

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

## **Caractérisation du rôle d'UL24 dans la neuropathogenèse du virus de l'herpès simplex 1 par bioimagerie**

Par  
Pierre-Alexandre Rochette

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

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur interne : Jean-François Laliberté  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Institut National de la Recherche Scientifique

Examineur externe : Louis Flamand  
Faculté de Médecine  
Université Laval

Examineur externe : Nathalie Arbour  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal

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



## RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) infecte d'abord les cellules des muqueuses pour ensuite se propager vers les ganglions sensitifs où une infection persistante latente sera établie. Celui-ci peut se réactiver suite à différents stressés, causant ainsi des infections récurrentes au niveau des muqueuses. Dans un modèle murin d'infection oculaire, la protéine virale UL24 a été démontrée comme étant un déterminant de la pathogenèse virale. Lors d'une infection *in vivo* par un virus n'exprimant pas UL24 (UL24X), on observe une diminution légère des titres viraux au niveau de la cornée, mais une diminution drastique des titres viraux dans les ganglions trigéminaux (TG) à 3 jours post-infection (jpi). Son absence est aussi associée à une diminution des taux de réactivation virale *ex vivo* dans un modèle d'explant de TG. Nous travaillons avec l'hypothèse de recherche qu'UL24 est un facteur de neuropathogenèse important en temps précoces lors de l'infection *in vivo*, ce qu'une étude *in vivo* et *in situ* plus approfondie nous a permis de tester.

En premier lieu, nous avons tenté d'élucider la cause de la chute des titres viraux dans les TG en absence d'UL24. Des infections en contexte de cellules neuronales primaires ont démontré que cette protéine virale n'est pas un facteur essentiel à la réplication virale neuronale. Des analyses *in situ* par immunohistofluorescence contre des antigènes viraux ont démontré une réduction drastique du nombre de neurones infectés de façon productive à 3 jpi, révélant la cause de la chute des titres viraux en absence d'UL24. De plus, une réduction du nombre de neurone abritant du génome viral en absence d'UL24, détecté par hybridation *in situ* à 2 jpi, a démontré que cette protéine jouerait un rôle dans la dissémination de l'infection de la cornée vers les tissus neuronaux.

En second lieu, nous avons poussé nos capacités à étudier une infection virale en contexte de tissus non-sectionnés via une stratégie qui combine une plateforme de microscopie multiphotonique multimodale et des virus exprimant des protéines fluorescentes en collaboration avec l'INRS-EMT. Nous avons construit des virus recombinants ayant un phénotype de type sauvage, et exprimant avec stabilité la protéine

fluorescente rouge (RFP) mCherry. Des TG non-sectionnés, infectés par *vUs7-8mCherry*, nous ont permis de mettre au point la plateforme de microscopie multimodale. Nous avons réussi à optimiser la microscopie à fluorescence à 2-photons pour détecter en trois dimensions les cellules infectées exprimant mCherry. De plus, nous avons aussi réussi à optimiser la microscopie CARS, nous permettant de visualiser un signal intrinsèque à la myéline sur les axones. Finalement, nous avons été les premiers à conjuguer la microscopie CARS et la microscopie à fluorescence pour visualiser dans un tissu non-sectionné des neurones infectés par un virus, tout en conservant le contexte spatial tissulaire.

En conclusions, nous avons identifié UL24 comme étant un nouveau facteur de dissémination virale de la périphérie vers les tissus neuronaux. La stratégie d'analyse d'infection *in situ* que nous avons développée via les virus exprimant une RFP est une preuve de concept importante permettant des études *in vivo* plus approfondies de virus neurotrope. Nos virus recombinants au phénotype de type sauvage pourront servir de plateforme pour y insérer des mutations et élucider le rôle de protéines virales, telle qu'UL24, dans la pathogenèse virale. Il serait intéressant d'utiliser des virus recombinant exprimant une RFP plus brillante que mCherry, telle la RFP tdTomato, afin de réduire le seuil de détection de cellules infectées lors d'analyse histologiques. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier la réactivation virale *in vivo* du VHS-1 chez la souris, induite via l'injection d'un inhibiteur d'histone déacétylase (NaB). Enfin, l'induction de l'expression d'une RFP exprimée par le VHS-1 lors de la réactivation virale *in vivo* permettrait l'analyse des premières étapes de la réactivation virale *in vivo* et faciliterait l'étude de déterminants viraux de la réactivation virale *in vivo*.

---

Pierre-Alexandre Rochette

---

Angela Pearson

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier l'équipe du laboratoire Angela Pearson qui, en 2007, m'a accueilli et initié à la recherche scientifique : Angela Pearson, Luc Bertrand, Maria Lymberopoulos, Gabriel-André Leiva-Torres et Alain Boulende. Mon projet de recherche découle de résultats obtenus par mon ancien collègue, mentor et ami Gabriel-André Leiva-Torres, sans qui je n'aurais pas eu tant de facilité à réaliser des expérimentations animales. Luc Bertrand et Maria Lymberopoulos, premiers doctorants du laboratoire Pearson, ont certainement mis la barre haute pour tous les étudiants futurs voulant suivre leur cheminement.

Depuis mon arrivée au laboratoire, nous avons accueilli plusieurs autres personnes qui ont rendu mes huit dernières années plus qu'agréables. Je remercie spécialement Carolina Sanabria Solano et Gabriel Ouellet Lavallé pour les heures de plaisirs que nous avons eu au laboratoire, ainsi qu'à l'extérieur. Ensemble, nous avons discuté de science, découverts les joyaux du mauvais cinéma, construits des maisons et exploré des cavernes. J'aimerais aussi remercier mes amis scientifiques : Noémie Bérubé-Carrière, Benoit Bélanger, Dominique Favreau, Tania Charpentier, Maude Boisverts, Sasha Silva, Christine Matte, Maria Podinovskaia et David Finkelstein.

J'aimerais souligner la contribution de Pierre Talbot et Patrick Labonté qui m'ont tous deux suivi tout au long de mon doctorat, ainsi que Louise Savard et les membres de la fondation Armand-Frappier pour m'avoir ouvert la porte à plusieurs opportunités professionnelles.

Surtout, j'aimerais remercier ma superviseure de thèse Angela Pearson, avec qui j'ai travaillé chaque jour de la semaine pour près de huit ans. Elle a pris une chance en m'acceptant dans son laboratoire et de ce fait, a énormément influencé le déroulement de ma vie. Elle m'a formé pour que je devienne le scientifique que je suis aujourd'hui, m'a permis de visiter le monde en m'envoyant à des conférences scientifiques, et m'a fait confiance en m'offrant plusieurs responsabilités qui ont contribué à mon entrée sur le marché du travail. Merci pour tout, ce ne sera pas pareil de travailler sans vous.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille sans qui je ne serais pas arrivé là où je le suis aujourd'hui. Ma chère mère Christiane Legros n'a jamais attendu que je lui demande quoi que ce soit pour m'offrir de l'amour, de la nourriture, etc. Je n'avais pas 10 ans qu'elle m'avait acheté mon premier ensemble de chimie, mon premier ensemble d'archéologie, et mon premier télescope. Il y a 20 ans, nous avons écouté le film « outbreak » ensemble, m'initiant au monde de la virologie. Je lui dois certainement tout ce que j'ai aujourd'hui.

Mes Grands-Parents Daniel Legros et Gabriel Beudet m'ont soutenu toute leur vie dans la poursuite de mes études. Mon beau-père Louis Gareau m'a accueilli dans sa famille les bras grand ouverts avec fierté. Mes frères et sœur Martin Gareau, Catherine Gareau, Simon Gareau, et Simon Dubois m'ont tous servi d'exemple et m'ont appris à discuter comme un adulte lorsque j'étais plus jeune. Je n'aurais pu souhaiter pour des meilleurs amis avec qui grandir que Philippe Barsamian, Yee-Ho Au et Benjamin Niaulin. Leur influence, tout au long de mon enfance et de mon adolescence, n'a été que positive.

Pour terminer, je voudrais remercier ma fiancée, mon amie, ma collègue et mon amour Carolina Gomez. Elle a été à mes côtés lors de mes différentes victoires et défaites, et n'a jamais hésité à me pousser pour que je puisse me dépasser. Sans sa présence, son écoute et ses conseils, les jours et les nuits au laboratoire auraient été beaucoup plus difficiles.

Merci à tous! Je n'aurais jamais pu y arriver seul.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	xiii
LISTE D'ABRÉVIATIONS .....	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	19
1 Les virus herpès .....	19
1.1 Les <i>Herpesvirales</i> .....	20
1.2 Caractéristiques générales du VHS-1 .....	22
1.3 Le cycle de réplication virale.....	24
1.3.1 L'entrée virale.....	24
1.3.2 Transport de la nucléocapside virale vers le noyau .....	27
1.3.3 Expression temporelle des gènes viraux et réplication du génome viral .....	28
1.3.4 Sortie du virus .....	30
1.3.5 Réplication virale en contexte neuronal .....	33
1.3.6 Sortie cellulaire en contexte neuronal .....	34
2 Pathogenèse du VHS-1.....	36
2.1 Innervation sensorielle de la périphérie .....	36
2.2 L'anatomie du ganglion trigéminal .....	38
2.3 La neuropathogenèse virale .....	40
2.3.1 L'infection aiguë du ganglion trigéminal .....	40
2.3.2 L'établissement de la latence.....	41
2.3.3 La réactivation virale à partir de la latence.....	45
2.4 La réponse immunitaire contre une infection par le VHS-1 .....	47
2.5 Les modèles d'étude de la neuropathogenèse .....	49
2.5.1 Les modèles d'étude de la réplication virale neuronale .....	49
2.5.2 Les modèles d'étude de la dissémination de l'infection .....	50
2.5.3 Les modèle d'études de lésions zosteriformes .....	51
2.5.4 Les modèles d'études de l'infection latente par le VHS-1 .....	51
2.5.5 Les modèles d'études de la caractérisation de la réactivation virale .....	52

2.6 Les déterminants viraux de la neuropathogenèse .....	53
2.6.1 Déterminants viraux de la réplication neuronale .....	53
2.6.2 Déterminant viraux de la dissémination virale.....	54
2.6.3 Les protéines virales impliquées dans l'évasion de la réponse immunitaire.....	55
2.7 La vaccination contre les <i>alphaherpesvirinae</i> .....	57
2.8 Le VHS-1 comme virus oncolytique.....	58
3 La famille de la protéine virale UL24 .....	60
3.1 Généralités .....	60
3.2 Le motif d'endonucléase PD-(D/E)-xK d'UL24 .....	60
3.3 Expression du gène <i>UL24</i> chez le VHS-1 .....	61
3.4 Importance d'UL24 dans la cellule hôte.....	63
3.5 UL24 du VHS-1 comme déterminant de la pathogenèse virale.....	64
3.6 Les orthologues d'UL24.....	65
3.6.1 Orthologue d'UL24 chez le VHS-2 .....	65
3.6.2 Orthologue d'UL24 chez le virus de l'herpès humain 3.....	66
3.6.3 Orthologues d'UL24 chez les <i>betaherpesvirinae</i> humains.....	66
3.6.4 Orthologues d'UL24 chez les <i>gammaherpesvirinae</i> .....	67
3.6.5 Orthologues d'UL24 chez les virus de l'herpès non-humains .....	68
3.7 La protéine virale UL24 comme cible thérapeutique .....	68
4 Expression de gènes rapporteurs chez les VHS-1 recombinants .....	70
4.1 Stratégies de construction de virus recombinant.....	70
4.2 Visualisation de l'infection lytique .....	71
4.3 Visualisation des sites d'infection latente .....	73
4.4 Visualisation de mécanismes moléculaires impliqués lors de l'infection virale.....	74
5 La microscopie à optique non-linéaire.....	75
5.1 La microscopie à fluorescence à deux photons.....	77
5.2 Les signaux de Seconde Harmonique.....	78
5.3 Les signaux de type troisième harmonique ou Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS) .....	78
6 Applications de technologies de microscopie non-linéaire multimodale .....	79
6.1 Analyse de l'anatomie tissulaire et de la physiologie cellulaire et animale .....	79
6.2 Diagnostic biomédicale.....	81
6.3 Analyse des interactions hôte-pathogènes.....	82
7 Hypothèse de travail.....	82

<b>CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION</b> .....	85
Résumé de la première publication .....	85
Contribution des auteurs.....	86
Summary .....	88
Introduction .....	89
Results.....	90
Construction and characterization of a UL24X rescue virus .....	90
Importance of UL24 for viral replication in primary embryonic neurons is similar to that in epithelial-derived cell lines. ....	91
Reduction of the ocular viral load as observed in absence of UL24 is not sufficient to explain the drastic reduction of viral titers in the TG .....	92
UL24 is important to establish a productive infection in a high number of neurons at 3 dpi. ....	93
Absence of UL24 leads to a reduced number of TG neurons staining positive for HSV-1 DNA 2 dpi.....	94
Discussion .....	95
Reduced viral titers in the eye cannot explain the drastic reduction of viral titers in TG seen with UL24X .....	95
A UL24 mutant replicates similarly in epithelia-derived cells, in murine embryonic neurons, and in LA-N-5-derived neurons .....	95
UL24 affects the spread of infection from the cornea to neurons of the TG .....	96
Methods .....	97
Viruses and cells .....	97
Viral replication assays .....	97
Immunofluorescence on cells in culture .....	98
Murine model of ocular infection .....	98
Disease scoring.....	99
Probe preparation for wholemount <i>in situ</i> hybridization .....	99
Wholemount <i>in situ</i> hybridization .....	99
Histological sectioning.....	99
Immunohistofluorescence .....	99
Analysis of stained histological sections by fluorescence microscopy .....	100
Analysis of histological sections after whole mount <i>in situ</i> hybridization.....	100
Acknowledgments.....	101
Tables and Figures .....	102

<b>CHAPITRE 3 : SECONDE PUBLICATION</b> .....	109
Résumé de la seconde publication .....	109
Contribution des auteurs.....	110
Abstract.....	112
Keywords .....	113
Introduction .....	114
Results.....	116
Production of vUs7-8mCherry .....	116
Characterization of vUs7-8mCherry <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	116
Visualisation of infected cells by fluorescence microscopy .....	117
Visualization of whole TG using multimodal non-linear optical microscopy .....	118
Discussion .....	119
Materials and methods .....	121
Ethics Statement .....	121
Plasmid construction .....	121
Construction of recombinant viruses .....	122
Viruses and cells .....	122
Western Blotting.....	122
Viral replication assays .....	122
Murine model of ocular infection .....	123
Tissue sections and confocal analysis .....	123
Immunohistofluorescence analysis of TG sections .....	124
Multimodal non-linear optical microscopy platform .....	124
Tables and Figures .....	126
 <b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	 135
4. Discussion .....	135
4.1. Importance d'UL24 pour la neuropathogénèse du VHS-1 .....	135
4.1.1 Caractérisation de vUL24X-Rescue.....	135
4.1.2 UL24 et la réplication virale neuronale.....	136
4.1.3 Relation entre l'infection périphérique et les titres viraux dans les TG .....	137
4.1.4 Importance d'UL24 pour l'établissement d'une l'infection productive dans le TG .....	138
4.1.5 Importance d'UL24 pour la dissémination rétrograde de l'infection .....	139

4.1.6 Relation entre l'infection périphérique et la maladie associée à l'infection par le VSH-1 chez la souris.....	140
4.1.7 Relation entre l'infection périphérique et la réactivation virale .....	141
4.1.8 Mécanismes possibles impliquant UL24 dans la dissémination virale à partir de cellules épithéliales .....	142
4.1.9 Implication clinique de virus mutant en UL24.....	145
4.2 Visualisation de l'infection virale par bioimagerie .....	146
4.2.1 Stratégie de production de virus recombinant exprimant une protéine fluorescente rouge .....	146
4.2.2 Caractérisation de vUs7-8mCherry.....	147
4.2.3 Visualisation de l'infection par microscopie multiphotonique multimodale .....	148
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	152
<b>ANNEXE I</b> .....	183
Introduction .....	185
Matériel et Méthodes .....	186
Résultats.....	188
Conclusions .....	192
<b>ANNEXE II</b> .....	196
Liste de publications .....	197



# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## Introduction

Figure 1.1 : Le virion extracellulaire .....	20
Figure 1.2 : Structure du génome viral .....	23
Figure 1.3 : Le cycle de réplication virale .....	26
Figure 1.4 : Modèles de sortie cellulaire.....	31
Figure 1.5 : Modèles de sortie neuronale.....	35
Figure 1.6 : Infection primaire <i>in vivo</i> .....	39
Figure 1.7 : Réactivation de l'infection latente.....	44
Figure 1.8 : Profil de transcription du gène <i>UL24</i> .....	62
Figure 1.9 : Principe physique de microscopie multiphotonique .....	77

## Première publication

Figure 1 : Characterization of a UL24X rescue virus in cell culture.....	102
Figure 2 : Rescue of UL24X mutation corrects <i>in vivo</i> defects observed in the mouse ocular infection model .....	103
Figure 3 : Replication of a UL24-deficient virus in neurons.....	104
Figure 4 : Reduction of the ocular viral load as observed in absence of UL24 is not sufficient to explain the 4log <sub>10</sub> reduction of viral titers in TG .....	105
Figure 5 : UL24 is important for the dissemination of the acute infection in a high number of neurons .....	106
Table 1 : Rescue of UL24X mutation corrects disease severity <i>in vivo</i> observed in the mouse ocular.....	107
Table 2 : Reduction of the infectious inoculum reduces the incidence of <i>ex vivo</i> viral reactivation .....	108

## Seconde publication

Figure 1 : Production of a recombinant strain of HSV-1 expressing a red fluorescent protein..	126
Figure 2 : Characterization of vUs7-8mCherry .....	127
Figure 3 : Insertion of the mCherry expression cassette between <i>Us7</i> and <i>Us8</i> does not alter virus phenotype <i>in vivo</i> .....	128
Figure 4 : Identification of cells infected by vUs7-8mCherry in histological sections .....	129

Figure 5 : Visualization of a non-sectioned infected TG with a multimodal non-linear imaging platform .....	130
Table 1 : Expression of mCherry does not reduce viral <i>ex vivo</i> reactivation frequency .....	131
Figure S1 : Identification of cells infected with vUs7-8mCherry in TG sections .....	132

## **Discussion**

Figure 4.1 : Hypothèse impliquant UL24 dans la pathogenèse virale.....	143
--	-----

## **Annexe I**

Figure 1 : Caractérisation de vUs7-8tdTomato .....	189
Figure 2 : Visualisation de l'infection par vUs7-8tdTomato .....	190
Figure 3 : Caractérisation de la réactivation virale <i>in vivo</i> de vUs7-8tdTomato par injection de NaB .....	191

## LISTE D'ABRÉVIATIONS

<b>3-OS-HS</b>	<b>Héparine-sulfates modifiées</b>
<b>Aa</b>	<b>Acide aminé</b>
<b>ABB</b>	<b>« Antibody bipolar bridge » (Pont bipolaire d'anticorps)</b>
<b>ACV</b>	<b>Acyclovir</b>
<b>ACV-MP</b>	<b>Acyclovir monophosphate</b>
<b>ACV-TP</b>	<b>Acyclovir triphosphate</b>
<b>AMP</b>	<b>Adénosine monophosphate</b>
<b>ADN</b>	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide ribonucléique</b>
<b>ARN pol</b>	<b>ARN polymérase</b>
<b>ARNm</b>	<b>ARN messenger</b>
<b>B virus</b>	<b>l'herpès cercopithecine</b>
<b>b-Nos</b>	<b>« brain-NOS » (NOS du cerveau)</b>
<b>BVH</b>	<b>« Bovine herpès virus » (Virus de l'herpès bovin)</b>
<b>cAMP</b>	<b>« cyclic AMP » (AMP cyclique)</b>
<b>CARS</b>	<b>« Coherent Anti-stokes Raman Scattering »</b>
<b>Cdc42</b>	<b>« Cell division control protein 42 homolog »</b>
<b>CGRP</b>	<b>« Calcitonin gene-related peptide »</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité</b>
<b>CNS</b>	<b>Système nerveux central</b>
<b>DC</b>	<b>« Dendritic cell » (Cellule dendritique)</b>
<b>dTMP</b>	<b>Désoxythymidine monophosphate</b>
<b>dTTP</b>	<b>Désoxythymidine triphosphate</b>
<b>E</b>	<b>« Early » Précoce</b>
<b>EBV</b>	<b>« Epstein-Barr virus » (Virus d'Epstein-Barr)</b>
<b>EGFR</b>	<b>« Epithelial growth factor receptor » (Récepteur du facteur de croissance épithéliale)</b>
<b>GFP</b>	<b>« Green fluorescent protein » (Protéine fluorescente verte)</b>
<b>HCMV</b>	<b>« Human cytomegalovirus » (Cytomégalovirus humain)</b>
<b>HDAC</b>	<b>« Histone deacetylase » (Déacétylase d'histone)</b>
<b>HHV</b>	<b>« Human herpes virus » (Virus de l'herpès humain)</b>
<b>hpi</b>	<b>Heure post-infection</b>

