1 origin-binding protein. *Journal of Virology* 66(7):3986-3995.
- Fölsch, Ohno, Bonifacino & Mellman (1999) A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99(2):189-198.
- Foster, Chouljenko & Kousoulas (2008) Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *Journal of Virology* 82(13):6310-6323.
- Foster & Kousoulas (1999) Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *Journal of Virology* 73(10):8457-8468.
- Foster, Melancon, Baines & Kousoulas (2004a) 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(10):5347-5357.
- Foster, Melancon, Olivier & Kousoulas (2004b) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. *Journal of Virology* 78(23):13262-13277.
- Franke (2009) Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(3):a003061.
- Fuchs, Klupp, Granzow & Mettenleiter (1997) The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *Journal of Virology* 71(7):5639-5646.
- Fuchs, Klupp, Granzow, Osterrieder & Mettenleiter (2002) The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and

- represent components of primary enveloped but not mature virions. *Journal of Virology* 76(1):364-378.
- Furuse (2010) Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(1):a002907.
- Furuse, Hirase, Itoh, Nagafuchi, Yonemura & Tsukita (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123(6):1777-1788.
- Furuse, Sasaki, Fujimoto & Tsukita (1998) A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 143(2):391-401.
- Galen, Cheshenko, Tuyama, Ramratnam & Herold (2006) Access to Nectin Favors Herpes Simplex Virus Infection at the Apical Surface of Polarized Human Epithelial Cells. *Journal of Virology* 80(24):12209-12218.
- Garber, Beverley & Coen (1993) Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1):459-462.
- Ghosh-Choudhury, Butcher, Reid & Ghosh (1994) Effect of tunicamycin and monensin on the transport to the cell surface and secretion of a viral membrane glycoprotein containing both N- and O-linked sugars. *Biochemistry and Cell Biology* 72(1-2):20-25.
- Glaser & Kiecolt-Glaser (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology* 5(3):243.
- Goldstein & Weller (1988a) Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant. *Virology* 166(1):41-51.
- Goldstein & Weller (1988b) Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *Journal of Virology* 62(1):196-205.
- Goodell, Quinn, Mkrtychian, Schuffler, Holmes & Corey (1983) Herpes Simplex Virus Proctitis in Homosexual Men. *New England Journal of Medicine* 308(15):868-871.
- Gottlieb & Challberg (1994) Interaction of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase and the UL42 accessory protein with a model primer template. *Journal of Virology* 68(8):4937-4945.
- Granzow, Klupp, Fuchs, Veits, Osterrieder & Mettenleiter (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *Journal of Virology* 75(8):3675-3684.
- Granzow, Klupp & Mettenleiter (2004) The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *Journal of Virology* 78(3):1314-1323.
- Granzow, Klupp & Mettenleiter (2005) Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *Journal of Virology* 79(5):3200-3205.
- Gray, Starnes, White & Mahalingam (2001) The DNA sequence of the simian varicella virus genome. *Virology* 284(1):123-130.
- Griffin & Bournsnel (1990) Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *Journal of General Virology* 71(4):841-850.
- Griffiths, Renfrey & Minson (1998) Glycoprotein C-deficient mutants of two strains of herpes simplex virus type 1 exhibit unaltered adsorption characteristics on polarized or non-polarized cells. *Journal of General Virology* 79(4):807-812.

- Gross, Harley & Wilson (2003) The cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317(1):1-12.
- Gruffat, Marchione & Manet (2016) Herpesvirus late gene expression: a viral-specific pre-initiation complex is key. *Frontiers in Microbiology* 7:869.
- Gu (2016) Infected cell protein 0 functional domains and their coordination in herpes simplex virus replication. *World journal of virology* 5(1):1.
- Gu, Liang, Mandel & Roizman (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 of the United States of America* 102(21):7571-7576.
- Guan, Guo, Yang, Liao, Liu, Che, Zhang, Wang, Wang & Li (2014) HSV-1 nucleocapsid egress mediated by UL31 in association with UL34 is impeded by cellular transmembrane protein 140. *Virology* 464:1-10.
- Guo, Audry, Ciancanelli, Alsina, Azevedo, Herman, Anguiano, Sancho-Shimizu, Lorenzo, Pauwels, Philippe, Perez de Diego, Cardon, Vogt, Picard, Andrianirina, Rozenberg, Lebon, Plancoulaine, Tardieu, Valerie, Jouanguy, Chaussabel, Geissmann, Abel, Casanova & Zhang (2011) Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *Journal of Experimental Medicine* 208(10):2083-2098.
- Guttman & Finlay (2009) Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788(4):832-841.
- Harkness, Kader & DeLuca (2014) Transcription of the herpes simplex virus 1 genome during productive and quiescent infection of neuronal and nonneuronal cells. *Journal of Virology* 88(12):6847-6861.
- Harley, Dasgupta & Wilson (2001) Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *Journal of Virology* 75(3):1236-1251.
- Hartsock & Nelson (2008) Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(3):660-669.
- Hashido, Kawana, Matsunaga & Inouye (1999) Changes in prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies from 1973 to 1993 in the rural districts of Japan. *Microbiology and Immunology* 43(2):177-180.
- Hayashi (1995) Role of tight junctions of polarized epithelial MDCK cells in the replication of herpes simplex virus type 1. *Journal of Medical Virology* 47(4):323-329.
- Hayward, Jacob, Wadsworth & Roizman (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11):4243-4247.
- Heilingloh & Krawczyk (2017) Role of L-Particles during Herpes Simplex Virus Infection. *Frontiers in Microbiology* 8:2565.
- Heming, Conway & Homa (2017) Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Cell Biology of Herpes Viruses*, Springer. p 119-142.
- Heming, Huffman, Jones & Homa (2014) Isolation and characterization of the herpes simplex virus 1 terminase complex. *Journal of Virology* 88(1):225-236.
- Herman, Ciancanelli, Ou, Lorenzo, Klaudel-Dreszler, Pauwels, Sancho-Shimizu, Perez de Diego, Abhyankar, Israelsson, Guo, Cardon, Rozenberg, Lebon, Tardieu, Heropolitanska-Pliszka,