<b>Hsp90</b>	« Heat shock protein 90 »
<b>HSPG</b>	« Heparan sulfate proteoglycan » (Héparan sulfate protéoglycan)
<b>HVEM</b>	« Herpes virus entry mediator » (Médiateur d'entrée virus herpès)
<b>ICER</b>	« Inducible cAMP early repressor » (répresseur précoce inductible par cAMP)
<b>IE</b>	« Immediate-early » (Immédiat-précoce)
<b>IL</b>	Interleukine
<b>iNos</b>	NOS inductible
<b>jpi</b>	Jour post-infection
<b>kbp</b>	« Kilobasepair » (Kilopaire de base)
<b>KSHV de Kaposi)</b>	« Kaposi sarcoma associated herpes virus » (Virus de l'herpès du sarcome de Kaposi)
<b>L</b>	« Late » (tardif)
<b>LAT</b>	« Latency associated transcript » (Transcrit associé à la latence)
<b>MAG</b>	« Myelin associated glycoprotein » (glycoprotéine associée à la myéline)
<b>MIEP</b>	« Major immediate-early promoter » (Promoteur majeur immédiat-précoce)
<b>MNE</b>	Membrane nucléaire externe
<b>MNI</b>	Membrane nucléaire interne
<b>NaB</b>	Butyrate de sodium
<b>NGF</b>	« Nerve growth factor »
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>NM2a</b>	« Non-muscle myosin 2 a » (Myosine non musculaire de type 2 a)
<b>NO</b>	« Nitric oxide » (Oxide nitrique)
<b>NOS</b>	« Nitric oxide synthase » (Synthase d'oxide nitrique)
<b>NPC</b>	« Nuclear pore complexe » (Complexe de pore nucléaire)
<b>PCR</b>	« Polymerase chain reaction » (Réaction de polymérase en chain »
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIRLa</b>	« paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha”
<b>PRR</b>	« Pattern recognition receptor » (Récepteur de patron moléculaire)
<b>PrV</b>	« Pseudorabies virus » (Virus de la pseudorage)
<b>qPCR</b>	« quantitative PCR » (PCR quantitative)
<b>RFP</b>	« Red fluorescent protein » (Protéine fluorescente rouge)
<b>RR</b>	« Ribonucleotide reductase » (Réductase des ribonucléotides)
<b>SGH</b>	« Second harmonic generation » (Génération de seconde harmonique)
<b>TG</b>	« Trigeminal ganglia » (Ganglion trigeminal)
<b>TK</b>	Thymidine kinase

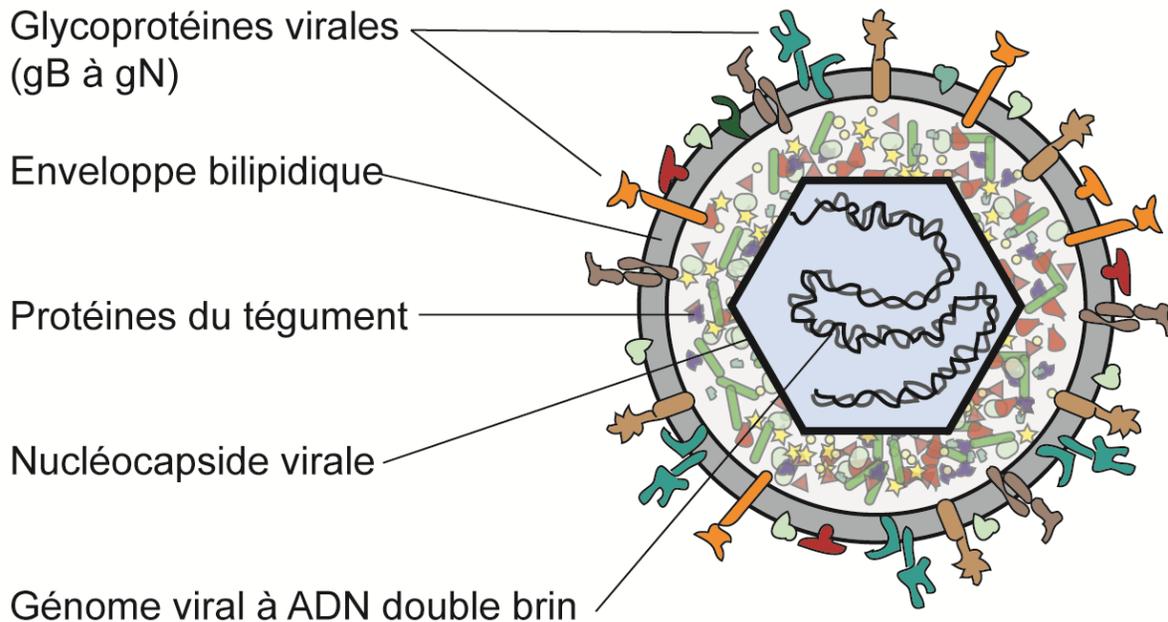
<b>TLR</b>	<b>« Toll-like receptor » (Récepteur toll-like)</b>
<b>TNF</b>	<b>« Tumor necrosis factor »</b>
<b>TRE</b>	<b>« Thyroid response element »</b>
<b>UL</b>	<b>Unique longue</b>
<b>US</b>	<b>« Unique short » (Unique courte)</b>
<b>UVB</b>	<b>Ultraviolet B</b>
<b>Vhs</b>	<b>« Virion host shutoff » (Protéine d'arrêt de l'hôte du virion)</b>
<b>VHS-1</b>	<b>Virus de l'herpès simplex 1</b>
<b>VHS-2</b>	<b>Virus de l'herpès simplex 2</b>
<b>VZV</b>	<b>« Varicella zoster virus » (Virus de la varicelle)</b>



# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1 Les virus herpès

Nous côtoyons les virus herpès depuis très longtemps. La terminologie « Herpes » nous provient de la Grèce antique décrivant des lésions qui semblent ramper au niveau de la peau (Fields *et al.*, 2007). Toutefois, considérant l'étiologie incertaine de ces lésions, il est plus exacte d'attribuer à Celsus, à Rome au premier siècle, la première description de lésions herpétiques (Fields *et al.*, 2007). Aujourd'hui, l'on estime qu'au moins 80% de la population mondiale est infectée par le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) (Liedtke *et al.*, 1993). Malgré que l'infection par le VHS-1 chez un hôte en santé soit généralement bénigne, les symptômes peuvent devenir très sévères en absence d'un système immunitaire compétent (D. Kimberlin, 2004a, D. W. Kimberlin, 2004b, D. W. Kimberlin, 2004c, Mann *et al.*, 1984, Rand *et al.*, 1977). L'infection récurrente du VHS-1 peut parfois mener à des encéphalites virales très sévères (Baringer *et al.*, 1994, J. A. Nicoll *et al.*, 1993). De plus, la récurrence de l'infection au niveau de la cornée est la première cause de cécité dans les pays développés due à une maladie infectieuse (Streilein *et al.*, 1997). À ce jour, la seule classe d'agent antiviral disponible contre le VHS-1 est les analogues de la guanine, tel l'acyclovir (ACV), ciblant le métabolisme de l'ADN viral (Elion *et al.*, 1977). L'ACV est converti en ACV-monophosphate (ACV-MP) par la thymidine kinase (TK) virale, lui permettant d'être converti en ACV-triphosphate (ACV-TP) par des kinases cellulaires. L'ACV-TP inhibe la polymérase d'ADN virale. L'utilisation de l'ACV lors d'infections récurrentes peut mener à l'apparition de virus résistant à ce traitement (Morfin *et al.*, 2003). Il est donc important d'améliorer nos connaissances fondamentales sur la biologie du VHS-1, afin d'alimenter la recherche appliquée et trouver de nouvelles cibles antivirales ainsi que développer des vaccins contre ces infections.



**Figure 1.1** Le virion extracellulaire : La particule virale est composée de diverses glycoprotéines virales, ancrées dans une membrane bilipidique entourant le tégument qui consiste de plusieurs protéines virales et cellulaires. Au centre de la particule virale, l'on retrouve une nucléocapside virale icosaédrale qui contient un génome à ADN double brin de long de 152 kb. Inspiré de Timothy Paustian (Paustian, 2011).

## 1.1 Les *Herpesvirales*

L'ordre des *Herpesvirales* est divisé en trois familles : Les *Alloherpesviridae* infectant les poissons et amphibiens, les *Malacoherpesviridae* infectant les mollusques, et les *Herpesviridae* infectant les autres animaux (Davison, 2010).

Les *Herpesviridae*, parmi les plus anciens virus infectant les eukaryotes, existent depuis maintenant 400 millions d'années, date à laquelle il est estimé que les *alphaherpesvirinae* se sont séparés d'un second groupe qui comprendra les sous-familles des *betaherpesvirinae* et des *gammaherpesvirinae* (McGeoch *et al.*, 1995). Ces trois sous-familles de virus sont caractérisées par leur enveloppe dérivée de la cellule hôte, leur génome à ADN double-brin encapsidé, entouré du tégument (Figure 1.1). Ils ont comme propriété majeure leur capacité d'établir une infection persistante sous état latent (Fields *et al.*, 2007). Nous retrouvons neuf virus de l'herpès humain (HHV) à travers ses trois sous-familles (Davison, 2010).

Les *Alphaherpesvirinae* humains comprennent le VHS-1, le virus de l'herpès simplex 2 (VHS-2), du genre *Simplexvirus*, ainsi que le virus de la varicelle (VZV) du genre *Varicellovirus*. Les virus de cette sous-famille sont reconnus pour leur capacité de se répliquer rapidement, et d'établir une infection latente dans les neurones (Fields *et al.*, 2007). Une infection par un *alphaherpesvirinae* humain cause des lésions cutanées récurrentes lorsque le virus latent se réactive. Contrairement au VHS-1 et VHS-2, le VZV se réactive typiquement en vieil âge et cause une maladie connue sous le nom de zona (Fields *et al.*, 2007). Ces trois virus ont le potentiel de causer des encéphalites virales chez des hôtes en santé (Baringer *et al.*, 1994, J. A. Nicoll *et al.*, 1993). Ils sont de plus considérés comme virus opportunistes ; les symptômes associés à la maladie qu'ils causent peuvent devenir très sévères en absence d'un système immunitaire compétent.

Le virus de l'herpès cercopithecine (B Virus), un *alphaherpesvirinae*, a la distinction d'être le seul virus d'herpès chez les primates pouvant causer une maladie extrêmement pathogénique chez les humains (Fields *et al.*, 2007). Ce virus est endémique chez les macaques, et l'on estime une fréquence d'infection active à 2% (Huff *et al.*, 2003a, Huff *et al.*, 2003b, Weigler *et al.*, 1993). Lors de l'infection chez l'humain, les sites principaux de réplication virale de ce virus sont la moelle épinière et le cervelet (Fields *et al.*, 2007). La maladie engendre d'abord des symptômes similaires à la grippe, suivie d'une perte de sensation au site d'infection initial. Le tout se termine par une myélite transverse montante et d'un arrêt respiratoire. Sans traitements, 80% des infections humaines sont fatales (Fields *et al.*, 2007).

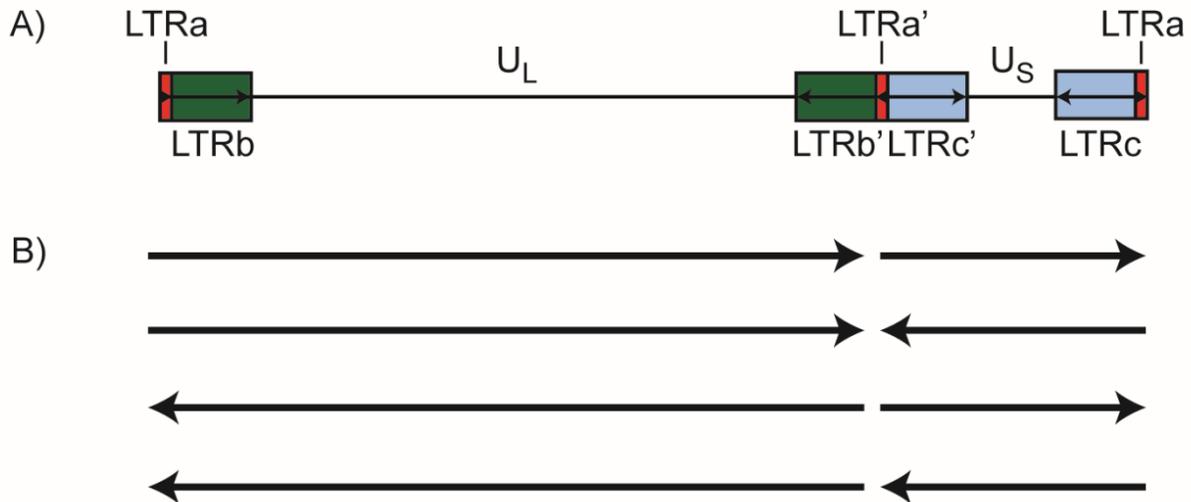
Les *Betaherpesvirinae* humains sont constitués du cytomégalovirus humain (HCMV) du genre *Cytomégalovirus*, ainsi que des virus de l'herpès humain 6A et 6B (HHV-6A et HHV-B) et 7 (HHV-7) du genre *Roseolovirus*, agents causatifs de la roséole chez les enfants (Fields *et al.*, 2007). Les virus de cette sous-famille sont reconnus pour se répliquer plus lentement que les autres membres de la famille, et pour établir une infection latente dans les leucocytes. Le HHV-6 quant à lui se démarque des autres virus de l'herpès humain par sa capacité d'établir une infection latente en intégrant son génome viral au niveau des télomères de certains chromosomes de l'hôte (Arbuckle *et al.*, 2010, Flamand *et al.*, 2010). Il est estimé que près de 70 millions d'individus possèdent le génome du HHV6 intégré au niveau de leurs chromosomes (Arbuckle *et al.*, 2010, Morissette *et al.*, 2010). Ces quatre virus sont ubiquitaires et démontrent une distribution mondiale, avec une infection latente établie chez la majorité des adultes. Chez un adulte immunocompromis, ces virus peuvent causer plusieurs maladies telles une pneumonie (HHV6,

HCMV), le rejet de greffe lors de transplantation de moelle osseuse (HHV6, HCMV) ou d'organes (HHV6, HHV7, HCMV) (Fields *et al.*, 2007). Lors de transplantation, les infections latentes peuvent se réactiver et causer une maladie fibrillaire sévère, parfois mortelle.

Finalement, la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* humains est composée des genres *Rhadinovirus* et *Lymphocryptovirus*, comprenant le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) et le virus d'Epstein-barr (EBV) respectivement (Fields *et al.*, 2007, Roizman *et al.*, 2001). Cette sous-famille est reconnue pour se répliquer à des rythmes plus variables que le reste de la famille, et pour avoir un potentiel oncogénique. L'établissement d'une infection latente par ces virus peuvent transformer la cellule infectée, principalement les lymphocytes B (Fields *et al.*, 2007). Les maladies principales associées à EBV sont la mononucléose infectieuse, le lymphome de Burkitt, ainsi que le carcinome nasopharyngéale, et celle associée au KSHV est le sarcome de Kaposi chez les personnes immunodéficientes.

## 1.2 Caractéristiques générales du VHS-1

Le VHS-1 est le virus prototypique de la famille des *Herpesviridae*. Son génome à ADN double-brin de 152 kilopaires de base (kbp) contient au moins 80 gènes sur plus (Fields *et al.*, 2007). Ce génome est séparé en deux régions de séquences uniques appelées région unique longue (UL) et unique courte (US) (Figure 1.2) (Wadsworth *et al.*, 1975). Les gènes codés dans ces régions sont nommés selon le diminutif approprié, UL ou US, suivi de leur rang respectif. La région UL est flanquée de régions répétées appelées  $R_L$  ou  $ab/a'b'$ , et la région US est flanquée des régions répétées appelées  $R_S$  ou  $ac/a'c'$  (Roizman, 1979, Wadsworth *et al.*, 1975). Les six gènes présents dans les régions répétées se retrouvent en deux copies dans le génome du VHS-1. Les 43 gènes ancestraux présents chez tous les *Herpesviridae* se retrouvent dans la région UL et jouent des rôles dans l'entrée du virus dans la cellule, dans la réplication de l'ADN viral, dans l'assemblage de la capsid et l'encapsidation du génome viral, que dans la sortie du virion de la cellule hôte (Brown, 2007, Davison, 2002, McGeoch *et al.*, 2006). Les gènes spécifiques au VHS-1 se retrouvent dans la région US ainsi qu'à l'extrémité du segment UL, et jouent des rôles importants dans le tropisme cellulaire et dans les interactions hôte-pathogène (J. Brown, 2004, Brown, 2007). Finalement, lors de la réplication virale, les régions UL et US s'inversent à haute fréquence par des processus de recombinaison homologue, produisant quatre isomères distincts du génome viral, généralement équimolaire dépendamment de la souche virale (Hayward *et al.*, 1975).



**Figure 1.2** Structure du génome viral : A) Les séquences uniques du VHS-1 sont regroupées en une région longue (UL) et en une région courte (US), flanquées de région répétées. Les différents gènes viraux sont identifiés par un préfixe identifiant la région dans laquelle ils se retrouvent, suivi d'un chiffre identifiant leur position respective. B) Quatre isomères du génome viral sont produit par recombinaison homologue au niveau des régions répétées, permettant d'inverser l'orientation des régions UL et US.

La nucléocapside de VHS-1 possède une symétrie icosaédrale de 125 nm de diamètre (Subak-Sharpe *et al.*, 1998). Elle est formée de 162 capsomères composées de 13 protéines distinctes (VP5, VP19C, VP23, VP24, VP26, UL6, UL17, UL18, UL19, UL25, UL26, UL35, UL38) (Fields *et al.*, 2007). La protéine virale VP5 est la protéine majeure de la capside, présente dans tous les pentons et hexons de la capside. Enfin, la porte d'entrée et de sortie du génome viral au niveau de la capside est composée de douze copies de la protéine virale UL6, formant un anneau. La capside virale est entourée du tégment, un ensemble de 23 protéines virales regroupées par interactions protéines/protéines (Loret *et al.*, 2008). Le tégment est séparé qualitativement en tégment interne, à proximité de la nucléocapside virale, ainsi qu'en tégment externe, à proximité de l'enveloppe lipidique. Ces protéines jouent un rôle important lors des étapes précoces d'une nouvelle infection cellulaire. Elles sont impliquées dans le transport de la capside vers le noyau, dans la transactivation des gènes viraux, ainsi que dans les réponses contre les mécanismes de défense antiviraux intrinsèques (Fields *et al.*, 2007, Loret *et al.*, 2008). De plus, nous retrouvons au moins 49 protéines cellulaires faisant partie du tégment (Loret *et al.*, 2008, Stegen *et al.*, 2013). Toutefois, elles s'y retrouvent en très faible quantité, voire de 1 à 4 copies par virion.

Finalement, nous retrouvons douze protéines virales insérées dans l'enveloppe lipidique, dont huit glycoprotéines virales : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, et gM (Loret *et al.*, 2008, Stegen *et al.*, 2013). Ces protéines sont entre autres impliquées dans l'adhésion initiale du virus à des récepteurs cellulaires, ainsi que dans l'évènement de fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe lipidique du virus.

## 1.3 Le cycle de réplication virale

### 1.3.1 L'entrée virale

Le VHS-1 est considéré comme étant pantropique, pouvant infecter une gamme de cellule très variée (e.g. cellules épithéliales, immunitaires et neuronales) (Fields *et al.*, 2007). La première interaction entre le virus et la cellule se fait via une interaction entre certaines glycoprotéines virales et des récepteurs cellulaires. Les glycoprotéines gC et gB permettent au virus d'adhérer aux cellules en interagissant avec les protéoglycans héparine sulfate (HSPG), et l'hétérodimère formé par les glycoprotéines gH et gL peut se lier aux intégrines (Laquerre *et al.*, 1998, van Dyck *et al.*, 2004). Les interactions avec les HSPG et les intégrines sont réversibles et permettent principalement aux glycoprotéines de fusion de se rapprocher de leurs récepteurs cellulaires et d'initier l'infection cellulaire.

Il existe deux classes typiques de machinerie de fusion virale. La machinerie de fusion virale de type I décrit un homotrimère, clivé en une unité transmembranaire et une unité de surface (White *et al.*, 2008). Suite à un signal activateur, l'homotrimère pénètre dans la cellule cible et se replie sur lui-même afin de rapprocher les membranes virales et cellulaires, et permettre l'échange de lipides. La machinerie de fusion virale de type II implique un hétérodimère, où la protéine de fusion est retenue à la surface du virion par une seconde protéine. Une fois les protéines clivées, la glycoprotéine peut se lier à son récepteur et former un hétérotrimère (White *et al.*, 2008). La liaison avec le récepteur cellulaire produit un changement conformationnel irréversible qui expose une région hydrophobique de la protéine de fusion et permet son insertion dans la membrane cellulaire. La machinerie de fusion de classe III, telle celle du VHS-1, est atypique et partage des mécanismes de fusion avec les types I et II. Dans le VHS-1, elle est composée de quatre glycoprotéines virales (gB, gD, gH, et gL) (White *et al.*, 2008). L'attachement du virus à la cellule permet à la glycoprotéine gD de se lier à ses récepteurs cellulaires, soit le récepteur du tumor necrosis factor (TNF), aussi appelé herpes virus entry mediator (HVEM), la Nectine-1, la Nectine-2, ou les héparine-sulfates modifiées (3-OS-HS) (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000, Fields *et al.*,

2007). La nectine-1 est exprimée dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales et neuronales (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000, Valyi-Nagy *et al.*, 2004). gD pourra alors changer de conformation et signaler à gB et gH/gL d'initier la fusion avec la membrane plasmique. gB peut aussi se lier à des récepteurs nécessaires à la fusion du virus avec la cellule, tel paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha (PIRL $\alpha$ ), la myelin associated glycoprotein (MAG), et non-muscle myosin 2A (NM2a) (Arii *et al.*, 2010, Campadelli-Fiume *et al.*, 2000, Fields *et al.*, 2007). PIRL $\alpha$  est exprimée par les cellules du système immunitaire ainsi que chez les neurones, MAG est exprimée préférentiellement dans les tissus neuronaux (Suenaga *et al.*, 2010). Les deux protéines du VHS-1 impliquées directement dans l'acte de fusion sont gB et gH. gL sert principalement de chaperone à gH pour permettre le bon repliement de celle-ci et son intégration dans l'enveloppe virale (Laquerre *et al.*, 1998). Bien que gH semble posséder des propriétés de protéines de fusion de type I (Duus *et al.*, 1995, Farnsworth *et al.*, 2007, Maresova *et al.*, 2001, Subramanian *et al.*, 2007), gB serait la protéine de fusion effectrice du complexe gB, gH/gL (Backovic *et al.*, 2007, Hannah *et al.*, 2009, Hannah *et al.*, 2007).

La fusion du virus avec la cellule se fait à la membrane plasmique, où la capsidie pourra être libérée dans le cytoplasme (Figure 1.3). L'entrée directe a d'abord été observée et caractérisée chez les cellules Vero et Hep2, puis dans des neurones (Fuller *et al.*, 1992, Fuller *et al.*, 1989, Fuller *et al.*, 1987, Wittels *et al.*, 1991). Toutefois, de nouvelles voies d'entrée pour le VHS-1 ont été caractérisées dans d'autres types cellulaires. L'entrée par endocytose dépendante d'un pH faible a été observée en contexte de cellules HeLa (Nicola *et al.*, 2003). Une endocytose dépendante du pH a aussi été observée avec une version mutante du VHS-1 chez des cellules CHO exprimant la nectine-1, mais l'entrée procède par fusion direct lorsque les cellules CHO expriment la nectine-2 (Nicola *et al.*, 2003). En contrepartie, l'entrée par endocytose indépendant du pH a été observée dans une lignée de mélanome murin exprimant la nectine-1 humaine (C10) (Milne *et al.*, 2005). On ignore par quels mécanismes la méthode d'entrée dans la cellule est déterminée. Il a été proposé que la présence d'un cytosquelette cortical dense pourrait prévenir l'entrée par fusion directe avec la membrane plasmique, et favoriser l'entrée par endocytose (Hoppe *et al.*, 2006, Petermann *et al.*, 2009, Rahn *et al.*, 2011). Il se peut aussi que l'internalisation par endocytose, suite à l'interaction avec gD et son récepteur, nécessite la présence d'un second récepteur toujours non-identifié.

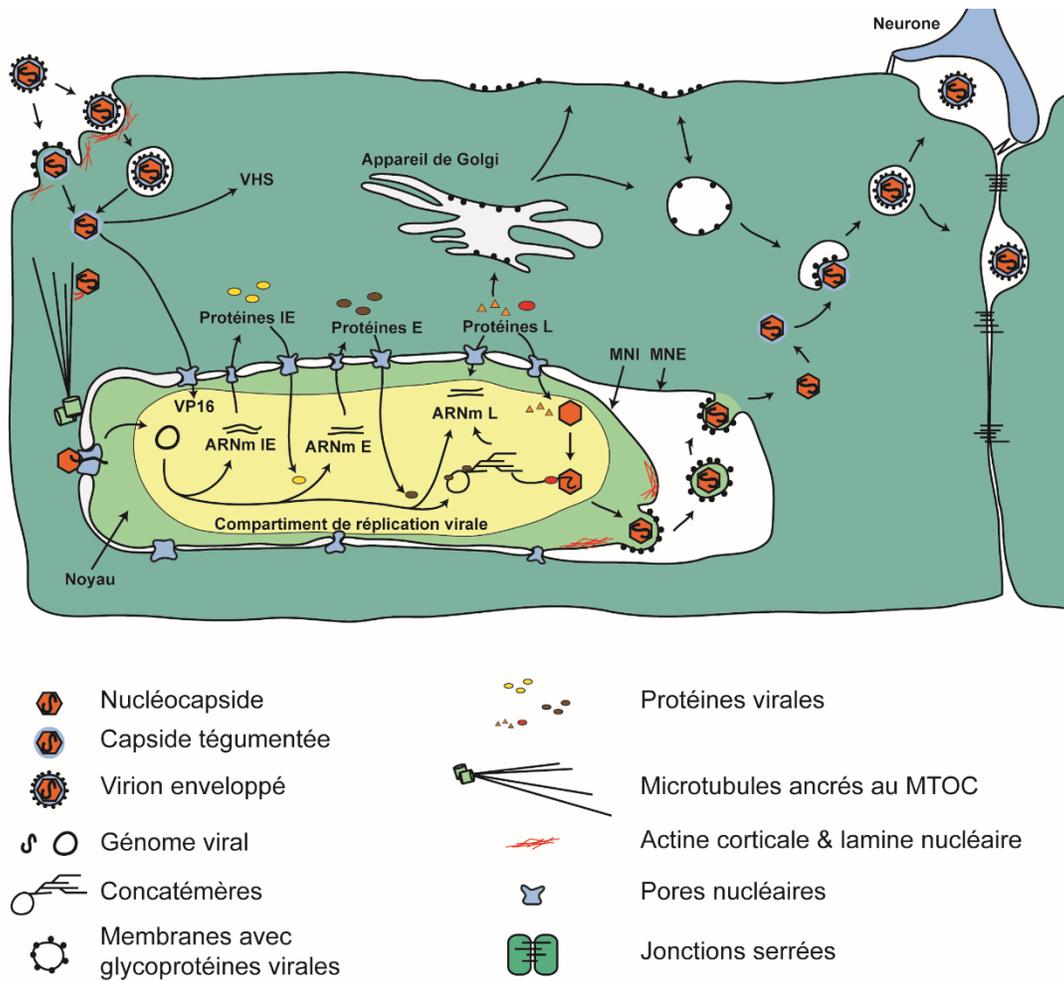


Figure 1.3

**Le cycle de réplication virale :** Le virion pénètre la cellule par fusion directe à la membrane plasmique, ou par endocytose pH dépendant ou indépendant, selon le type cellulaire. La nucléocapside virale sera partiellement détégumentée, et voyagera vers le noyau cellulaire via le réseau de microtubules. Le génome viral sera injecté dans le nucléoplasme au niveau des pores nucléaires et circularisé, puis les gènes viraux IE, E, et L seront exprimés suivant une cascade d'expression temporelle. L'expression des gènes gamma peut dépendre partiellement ( $\gamma_1$ ) ou entièrement ( $\gamma_2$ ) de la réplication du génome viral. Les concatémères du génome viral seront clivés puis encapsidés. La nucléocapside virale sortira du noyau puis de la cellule par exocytose, via des étapes d'enveloppement et désenveloppement et de réenveloppement.

### 1.3.2 Transport de la nucléocapside virale vers le noyau

Lors du relâchement de la capsid virale dans la cellule, celle-ci doit 1) traverser le cytosquelette d'actine corticale, 2) se déplacer activement de la surface de la cellule vers le noyau pour y injecter le génome viral, 3) et déjouer les réponses cellulaires antivirales intrinsèques (figure 1.3).

Une fois la fusion entre le virus et la cellule complétée, la capsid se retrouvera dans un réseau dense d'actine corticale. La liaison entre le virus et ses récepteurs cellulaires initie une cascade de signalisation menant à la phosphorylation de protéines cellulaires et à la dépolymérisation des microfilaments corticaux. Les voies de signalisation utilisées dépendent toutefois du type cellulaire en question. L'infection de cellules Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) et de kératinocytes humains active la signalisation Rac1 et Cdc42; l'infection de neurones active la voie de signalisation EGFR et PI3K, qui active la cofiline et dépolymérise l'actine corticale (Petermann *et al.*, 2009, Zheng *et al.*, 2014).

Il a été estimé que 231 ans seraient nécessaires pour que la capsid voyage de 10 mm dans un axone par diffusion passive (Sodeik *et al.*, 1997). Le VHS-1 capitalise sur le réseau de microtubule cellulaire afin de faciliter le transport de la capsid vers le noyau. Cela requiert la présence de protéines cellulaires telles heat shock protein 90 (Hsp90), dynéine et dynactine, ainsi que certaines protéines du tégument (Zhong *et al.*, 2014). Une protéine mineure de la capsid, VP26 (UL35), a été démontrée comme étant à la fois importante pour le transport actif de la capsid, mais aussi non-essentielle (Dohner *et al.*, 2006). De plus, la présence du tégument interne augmente l'efficacité du transport de la capsid vers le noyau (Wolfstein *et al.*, 2006). Il a été observé qu'un complexe de protéine virale VP1/2 et UL37 voyage avec la capsid et que ce complexe protéique colocalise avec celle-ci au niveau de la membrane nucléaire (Bucks *et al.*, 2007). Cela suggère la participation de VP1/2 et d'UL37 dans le transport actif de la capsid vers le noyau. Lorsque la capsid arrive à la membrane nucléaire externe (MNE), la nucléocapsid s'accostera aux complexes de pores nucléaires (NPC) via un mécanisme dépendant de la  $\beta$  importine et de la Ran-GTP, et expulsera son génome dans le nucléoplasme (Ojala *et al.*, 2000). La protéine virale VP1-3 semblerait aussi jouer un rôle dans l'attachement aux NPC et dans la libération du génome viral (Ojala *et al.*, 2000).

Certaines protéines du tégment seront quant à elles libérées dans le cytoplasme pour faciliter l'établissement d'une infection productive. La protéine virale « virion host shutoff » (VHS) dégrade les ARN messagers (ARNm) cellulaires, diminuant la demi-vie de ces ARN et réduisant à la baisse la synthèse protéique cellulaire (Kwong *et al.*, 1988). D'autres protéines virales voyageront indépendamment de la capsidie vers le nucléoplasme, tel VP16, afin d'aider à l'initiation de l'expression des gènes viraux (Antinone *et al.*, 2010a, O'Hare *et al.*, 1988).

### **1.3.3 Expression temporelle des gènes viraux et réplication du génome viral**

L'arrivée du génome viral dans le noyau sera suivi de l'expression des gènes viraux en phase séquentielle, ainsi que du remodelage extensif du nucléoplasme (figure 1.3) (Honess *et al.*, 1974). Les premiers gènes à être exprimés sont les gènes immédiats-précoces, aussi appelés gènes  $\alpha$ . Le promoteur de ces gènes possède des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaire tels les facteurs de transcription Sp1 et Oct1, permettant leur expression (Nogueira *et al.*, 2004, Whitlow *et al.*, 2009). Toutefois, la protéine du tégment VP16 est un transactivateur génique important interagissant avec les facteurs de transcription cellulaires, et est essentiel à l'initiation de l'expression des gènes viraux  $\alpha$  (Wysocka *et al.*, 2003) Les cinq gènes immédiats-précoces sont *ICP0*, *ICP4*, *ICP22*, *ICP27*, et *ICP47* (Ace *et al.*, 1989, Honess *et al.*, 1974). Ceux-ci sont impliqués dans des mécanismes de défense contre les mécanismes antiviraux cellulaires, ainsi que dans la régulation des gènes viraux. La protéine virale ICP0 dégrade plusieurs protéines cellulaires dont P53 ainsi que les corps nucléaires PML, via son activité d'E3-ubiquitine ligase (Boutell *et al.*, 2003a, Boutell *et al.*, 2003b, Everett *et al.*, 2006, Everett *et al.*, 2004). La protéine virale ICP47 inhibe la présentation antigénique aux cellules T, en interagissant avec la protéine cellulaire TAP impliquée dans le chargement de peptides au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Ahn *et al.*, 1996, Burgos *et al.*, 2006b, Lacaille *et al.*, 1998). La protéine virale ICP27 est impliquée à la fois dans l'inhibition de l'épissage alternatif des ARNm cellulaires et dans le transport des ARNm viraux hors du noyau afin de promouvoir leur traduction (Hann *et al.*, 1998, Hardy *et al.*, 1994, Pearson *et al.*, 2004). ICP22 quant à elle, inhibe l'expression génique en recrutant la kinase virale UL13 à l'ARN polymérase II (ARN pol II) afin de la phosphoryler (Bastian *et al.*, 2009, Fraser *et al.*, 2007, Rice *et al.*, 1995). Finalement, la protéine virale ICP4 est nécessaire à l'expression des gènes viraux précoces, appelés gènes  $\beta$ , ainsi que dans l'inhibition des gènes viraux  $\alpha$  (DeLuca *et al.*, 1984, Leopardi *et al.*, 1995, Lium *et al.*, 1996, Samaniego *et al.*, 1995).

Les gènes  $\beta$  codent pour des protéines virales impliquées dans la production de nouveaux génomes viraux. Il existe chez le VHS-1 trois sites d'origine de la réplication; sept gènes  $\beta$  sont considérés comme étant essentiels et suffisants à la réplication virale à partir de ces sites (Conley *et al.*, 1981, Marchetti *et al.*, 1988, Parris *et al.*, 1988, Purifoy *et al.*, 1977, Schaffer *et al.*, 1973, Stow, 1985, Stow *et al.*, 1986, Weller *et al.*, 1983, Weller *et al.*, 1985). Ces gènes codent pour le complexe d'ADN polymérase virale (UL30, UL42), le complexe d'ADN hélicase-primase (UL5, UL52, UL8), la protéine de liaison au site d'origine (UL9), ainsi que la protéine de liaison à l'ADN simple-brin ICP8 (UL29).

D'autres protéines, impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, sont considérées comme étant non-essentiels à la réplication virale telle la ribonucléotide reductase (UL39, UL40) et la thymidine kinase virale (UL23). Ces gènes sont toutefois considérés comme étant essentiels à la réplication du génome viral lors de l'infection de cellules en manque de nutriment, ou en état non-réplicatif, tel les neurones adultes où les cellules n'expriment aucun gène impliqué dans le métabolisme des acides nucléiques (Brandt *et al.*, 1991, Cameron *et al.*, 1988, D. J. Goldstein *et al.*, 1988a, D. J. Goldstein *et al.*, 1988b, Jacobson *et al.*, 1989a, Jacobson *et al.*, 1989b).

La réplication du génome viral à partir des trois sites d'origines de la réplication mène à la présence de concatémères complexes. De plus, la réplication du génome viral est hautement recombogénique. Des brins d'ADN homologues sont couramment échangés à l'intérieur du génome, entre différents génomes viraux de virus homologues tel le VHS-1 et le VHS-2, ainsi qu'avec des plasmides contenant des séquences virales (Bruckner *et al.*, 1992, Dutch *et al.*, 1992, Hayward *et al.*, 1975, Honess *et al.*, 1980, Sheldrick *et al.*, 1975, Smiley *et al.*, 1990, P. C. Weber *et al.*, 1988). L'existence d'isomères du génome viral, dont les régions UL et US sont inversées, implique des mécanismes de recombinaison homologue via les régions terminales et internes répétées (Bruckner *et al.*, 1992, Dutch *et al.*, 1992). Des virus mutants ne possédant pas les régions terminales et internes répétées peuvent se répliquer de façon efficace dans des lignées cellulaires immortalisées, mais sont sévèrement affectés pour la réplication virale dans des cellules primaires, suggérant un rôle spécifique de la recombinaison homologue *in vivo*. Les protéines du VHS-1 analogues aux recombinaisons Red  $\alpha$  et  $\beta$  du phage  $\lambda$ , l'exonucléase alcaline (UL12) et ICP8, stimulent et favorisent la recombinaison homologue lors de la réplication virale (Schumacher *et al.*, 2012, D. E. Wilkinson *et al.*, 2004). Des protéines cellulaires, telles RAD51, RPA, et le complexe MRE11 jouant un rôle dans la liaison à l'ADN simple-brin et dans la recombinaison homologue cellulaire, pourraient aussi être impliquées (D. E. Wilkinson *et al.*,

2004). Les mécanismes exacts et l'importance biologique de la recombinaison homologue chez les virus de l'herpès demeurent inconnus.

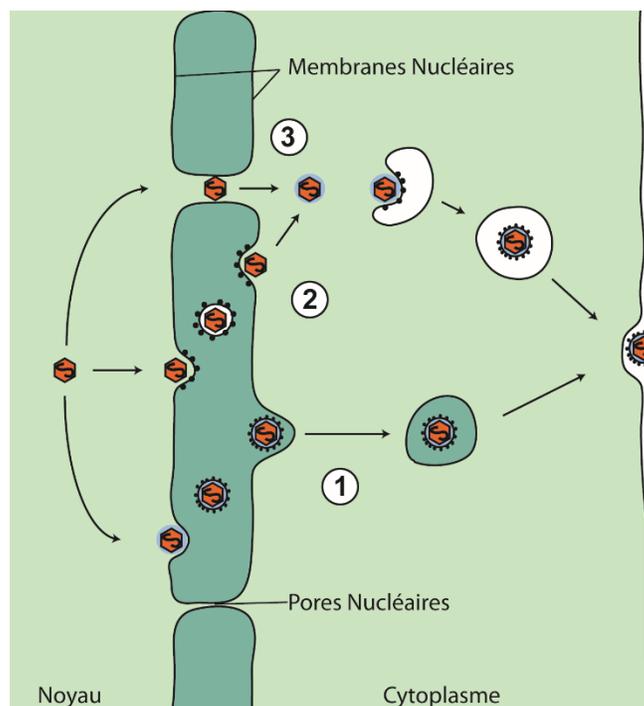
Les gènes tardifs, appelés gènes  $\gamma$ , sont les derniers à être exprimés. L'expression de certains gènes tardifs dépend partiellement de la réplication du génome viral (gènes  $\gamma_1$ ), tandis que pour d'autres, l'expression en dépend totalement (gènes  $\gamma_2$ ) (Fields *et al.*, 2007). Ces gènes codent pour des protéines structurales de virions infectieux (capside, tégument, glycoprotéines), pour des protéines impliquées dans l'encapsidation du génome viral, ainsi que pour des protéines impliquées dans les étapes de sortie des virions de la cellule. Au moins sept gènes viraux tardifs sont impliqués dans l'encapsidation des génomes viraux : *UL6*, *UL15*, *UL17*, *UL25*, *UL28*, *UL32*, et *UL33* (al-Kobaisi *et al.*, 1991, Baines *et al.*, 1994, Baines *et al.*, 1992, Cavalcoli *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 1996, Lamberti *et al.*, 1996, McNab *et al.*, 1998, Patel *et al.*, 1995, Poon *et al.*, 1993, V. G. Preston *et al.*, 1983, Reynolds *et al.*, 2000, Salmon *et al.*, 1998a, Salmon *et al.*, 1998b, Sheaffer *et al.*, 2001, Taus *et al.*, 1998a, Taus *et al.*, 1998b, Tengelsen *et al.*, 1993, D. Yu *et al.*, 1997, D. Yu *et al.*, 1998a, D. Yu *et al.*, 1998b). Il a été proposé que le complexe composé d'*UL15*, d'*UL28*, et d'*UL33* serve de terminase pour cliver l'ADN viral concatémérique en monomère (Heming *et al.*, 2014). La protéine *UL25* quant à elle servirait de bouchon pour retenir le génome viral dans la capsidie une fois encapsidé (Cockrell *et al.*, 2009, McNab *et al.*, 1998, Ogasawara *et al.*, 2001).