- Chaussabel, White, Abel, Zhang & Casanova (2012) Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *Journal of Experimental Medicine* 209(9):1567-1582.
- Herold, Visalli, Susmarski, Brandt & Spear (1994) Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *Journal of General Virology* 75 (Pt 6):1211-1222.
- Higgs, Preston & Stow (2008) The UL15 protein of herpes simplex virus type 1 is necessary for the localization of the UL28 and UL33 proteins to viral DNA replication centres. *Journal of General Virology* 89(7):1709-1715.
- Hill, Quenelle, Cardin, Vogel, Clement, Bravo, Foster, Bosch-Marce, Raja & Lee (2014) Inhibition of LSD1 reduces herpesvirus infection, shedding, and recurrence by promoting epigenetic suppression of viral genomes. *Science Translational Medicine* 6(265):265ra169-265ra169.
- Holland, Anderson, Shipman & Wagner (1980) Viral DNA synthesis is required for the efficient expression of specific herpes simplex virus type 1 mRNA species. *Virology* 101(1):10-24.
- Holland, Sandri-Goldin, Goldin, Glorioso & Levine (1984) Transcriptional and genetic analyses of the herpes simplex virus type 1 genome: coordinates 0.29 to 0.45. *Journal of Virology* 49(3):947-959.
- Holthofer, Windoffer, Troyanovsky & Leube (2007) Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 264:65-163.
- Honess, Buchan, Halliburton & Watson (1980) Recombination and linkage between structural and regulatory genes of herpes simplex virus type 1: study of the functional organization of the genome. *Journal of Virology* 34(3):716-742.
- Honess & Roizman (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14(1):8-19.
- Honess & Watson (1977) Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid. *Journal of Virology* 21(2):584-600.
- Hong-Yan, Murata, Goshima, Takakuwa, Koshizuka, Yamauchi & Nishiyama (2001) Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* 22(3):321-327.
- Huang, Yao, Wang, Shen, Hsu & Chen (2017) Thymidine Kinase-Negative Herpes Simplex Virus 1 Can Efficiently Establish Persistent Infection in Neural Tissues of Nude Mice. *Journal of Virology* 91(4).
- Ito, Sommer, Zerboni, Baiker, Sato, Liang, Hay, Ruyechan & Arvin (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(8):4819-4827.
- Itoh, Nagafuchi, Moroi & Tsukita (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α catenin and actin filaments. *The Journal of cell biology* 138(1):181-192.
- Ivanova, Buch, Döhner, Pohlmann, Binz, Prank, Sandbaumhüter, Bauerfeind & Sodeik (2016) Conserved tryptophan motifs in the large tegument protein pUL36 are required for efficient secondary envelopment of herpes simplex virus capsids. *Journal of Virology* 90(11):5368-5383.
- Jackson, Osburn, Cordy & Kendrick (1977) Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. *American Journal of Veterinary Research* 38(6):709-719.

- Jacob, Morse & Roizman (1979) Anatomy of herpes simplex virus DNA XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *Journal of Virology* 29(2):448-457.
- Jacobson, Chen, Cook, Kramer & Coen (1998) Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* 242(1):161-169.
- Jacobson, Leib, Goldstein, Bogard, Schaffer, Weller & Coen (1989a) A herpes simplex virus ribonucleotide reductase deletion mutant is defective for productive acute and reactivatable latent infections of mice and for replication in mouse cells. *Virology* 173(1):276-283.
- Jacobson, Martin & Coen (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(4):1839-1843.
- Jambunathan, Chouljenko, Desai, Charles, Subramanian, Chouljenko & Kousoulas (2014) Herpes simplex virus 1 protein UL37 interacts with viral glycoprotein gK and membrane protein UL20 and functions in cytoplasmic virion envelopment. *Journal of Virology* 88(11):5927-5935.
- Jayachandra, Baghian & Kousoulas (1997) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *Journal of Virology* 71(7):5012-5024.
- Jiang, Feng, Lin & Guo (2016) New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *International Journal Of Oral Science* 8:1.
- Johns, Gonzalez-Lopez, Sayers, Hollinshead & Elliott (2014) Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment. *Traffic* 15(2):157-178.
- Johnson & Baines (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Micro* 9(5):382-394.
- Johnson & Huber (2002) Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 76(1):1-8.
- Johnson, Webb, Wisner & Brunetti (2001) Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *Journal of Virology* 75(2):821-833.
- Kalamvoki & Roizman (2010) Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables herpes simplex virus gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(41):17721-17726.
- Kasem, Yu, Yamada, Kodaira, Matsumura, Tsujimura, Madbouly, Yamaguchi, Ohya & Fukushi (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400(2):259-270.
- Kelly, Bauerfeind, Binz, Sodeik, Laimbacher, Fraefel & Diefenbach (2014) The interaction of the HSV-1 tegument proteins pUL36 and pUL37 is essential for secondary envelopment during viral egress. *Virology* 454:67-77.
- Kenneson & Cannon (2007) Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 17(4):253-276.
- Khan, Srivastava, Chentoufi, Kritzer, Chilukuri, Garg, David, Vahed, Huang & Syed (2017) Bolstering the Number and Function of HSV-1-Specific CD8+ Effector Memory T Cells and Tissue-Resident Memory T Cells in Latently Infected Trigeminal Ganglia Reduces Recurrent Ocular Herpes Infection and Disease. *The Journal of Immunology* 199(1):186-203.