#### 1.3.4 Sortie du virus

Il existe trois modèles pouvant expliquer les mécanismes de sortie du virus du noyau (figure 1.4). Le premier modèle stipule que la capsidie acquiert son enveloppe via la fusion avec la membrane nucléaire interne (MNI), et que des vésicules de transport voyageront jusqu'à la membrane plasmique où les virus seront relâchés par exocytose (Leuzinger *et al.*, 2005, Wild *et al.*, 2005). Historiquement, le second modèle est celui du double enveloppement où les capsides seront d'abord enveloppées à la MNI puis relâchées au niveau de la MNE (Mettenleiter *et al.*, 2009). Le tégument sera acquis surtout dans le cytoplasme puis l'enveloppement final se fera avec des vésicules provenant du trans-golgi. Ces vésicules voyageront jusqu'à la membrane plasmique puis le virus sera relâché par exocytose. Finalement, le troisième modèle est celui du double enveloppement simple où une minorité des virions acquerra leur enveloppe à la MNI; la majorité des virus sortira du noyau via des pores nucléaires élargis et acquerra l'enveloppe finale dans le cytoplasme (Leuzinger *et al.*, 2005, Wild *et al.*, 2005, Wild *et al.*, 2009). Le modèle du double enveloppement est favorisé à ce jour (figure 1.3).

Malgré la présence de trois modèles de sortie nucléaire, le consensus est que la capsid virale subit un enveloppement à la MNI (Figure 1.3). Pour se faire, la MNI et la lamina nucléaire doivent subir des changements afin de permettre à la capsid d'être enveloppée (Scott *et al.*, 2001). Les protéines virales UL31 et UL34, la kinase virale Us3, ainsi que la kinase cellulaire PKC sont impliquées dans la modification de la MNI. La protéine UL31 agit comme compétiteur des lamines au sein de la MNI, les délogeant et affectant la composition de cette membrane (Reynolds *et al.*, 2002). Son interaction avec UL34, une protéine virale ancrée dans la MNI, augmente la délocalisation des lamines nucléaires, tandis que la kinase cellulaire PKC dépolymérise les lamines (Bjerke *et al.*, 2006, Hocevar *et al.*, 1993, Leach *et al.*, 2010). La kinase virale Us3 agit comme régulateur de l'activité du complexe UL31/UL34 sur les lamines via la phosphorylation de ces protéines virales (Bjerke *et al.*, 2006). D'autres protéines virales pourraient aussi être impliquées dans l'enveloppement de la capsid avec la MNI, tel les glycoprotéines gB, gD, et gM (Farnsworth *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2011, Skepper *et al.*, 2001).

**Figure 1.4 Modèles de sortie cellulaire : Trois modèles existent pour expliquer la sortie du virion de la**



cellule. 1) Le premier modèle décrit un enveloppement simple au niveau de la membrane nucléaire. 2) Le second modèle, majoritairement accepté, décrit un enveloppement primaire au niveau de la membrane nucléaire, ainsi qu'un enveloppement secondaire au niveau du cytoplasme. 3) Le troisième modèle suggère que la nucléocapside virale sort du noyau cellulaire via des pores nucléaires élargis, pour ensuite être tégumenté dans le cytoplasme et subir un enveloppement simple.

Une fois dans l'espace inter-membranaire, les vésicules fusionneront avec la MNE afin de relâcher les capsides dans le cytoplasme (Figure 1.3, 1.4). Ce processus pourrait impliquer les protéines virales UL20, gK, et VP16 puisqu'en leur absence, l'on observe une accumulation de capsides virales dans l'espace péri-nucléaire (Jayachandra *et al.*, 1997, Mossman *et al.*, 2000). Une délétion du gène *Us3* du virus de la pseudo-rage (PRV), l'homologue porcin du VHS-1, démontre aussi une accumulation de capside dans l'espace périnucléaire, impliquant cette kinase dans les étapes d'enveloppement primaire (Wagenaar *et al.*, 1995). Enfin, la présence d'*Us3* favorise la localisation d'UL34 à la membrane nucléaire (Bjerke *et al.*, 2006, Mou *et al.*, 2007, Ryckman *et al.*, 2004). Cette observation ne semble toutefois pas impliquer la phosphorylation d'UL34 car la mutation du site de phosphorylation de cette protéine n'altère pas sa localisation à la membrane nucléaire (Ryckman *et al.*, 2004).

La tégumentation se déroule principalement dans le cytoplasme, progressivement via une série d'interactions entre protéines, formant d'abord le tégument interne, puis le tégument externe (Figure 1.3, 1.4). Ces protéines servent à connecter la capside à son enveloppe, et participent à l'entrée ainsi qu'à la sortie du virus de la cellule (Mettenleiter *et al.*, 2006). La première couche du tégument interne est composée des protéines virales UL36 et UL19, formant les pentons de la capside, et interagissant avec la protéine virale UL37 (Cardone *et al.*, 2012). Les étapes subséquentes de la tégumentation ne sont toujours pas élucidées. La protéine virale UL48 est une protéine majeure du tégument qui, en plus d'un rôle dans la transactivation des gènes  $\alpha$ , interagit avec les protéines UL49 et UL41 (VHS) dans le cytoplasme (Fuchs *et al.*, 2002a, Lillycrop *et al.*, 1993). Son absence mène à un défaut de la maturation des virions dans le cytoplasme. De plus, une étude suggère qu'elle interagit aussi avec les glycoprotéines gB, gD et gH (Q. Zhu *et al.*, 1994). Ces données suggèrent qu'UL48 joue un rôle majeur dans la formation du tégument externe en connectant plusieurs protéines virales entres-elles, ainsi qu'en les connectant aux glycoprotéines virales. Enfin, la complexité de l'interactome des protéines du tégument révèle une certaine redondance des mécanismes de tégumentation et d'acquisition de l'enveloppe finale (Vittone *et al.*, 2005).

Lors de l'enveloppement secondaire, les capsides bourgeonnent dans des vésicules provenant du trans-golgi où les glycoprotéines virales sont insérées de sorte à ce que leur queue cytoplasmique soit en contact avec les protéines du tégument (Figure 1.3, 1.4) (McMillan *et al.*, 2001, Remillard-Labrosse *et al.*, 2009, Sugimoto *et al.*, 2008, Turcotte *et al.*, 2005). Certaines glycoprotéines virales dites non-essentielle se sont révélées cruciales à l'acquisition de l'enveloppe finale. Des mutations dans le complexe protéique formé des glycoprotéines E et I

(gE/gI), ou des mutations en gM, peuvent avoir un impact léger sur la capacité de former des plages de lyses en culture cellulaire (Lee *et al.*, 2009, Leeger *et al.*, 2009). Cependant, la combinaison de mutations en gM et en gE mène à un blocage de l'enveloppement, et ce malgré la capacité de la capsidie à acquérir son tégument (Farnsworth *et al.*, 2003). Il a été démontré via la technique de double-hybride en levure que gE et gM interagissent tous deux avec UL49 présente dans le tégument (Fuchs *et al.*, 2002b). Cette redondance peut expliquer la présence d'un phénotype sévère seulement lorsque *gE* et *gM* sont tous deux mutés. Finalement, le complexe gE/gI s'accumule à des sites de contact entre cellules (Farnsworth *et al.*, 2006b). Il a été suggéré que ces glycoprotéines s'associeraient à un récepteur intracellulaire au niveau de la membrane plasmique et permettraient la sortie directionnelle du virus pour faciliter l'infection intercellulaire.

### 1.3.5 Réplication virale en contexte neuronal

Les neurones sont les cellules ciblées par le VHS-1 comme site d'établissement de la latence. Toutefois, le VHS-1 a dû s'adapter au faible métabolisme de nucléotides dans les neurones adultes afin de pouvoir s'y répliquer. La thymidine kinase (TK) virale, le complexe de ribonucléotide reductase (RR) virale, ainsi que la protéine virale  $\gamma$ 34.5, contribuent à la capacité du VHS-1 de se répliquer dans les neurones (Bolovan *et al.*, 1994, Hay *et al.*, 1995, Jacobson *et al.*, 1989a).

TK virale (*UL23*) est une phosphotransférase impliquée dans le métabolisme des pyrimidines (Fields *et al.*, 2007). Cette protéine phosphoryle la thymidine, formant la dTMP, permettant à celle-ci d'être reconnue par les kinases cellulaires et de produire de la dTTP essentielle à la réplication de l'ADN. Contrairement à la TK cellulaire, la TK virale peut agir sur une large gamme de substrats, tel des analogues de la guanine (Darby *et al.*, 1981).

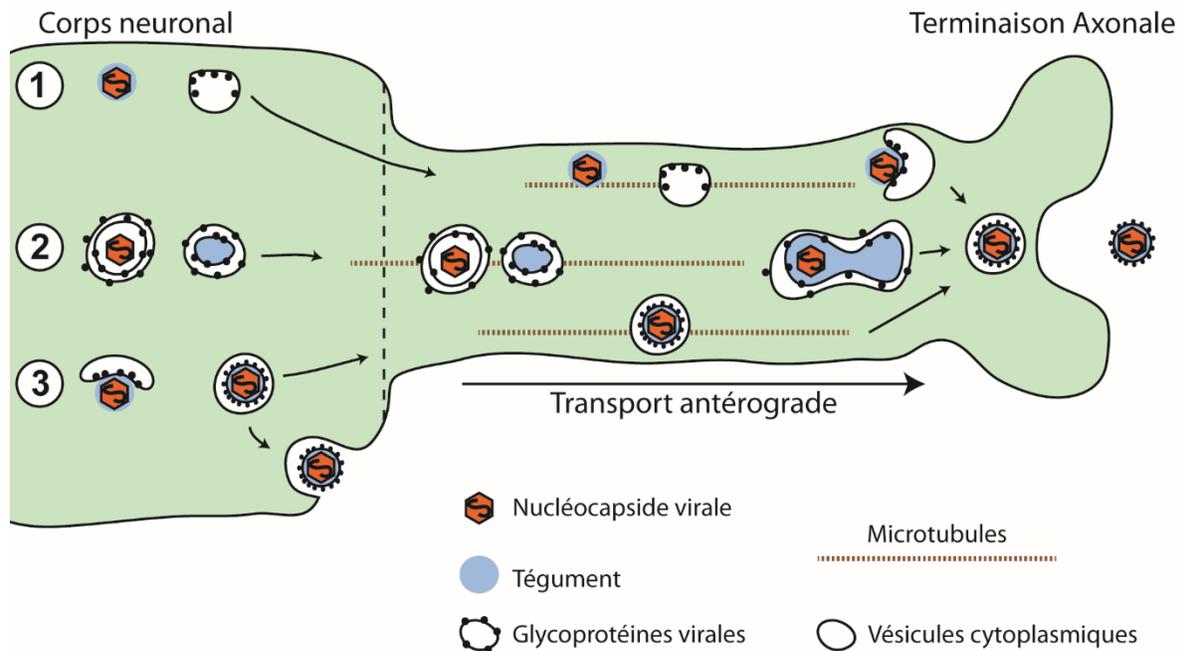
Le complexe RR virale, formé des sous-unités R1 (ICP6) et R2 (UL40), génère les déoxyribonucléotides essentiels à la polymérisation de l'ADN (Boehmer *et al.*, 1997). Ces deux sous-unités sont caractérisées par des cinétiques d'expression différentes et peuvent agir indépendamment l'une de l'autre. La sous-unité R1 est exprimée avec une cinétique immédiate précoce, possède une activité de protéine kinase (PK), et est associée à une activité anti-apoptotique (Perkins *et al.*, 2002). R2 quant à elle est exprimée avec une cinétique précoce et ainsi confère une cinétique précoce de l'activité de ribonucléotide réductase (Cohen *et al.*, 1972). Il a été démontré que des mutations en R1, autant chez le VHS-1 que chez le VHS-2, réduit

drastiquement la neurovirulence chez la souris, ainsi que l'efficacité de réplication virale dans des neurones primaires et dans des cellules qui ne sont pas activement en division (Cameron *et al.*, 1988, Jacobson *et al.*, 1989a). De plus, la protéine R1 interagit avec la caspase 8, protégeant ainsi les cellules de la mort cellulaire par apoptose (Chabaud *et al.*, 2007, Dufour *et al.*, 2011a, Dufour *et al.*, 2011b, Langelier *et al.*, 2002). En effet, contrairement à l'infection par un virus de type sauvage, l'infection de cellule HeLa par un mutant déficient en R1 ne peut empêcher l'induction de l'apoptose via l'ajout de  $TNF\alpha$ , via l'activation du récepteur Fas, ou via l'ajout de Poly (I - C) simulant la présence d'ARN double brin (Chabaud *et al.*, 2007, Dufour *et al.*, 2011a, Dufour *et al.*, 2011b, Langelier *et al.*, 2002).

La protéine virale  $\gamma_1$  ICP34.5 joue une double fonction lors de l'infection. Elle agit comme antagoniste de la protéine cellulaire PKR afin de prévenir l'arrêt de la synthèse protéique par la cellule, et inhibe l'induction de l'autophagie (He *et al.*, 1997, Leib *et al.*, 2009, Orvedahl *et al.*, 2007). Lors d'infection *in vivo*, l'absence de cette protéine virale mène à une diminution sévère de la neurovirulence (Bolovan *et al.*, 1994, Orvedahl *et al.*, 2007). Contrairement aux lignées cellulaires épithéliales, l'infection de primaires tel les fibroblastes embryonnaires murins par un virus déficient en ICP34.5 ne peut se poursuivre dû à l'incapacité du virus à antagoniser la PKR (He *et al.*, 1997, Wylie *et al.*, 2009).

### **1.3.6 Sortie cellulaire en contexte neuronal**

Les neurones se distinguent des autres types cellulaires par le prolongement de leur cytoplasme sur de grandes distances en structures appelées axones. Le VHS-1 utilise ces axones afin de se disséminer sur de longue distance, en suivant les chemins synaptiques. Les mécanismes de sortie cellulaire du VHS-1 dans les neurones demeurent toutefois incompris. Deux modèles, appuyés par des expériences, existent afin de décrire le site d'enveloppement final du virion ainsi que la nature des particules virales voyageant le long de l'axone (Figure 1.5) (Kratchmarov *et al.*, 2012). Le modèle marié stipule que la particule virale mature est formée au niveau du corps neuronale, et que des vésicules contenant les virions infectieux voyagent le long de l'axone jusqu'aux sites de sortie. Le second modèle, appelé le modèle séparé, décrit la sortie cellulaire comme étant le transport parallèle de capsides non-enveloppées et de vésicules contenant les glycoprotéines virales voyageant le long de l'axone, vers le site d'enveloppement finale et de sortie cellulaire aux régions distales de l'axone.



**Figure 1.5 Modèles de sortie neuronale : Trois modèles existent pour expliquer l'enveloppement de la capsidie dans le neurone et la sortie aux terminaisons axonales. 1) Le premier modèle décrit le transport séparé le long de l'axone de la nucléocapsidie virale et de vésicules cytoplasmiques contenant les glycoprotéines virales, suivi de l'acquisition de l'enveloppe finale aux sites distaux de l'axone. 2) Un second modèle décrit le transport de vésicules cytoplasmiques possédant des glycoprotéines virales contenant la nucléocapsidie virale, et de vésicules cytoplasmiques contenant des glycoprotéines et des protéines du tégument, suivi de la formation du virion infectieux mature aux sites distaux. 3) Enfin, le dernier modèle décrit l'enveloppement finale au niveau du corps neuronal, suivi du transport axonal de la particule virale infectieuse mature vers les terminaisons axonales. Ce dernier modèle est présentement accepté.**

En faveur du modèle marié, des études en microscopie électronique ont démontré la présence de capsides enveloppées le long des axones (Feierbach *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2011). De plus, il a été observé en utilisant des versions de la glycoprotéine virale et de la protéine de capsidie Vp26, étiquetées avec les protéines fluorescentes GFP et mRFP respectivement, que celles-ci voyagent ensemble le long de l'axone lors d'une infection par le VHS-1 (Antinone *et al.*, 2010b). Cependant, dans certains cas, les auteurs ont identifiés du signal de VP26-mRFP voyageant en absence de gB-GFP. Toutefois, cette observation peut être expliquée par les niveaux de fluorescence associés à gB-GFP sous le seuil de détection de leurs expériences.

En contrepartie, le modèle séparé a été proposé suite à l'observation en microscopie électronique de capsides non-enveloppées dans les axones en chambre de Campenot, où la culture de neurones dans un anneau de téflon à plusieurs compartiments permet de séparer les

terminaisons axonales des corps neuronaux (Penfold *et al.*, 1994). De plus, des capsides non-enveloppées ont été observées dans les axones en présence d'un inhibiteur du système sécrétoire et de l'enveloppement final de la capside, la brefeldine-A (Dasgupta *et al.*, 2001). Toutefois, d'autres études utilisant la brefeldine-A ont démontré un blocage complet de l'entrée des capsides dans les axones, compliquant ainsi l'interprétation des résultats (Snyder *et al.*, 2006).

Enfin, la protéine membranaire virale Us9 a été identifiée comme étant importante pour le transport antérograde des virions en interagissant avec la protéine motrice cellulaire Kif1A (Enquist *et al.*, 2002, Kratchmarov *et al.*, 2013, Snyder *et al.*, 2008). Le modèle séparé est incompatible avec un rôle de Us9 dans le transport de glycoprotéines et de capsides dénudées le long de l'axone (Snyder *et al.*, 2008). Une version révisée du modèle séparé a donc été proposée, où des capsides voyageraient indépendamment des glycoprotéines, dans des vésicules possédant uniquement la protéine virale membranaire Us9 (Snyder *et al.*, 2008). Toutefois, ce dernier modèle ne concorde pas avec les observations initiales en microscopie électronique de capsides non-enveloppées le long des axones. Le modèle marié est présentement favorisé pour décrire la sortie cellulaire en contexte neuronale.

## **2 Pathogenèse du VHS-1**

Le VHS-1 est un virus neurotrope qui, suite à l'infection de cellules épithéliales, infecte les neurones sensitifs et entre en latence. L'infection des neurones se fait dans les terminaisons axonales innervant les muqueuses périphériques. Caractéristiquement, l'infection se disséminera vers le ganglion trigéminal (TG) lors de l'infection des muqueuses des lèvres et du visage.

Plusieurs protéines virales sont dites non-essentielle lors de l'infection virale en culture cellulaire. Cependant, certaines d'entre elle s'avèrent importantes lors d'infection *in vivo*. Ces protéines virales sont appelées des déterminants de la pathogenèse, et jouent des rôles spécialisés dans les mécanismes d'entrée et de sortie de l'infection latente, dans le tropisme cellulaire *in vivo*, dans la dissémination virale à travers des tissus animaux complexes, ainsi que dans les interactions avec le système immunitaire.

### **2.1 Innervation sensorielle de la périphérie**

Les trois régions anatomiques du visage sont desservies en innervations somatosensorielles via trois nerfs : le nerf ophtalmique, le nerf maxillaire, et le nerf mandibulaire

(Netter, 1999, Ziyal *et al.*, 2004). Les axones du nerf ophtalmique sont projetés au niveau du front, des paupières supérieures, de la cornée, de la conjonctive, des muqueuses des sinus frontales, éthmoidales, et sphenoidales, et au niveau du dorsum du nez. Le nerf maxillaire dessert la lèvre supérieure, les régions latérales du nez, une partie de la cavité orale, les muqueuses de la cavité nasale, le sinus maxillaire, la mâchoire supérieure, et le palais. Les axones du nerf mandibulaire sont projetés au niveau des pommettes du visage, de la lèvre inférieure, du menton, des dents inférieures, de la gencive, de la muqueuse de la mâchoire inférieure, du plancher de la bouche, et au niveau des deux tiers antérieures de la langue. Finalement, ces trois nerfs se regroupent au niveau de la base du crâne pour former le ganglion neuronal sensitif appelé ganglion trigéminal (TG).

Les projections axonales au niveau du visage sont regroupées en fascicules : des regroupements de fibres nerveuses entourées de différents tissus conjonctifs nommés endonèvre et périnèvre (Netter, 1999, Ziyal *et al.*, 2004). Tandis que l'endonèvre est composé de collagène et recouvre une fibre nerveuse, le périnèvre est composé de cellules myofibroblastes épithéloïdes et peut regrouper plusieurs fascicules. Enfin, certains gros regroupements de fascicules sont recouverts à leur tour d'une membrane dense composée de tissus connectifs appelés l'épinèvre. Des terminaisons axonales libres émanent des fascicules afin de sonder la périphérie pour de l'information somatosensorielle tel la localisation et la pression, et la douleur et la température. De plus, les branches du TG projettent aussi des fibres nerveuses à propriétés motrices. Ces fibres sont projetées vers des muscles impliqués dans la mastication et dans l'avalement, ainsi que vers le muscle de l'oreille interne (tensor tympani) impliqués dans l'étouffement des sons, tels que ceux produits lors de la mastication (Walker, 1990).