- Klupp, Granzow, Fuchs, Keil, Finke & Mettenleiter (2007) Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(17):7241-7246.
- Knipe & Cliffe (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature reviews microbiology* 6(3):211.
- Knipe, Howley & Fields (2013) *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Sixth edition. 2 volumes (xx, 2456, I-2482 pages) p
- Knizewski, Kinch, Grishin, Rychlewski & Ginalski (2006) Human Herpesvirus 1 UL24 Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease. *Journal of Virology* 80(5):2575-2577.
- Ko, Cunningham & Diefenbach (2010) The Major Determinant for Addition of Tegument Protein pUL48 (VP16) to Capsids in Herpes Simplex Virus Type 1 Is the Presence of the Major Tegument Protein pUL36 (VP1/2). *Journal of Virology* 84(3):1397-1405.
- Kobayashi, Kato, Sagara, Watanabe, Maruzuru, Koyanagi, Arii & Kawaguchi (2017) Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26 Regulates Nucleocapsid Maturation. *Journal of Virology* 91(18):e01068-01017.
- Koff, Schwedes & Tegtmeyer (1991) Herpes simplex virus origin-binding protein (UL9) loops and distorts the viral replication origin. *Journal of Virology* 65(6):3284-3292.
- Kohn & Fenner (1987) Equine herpes myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 3(2):405-419.
- Kosuge, Yamanishi, Kawanishi, Hata, Zou, Chen, Mori, Sunagawa, Isegawa & Mukai (1999) Comparison of the Complete DNA. *J. Virol* 73(10):8053.
- Kosz-Vnenchak, Jacobson, Coen & Knipe (1993) Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons. *Journal of Virology* 67(9):5383-5393.
- Kramer, Jurak, Pesola, Boissel, Knipe & Coen (2011) Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia. *Virology* 417(2):239-247.
- Kratchmarov, Taylor & Enquist (2012) Making the case: Married versus Separate models of alphaherpes virus anterograde transport in axons. *Reviews in Medical Virology* 22(6):378-391.
- Kristie, Liang & Vogel (2010) Control of α -herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1799(3):257-265.
- Kristie & Roizman (1987) Host cell proteins bind to the cis-acting site required for virion-mediated induction of herpes simplex virus 1 alpha genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(1):71-75.
- Krummenacher, Carfi, Eisenberg & Cohen (2013) Entry of herpesviruses into cells: the enigma variations. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 790:178-195.
- Kurt-Jones, Orzalli & Knipe (2017) Innate Immune Mechanisms and Herpes Simplex Virus Infection and Disease. *Cell Biology of Herpes Viruses*, Springer. p 49-75.
- Kwiatkowski, Thompson & Bloom (2009) The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency. *Journal of Virology* 83(16):8173-8181.
- LaBoissiere & O'Hare (2000) Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol* 74(1):99-109.

- Laquerre, Argnani, Anderson, Zucchini, Manservigi & Glorioso (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 72(7):6119-6130.
- Lawrence (2018) Oral and genital herpes: four experimental treatment strategies. *Lung Cancer* 15:05.
- Leach, Bjerke, Christensen, Bouchard, Mou, Park, Baines, Haraguchi & Roller (2007) Emerin Is Hyperphosphorylated and Redistributed in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells in a Manner Dependent on both UL34 and US3. *Journal of Virology* 81(19):10792-10803.
- Lee, Raja & Knipe (2016) Herpesviral ICP0 protein promotes two waves of heterochromatin removal on an early viral promoter during lytic infection. *MBio* 7(1):e02007-02015.
- Lee, Vittone, Diefenbach, Cunningham & Diefenbach (2008) Identification of structural protein–protein interactions of herpes simplex virus type 1. *Virology* 378(2):347-354.
- Leger & Hendricks (2011) CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *Journal of Neurovirology* 17(6):528-534.
- Leib, Bogard, Kosz-Vnenchak, Hicks, Coen, Knipe & Schaffer (1989) A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. *Journal of Virology* 63(7):2893-2900.
- Leiva-Torres, Rochette & Pearson (2010) Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J Gen Virol* 91(Pt 5):1109-1116.
- Leuzinger, Ziegler, Schraner, Fraefel, Glauser, Heid, Ackermann, Mueller & Wild (2005) Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *Journal of Virology* 79(20):13047-13059.
- Liang, Quenelle, Vogel, Mascaro, Ortega & Kristie (2013a) A novel selective LSD1/KDM1A inhibitor epigenetically blocks herpes simplex virus lytic replication and reactivation from latency. *MBio* 4(1):e00558-00512.
- Liang, Vogel, Arbuckle, Rai, Jadhav, Simeonov, Maloney & Kristie (2013b) Targeting the JMJD2 histone demethylases to epigenetically control herpesvirus infection and reactivation from latency. *Science Translational Medicine* 5(167):167ra165-167ra165.
- Liang, Vogel, Narayanan, Peng & Kristie (2009) Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks α -herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nature Medicine* 15(11):1312.
- Lim & Chu (2014a) A polarized cell model for chikungunya virus infection: entry and egress of virus occurs at the apical domain of polarized cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(2):e2661.
- Lim, Seppanen, Hautala, Ciancanelli, Itan, Lafaille, Dell, Lorenzo, Byun, Pauwels, Ronnelid, Cai, Boucherit, Jouanguy, Paetau, Lebon, Rozenberg, Tardieu, Abel, Yildiran, Vergison, Roivainen, Etzioni, Tienari, Casanova & Zhang (2014b) TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology* 83(21):1888-1897.
- Lima, Zolini, Mansur, Lima, Wischhoff, Astigarraga, Dias, Silva, Béla & do Valle Antonelli (2010) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *The American journal of pathology* 177(5):2433-2445.

- Liu & Zhou (2007) Comparative virion structures of human herpesviruses. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R & Yamanishi K (Édit.) Cambridge University Press 2007., Cambridge.
- Lomonte (2006) La protéine ICP0 du virus herpès simplex de type 1: l'ubiquitination au service de l'infection. *Virologie* 10(6):423-429.
- Lomonte, Thomas, Texier, Caron, Khochbin & Epstein (2004) Functional interaction between class II histone deacetylases and ICP0 of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 78(13):6744-6757.
- Loregian & Palu (2005) Disruption of the interactions between the subunits of herpesvirus DNA polymerases as a novel antiviral strategy. *Clinical Microbiology and Infection* 11(6):437-446.
- Loret, Guay & Lippe (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of Virology* 82(17):8605-8618.
- Lucinda, Figueiredo, Pessoa, da Silva Santos, Lima, Freitas, Machado, Kroon, do Valle Antonelli & Campos (2017) Dendritic cells, macrophages, NK and CD8+ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virology Journal* 14(1):37.
- Lustig & Levine (1992) One hundred years of virology. *Journal of Virology* 66(8):4629-4631.
- Lymberopoulos, Bourget, Ben Abdeljelil & Pearson (2011) Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412(2):341-348.
- Lymberopoulos & Pearson (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.
- Mahmoud, Hasabelnaby, Hammad & Sakr (Antiviral Nucleoside and Nucleotide Analogs: A Review.
- Marozin, Prank & Sodeik (2004) Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *Journal of General Virology* 85(Pt 4):775-786.
- Marques, Anwar, Eskildsen-Larsen, Rebouillat, Paludan, Sen, Williams & Hartmann (2008a) The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain. *Journal of General Virology* 89(11):2767-2772.
- Marques, Cheeran, Palmquist, Hu, Urban & Lokensgard (2008b) Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *The Journal of Immunology* 181(9):6417-6426.
- Marques, Hu, Sheng & Lokensgard (2006) Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Research* 121(1):1-10.
- Martin-Belmonte & Mostov (2008) Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 20(2):227-234.
- Matter, Aijaz, Tsapara & Balda (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):453-458.
- Maurer, Sodeik & Grünwald (2008) Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30):10559-10564.

- McGeoch, Cook, Dolan, Jamieson & Telford (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* 247(3):443-458.
- McGeoch, Cunningham, McIntyre & Dolan (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(12):3057-3075.
- McGeoch, Dalrymple, Davison, Dolan, Frame, McNab, Perry, Scott & Taylor (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* 69 (Pt 7):1531-1574.
- McGraw, Awasthi, Wojcechowskyj & Friedman (2009a) Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not Us9. *Journal of Virology* 83(17):8315-8326.
- McGraw & Friedman (2009b) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E mediates retrograde spread from epithelial cells to neurites. *Journal of Virology* 83(10):4791-4799.
- McMillan & Johnson (2001) Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus gE Causes Accumulation in the trans-Golgi Network, a Site of Virus Envelopment and Sorting of Virions to Cell Junctions. *Journal of Virology* 75(4):1928-1940.
- McNab, Desai, Person, Roof, Thomsen, Newcomb, Brown & Homa (1998) The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *Journal of Virology* 72(2):1060-1070.
- Megaw, Rapaport, Avidor, Frenkel & Davison (1998) The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* 244(1):119-132.
- Melancon, Fulmer & Kousoulas (2007) The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment. *Virology Journal* 4:120.
- Melchjorsen (2012) Sensing herpes: more than toll. *Reviews in Medical Virology* 22(2):106-121.
- Melchjorsen, Kristiansen, Christiansen, Rintahaka, Matikainen, Paludan & Hartmann (2009) Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 29(4):199-208.
- Meng, Han, Li, Dong & Wang (2018) Multifunctional viral protein γ 34. 5 manipulates nucleolar protein NOP53 for optimal viral replication of HSV-1. *Cell Death & Disease* 9(2):103.
- Mercier-Darty, Boutolleau, Lepeule, Rodriguez & Burrel (2018) Utility of ultra-deep sequencing for detection of varicella-zoster virus antiviral resistance mutations. *Antiviral Research* 151:20-23.
- Mertz, Rosenthal & Stanberry (2003) Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? *Sexually Transmitted Diseases* 30(10):801-802.
- Messer, Jacobs, Dhummakupt & Bloom (2015) Inhibition of H3K27me3-specific histone demethylases JMJD3 and UTX blocks reactivation of herpes simplex virus 1 in trigeminal ganglion neurons. *Journal of Virology* 89(6):3417-3420.
- Mettenleiter (2002) Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology* 76(4):1537-1547.
- Mettenleiter (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research* 106(2):167-180.
- Mettenleiter (2006) Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Veterinary Microbiology* 113(3):163-169.