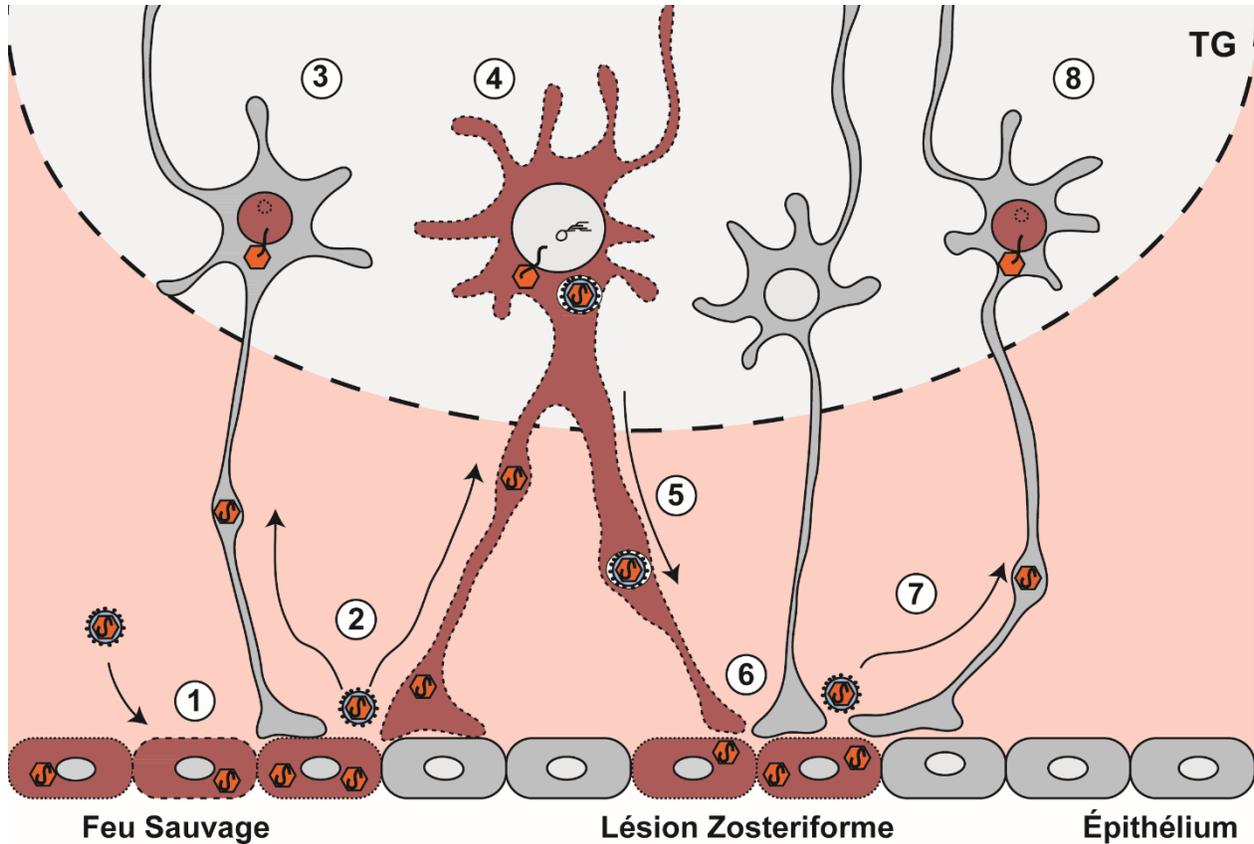
La cornée est le tissu périphérique le plus densément innervé, desservit par le nerf ophtalmique du TG (J. He *et al.*, 2010, Marfurt *et al.*, 2010). Les fibres nerveuses pénètrent le globe oculaire uniformément via la périphérie, au niveau des régions basales de la cornée. Ces fibres nerveuses se ramifient graduellement en fibres nerveuses plus petites en traversant les différentes couches de l'œil, pour enfin rejoindre les cellules épithéliales de la surface. Les terminaisons axonales intraépithéliales sont elles aussi ramifiées à une densité de 608 terminaisons par mm<sup>2</sup> (Marfurt *et al.*, 2010, Muller *et al.*, 2003). Tout comme le reste du visage, l'innervation de la cornée joue un rôle somatosensoriel. Toutefois, les terminaisons axonales de la cornée jouent un rôle supplémentaire au niveau du maintien de l'intégrité de la cornée. Les neurones sécrètent des substances trophiques permettant l'homéostasie de la cornée, et activent des voies de signalisation du pont du système nerveux central pour stimuler certains réflexes tel

le clignement des yeux ainsi que la production de larmes (Marfurt *et al.*, 2010). La communication de l'information entre cellules épithéliales, ainsi qu'entre les cellules épithéliales et les neurones, se fait par sécrétion de molécules dans le milieu extracellulaire, ainsi que par la présence d'hémicanaux (Oswald *et al.*, 2012). Ce contact étroit entre les cellules épithéliales de la cornée et les terminaisons axonales permet un transfert rapide d'informations, telles les blessures à la cornée. Les neurones détectent certaines molécules associées à la mort cellulaire en périphérie, tels les nucléotides, via des récepteurs cellulaires purinergiques (P2), déclenchant une mobilisation intraneuronale de calcium (Oswald *et al.*, 2012). Une fois les neurones activés, ceux-ci vont à leur tour libérer certaines molécules au niveau de la cornée, tels de l'ATP et du glutamate, ainsi que la substance P, afin de recruter des cellules lymphatiques et permettre la guérison du tissu périphérique.

## 2.2 L'anatomie du ganglion trigéminal

Le TG est composé d'une multitude de cellules tel les astrocytes, les microglies, des lymphocytes sentinelles, ainsi qu'une grande diversité de neurones. Les neurones du TG sont considérés comme étant post-mitotiques, où il y a une absence de la réplication de l'ADN cellulaire mais ayant un métabolisme élevé afin de permettre la communication inter-neuronale. Ces neurones sont pseudo-unipolaires; ils ne possèdent aucune dendrite mais plutôt un long axone qui relie la périphérie au système nerveux centrale (CNS) ainsi qu'au tronc cérébrale (Lazarov, 2002). Les neurones des ganglions sensitifs ont longtemps été classifiés selon la taille de leur corps cellulaire, le degré de myélination, ainsi que la cible de leurs terminaisons axonales (Lazarov, 2002). Toutefois, de plus récentes études ont établi une nomenclature basée sur les différents marqueurs cellulaires tels que les différents canaux à ions ainsi que les récepteurs neuronaux somatosensorielles. Les classes de neurones sensitifs primaires impliquées dans la biologie du VHS-1 correspondent, mais ne sont pas limités, aux types cellulaires exprimant les molécules suivantes: 1) Les neurones nociceptifs présentant le récepteur à NGF Trk<sub>A</sub>, 2) les neuropeptides substance P (SP) et « calcitonin gene-related peptide » CGRP, 3) la synthase d'oxide nitrique de cerveau (b-NOS), 4) le glycoconjugué SSEA3, 5) le neurofilament RT97, et 6) les glycoconjugués KH10 et A5 (Lazarov, 2002). Malgré que ces différents sous-types neuronaux soient présents tant chez les rats, les souris, et les humains, leurs proportions peuvent varier dépendamment des espèces (Lazarov, 2002). De plus, chez l'homme et la souris, les neurones

du TG peuvent co-exprimer certains de ces marqueurs, compliquant ainsi leur identification. Tous ces sous-types neuronaux sont susceptibles à l'infection par le VHS-1.



**Figure 1.6** Infection primaire *in vivo* : Le virus infecte d'abord les cellules épithéliales des muqueuses, où le virus se réplique, causant la mort cellulaire et une lésion cutanée appelée le feu sauvage (1). Le virion infectieux pourra accéder aux terminaisons axonales innervant le dermatome infecté, et voyager par transport axonal rétrograde vers les corps neuronaux situés dans le ganglion neuronal (2). Les neurones infectés entreront soit en latence (3), ou en cycle d'infection lytique (4). Lorsqu'une infection productive neuronale est établie, des particules virales infectieuses sont produites, et voyageront par transport axonal antérograde vers la périphérie (5). L'infection d'un neurone permettra au virus d'infecter des régions distales au site d'infection primaire, produisant ainsi des lésions zosteriformes, des lésions cutanées ressemblant au zona causé par le VZV (6). De nouvelles terminaisons axonales pourront alors être accessibles, permettant au virus d'établir une infection latente dans un grand nombre de neurone (7). Les cytoplasmes rouges représentent des infections lytiques, les noyaux cellulaires rouges représentent les infections latentes.

## 2.3 La neuropathogénèse virale

### 2.3.1 L'infection aiguë du ganglion trigéminal

L'infection des terminaisons axonales en périphérie permet l'établissement d'une infection productive dans les ganglions neuronaux (Figure 1.6). Les neurones infectés entreront soit en latence ou en cycle de réplication virale lytique. Lors de l'infection aiguë neuronale, le virus peut réinfecter la cornée causant des lésions zosteriformes, et permettant au virus d'accéder à de nouvelles terminaisons axonales et d'établir la latence dans un grand nombre de neurones (Figure 1.6) (Thompson *et al.*, 2000).

L'infection d'un neurone par le VHS-1 résulte en l'expression de gènes viraux lytiques, indépendamment de l'initiation de la réplication du génome viral. Toutefois, la régulation des gènes immédiat-précoces dans les neurones diffère de la régulation génique dans les cellules épithéliales. Il a été observé chez des souris transgéniques non infectées où le promoteur viral d'ICP4 a été intégré dans le génome murin que ce promoteur est activé dans les cellules de Schwann, mais ne l'est pas dans les cellules neuronales (Taus *et al.*, 2001). En contrepartie, chez d'autres souris transgéniques, les promoteurs d'ICP27 et d'ICP0 ne sont activés que dans certains sous-types de neurones du TG (Loiacono *et al.*, 2002). En fait, la régulation du promoteur d'ICP0 dépend de l'âge de ses souris transgéniques, ainsi que de la présence du facteur de transcription neuronal Olf-1, exprimé de façon différentielle dans différents types de neurones (Loiacono *et al.*, 2002). Il a été suggéré que l'entrée en cycle d'infection lytique dans un neurone puisse être favorisée par une haute multiplicité d'infection cellulaire, augmentant le nombre de produits viraux lytiques dans les temps précoces de l'infection neuronale. La charge virale dans un neurone ne dépend pas de la capacité du virus à s'y répliquer, suggérant que la capacité du virus à réinfecter un même neurone à partir de la périphérie pourrait jouer un rôle dans l'établissement d'une infection neuronale productive (Thompson *et al.*, 2000). Enfin, le sous-type de neurone infecté serait aussi impliqué dans le choix d'entrée ou non en cycle d'infection lytique. Les neurones positifs pour le marqueur A5 ont été identifiés comme étant non-permissifs à l'infection par le VHS-1 en culture cellulaire, contrairement au VHS-2 pouvant s'y répliquer (Bertke *et al.*, 2011).

L'infection d'un grand nombre de neurones dans un tissu neuronal dépend de la capacité du virus à y établir une infection productive et produire des virions infectieux. En contrepartie, la charge génomique virale neuronale, c'est-à-dire le nombre moyen de génome viral présent dans un neurone, est indépendante de la capacité du virus à établir une infection productive dans un tissu neuronal. (Thompson *et al.*, 2000). La charge génomique virale neuronale dépend plutôt de

la quantité de virus pouvant rejoindre les neurones à partir de la périphérie. L'infection productive du TG par le VHS-1 va permettre au virus de rapidement réinfecter la périphérie par voie antérograde en suivant le parcours axonal, ce qui mène à l'apparition de lésions zosteriformes dans les muqueuses entourant le dermatome initialement infecté (Figure 1.6). Les lésions zosteriformes sont des lésions cutanées suivant les nerfs infectés, pouvant ressembler aux lésions présentes lors de la réactivation du VZV causant une maladie appelée le zona, ou le Herpes Zoster en anglais. Ces lésions permettront au virus d'accéder à de nouvelles terminaisons axonales et ainsi d'augmenter l'étendue de l'infection au sein du ganglion neuronal. Bien que le virus puisse être relâché à partir des corps neuronaux, la dissémination interneuronale du VHS-1 est limitée aux chemins synaptiques. Les corps neuronaux dans le TG sont isolés les uns des autres, entourés de cellules gliales moins permissives à l'infection (Card *et al.*, 1993, Lokensgard *et al.*, 2002, Reinert *et al.*, 2012, R. Wilkinson *et al.*, 1999). De plus, une astroglie est induite suite à l'infection par le VHS-1, augmentant de façon significative le nombre d'astrocytes présent dans les ganglions neuronaux, limitant d'avantage la dissémination de l'infection au sein du tissu (Card *et al.*, 1993). La capacité du VZV à se répliquer de façon efficace dans les cellules gliales, contrairement aux VHS-1 et VHS-2, pourrait expliquer en partie certaines différences de la neuropathogénèse de ce virus (Assouline *et al.*, 1990, Baiker *et al.*, 2004). Les cellules de Schwann, formant la gaine de myéline de l'axone, peuvent aussi être infectées par le VHS-1 (Ohara *et al.*, 2001). La détection de gaines de myéline infectées est souvent associée à la présence d'un axone infecté, ou à une région de l'endoneurium où des antigènes viraux sont détectés (Ohara *et al.*, 2001). Il a donc été suggéré que la dissémination virale interneuronale puisse se faire via les lésions zosteriformes en périphérie, entre axones au niveau de l'endoneurium lors du transport antérograde axonale, ou via la présence même de virus dans l'espace intercellulaire de l'endoneurium (Ohara *et al.*, 2001).

### **2.3.2 L'établissement de la latence**

L'établissement d'une infection latente efficace correspond à une haute fréquence de neurones infectés de façon latente, ainsi qu'à un nombre élevé de génome latent par neurone. La charge virale périphérique, ainsi que la réplication virale en contexte neuronal, contribuent tous les deux à une charge virale latente élevée (S. H. Chen *et al.*, 2004, Thompson *et al.*, 2000). Une infection latente est caractérisée par un patron très restreint d'expression de gènes viraux lytiques et à l'expression des transcrits associés à la latence (LAT), spécifiques à l'infection latente et ne codant pour aucune protéine. Les génomes viraux latents sont conservés sous forme d'épisome

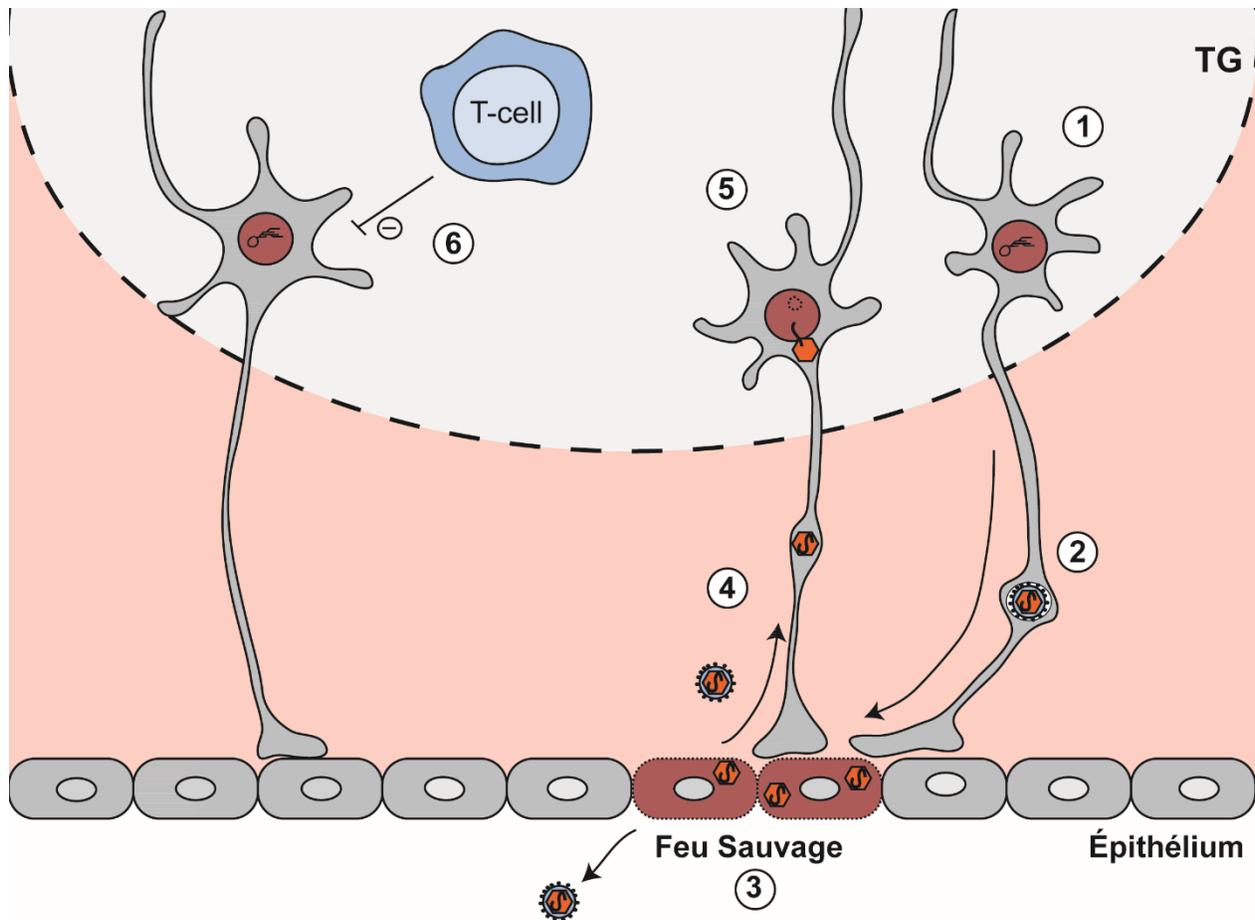
dans le noyau des neurones, et sont associés à des histones hypoacétylés, menant à la réduction de l'expression génique (Efstathiou *et al.*, 2005). La région LAT du génome viral est quant à elle associée à des histones acétylés, permettant au promoteur d'être actif (Efstathiou *et al.*, 2005). Les transcrits LAT ne sont toutefois pas nécessaires à l'établissement et au maintien de la latence (Ho *et al.*, 1989). L'activité du promoteur LAT est spécifique aux neurones (Taharaguchi *et al.*, 2002, Taharaguchi *et al.*, 2003). L'expression de ces transcrits résulte en l'expression de plusieurs microARN ciblant des gènes viraux ainsi que cellulaires, et favorisant l'entrée en infection latente (Umbach *et al.*, 2008). Enfin, une étude a identifié par « microarray » que l'infection latente altère de façon significative le transcriptome des neurones (Clement, 2008, Kramer, 2003). Les gènes affectés sont impliqués dans le métabolisme et la maturation des protéines, dans le métabolisme des carbohydrates, dans l'adhésion cellulaire, dans l'apoptose, ainsi que dans les défenses de l'hôte et la réponse immunitaire (Clement *et al.*, 2008).

Il a été suggéré que l'entrée en latence est due à l'incapacité du virus à exprimer ses gènes lytiques immédiat-précoces à des niveaux suffisamment élevés, tel lors de l'infection de neurones non-permissifs à l'infection lytique par le VHS-1 (Bertke *et al.*, 2011). En effet, les neurones non-permissifs sont associés à des niveaux élevés des transcrits LAT lors de leur infection. De plus, des infections de cultures de TG *ex vivo* ont révélé qu'une infection distale des terminaisons axonales, contrairement à l'infection au niveau des corps neuronaux, favorise l'entrée en latence (Hafezi *et al.*, 2012). Ceci pourrait être expliqué par la perte du facteur de transcription viral VP16 lors du transport axonale. VP16 se lie au facteur de transcription Oct-1, ainsi qu'à la protéine cellulaire HCF-1 qui permet sa localisation nucléaire. Ce complexe protéique se lie à l'ADN viral et augmente significativement l'expression des gènes immédiat-précoces. En absence de VP16 lors de l'infection neuronale, l'expression de gènes immédiat-précoces risque de ne pas être suffisamment élevée pour permettre l'entrée en cycle d'infection lytique, ce qui favorise ainsi l'entrée en latence.