- Mettenleiter, Klupp & Granzow (2009) Herpesvirus assembly: an update. *Virus Research* 143(2):222-234.
- Mettenleiter & Minson (2006) Egress of Alpha herpesviruses. *Journal of Virology* 80(3):1610-1612.
- Miller, Press, Daniels, Sasaki, Milbrandt & DiAntonio (2009) A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nature Neuroscience* 12(4):387.
- Mingo, Han, Newcomb & Brown (2012) Replication of herpes simplex virus: egress of progeny virus at specialized cell membrane sites. *Journal of Virology* 86(13):7084-7097.
- Miranda-Saksena, Armati, Boadle, Holland & Cunningham (2000) Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol* 74(4):1827-1839.
- Miranda-Saksena, Boadle, Aggarwal, Tijono, Rixon, Diefenbach & Cunningham (2009) Herpes Simplex Virus Utilizes the Large Secretory Vesicle Pathway for Anterograde Transport of Tegument and Envelope Proteins and for Viral Exocytosis from Growth Cones of Human Fetal Axons. *Journal of Virology* 83(7):3187-3199.
- Montgomery, Warner, Lum & Spear (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
- Mossman, Sherburne, Lavery, Duncan & Smiley (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *Journal of Virology* 74(14):6287-6299.
- Mostafa & Davido (2013) Herpes simplex virus 1 ICP22 but not US 1.5 is required for efficient acute replication in mice and VICE domain formation. *Journal of Virology* 87(24):13510-13519.
- Mostafa, Thompson, Konen, Haenchen, Hilliard, Macdonald, Morrison & Davido (2018) Herpes Simplex Virus 1 Mutant with Point Mutations in UL39 Is Impaired for Acute Viral Replication in Mice, Establishment of Latency, and Explant-Induced Reactivation. *Journal of Virology*.
- Mostafa, Thompson, Kushnir, Haenchen, Bayless, Hilliard, Link, Pitcher, Loveday, Schaffer & Davido (2011) Herpes simplex virus 1 ICP0 phosphorylation site mutants are attenuated for viral replication and impaired for explant-induced reactivation. *Journal of Virology* 85(23):12631-12637.
- Mostov (1995) Regulation of protein traffic in polarized epithelial cells. *Histol Histopathol* 10(2):423-431.
- Murayama, Kuno, Jisaki, Obuchi, Sakamuro, Furukawa, Mukaida & Matsushima (1994) Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *Journal of Virology* 68(11):7582-7585.
- Muylaert, Tang & Elias (2011) Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *Journal of Biological Chemistry* 286(18):15619-15624.
- Nascimento, Costa, Dias & Parkhouse (2011a) MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Archives of Virology* 156(3):375-386.
- Nascimento, Costa, Dias & Parkhouse (2011b) MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Archives of Virology* 156(3):375-386.
- Nascimento, Costa & Parkhouse (2012) Virus manipulation of cell cycle. *Protoplasma* 249(3):519-528.

- Nascimento, Dias & Parkhouse (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(7):1143-1149.
- Natoli, Leoni, D'Agnano, Zucco & Felsani (2012) Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology In Vitro* 26(8):1243-1246.
- Nelson (2008) Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 2):149-155.
- Neumann, Bhattacharjee, Giordani, Bloom & Hill (2007) In vivo changes in the patterns of chromatin structure associated with the latent herpes simplex virus type 1 genome in mouse trigeminal ganglia can be detected at early times after butyrate treatment. *Journal of Virology* 81(23):13248-13253.
- Newcomb, Fontana, Winkler, Cheng, Heymann & Steven (2017) The primary enveloped virion of herpes simplex virus 1: its role in nuclear egress. *MBio* 8(3):e00825-00817.
- Newcomb, Juhas, Thomsen, Homa, Burch, Weller & Brown (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *Journal of Virology* 75(22):10923-10932.
- Newcomb, Trus, Cheng, Steven, Sheaffer, Tenney, Weller & Brown (2000) Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus. *Journal of Virology* 74(4):1663-1673.
- Nicola, Hou, Major & Straus (2005) Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *Journal of Virology* 79(12):7609-7616.
- Nicola, McEvoy & Straus (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Journal of Virology* 77(9):5324-5332.
- Nicoll, Hann, Shivkumar, Harman, Connor, Coleman, Proença & Efstathiou (2016) The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. *PLoS Pathogens* 12(4):e1005539.
- Niessen (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127(11):2525-2532.
- Nieuwenhuis, van Doornum, Mulder, Neumann & van der Meijden (2006) Importance of herpes simplex virus type-1 (HSV-1) in primary genital herpes. *Acta Dermato-Venereologica* 86(2):129-134.
- Nogueira, Wang, Tantin, Sharp & Kristie (2004) Herpes simplex virus infections are arrested in Oct-1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(6):1473-1478.
- Ogasawara, Suzutani, Yoshida & Azuma (2001) Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *Journal of Virology* 75(3):1427-1436.
- Olivo, Nelson & Challberg (1988) Herpes simplex virus DNA replication: the UL9 gene encodes an origin-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(15):5414-5418.
- Orvedahl, Alexander, Tallóczy, Sun, Wei, Zhang, Burns, Leib & Levine (2007) HSV-1 ICP34. 5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host & Microbe* 1(1):23-35.
- Osterrieder (2017) *Cell Biology of Herpes Viruses*. Springer,

- Owen, Crump & Graham (2015) Tegument assembly and secondary envelopment of alphaherpesviruses. *Viruses* 7(9):5084-5114.
- Paludan, Bowie, Horan & Fitzgerald (2011) Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nature Reviews: Immunology* 11(2):143-154.
- Pan, Flores, Umbach, Pesola, Bentley, Rosato, Leib, Cullen & Coen (2014) A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency. *Cell Host & Microbe* 15(4):446-456.
- Pearson & Coen (2002) Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 76(21):10821-10828.
- Peng, Chanthaphavong, Sun, Trigilio, Phasouk, Jin, Layton, Li, Correnti & De van der Schueren (2017) Keratinocytes produce IL-17c to protect peripheral nervous systems during human HSV-2 reactivation. *Journal of Experimental Medicine* 214(8):2315-2329.
- Peng, Vitvitskaia, Carpenter, Wechsler & Jones (2008) Identification of two small RNAs within the first 1.5-kb of the herpes simplex virus type 1–encoded latency-associated transcript. *Journal of Neurovirology* 14(1):41-52.
- Piret & Boivin (2015) Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Reviews in Medical Virology* 25(5):300-319.
- Polcicova, Goldsmith, Rainish, Wisner & Johnson (2005) The Extracellular Domain of Herpes Simplex Virus gE Is Indispensable for Efficient Cell-to-Cell Spread: Evidence for gE/gI Receptors. *Journal of Virology* 79(18):11990-12001.
- Post, Mackem & Roizman (1981) Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters. *Cell* 24(2):555-565.
- Pourchet, Modrek, Placantonakis, Mohr & Wilson (2017) Modeling HSV-1 latency in human embryonic stem cell-derived neurons. *Pathogens* 6(2):24.
- Preston & Newton (1976) The effects of herpes simplex virus type 1 on cellular DNA-dependent RNA polymerase activities. *Journal of General Virology* 33(3):471-482.
- Quinn, Stamm, Goodell, Mkrtychian, Benedetti, Corey, Schuffler & Holmes (1983) The polymicrobial origin of intestinal infections in homosexual men. *New England Journal of Medicine* 309(10):576-582.
- Rao & Feiss (2015) Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses. *Annual review of virology* 2:351-378.
- Rasheed, Ansari, Ihsan, Navid & Raza (2018) Prediction of conserved sites and domains in glycoproteins B, C and D of herpes viruses. *Microbial Pathogenesis* 116:91-99.
- Reske, Pollara, Krummenacher, Chain & Katz (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Reviews in Medical Virology* 17(3):205-215.
- Reynolds, Ryckman, Baines, Zhou, Liang & Roller (2001) U(L)31 and U(L)34 Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1 Form a Complex That Accumulates at the Nuclear Rim and Is Required for Envelopment of Nucleocapsids. *Journal of Virology* 75(18):8803-8817.
- Reynolds, Wills, Roller, Ryckman & Baines (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *Journal of Virology* 76(17):8939-8952.
- Robinson & Bonifacino (2001) Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 13(4):444-453.

- Rochette, Bourget, Sanabria-Solano, Lahmidi, Ouellet Lavallee & Pearson (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 (2013) *The herpesviruses*. Springer Science & Business Media,
- Roizman & Sears (1987) An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol* 41:543-571.
- Roizman & Whitley (2013) An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu Rev Microbiol* 67:355-374.
- Roizman, Zhou & Du (2011) Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues. *Journal of Neurovirology* 17(6):512-517.
- Roller, Bjerke, Haugo & Hanson (2010) Analysis of a charge cluster mutation of herpes simplex virus type 1 UL34 and its extragenic suppressor suggests a novel interaction between pUL34 and pUL31 that is necessary for membrane curvature around capsids. *Journal of Virology* 84(8):3921-3934.
- Roller, Zhou, Schnetzer, Ferguson & DeSalvo (2000) Herpes simplex virus type 1 UL34 gene product is required for viral envelopment. *Journal of Virology* 74(1):117-129.
- Ruyechan, Morse, Knipe & Roizman (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(2):677-697.
- Sakisaka, Taniguchi, Nakanishi, Takahashi, Miyahara, Ikeda, Yokoyama, Peng, Yamanishi & Takai (2001) Requirement of interaction of nectin-1 α /HveC with afadin for efficient cell-cell spread of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 75(10):4734-4743.
- Sanabria-Solano, Gonzalez, Richerieux, Bertrand, Dridi, Griffiths, Langelier & Pearson (2016) Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1UL24 protein (HSV-1UL24 inhibits accumulation of viral transcripts). *Virology* 495:148-160.
- Sandgren, Bertram & Cunningham (2016) Understanding natural herpes simplex virus immunity to inform next-generation vaccine design. *Clin Transl Immunology* 5(7):e94.
- Sankhala, Lokareddy & Cingolani (2016) Divergent evolution of nuclear localization signal sequences in herpesvirus terminase subunits. *Journal of Biological Chemistry* 291(21):11420-11433.
- Sathiyamoorthy, Chen, Longnecker & Jardetzky (2017) The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Current Opinion in Virology* 24:97-104.
- Sawtell & Thompson (1992) Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *Journal of Virology* 66(4):2150-2156.
- Schrag, Prasad, Rixon & Chiu (1989) Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56(4):651-660.
- Schumacher, Mohni, Kan, Hendrickson, Stark & Weller (2012) The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathogens* 8(8):e1002862.
- Scott & O'Hare (2001) Fate of the Inner Nuclear Membrane Protein Lamin B Receptor and Nuclear Lamins in Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology* 75(18):8818-8830.
- Seabra & Coudrier (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* 5(6):393-399.
- Sears, McGwire & Roizman (1991) Infection of polarized MDCK cells with herpes simplex virus 1: two asymmetrically distributed cell receptors interact with different viral proteins.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(12):5087-5091.
- Sheldrick & Berthelot (1974) Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 667-678.
- Sherman, Gottlieb & Challberg (1992) The UL8 subunit of the herpes simplex virus helicase-primase complex is required for efficient primer utilization. *Journal of Virology* 66(8):4884-4892.
- Sheth, Fesenko, Collins, Moran, Wild, Anderson & Fleming (1997) Tight junction assembly during mouse blastocyst formation is regulated by late expression of ZO-1 alpha+ isoform. *Development* 124(10):2027-2037.
- Shieh, WuDunn, Montgomery, Esko & Spear (1992) Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 116(5):1273-1281.
- Shintaku, Umehara, Iwaisako, Tahara & Adachi (2003) Herpes simplex pancreatitis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 127(2):231-234.
- Shintani & Klionsky (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306(5698):990-995.
- Shobha & Ohol (2018) EFFICACY AND SAFETY OF TABLET FAMCICLOVIR 500 MG (PENVIR) IN THE TREATMENT OF OCULAR HERPES. *INDIAN JOURNAL OF APPLIED RESEARCH* 8(2).
- Shteyn, Pigati & Folsch (2011) Arf6 regulates AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 194(6):873-887.
- Shukla, Liu, Blaiklock, Shworak, Bai, Esko, Cohen, Eisenberg, Rosenberg & Spear (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
- Shukla, Singh & Shukla (2009) Role of Nectin-1, HVEM, and PILR- α in HSV-2 Entry into Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(6):2878-2887.
- Smibert, Popova, Xiao, Capone & Smiley (1994) Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *Journal of Virology* 68(4):2339-2346.
- Smiley (2004) Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *Journal of Virology* 78(3):1063-1068.
- Smiley, Duncan & Howes (1990) Sequence requirements for DNA rearrangements induced by the terminal repeat of herpes simplex virus type 1 KOS DNA. *Journal of Virology* 64(10):5036-5050.
- Smith (2012) Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annual review of microbiology* 66:10.1146/annurev-micro-092611-150051.
- Smith, Boutell & Davido (2011) HSV-1 ICP0: paving the way for viral replication. *Future Virology* 6(4):421-429.
- Smith & de Harven (1978) Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells. *Journal of Virology* 26(1):102-109.
- Smith & Fuchs (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* 141(5):1229-1241.
- Snyder, Polcicova & Johnson (2008) Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol* 82(21):10613-10624.