Des variations de l'expression génique cellulaire pourraient aussi être impliquées dans les mécanismes d'établissement de la latence. Le facteur de transcription Oct-1, via son interaction avec HCF et VP16, permet l'expression de gènes immédiat-précoces. Toutefois, cette protéine est régulée à la baisse dans les neurones (Valyi-Nagy *et al.*, 1991). Plusieurs facteurs de transcription neuronaux reconnaissent et inhibent les promoteurs immédiat-précoces. Le facteur de transcription Olf-1, se liant au promoteur d'ICP0, est exprimé différenciellement dans différents sous-types de neurones (Devireddy *et al.*, 2000, N. G. Jones *et al.*, 2003). De plus, la présence d'un facteur de transcription cellulaire, Zhangfei, se lie à la protéine cellulaire HCF et inhibe

l'expression d'ICP-0 (Akhova *et al.*, 2005). ICP0 serait impliqué dans l'établissement de la latence à plusieurs niveaux. Sa présence est requise pour déjouer des réponses anti-virale intrinsèques à la cellule et favoriser l'entrée en cycle d'infection lytique. ICP0 a aussi été identifiée comme pouvant inhiber le complexe REST-CoREST impliqué dans l'inhibition de l'expression génique, et pouvant interagir avec la déacétylase d'histone HDAC2 afin de favoriser l'expression de gènes viraux (Ferenczy *et al.*, 2011). Enfin, un second facteur de transcription cellulaire, Luman, séquestre HCF dans le cytoplasme des neurones sensitifs et affecte la localisation neuronale d'ICP0. Lors de l'infection de neurones primaires, ICP0 ne peut s'accumuler dans le noyau des neurones, et ainsi ne peut dégrader les corps ND10 (Xp Chen *et al.*, 2000). De plus, les niveaux de protéines cellulaires Zhangfei et Luman peuvent diminuer les quantités de HCF libre, pouvant normalement interagir avec VP16 pour activer l'expression des gènes immédiat-précoces dans les neurones. Il faut noter que l'expression exogène de VP16 chez des souris transgéniques n'empêche pas l'établissement de la latence dans les neurones, et ne favorise pas la réactivation virale à partir de la latence, suggérant que l'établissement de la latence dépendrait de plusieurs autres facteurs (Sears *et al.*, 1991). Enfin, un microARN neuronal, miR-138, a été identifié comme pouvant cibler les transcrits d'ICP0 et inhiber son expression (Pan *et al.*, 2014). La mutation des séquences ciblées par miR-138 sur les transcrits d'ICP0 mène entre autres à une augmentation de l'expression d'ICP0 dans les neurones et à l'augmentation de l'expression des gènes viraux lytiques.

Les transcrits LAT sont exprimés en abondance lors de la latence et jouent un rôle dans l'établissement ainsi que le maintien de l'infection latente. Les transcrits LAT sont présents dans le cytoplasme et sont associés à des polyribosomes ainsi qu'à des facteurs d'épissage, tandis qu'un intron de 2 kbp s'accumule dans le noyau neuronal (Ahmed *et al.*, 2001, Thomas *et al.*, 2002). Ces transcrits ont été identifiés comme étant importants pour le maintien de la latence. Des études chez la souris ont démontré qu'en absence de LAT, on observe une augmentation de la perte de neurones infectés de façon latente sur une longue période de temps comparativement au virus de type sauvage (M. P. Nicoll *et al.*, 2013, M. P. Nicoll *et al.*, 2012a). Ceci pourrait être dû à un rôle de *LAT* dans la survie neuronale, ou comme facteur anti-apoptotique. La présence des transcrits LAT coïncide avec la régulation à la baisse des transcrits viraux lytiques (Margolis *et al.*, 1992). Plusieurs microARN sont exprimés à partir de régions en périphérie ou à l'intérieur du cadre de lecture du gène *LAT* (Kang *et al.*, 2006, Umbach *et al.*, 2008, Umbach *et al.*, 2010).



**Figure 1.7** Réactivation de l'infection latente : L'infection latente peut se réactiver suite à un stress, et initier le cycle d'infection lytique (1). Des particules virales infectieuses seront produites et voyageront par transport axonal antérograde vers la périphérie, causant une lésion des muqueuses appelée feu sauvage (2). De nouvelles terminaisons axonales seront alors accessibles au virus, permettant d'établir une infection latente dans de nouveaux neurones (3). Lorsqu'une infection latente tente de se réactiver, des cellules T réagiront à la présence de produits lytiques viraux et inhiberont l'évènement de réactivation virale, participant ainsi au maintien de l'infection latente (4). Les cytoplasmes rouges représentent des infections lytiques, les noyaux cellulaires rouges représentent les infections latentes.

Parmi les huit microARN du VHS-1, six d'entre eux sont exprimés uniquement lors de la latence (miR-H2, H3, H4, H5, H7 et H8), l'un est exprimé lors de l'infection aiguë ainsi que lors de la latence (miR-H1), et le dernier n'est exprimé que lors de l'infection productive (miR-H6) (Kang *et al.*, 2006, Umbach *et al.*, 2008, Umbach *et al.*, 2010). Les cibles de seulement quatre micro-ARN chez les simplexvirus ont été identifiées à ce jour. Chez le VHS-1, miR-H6 inhibe l'expression d'ICP4 tandis que miR-H2 réduit les quantités de protéines d'ICP0 (Tang *et al.*, 2009, Umbach *et al.*, 2008). Chez le VHS-2, miR-H3 et miR-H4 réduisent l'expression du facteur de neurovirulence ICP34.5 (Tang *et al.*, 2008, Tang *et al.*, 2009). De plus, deux petits ARN sont aussi exprimés à partir du transcrit LAT (LAT s-RNA). LAT s-RNA-2 a été associé à une réduction des

niveaux de protéines d'ICP4 (Shen *et al.*, 2009). En transfection transitoire, LAT s-RNA-1 a été associé à une réduction sévère des titres viraux lors d'infection en culture cellulaire.

### 2.3.3 La réactivation virale à partir de la latence

Le maintien de la latence est le résultat de facteurs viraux, de facteurs cellulaires et du système immunitaire. Le neurone tente de maintenir le génome viral sous forme d'épisome, lié à des histones déacétylés, afin de réprimer l'expression de gènes viraux ; l'expression de miR-138 ciblant ICP0 contribue à l'inhibition de l'expression des gènes viraux lytiques. Le virus exprime les transcrits LAT afin de promouvoir la survie des neurones infectés de façon latente. Enfin, des lymphocytes T circulant dans les ganglions neuronaux ciblent les neurones exprimant des gènes viraux lytiques et inhibent la progression en cycle d'infection lytique tout en permettant la survie neuronale (Figure 1.7).

Certains transcrits viraux lytiques du VHS-1 peuvent être détectés dans un tissu où la latence est établie (Kramer *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 2014). Il a été proposé que la latence puisse s'animer dans une grande quantité de neurones qui tenteront d'exprimer des gènes viraux lytiques, mais qu'une réponse antivirale force l'infection à retourner en latence (Feldman *et al.*, 2002). En effet, lors d'analyse de neurones individuels, les quantités de transcrits viraux lytiques lors de la latence corrélaient avec de hauts niveaux de transcrits cellulaires associés à une réponse anti-virale intrinsèque (Feldman *et al.*, 2002). Enfin, plusieurs cellules immunitaires circulent dans les TG humains lors de la latence et sont spécifiques contre des protéines virales de classes cinétiques et structurales variées (St Leger *et al.*, 2011, van Velzen *et al.*, 2013). Ces observations suggèrent que chez la souris, de nombreuses barrières cellulaires existent afin d'empêcher la progression de la réactivation virale en infection productive.

L'explantation de ganglions neuronaux où la latence a été établie est un stress suffisant pour induire la réactivation virale *ex vivo*. Lors de la réactivation virale *ex vivo*, l'expression des gènes lytiques est désordonnée (Du *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2012). Plusieurs stimuli externes, ainsi que des facteurs menant à l'immunosuppression, peuvent induire des événements de réactivation virale. Les neurones des ganglions sensitifs sont en contact intime avec les cellules épithéliales ; un dommage des muqueuses périphériques, une augmentation de la température, ou la présence d'un composé chimique peuvent induire une cascade de signalisation intracellulaire des neurones, et ainsi modifier son état transcriptionnel. Le récepteur neuronal VR-1, lorsqu'activé, induit l'expression de PKA et de la forme cyclique de l'adénosine monophosphate (cAMP) dans les neurones, et peut réactiver l'infection latente dans des cultures neuronales (Hunsperger *et al.*,

2003). L'activation de voies de signalisation cellulaire impliquant le cAMP dépend de l'expression du répresseur précoce inductible par cAMP (ICER) (Jaworski *et al.*, 2003). ICER seul agit comme répresseur en se liant à des sites CRE. Les niveaux de transcrits viraux LAT sont diminués lors de la réactivation à partir de la latence ; le promoteur LAT contient des sites CRE. Le facteur cellulaire inductible ICER pourrait donc participer à la réactivation virale en régulant à la baisse les transcrits LAT. En effet, il a été observé qu'ICER est induit lors de stress thermique, un stress pouvant réactiver l'infection chez l'animal (Naranjo *et al.*, 1997). De plus, l'ajout exogène d'ICER lors d'infection quiescente dans une culture neuronal peut réactiver l'infection (Colgin *et al.*, 2001).

Les mécanismes d'acétylation des histones sont fortement associés aux mécanismes de réactivation à partir de la latence. L'inhibition des déacétylases d'histones (HDAC), les protéines cellulaires responsables de l'inhibition de la transcription via la déacétylation des histones, est un stress suffisant pour induire un événement de réactivation virale (Neumann *et al.*, 2007). La protéine virale ICP0 peut participer à la réactivation virale de façon similaire. Lorsqu'exprimé par le virus, ICP0 peut dissocier les HDAC du complexe de protéine REST/CoREST pour ainsi contrer l'inhibition de la transcription de gènes viraux par la cellule (Ferenczy *et al.*, 2011). Des éléments présents dans le promoteur d'ICP0 peuvent interagir avec certaines protéines cellulaires associées au stress. Lors de l'explantation des TG, l'expression du facteur cellulaire Bcl-3 est induite dans les neurones. Ce facteur peut se lier à un facteur d'acétylation d'histone, Tip60, ainsi qu'à une sous-unité de NF $\kappa$ B. Le promoteur d'ICP0 contient des éléments de liaison à NF $\kappa$ B, et donc Bcl-3 pourrait y être recruté lors de différents stress et augmenter l'expression d'ICP0 via l'acétylation des histones (Tsavachidou *et al.*, 2001). De plus, le facteur cellulaire HCF, normalement restreint au cytoplasme dans les neurones, est transloqué vers le noyau suite à l'explantation des TG, pouvant participer à l'augmentation de l'expression d'ICP0 (Kristie *et al.*, 1999). Enfin, la modulation de certains facteurs physiologiques peut participer à la réactivation de la latence. En culture neuronale, le retrait du facteur de croissance neuronal (NGF) est associé à une réactivation de l'infection latente ; l'infection latente *in vivo* chez la souris peut être réactivée en utilisant des anticorps spécifiques contre le NGF (J. M. Hill *et al.*, 1997, Wilcox *et al.*, 1990). De plus, nous retrouvons des éléments de réponse à l'hormone thyroïde (TRE) dans certains promoteurs de gènes viraux lytiques. L'ajout de l'hormone thyroïde en culture neuronale mène à l'inhibition de l'expression de la TK ainsi qu'ICP0, et il a été suggéré qu'une variation dans les niveaux de l'hormone thyroïde chez l'humain puisse jouer un rôle dans la réactivation virale (Hsia *et al.*, 2011, Hsia *et al.*, 2010).

## 2.4 La réponse immunitaire contre une infection par le VHS-1

Le VHS-1 peut causer des infections récurrentes en contexte d'un système immunitaire compétent. Cependant, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs permettent de limiter grandement la sévérité de ces infections. L'infection primaire est principalement contrôlée par le système immunitaire inné, tandis que le système immunitaire adaptatif joue un rôle important dans le maintien de la latence et la réponse aux infections récurrentes (Carr *et al.*, 2001).

L'infection par le VHS-1 est détectée de façon précoce par des senseurs cellulaires contre différents patrons moléculaires associés aux infections virales (PRR). Une infection par le VHS-1 peut générer plusieurs ARN à double brin, exprimés à partir de cadres de lecture ouverts se chevauchant en sens inverse dans le génome viral (F. Weber *et al.*, 2006). Les ARN à double brin peuvent être détectés dans les compartiments extracellulaires via le Scavenger Receptor de classe A, au niveau des endosomes intracellulaires par le TLR3, et au niveau du cytosol via les senseurs RIG-I et MDA5 (Gill *et al.*, 2008, Melchjorsen *et al.*, 2010, Suzuki *et al.*, 1997). L'ADN viral est reconnu par le récepteur « toll-like » (TLR) 9 des endosomes, ainsi que dans le cytoplasme par les protéines cellulaire DAI, Nalp3, et AIM2 (Hornung *et al.*, 2009, Krug *et al.*, 2004, Lund *et al.*, 2003, Rathinam *et al.*, 2010, Stutz *et al.*, 2009, Tang *et al.*, 2008). Les lipopeptides viraux peuvent aussi être reconnus par le complexe TLR2/6; gD présent sur le virion extracellulaire peut être reconnu par le TLR2 présent à la surface des cellules NK (Kim *et al.*, 2012). L'activation des TLR mène à une réponse d'interféron de type I, protectrice contre l'infection par le VHS-1, induisant l'expression de plusieurs autres senseurs intracellulaires impliqués dans la réponse antivirale tel le senseur d'ARN PKR (Heinicke *et al.*, 2009). L'absence de certaines de ces molécules confère une susceptibilité aux infections par le VHS-1 ainsi qu'une augmentation de la sévérité des symptômes.

La réponse cellulaire du système immunitaire innée joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par le VHS-1 en périphérie. Les cellules NK peuvent reconnaître les virions via le TLR2, ainsi que les cellules infectées via la régulation à la baisse du complexe MHC de classe I par la protéine virale ICP47 (Kim *et al.*, 2012). Malgré certains résultats contradictoires chez la souris, pouvant être expliqués par des variations génétiques associés aux souches murines et virales utilisées, plusieurs études démontrent une corrélation entre l'absence de cellules NK et NKT avec une augmentation de la sévérité des infections et avec une augmentation de la fréquence d'encéphalites virales (Grubor-Bauk *et al.*, 2008, Nandakumar *et al.*, 2008). Les neutrophiles phagocytent les cellules apoptotiques ou nécrotiques infectées, et sécrètent du TNF $\alpha$  pouvant

induire l'apoptose chez les cellules infectées (Lundberg *et al.*, 2007). Les macrophages sont aussi recrutés aux sites infectés, participent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'à la présentation antigénique (Ellermann-Eriksen, 2005, Kodukula *et al.*, 1999). Ces cellules sécrètent du TNF, de l'interleukine (IL) 6, la molécule RANTES, des interférons de type 1, ainsi que de l'oxide nitrique (NO). Les macrophages servent à limiter la dissémination de l'infection aux sites périphériques ainsi qu'au niveau des tissus neuronaux. Des souris déficientes en iNOS, enzyme permettant la production de NO, démontrent une augmentation de la réplication virale au niveau des ganglions neuronaux (Zolini *et al.*, 2014). Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle important en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Elles permettent d'activer les cellules B et T, ainsi que les cellules NK via la sécrétion de l'IL18 suite à la reconnaissance de l'infection par le VHS-1 (Barr *et al.*, 2007). Il a été observé que des souris déficientes en DC démontrent une augmentation de la neurovirulence suite à l'infection par le VHS-1, principalement dû à une réponse cellulaire inadéquate impliquant les cellules NK, les cellules T CD4+, et les cellules T CD8+ (Mott *et al.*, 2008). Au sein de tissus neuronaux, les cellules gliales jouent un rôle dans le contrôle de l'infection virale par le VHS-1. Les astrocytes sont des cellules non-permissives, pouvant restreindre l'infection via leur forte expression du TLR3 (Reinert *et al.*, 2012). L'infection de tissus neuronaux mène à une astrocytose, limitant la dissémination de l'infection virale en entourant les neurones. Les microglies, cellules phagocytaires du système nerveux, expriment les TLR1 à 9 et sécrètent plusieurs cytokines proinflammatoires tel que font les macrophages en périphérie. Les oligodendrocytes ainsi que les neurones n'expriment que le senseur d'ARN double brin, le TLR-3, expliquant l'importance de ce senseur intracellulaire pour la protection contre le VHS-1 (Reinert *et al.*, 2012).

Les cellules T CD8+ de la réponse immunitaire adaptative jouent un rôle crucial dans la défense contre le VHS-1. Elles sécrètent de l'interféron gamma pouvant induire un état antiviral protecteur au niveau des cellules. Elles peuvent induire l'apoptose via la sécrétion de perforin, de granzyme activant la caspase 3, et interagissent avec le récepteur de mort CD95 menant à l'activation de la caspase 8. Les cellules T CD8+ circulant dans les ganglions neuronaux maintiennent l'état latent, prévenant ainsi la réactivation de l'infection virale. Toutefois, puisque les neurones sont difficilement remplaçables, la reconnaissance de neurones infectés par les cellules T CD8+ mène à la sécrétion de granzymes A et B non-cytolytiques (Knickelbein *et al.*, 2008, Pereira *et al.*, 2000). Contrairement à l'action de la granzyme B en périphérie, celle-ci mène au clivage d'ICP4 dans les neurones (Knickelbein *et al.*, 2008). La sécrétion de granzyme A protège les neurones et limite la dissémination virale intraganglionnaire via un mécanisme inconnu. En ce qui concerne la réponse humorale du système immunitaire adaptatif, le rôle des

cellules B dans la protection contre la VHS-1 demeure controversé. Chez les souris, les cellules B ne semblent pas offrir de protection significative contre les infections primaires par le VHS-1 ; toutefois, le transfert d'anticorps spécifiques contre le VHS-1 peut offrir une protection contre le VHS-1 et être utilisé comme prophylactique (Kumel *et al.*, 1985).

## **2.5 Les modèles d'étude de la neuropathogenèse**

Les virus VHS-1 et VHS-2 sont capables d'infecter une grande variété d'hôtes animales, tels les primates non-humains, les rongeurs, et la volaille. Plusieurs modèles d'études de la pathogenèse virale sont alors disponibles. Toutefois, considérant que ces animaux ne sont pas les hôtes naturels de ces virus, la neuropathogenèse virale va différer de l'humain ainsi que d'un animal à l'autre. Par exemple, les souris et les rats offrent la possibilité d'étudier la pathogenèse virale chez un grand nombre d'animaux à faible coût, mais le virus ne peut se réactiver spontanément tel chez les lapins ou les cochons d'inde (Webre *et al.*, 2012). Le choix du modèle animal se fera selon le sujet des études en question.

### **2.5.1 Les modèles d'étude de la réplication virale neuronale**

Les déterminants de la réplication virale neuronale sont nécessaires à l'établissement d'une infection virale productive dans les tissus nerveux, peu importe la voie d'infection utilisée. La réplication virale neuronale dépend de la capacité du VHS-1 à se répliquer en absence de synthèse d'ADN, ainsi que d'empêcher l'arrêt de la synthèse protéique tel que discuté précédemment. Bien que les infections *in vivo* à partir de la périphérie permettent de caractériser la réplication virale dans un neurone, l'infection directe de neurones demeure la méthode convoitée pour caractériser les déterminants de la réplication virale neuronale. *In vivo*, les infections intraoculaires, intranasales, intraganglionnaires, ainsi qu'intracrânielles permettent au virus d'infecter des cellules épithéliales tout en permettant d'accéder directement aux neurones et de s'y répliquer, limitant ainsi la contribution de la réplication virale dans les muqueuses (Card *et al.*, 1991, Kopp *et al.*, 2009, Shimeld *et al.*, 1985, Shivkumar *et al.*, 2013). L'avantage des infections neuronales *in vivo* est de permettre la caractérisation de la réplication virale neuronale en contexte d'un système immunitaire compétent, ainsi qu'en contexte tissulaire natif. Cependant, lors d'infections *in vivo*, il est très difficile de contrôler pour la multiplicité d'infection par cellule, n'y d'assurer l'infection d'un seul type cellulaire.

La culture de neurone primaire peut permettre un meilleur contrôle de certains paramètres d'infection. Les neurones embryonnaires primaires de souris ou de rats, du système nerveux central ou du système nerveux périphérique, sont facilement cultivables et permettent de faire ressortir des phénotypes associés à un défaut en la réplication virale neuronale *in vivo* (Perkins *et al.*, 2002). Il est aussi possible d'étudier les infections neuronales par le VHS-1 en contexte de culture de neurones provenant de souris adultes. Cependant, contrairement aux neurones primaires embryonnaires, la culture de neurones adultes nécessite l'ajout de plusieurs facteurs de croissance neuronale additionnels afin de promouvoir la survie cellulaire (Eide *et al.*, 2005). Puisque le VHS-1 peut infecter une grande variété d'hôte, il est aussi possible de cultiver et d'infecter des tissus neuronaux provenant d'autres animaux, tel la volaille (Hafezi *et al.*, 2012). Enfin, il est possible de réguler à la baisse la synthèse de nucléotides dans des cellules immortalisées lorsque celles-ci sont cultivées en absence de sérum, permettant d'y caractériser des facteurs de réplication virale neuronale (D. J. Goldstein *et al.*, 1988a, D. J. Goldstein *et al.*, 1988b).

### **2.5.2 Les modèles d'étude de la dissémination de l'infection**

Il existe plusieurs méthodes d'infection *in vivo* permettant de caractériser des déterminants de la dissémination : les infections oculaires, les infections des babines autour des moustaches, les infections de la peau au niveau du flanc, les infections des coussinets de la patte, ainsi que les infections intra-vaginales, (Allan *et al.*, 2003, Blakeney *et al.*, 2005, Leib *et al.*, 1989, Shivkumar *et al.*, 2013). Puisque des neurones afférents et efférents sont présents dans la rétine de l'œil, les infections intraoculaires peuvent être utilisés afin d'étudier les mécanismes de transport axonaux rétrograde et antérograde en parallèle *in vivo* (Card *et al.*, 1991). L'infection périphérique se déroule typiquement suite à la scarification légère des muqueuses afin de briser des barrières physiques. Les infections intra-vaginales souvent chez le cochon d'inde sont quant à elle typiquement utilisées en contexte de modèle d'études du VHS-2.