- Snyder, Wisner & Johnson (2006) Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J Virol* 80(22):11165-11177.
- Spear (1993) Membrane fusion induced by herpes simplex virus. *Viral fusion mechanisms*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla:201-232.
- Spear (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology* 6(5):401-410.
- Spear, Eisenberg & Cohen (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1):1-8.
- Spivack & Fraser (1987) Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *Journal of Virology* 61(12):3841-3847.
- Stegen, Yakova, Henaff, Nadjar, Duron & Lippe (2013) Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen. *PLoS One* 8(1):e53276.
- Stevens & Cook (1971) Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* 173(3999):843-845.
- Stevens, Wagner, Devi-Rao, Cook & Feldman (1987) RNA complementary to a herpesvirus alpha gene messenger RNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235:1056-1060.
- Strahl & Allis (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41.
- Strang & Stow (2005) Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *Journal of Virology* 79(19):12487-12494.
- Svobodova, Bell & Crump (2012) Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *Journal of Virology* 86(1):473-483.
- Takai & Nakanishi (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116(Pt 1):17-27.
- Taylor, Brockman, McNamee & Knipe (2002) Herpes simplex virus. *Frontiers in Bioscience* 7:d752-d764.
- Thellman & Triezenberg (2017) Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. *Pathogens* 6(3):28.
- Thomsen, Newcomb, Brown & Homa (1995) Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26. 5 genes. *Journal of Virology* 69(6):3690-3703.
- Tirabassi & Enquist (1999) Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE. *Journal of Virology* 73(4):2717-2728.
- Tischer, Smith & Osterrieder (2010) En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods in Molecular Biology* 634:421-430.
- Tischer, von Einem, Kaufer & Osterrieder (2006) Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *BioTechniques* 40(2):191-197.
- Tomishima & Enquist (2002) In Vivo Egress of an Alphaherpesvirus from Axons. *Journal of Virology* 76(16):8310-8317.
- Topp, Rothman & Lavail (1997) Herpes Virus Infection of RPE and MDCK Cells: Polarity of Infection. *Experimental Eye Research* 64(3):343-354.
- Tran, Kissner, Westerman & Sears (2000) A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1818-1822.

- Treat, Bidula, Ramachandran, St Leger, Hendricks & Kinchington (2017) Influence of an immunodominant herpes simplex virus type 1 CD8+ T cell epitope on the target hierarchy and function of subdominant CD8+ T cells. *PLoS Pathogens* 13(12):e1006732.
- Trus, Booy, Newcomb, Brown, Homa, Thomsen & Steven (1996) The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. *Journal of Molecular Biology* 263(3):447-462.
- Tsukita & Furuse (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9(7):268-273.
- Tugizov, Maidji & Pereira (1996) Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells. *Journal of General Virology* 77(1):61-74.
- Turcotte, Letellier & Lippé (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(14):8847-8860.
- Umbach, Kramer, Jurak, Karnowski, Coen & Cullen (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.
- Umeda, Ikenouchi, Katahira-Tayama, Furuse, Sasaki, Nakayama, Matsui, Tsukita, Furuse & Tsukita (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126(4):741-754.
- Vagin, Kraut & Sachs (2009) Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 296(3):F459-469.
- van Genderen, Brandimarti, Torrisi, Campadelli & van Meer (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 200(2):831-836.
- Vittone, Diefenbach, Triffett, Douglas, Cunningham & Diefenbach (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 79(15):9566-9571.
- von Einem, Schumacher, O'Callaghan & Osterrieder (2006) The α -TIF (VP16) Homologue (ETIF) of Equine Herpesvirus 1 Is Essential for Secondary Envelopment and Virus Egress. *Journal of Virology* 80(6):2609-2620.
- Wang, Duh & Wu (2004) Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *Journal of Virology* 78(18):9750-9762.
- Wang, Zhou, Johnson, Colgrove, Coen & Knipe (2005) Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(44):16055-16059.
- Ward, Campadelli-Fiume, Avitabile & Roizman (1994) Localization and putative function of the UL20 membrane protein in cells infected with herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 68(11):7406-7417.
- Weed & Nicola (2017) Herpes simplex virus membrane fusion. *Cell Biology of Herpes Viruses*, Springer. p 29-47.
- Weir & Stow (1990) Two binding sites for the herpes simplex virus type 1 UL9 protein are required for efficient activity of the oriS replication origin. *Journal of General Virology* 71(6):1379-1385.
- Weller & Coen (2012) Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(9):a013011.