Toutefois, les modèles *in vivo* permettent difficilement de distinguer entre des mécanismes de dissémination virale impliquant la sortie au niveau de la cellule épithéliale, et le transport rétrograde axonal. Des modèles en culture cellulaire de chambres compartimentés, les chambres de Campenot, ont été mis au point afin de pouvoir caractériser spécifiquement le transport axonal et la dissémination à partir de cellules épithéliales vers les axones (Campenot, 1977). Des anneaux en téflon sont déposés sur des pétris égratignés à l'aide d'aiguilles ; les neurones ensemencés dans la chambre produisent des axones pouvant pénétrer la barrière de l'anneau en

empruntant les voies créées par les égratignures, ce qui sépare les corps neuronaux des terminaisons axonales. Des neurones embryonnaires primaires typiquement en provenance du système nerveux périphérique sont utilisés puisqu'ils peuvent former de longs axones robustes. L'infection des terminaisons axonales permet d'étudier les facteurs viraux essentiels au transport axonal rétrograde, tandis que l'infection de cellules épithéliales superposées aux terminaisons axonales permet d'étudier les mécanismes viraux impliqués dans l'infection des axones à partir de la périphérie. De plus, il est aussi possible de cultiver des ganglions neuronaux périphériques adultes non-dissociés en contexte de chambre de Campenot, permettant ainsi de caractériser des mécanismes de dissémination virale vers les neurones, en contexte de tissus complet et d'une grande variété de type cellulaire (Campenot, 1977, H. M. McGraw *et al.*, 2009b). Enfin, l'infection des corps neuronaux dans une chambre de Campenot permet l'étude des mécanismes impliqués dans la dissémination virale antérograde, typiquement plus difficiles à étudier en contexte d'infection *in vivo* (H. M. McGraw *et al.*, 2009b).

### **2.5.3 Les modèle d'études de lésions zosteriformes**

L'établissement d'une infection productive *in vivo* dans un ganglion neuronal par le VHS-1 est suivi d'une dissémination antérograde du virus le long du nerf, qui pourra ensuite réinfecter les muqueuses et provoquer l'apparition de lésions cutanées appelées lésions zosteriformes. La caractérisation de ces lésions permet de sonder des facteurs viraux impliqués dans la réplication virale neuronale, dans la dissémination antérograde des neurones vers la périphérie, ainsi que de sonder l'efficacité du système immunitaire innée à contrôler l'infection en périphérie. Malgré que les infections périphériques du visage et des coussinets de la patte provoquent des lésions et de l'inflammation en périphérie, le modèle d'étude privilégié pour la caractérisation de lésions zosteriformes est l'infection du flanc chez la souris (Simmons *et al.*, 1984). Dans ce modèle, la lésion zosteriforme suit le nerf intercostal infecté, infectant une grande superficie de la peau, facilitant la détection de phénotypes. Le modèle d'infection vaginal est aussi utilisé afin d'étudier les lésions zosteriformes et le relâchement de virus lors d'infections récurrentes (Bernstein *et al.*, 1986).

### **2.5.4 Les modèles d'études de l'infection latente par le VHS-1**

Il est estimé que la latence est établie dans le ganglion neuronal chez la souris 30 jours après l'infection périphérique. Lors de l'infection latente, seuls les transcrits viraux LAT sont

abondamment exprimés ; certains neurones sont dits en animation lors de la latence lorsque ceux-ci tentent de se réactiver et expriment de manière transitoire des gènes viraux lytiques. La latence est maintenue via plusieurs interactions entre le virus, la cellule, et le système immunitaire. Les modèles *in vivo* permettent de sonder, via des études histologiques et de quantification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR), la charge virale latente dans les neurones, ainsi que le statut du système immunitaire lors de la latence (Jacobson *et al.*, 1998, van Velzen *et al.*, 2013). Des études longitudinales permettent aussi de caractériser des gènes viraux impliqués dans le maintien de l'infection latente (Nicoll *et al.*, 2013, Nicoll *et al.*, 2012a, Nicoll *et al.*, 2012b).

Cependant, les modèles d'infections *in vivo* peuvent difficilement permettre l'étude de mécanismes précoces impliqués dans l'établissement de la latence, tel la chromatinisation du génome viral. Il est possible d'induire une infection quiescente, analogue à la latence, dans certains types cellulaires, via l'ajout d'antiviraux pour une durée de 7 jours (Danaher *et al.*, 1999). L'infection latente peut aussi être établie en absence d'antiviraux en utilisant des cultures de neurones primaires avec des virus déficients en certaines protéines immédiates-précoces, ou déficients en facteurs de réplication virale neuronales (Jurak *et al.*, 2014). Des cultures d'infections latentes pouvant être réactivées ont aussi été réalisées à partir de tissus neuronaux provenant de souris infectées préalablement (Halford *et al.*, 1996). Finalement, il existe un modèle d'infection quiescente en contexte de cellules non-neuronaux tel les fibroblastes humains, où l'infection par des virus déficients en certaines protéines immédiates-précoces mènent à la circularisation et à la répression du génome viral tel qu'observé *in vivo* (C. M. Preston *et al.*, 1997). Toutefois, les transcrits LAT ne sont observés que lorsque la latence est étudiée en contexte neuronale.

### **2.5.5 Les modèles d'études de la caractérisation de la réactivation virale**

La souris est un des modèles animaux les plus utilisés pour étudier la pathogenèse du VHS-1 *in vivo*. Cependant, aucune réactivation virale spontanée n'est observée chez cet animal pouvant mener à la détection de virus en périphérie. Les infections récurrentes sont typiquement étudiées *in vivo* en contexte d'infection oculaire chez le lapin pour le VHS-1, ainsi qu'en contexte d'infection vaginale chez le cochon d'inde pour le VHS-2 (Blakeney *et al.*, 2005, Webre *et al.*, 2012).

Il existe toutefois des méthodes nous permettant d'induire la réactivation virale chez la souris, typiquement suite à une infection oculaire, et ainsi étudier l'efficacité de la réactivation virale. L'explantation du ganglion neuronal est un stress suffisant permettant d'induire la

réactivation virale (Steiner *et al.*, 1989). Le ganglion neuronal, dissocié ou non, est déposé en coculture avec un tapis de cellules Vero. Les événements de réactivation virale seront détectés via l'apparition d'effets cytopathiques au niveau du tapis cellulaire. Malgré la simplicité de cette technique, la réactivation virale ne se déroule pas en présence d'un tissu intact, ni en présence d'un système immunitaire compétent. La réactivation virale peut-être induite *in vivo* chez la souris via des stressés hyperthermiques, l'ajout d'immunosuppresseur tel le cyclophosphamide et le dexaméthasone, par iontophorese transcornéenne d'épinéphrine, ainsi que par rayons ultraviolets de type B (UVB) (Webre *et al.*, 2012). Cependant, la seule technique ayant démontré la capacité de réactiver l'infection latente en présence d'un système immunitaire compétent chez la souris, et de détecter des virus infectieux en périphérie, est via l'injection intrapéritonéale d'un inhibiteur de déacétylase d'histone, le butyrate de sodium (NaB) (Neumann *et al.*, 2007). Il faut noter que l'efficacité de l'induction de la réactivation virale *in vivo* chez la souris dépend de la souche de souris utilisée; les souris DBA/2 et Balb/c sont typiquement plus susceptibles à l'infection par le VHS-1 que les souris CD-1 et C57BL/6 (Kastrukoff *et al.*, 2012, Perng *et al.*, 2001, Webre *et al.*, 2012).

## **2.6 Les déterminants viraux de la neuropathogénèse**

Les déterminants viraux de la neuropathogénèse sont les diverses protéines virales non-essentielle en culture cellulaire, pouvant jouer des rôles important lors de l'établissement d'une infection productive *in vivo*, dans l'établissement de la latence, ainsi que dans la réactivation virale à partir de la latence. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les déterminants de la réplication neuronale mentionnés précédemment, les protéines virales impliquées dans le transport axonale ainsi que dans la sortie dirigée de cellules polarisées, les protéines virales impliquées dans l'évasion de la réponse immunitaire, ainsi que les transcrits viraux LAT.

### **2.6.1 Déterminants viraux de la réplication neuronale**

La protéine virale RR joue un rôle important dans la réplication virale neuronale *in vivo*. Deux VHS-1 mutants dérivés de la souche sauvage 17, ts1207 et ts1222, comportent une mutation dans le gène *R1* et *R2* respectivement (Cameron *et al.*, 1988). Comparativement aux virus de références, la virulence des virus mutants suite à l'infection intracrâniale et intrapéritonéale, défini par LD50, est diminuée d'un facteur de  $10^6$ . Un second mutant en *R1* appelé delta-ICP6, dérivé de la souche sauvage KOS, a été étudié en contexte d'infection oculaire

chez des souris BALB/c et CD-1 (Brandt *et al.*, 1991). Les titres viraux de delta-ICP6 détectés dans le surfactant oculaire sont réduits de  $1\log_{10}$  par rapport aux virus de référence. Toutefois, les titres viraux dans les TG ainsi qu'au niveau de l'encéphale étaient indétectables ; le virus mutant n'a pu établir une infection latente de façon efficace, pouvant se réactiver suite à l'explantation des TG. La mutation du gène *R1* a aussi mené à une diminution de la sévérité de la maladie au niveau des globes oculaires de la souris, identifiée par la présence d'une kératite et de la vascularisation du globe oculaire. La perte de virulence due à une mutation en *R1* peut être spécifique à l'espèce puisque ce virus mutant peut induire des lésions cutanées lors d'infection cutanée chez le cochon d'inde (Turk *et al.*, 1989). Il est intéressant de noter qu'*UL39* agit comme déterminant de la pathogenèse virale chez le VHS-2 via son activité PK de *R1* (ICP10-PK) et non via son activité de ribonucléotide réductase tel que pour le VHS-1 (Golembewski *et al.*, 2007).

Tout comme le complexe RR, la TK virale est importante pour la contribution du virus au métabolisme d'acides nucléiques cellulaires dans les neurones. La perte de la TK virale induit une perte significative de la neurovirulence *in vivo*. La thymidine kinase virale est accessoire à la réplication virale en périphérie, mais est essentielle pour la réplication virale dans les tissus neuronaux, ainsi que pour la réactivation virale à partir de la latence chez des souris adultes, mais non chez des souris nouveau-nées (Field *et al.*, 1978). Des virus déficients en TK peuvent établir la latence de façon efficace, mais dans un nombre restreint de neurones (Thompson *et al.*, 2000).

Les cellules répondent à une infection par le VHS-1 en induisant un arrêt de la synthèse protéique via PKR, et diminuent l'induction de l'autophagie. ICP34.5 est une protéine virale tardive dont l'absence produit des titres viraux drastiquement inférieurs chez la souris comparativement aux virus de références (Bolovan *et al.*, 1994). Cette protéine est multifonctionnelle. Elle comporte un motif GADD34 lui permettant de se lier à PKR, et possède un site de liaison à la Beclin-1. Son motif GADD34 empêche l'inhibition de la synthèse protéique par la cellule en inhibant la phosphorylation d'eIF2a en recrutant PP1a. Toutefois, la contribution majeure d'ICP34.5 pour la neurovirulence est associée à son inhibition de l'autophagie via sa liaison avec la Beclin-1 (Gobeil *et al.*, 2012, Leib *et al.*, 2009, Orvedahl *et al.*, 2007). Un mutant en ICP34.5 ne pouvant inhiber l'autophagie mais ayant conservé son motif GADD34 produit des titres viraux similaires à ceux du virus de type sauvages en culture cellulaire, mais est sévèrement atténué *in vivo*.

## **2.6.2 Déterminants viraux de la dissémination virale**

Parmi les 13 glycoprotéines virales encodées par le génome du VHS-1, seule gB, gD, gH, gL, et gK sont considérées comme étant essentielles pour établir une infection productive en

culture cellulaire (Fields *et al.*, 2007). De ce fait, la conservation de glycoprotéines virales dites non-essentiels (gC, gE, gI, gG, gJ, gM, gN et UL43) suggère que celles-ci jouent des rôles spécifiques *in vivo* que l'on peut difficilement sonder en contexte d'infection de lignée cellulaire.

Dans un modèle d'infection de l'oreille chez la souris par le VHS-1, l'absence de la glycoprotéine G ou J mène à une réduction d'environ  $1\log_{10}$  des titres viraux neuronaux, tandis que l'absence de gE ou de gI mène à une réduction drastique des titres viraux dans les ganglions neuronaux (Balan *et al.*, 1994). gE et gI sont les sujets d'études approfondies portant sur les mécanismes de dissémination virale entre les cellules épithéliales et les neurones. gE a été démontrée comme étant importante pour la dissémination de différents herpesvirus tel le VZV et le virus de la pseudorange (PrV), l'homologue porcine du VHS-1 (Collins *et al.*, 2003, Farnsworth *et al.*, 2006b, Helen M. McGraw *et al.*, 2009a, H. M. McGraw *et al.*, 2009b, Mo *et al.*, 2003, Stylianou *et al.*, 2009). Lors de l'infection neuronale, gE est impliquée dans le transport de protéines de la capsid, du tégument, ainsi que de certaines glycoprotéines virales vers les axones (Aleksandra Snyder *et al.*, 2008). Le complexe gE/gI ne joue aucun rôle dans l'entrée cellulaire ainsi que dans la réplication virale ; ces glycoprotéines participent à la dissémination de l'infection *in vivo* en jouant un rôle important dans la sortie cellulaire (Collins *et al.*, 2003, Farnsworth *et al.*, 2006b, Johnson *et al.*, 2001, H. M. McGraw *et al.*, 2009b, Aleksandra Snyder *et al.*, 2008). Suite à l'infection du flanc de la souris, l'absence de gE ou de gI chez le PrV permet une dissémination virale rétrograde de type sauvage, mais résulte en une diminution drastique de lésions zosteriformes, suggérant un rôle précis au niveau de mécanismes de transport antérograde (Brittle *et al.*, 2004). En contrepartie, des mutants en gE et gI chez le VHS-1 démontrent un défaut sévère au niveau de la dissémination virale rétrograde suite à l'infection à partir de la peau, mais non lors de l'infection de la rétine (Saldanha *et al.*, 2000) (F. Wang *et al.*, 2005a). Des études en chambre de Campenot ont confirmé l'importance de gE/gI pour l'infection des terminaisons axonales, seulement lorsque ceux-ci sont co-cultivés avec des cellules épithéliales polarisées (H. M. McGraw *et al.*, 2009b). Les différents degrés de neurovirulence associés aux mutants déficients en gE peuvent être dus au modèle d'infection animal utilisé et ainsi à la quantité de terminaisons axonales pouvant être directement infectées.

### **2.6.3 Les protéines virales impliquées dans l'évasion de la réponse immunitaire**

Le VHS-1 a développé plusieurs mécanismes d'évasion de la réponse cellulaire anti-virale intrinsèque. ICP0 a été démontré comme pouvant interférer avec l'activation de gènes stimulés

par l'interféron en inhibant l'action d'IRF3 et d'IRF7 (R. Lin *et al.*, 2004). La kinase virale Us3 a été impliquée dans la protection contre l'apoptose en inhibant le relâchement du cytochrome C de la mitochondrie, et en modulant l'activité de Bad (Cartier *et al.*, 2003). En absence d'Us3, on observe une augmentation de l'induction de l'apoptose, ainsi qu'une réduction du nombre de neurones infectés suite à l'infection périphérique (Asano *et al.*, 2000, Geenen *et al.*, 2005). L'induction de l'apoptose en absence d'Us3 restreint la production de virions infectieux lors de l'infection productive neuronale. Cela limite la formation de lésions zosteriformes permettant au virus d'atteindre de nouvelles terminaisons axonales, menant à la réduction drastique du nombre de neurones infectés dans le TG. De plus, Us3 pourrait favoriser l'infection *in vivo* en modulant à la baisse la réponse aux interférons via les TLR (Peri *et al.*, 2008). Les infections par un virus déficient en Us3 sont plus sensibles au traitement à l'interféron ; des niveaux plus élevés de TLR3 et de MrpA ont été observés lors de l'infection virale par un virus déficient en Us3 (Peri *et al.*, 2008).

La protéine virale ICP34.5 module à la baisse la reconnaissance de l'infection par le système immunitaire via l'inhibition de l'autophagie. La Beclin-1 est un régulateur clé de l'autophagie, dont la signalisation cellulaire implique PKR. ICP34.5 se lie à la Beclin-1 et empêche l'induction de l'autophagie par la cellule suite à l'infection par le VHS-1 (Gobeil *et al.*, 2012, Leib *et al.*, 2009, Orvedahl *et al.*, 2007). Considérant les hauts niveaux d'autophagie au sein d'un neurone, lors d'une infection intracérébrale chez la souris, un virus mutant en ICP34.5 démontre une réduction importante de la mortalité, ainsi qu'à une diminution drastique des titres viraux neuronaux. La neurovirulence d'un mutant en ICP34.5 est rétablie lors d'infection de souris déficiente en la PKR cellulaire (Orvedahl *et al.*, 2007).

Les réponses cellulaires ainsi qu'humorales sont aussi régulées à la baisse par le VHS-1. Les protéines virales Us3 et gB coopèrent afin d'inhiber la présentation antigénique aux cellules NK via le CD1d et ainsi empêcher leur activation (Rao *et al.*, 2011). Us3 peut aussi diminuer les quantités de MHC de classe I à la surface cellulaire dépendamment du type cellulaire (Cartier *et al.*, 2004). La protéine virale ICP47 quant à elle empêche le chargement de peptides viraux sur le transporteur TAP et ainsi inhibe la présentation antigénique via le MHC de classe I (Ahn *et al.*, 1996, Burgos *et al.*, 2006b, Lacaille *et al.*, 1998). La glycoprotéine C, à la surface des virions extracellulaires, protège les particules virales de la neutralisation par le complément (Hook *et al.*, 2006). Lorsque présente à la surface cellulaire, gC protège les cellules infectées de la lyse par le complément en inhibant l'activation de la cascade du complément en se liant avec C3b ainsi qu'en bloquant la liaison de properdin à C5 et C3b (Hung *et al.*, 1994). Finalement, le complexe

hétérodimérique de glycoprotéines virales gE/gI sert de récepteur Fc $\gamma$ , masquant la région Fc, formant des ponts bipolaires d'anticorps (ABB) (Chapman *et al.*, 1999, Ndjamen *et al.*, 2014, Sprague *et al.*, 2004). Les ABB formés à la surface des cellules infectées sont rapidement internalisés et dirigés vers les lysosomes pour la dégradation protéique, contribuant au recyclage de la surface cellulaire infectée, et donc à l'évasion virale de la réponse immunitaire.

Enfin, le virus possède aussi un tropisme pour les cellules immunitaires permettant de moduler la réponse immunitaire de l'hôte. L'infection des cellules T par le VHS-1 inhibe la signalisation du TCR en inhibant la formation du complexe de signalisation LAT (Confer *et al.*, 1990, Posavad *et al.*, 1992, Sloan *et al.*, 2003). De plus, le VHS-1 active les voies de signalisation de JNK ainsi que p38, menant à la sécrétion de l'IL10 et favorisant un profil Th2 plutôt que Th1 (Sloan *et al.*, 2007, Sloan *et al.*, 2003). L'infection des cellules dendritiques par le VHS-1 mène à la dégradation par ICP0 de la molécule cellulaire CD83, marqueur de DC mature impliqué dans la co-stimulation des cellules T (Kummer *et al.*, 2007). De plus, chez les cellules dendritiques, l'interférence de l'autophagie par ICP34.5 inhibe la présentation antigénique et l'activation des cellules T (Gobeil *et al.*, 2012). Finalement, ICP47 du VHS-2 a été démontré comme pouvant diminuer les quantités de HLA-C chez les macrophages et ainsi rendre ces cellules plus susceptibles à la lyse par les cellules NK (Elboim *et al.*, 2013).

## **2.7 La vaccination contre les *alphaherpesvirinae***

La mise au point d'une plateforme vaccinale contre les virus de l'herpès se font souvent chez le cochon d'inde. Un vaccin efficace en modèle animal doit pouvoir réduire l'efficacité de réplication virale en périphérie, empêcher la dissémination virale vers les tissus neuronaux afin de réduire l'incidence d'encéphalite et de mortalité, réduire l'établissement de la latence ainsi que la réactivation virale à partir de la latence. Une variante atténuée du VZV, la souche virale Oka, a été le premier vaccin contre un herpesvirus à être commercialement disponible dans plusieurs pays (Hambleton *et al.*, 2005, Krause *et al.*, 1995, Tan *et al.*, 1996). Ce vaccin permet de protéger la population contre les épidémies de varicelle. Toutefois, la souche vaccinale peut établir la latence et se réactiver pour causer le zona, mais à plus faible incidence qu'un virus de type sauvage (Krause *et al.*, 2000). Afin de prévenir l'apparition du zona, la souche vaccinale peut être administrée à l'âge de 60 ans comme vaccin contre le zona et permettre de réduire de façon significative l'incidence du zona et de la névralgie post-herpétique dans la population.