- Whitbeck, Lawrence & Bello (1994) Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* 200(1):263-270.
- Whitley & Roizman (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.
- Whitlow & Kristie (2009) Recruitment of the transcriptional coactivator HCF-1 to viral immediate-early promoters during initiation of reactivation from latency of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 83(18):9591-9595.
- Wilcox, Crnic & Pizer (1992) Replication, latent infection, and reactivation in neuronal culture with a herpes simplex virus thymidine kinase-negative mutant. *Virology* 187(1):348-352.
- Wilkinson & Weller (2004) Recruitment of cellular recombination and repair proteins to sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication is dependent on the composition of viral proteins within prereplicative sites and correlates with the induction of the DNA damage response. *Journal of Virology* 78(9):4783-4796.
- Wisner, Brunetti, Dingwell & Johnson (2000) The Extracellular Domain of Herpes Simplex Virus gE Is Sufficient for Accumulation at Cell Junctions but Not for Cell-to-Cell Spread. *Journal of Virology* 74(5):2278-2287.
- Wisner, Sugimoto, Howard, Kawaguchi & Johnson (2011) Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Capsids in Neurons by both Separate and Married Mechanisms. *Journal of Virology* 85(12):5919-5928.
- Wu, Nelson, McGeoch & Challberg (1988) Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *Journal of Virology* 62(2):435-443.
- WuDunn & Spear (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology* 63(1):52-58.
- Wurtele, Li, Zhou, Zhang & Verreault (2009) Histone acetylation and chromatin assembly. *Medecine sciences: M/S* 25(2):121.
- Wysocka & Herr (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci* 28(6):294-304.
- Xu, Schillinger, Sternberg, Johnson, Lee, Nahmias & Markowitz (2002) Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *The Journal of infectious diseases* 185(8):1019-1024.
- Xu, Su, Pearson, Mody & Zheng (2017) Herpes simplex virus 1 UL24 abrogates the DNA sensing signal pathway by inhibiting NF- κ B activation. *Journal of Virology* 91(7):e00025-00017.
- Yamada, Pokutta, Drees, Weis & Nelson (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123(5):889-901.
- Yang, Ortiz, Lander & Catalano (2015) Thermodynamic interrogation of the assembly of a viral genome packaging motor complex. *Biophysical Journal* 109(8):1663-1675.
- Yang, Qiu, Biswas, Jin, Watkins, Montelaro, Coyne & Wang (2008) Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry* 283(13):8643-8653.
- Zerboni, Sen, Oliver & Arvin (2014) Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 12(3):197-210.
- Zhang, Jouanguy, Ugolini, Smahi, Elain, Romero, Segal, Sancho-Shimizu, Lorenzo, Puel, Picard, Chapgier, Plancoulaine, Titeux, Cognet, von Bernuth, Ku, Casrouge, Zhang, Barreiro, Leonard, Hamilton, Lebon, Heron, Vallee, Quintana-Murci, Hovnanian, Rozenberg, Vivier, Geissmann, Tardieu, Abel & Casanova (2007) TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317(5844):1522-1527.

- Zhang, Liu & Wei (2017) Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *J Zhejiang Univ Sci B* 18(4):277-288.
- Zhang, Selariu, Warden, Huang, Huang, Zaccheus, Cheng, Xia & Zhu (2010) Genome-wide mutagenesis reveals that ORF7 is a novel VZV skin-tropic factor. *PLoS Pathogens* 6(7):e1000971.
- Zhu, Zhang, Ghosh, Cuevas, Forero, Dhar, Ibsen, Schmid-Burgk, Schmidt & Ganapathiraju (2014) Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor. *Immunity* 40(6):936-948.
- Zinn & Benjamin-Henkind (1979) *Anatomy of the Human Pigment Epithelial Cell*. (Cambridge, MA: Harvard Univ. Press)p.

LISTE DE PUBLICATIONS

A mutation in UL24 abolishes expression of the newly identified UL24.5 protein of herpes simplex virus 1, and leads to an increase in pathogenicity in mice

Dridi S., Richerieux N., Gonzalez CE., Vanharen M., Sanabria-Solano C., Pearson A. (Under revision) Journal of Virology.

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

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

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

Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1UL24 protein (HSV-1UL24 inhibits accumulation of viral transcripts)

Sanabria-Solano C., Gonzalez CE., Richerieux N., Bertrand L., Dridi S., Griffiths A., Langelier Y., Pearson A. (2016) Virology. doi : 10.1016/j.virol.2016.05.006

Contribution : Cinétique d'expression pour l'expérience de la figure 8