Aucun vaccin efficace contre le VHS-1 et VHS-2 n'est disponible commercialement en Amérique. Les vaccins produits à partir du VHS-1 et du VHS-2 inactivé, le Lupidon G et Lupidon H respectivement, sont disponibles en Europe ; leur efficacité n'a toutefois pas été démontrée

dans des études cliniques à l'aveugle à grande échelle et ne sont pas approuvés par la FDA en Amérique (Weller, 2011). Un second vaccin produit à partir du VHS-2 inactivé, le vaccin Skinner, est disponible au Royaume Unis, mais n'offre qu'une protection modeste contre la récurrence des infections par le VHS-2 chez les femmes (Weller, 2011). Plusieurs tentatives de mutagenèse ont été effectuées afin de produire un vaccin contre les simplex virus. Des virus atténués possédants par exemples des mutations en UL39 (ICP10deltaPK), ou en gE (NS-gE null), ont été testés comme souche vaccinale et peuvent offrir une protection en modèle animal (Weller, 2011).

La glycoprotéine D, étant une cible importante pour les anticorps neutralisant, est une cible thérapeutique intéressante lors de la production de vaccins sous-unitaires ou de vaccins à ADN. Le vaccin sous-unitaire gD2-MPL, utilisant le MPL comme adjuvant afin de favoriser une réponse immunitaire de type Th1, offre une réduction partielle des symptômes associés au VHS-2 chez les femmes séronégatives pour le VHS-1, mais aucune protection chez l'homme ou chez les femmes déjà séropositives pour le VHS-1 (Thoelen *et al.*, 2001, Weller, 2011). Le vaccin sous-unitaire gD2/gB2-MF59 ne génère aucune protection contre le VHS-1, possiblement car celui-ci engendre une immunité de type Th2 plutôt qu'une réponse de type Th1 (Singh *et al.*, 1998, Stanberry *et al.*, 1989, Straus *et al.*, 1994, Straus *et al.*, 1993, Straus *et al.*, 1997, Valensi *et al.*, 1994). Malgré des résultats positifs en essais pré-cliniques, un essai clinique centré sur l'utilisation d'un vaccin à ADN codant pour la protéine virale gD a démontré l'induction d'une réponse cellulaire seulement chez l'un des quatre participants (Kalema *et al.*, 2012).

Enfin, d'autres tentatives de vaccination ont été effectuées en utilisant des virus mutants produits dans une lignée cellulaire complémentaire et ne pouvant ainsi se répliquer que sur un cycle de réplication virale. Le double mutant dl5-29, n'exprimant pas les protéines virales UL5 et ICP8, peut exprimer plusieurs gènes viraux mais ne peut se répliquer suite à l'infection cellulaire. Des essais pré-cliniques ont démontré que ce virus est sécuritaire chez la souris et le cochon d'inde, même lors d'infections intracérébrales, et peut induire une immunité contre le VHS-1 (Da Costa *et al.*, 2000, Hoshino *et al.*, 2005, Hoshino *et al.*, 2009, Hoshino *et al.*, 2008, C. A. Jones *et al.*, 2000). Ce vaccin est présentement en développement comme vaccin contre le VHS-2 par Sanofi Pasteur.

## **2.8 Le VHS-1 comme virus oncolytique**

Le VHS-1 mutant en la TK virale, un déterminant de la réplication virale neuronale, est le premier exemple de virus modifié dans l'optique de traiter contre un cancer (Martuza *et al.*, 1991).

En absence de TK, le VHS-1 peut se répliquer dans les gliomes, mais ne peut se répliquer dans des neurones sains car ceux-ci ne sont pas en phase répliative. Toutefois, l'absence de la thymidine kinase virale a pour désavantage de ne plus permettre l'utilisation de l'acyclovir comme agent antiviral afin de protéger le patient contre l'infection. Plusieurs autres gènes viraux sont désormais ciblés lors du développement de VHS-1 oncolytique (oVHS) afin de favoriser la répliation virale dans les cellules cancéreuse, tels ICP34.5, RR, Us3, et ICP0 (Benetti *et al.*, 2004, Perkins *et al.*, 2003, Weller, 2011). La présence d'un phénotype syncytiale permet d'améliorer la dissémination virale dans une tumeur, ainsi que permet une meilleur reconnaissance par le système immunitaire (Bateman *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2007, Weller, 2011). De plus, la taille et la structure du génome viral permet de facilement introduire des gènes exogènes pouvant favoriser l'oncolyse. Les gènes codant pour l'IL-4, IL-12, IL-18, et le GM-CSF ont entre autre été utilisés dans le contexte d'oVHS recombinants, IL-12 ayant démontré la meilleure efficacité pour augmenter l'immunité anti-tumorale (Fukuhara *et al.*, 2005, Han *et al.*, 2007, Ino *et al.*, 2006, B. L. Liu *et al.*, 2003, Parker *et al.*, 2000, Parker *et al.*, 2005, Wong *et al.*, 2001, Zabransky *et al.*, 1998). Plusieurs versions du VHS-1 sont présentement testés comme thérapies contres certains cancers. Le virus rRp450, n'exprimant pas la protéine ICP6 et codant pour l'enzyme recombinant cytochrome P450 qui active les oxazaphosphorines telle la cyclophosphamide servant de prodrogue, est en essai pour traiter les tumeurs primaires et les métastases au niveau du foie (Aghi *et al.*, 1999, [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)). Une version du VHS-1, OrientX010, exprimant la hGM-CSF recombinante, est présentement en essai pour traiter différents types de tumeurs solides tel le cancer de la peau, le cancer du foie, et le cancer des poumons (H. Liu *et al.*, 2013, [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)). La souche virale HSV1716, mutante pour le gène ICP6, est présentement testée pour traiter des tumeurs solides extra-crâniennes (Harland *et al.*, 2002, Papanastassiou *et al.*, 2002, Rampling *et al.*, 2000, [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)). La souche virale syncytiale HF10, possédant plusieurs gènes mutés, est en essai pour traiter les métastases de stades 3 et 4 provenant de mélanomes (Takakuwa *et al.*, 2003, [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)). Enfin, la souche virale M032 exprimant l'IL2 humain, basé sur la souche M002 exprimant l'IL12 murin, est en essai comme traitement pour différentes tumeurs du système nerveux central (Parker *et al.*, 2000, [www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)).

## 3 La famille de la protéine virale UL24

### 3.1 Généralités

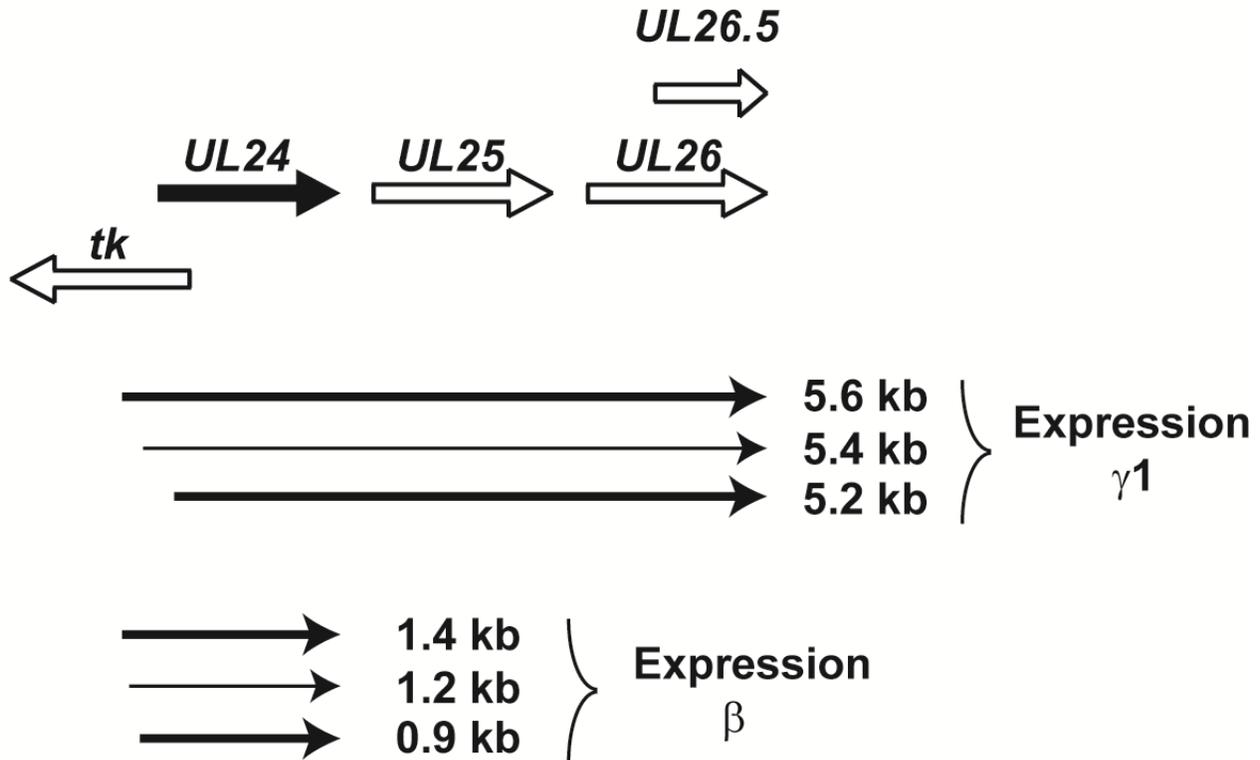
La protéine virale UL24 est codée par un gène ancestral des *herpesviridae*, est hautement conservée à travers les différents virus de l'herpès, et dont la fonction est inconnue (Davison, 2002). Chez le VHS-1, le cadre de lecture ouvert du gène *UL24* chevauche partiellement en sens inverse le cadre de lecture ouvert du gène *UL23*, codant pour la TK virale (McGeoch *et al.*, 1988). UL24 est hautement basique et est composée de 269 acides aminés (aa); elle possède cinq régions d'homologie en sa partie N-terminale que l'on retrouve à travers les différents orthologues d'UL24 (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989b, Knizewski *et al.*, 2006). À l'intérieur des cinq domaines d'homologie, l'on retrouve plusieurs acides aminés hautement conservés, invariable chez les différents orthologues d'UL24 (Knizewski *et al.*, 2006). La partie C-terminale de la protéine est quant à elle plus variable, ne révélant un degré d'homologie élevé qu'avec les *alphaherpesvirinae*.

### 3.2 Le motif d'endonucléase PD-(D/E)-xK d'UL24

Une analyse bioinformatique a identifié un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)xK se retrouvant dans le second et le troisième domaine d'homologie de la protéine virale UL24 (Knizewski *et al.*, 2006). Le site catalytique implique deux acides aminés hautement conservés : E99 et K101. La superfamille d'endonucléase en question implique typiquement des endonucléases de restriction, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, ainsi que des résolvasés de jonction de type Holliday (Knizewski *et al.*, 2006). Certaines de ces protéines sont aussi impliquées dans la recombinaison homologue cellulaire. Le VHS-1 code pour une seconde endonucléase de type PD-(D/E)-xK, UL12, impliquée dans la recombinaison homologue du VHS-1 lors de la réplication du génome viral (Bujnicki *et al.*, 2001). L'activité d'exonucléase d'UL12 participe à l'échange de brin d'ADN lors de la réplication du génome viral ; la mutation d'UL12 diminue l'efficacité de synthèse d'ADN viral (J. N. Goldstein *et al.*, 1998, Weller *et al.*, 1990). Il est possible qu'UL24 possède des fonctions similaires à UL12, impliquant cette protéine dans les événements de recombinaisons homologues du VHS-1; l'activité du motif d'endonucléase d'UL24 chez les différents orthologues reste à être validée.

### 3.3 Expression du gène *UL24* chez le VHS-1

La transcription du gène *UL24* est associée avec six transcrits viraux. Trois sites d'initiation de la transcription sont impliqués, dont un à l'intérieur du cadre de lecture ouvert, et deux différents signaux de polyadénylation sont utilisés (Holland *et al.*, 1984, Jacobson *et al.*, 1993, Kibler *et al.*, 1991, McGeoch *et al.*, 1988, Read *et al.*, 1982). Les transcrits courts d'*UL24*, de 1.4, 1.2 et 0.9 kb, sont exprimés avec une cinétique d'expression précoce et utilisent le signal de polyadénylation d'*UL24* (Figure 1.8) (W. J. Cook *et al.*, 1996). Les transcrits longs d'*UL24*, de 5.6, 5.4 et 5.2 kb, sont exprimés avec une cinétique d'expression tardive et utilisent le signal de polyadénylation du gène *UL26* (Figure 1.8) (W. J. Cook *et al.*, 1996). L'expression des transcrits courts et des transcrits longs est régulée via un mécanisme de polyadénylation alternative. La protéine virale *UL24* est exprimée avec une cinétique tardive et est associée à la présence des transcrits longs (Pearson *et al.*, 2002b). L'accumulation des transcrits longs d'*UL24* lors du cycle d'infection lytique requiert l'expression de la protéine virale *ICP27*; l'export nucléaire des transcrits longs d'*UL24* est réduit de façon significative en absence d'*ICP27* (Pearson *et al.*, 2004). Enfin, l'absence de la protéine virale *ICP27* lors de l'infection résulte en des niveaux indétectables d'*UL24*. On ignore l'importance des transcrits court pour la biologie du VHS-1.



**Figure 1.8** Profil de transcription du gène *UL24* : Le gène viral *UL24* chevauche partiellement en sens inverse le gène *UL23*, codant pour la TK virale. Six différents transcrits sont produits lors de l'expression d'*UL24* via un mécanisme de polyadénylation alternatif. Les trois transcrits courts utilisent un signal de polyadénylation associé au gène *UL24*. Les trois transcrits long, dont leur expression dépend partiellement de la réplication du génome viral, utilisent un signal de polyadénylation associé aux gènes *UL26* et *UL26.5*. Inspiré de Pearson et al. (2002).

En contexte d'infection, la protéine virale UL24 se retrouve dans le noyau, ainsi que dans le cytoplasme (Pearson *et al.*, 2002b). Cette protéine se retrouve aussi de façon transitoire au nucléole (Bertrand *et al.*, 2010, Bertrand *et al.*, 2008b, Lymberopoulos *et al.*, 2007). En absence d'autres protéines virales, UL24 s'accumule dans l'appareil de golgi ainsi que dans le noyau (Bertrand *et al.*, 2008b). L'expression d'UL24 sous plateforme lentivirale a été associée à l'induction de l'apoptose ainsi qu'à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Nascimento *et al.*, 2009). Son expression par transfection a été associée à la modification nucléolaire lors de l'infection par le VHS-1 (Bertrand *et al.*, 2008b, Lymberopoulos *et al.*, 2011, Lymberopoulos *et al.*, 2007). L'expression de versions tronquées d'UL24 a révélé que la partie N-terminale seule de la protéine possède un signal de localisation nucléolaire, et qu'elle est suffisante pour se localiser dans le noyau et induire la dispersion des protéines nucléolaires B23 et nucléoline (Bertrand *et al.*, 2008b, Lymberopoulos *et al.*, 2011). Une étude approfondie de mutants ponctuels en UL24 a révélé l'importance de certains acides aminés hautement conservés d'UL24 pour ces

modifications nucléolaires, notamment les résidus conservés prédits de former le site catalytique ; les mécanismes impliqués demeurent inconnus (Bertrand *et al.*, 2010, Lymberopoulos *et al.*, 2011). Une version tronquée d'UL24 ne possédant pas la partie N-terminale est exclue du noyau et se localise au niveau du trans-golgi (Bertrand *et al.*, 2008b).

### 3.4 Importance d'UL24 dans la cellule hôte

Une étude de mutagenèse ciblant le gène codant pour la TK virale a révélé que certaines mutations chevauchant le cadre de lecture ouvert d'UL24 menaient à la production de plages de lyses plus petites que le virus parental (Jacobson *et al.*, 1989b). De plus, des mutations en UL24 confèrent un phénotype syncytial, sensible à la température, plus pénétrant lorsque les cellules infectées sont incubées à 39°C plutôt qu'à 37°C (Sanders *et al.*, 1982).

Une souche de VHS-1 recombinant n'exprimant pas la protéine UL24 (UL24X) a été produit dans le fond génétique KOS (Jacobson *et al.*, 1998). Une série de 14 paires de base ont été insérées au site BgIII contenant trois codons d'arrêt de la traduction dans les trois cadres de lecture ouvert, pouvant théoriquement produire une protéine tronquée longue de 46 aa. L'ajout de quelques paires de base au site BgIII d'UL24, correspondant au site promoteur de *tk*, a été démontré comme n'ayant aucun impact sur l'expression et l'activité de TK. Ce virus exhibe les phénotypes caractéristiques associés à des mutations dans le cadre de lecture ouvert d'UL24, soit une réduction de la taille des plages de lyse, une diminution de l'efficacité de réplication virale d'au moins 85%, ainsi que l'apparition de plages syncytiales dont la pénétrance est sensible à la température (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989b). Enfin, en absence d'UL24, nous observons une augmentation du ratio de capsides nucléaires comparativement aux capsides cytoplasmiques, suggérant que l'absence d'UL24 affecte la sortie du virus du noyau (Lymberopoulos *et al.*, 2011).

L'importance d'UL24 dans la réplication virale semble impliquer le motif d'endonucléase de la protéine. La substitution de l'acide aminé hautement conservé G121 d'UL24, situé à l'extérieur du motif d'endonucléase de la protéine, confère au virus (vUL24-G121A) un phénotype syncytiale mais n'affecte pas son efficacité de réplication virale en culture cellulaire (Bertrand *et al.*, 2010). Les substitutions des acides aminés E99 et K101 impliquant le domaine catalytique du motif d'endonucléase d'UL24 quant à elles, confèrent au virus (vUL24-E99A/K101A) un phénotype syncytiale ainsi qu'un défaut dans la réplication virale (Bertrand *et al.*, 2010). De plus, tel un virus déficient en UL24, le virus vUL24-E99A/K101A ne peut redistribuer les protéines

nucléolaires B23 et nucléoline lors de l'infection de cellules épithéliales, impliquant le motif d'endonucléase dans les fonctions nucléolaires d'UL24 (Bertrand *et al.*, 2010, Lymberopoulos *et al.*, 2011). L'importance de la redistribution des protéines nucléolaires pour la réplication du VHS-1 n'a toujours pas été démontrée.

Les mécanismes impliqués dans l'apparition de plages syncytiales en absence d'UL24 ou en présence de mutations ponctuelles en UL24 demeurent inconnus. La perturbation des filaments d'actine avec certaines drogues inhibe la formation de syncytia produit par le virus UL24X (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). En absence d'UL24, les glycoprotéines virales impliquées dans la machinerie de fusion du virus (gB, gD, gH/gL) sont relocalisées par rapport au cytosquelette, impliquant potentiellement UL24 comme modulateur de la machinerie de fusion (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). La protéine virale UL24 semble alors posséder des fonctions spécifiques au nucléoplasme associées à son motif d'endonucléase (réplication virale, redistribution de protéines nucléolaires) et des fonctions associées à sa localisation cytoplasmique (modulateur de la machinerie de fusion virale).

### **3.5 UL24 du VHS-1 comme déterminant de la pathogenèse virale**

Dans un modèle d'infection de la cornée chez la souris, l'absence d'UL24 mène à une réduction modeste de  $1 \log_{10}$  des titres viraux dans le surfactant oculaire, une réduction similaire à ce qui est qu'observée en culture cellulaire (Jacobson *et al.*, 1998). Toutefois, l'absence d'UL24 mène à un défaut sévère de la neuropathogenèse (Jacobson *et al.*, 1998). Le virus UL24X produit des titres viraux au niveau des ganglions trigéminaux à 3 jours post-infection réduits jusqu'à  $4 \log_{10}$  par rapport au virus de type sauvage; la maladie inflammatoire périphérique associée à l'infection oculaire chez la souris est quasi-absente en absence d'UL24 (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Dans un essai de réactivation virale *ex vivo* par explantation des TG, 30% des ganglions neuronaux récoltés et dissociés sont associés à la réactivation d'une infection virale latente, comparativement à une réactivation virale du virus de type sauvage dans 100% des ganglions neuronaux récoltés (Jacobson *et al.*, 1998). Enfin, la quantification du nombre de génomes viraux et de transcrits viraux par PCR quantitative lors de la latence a révélé que l'absence d'UL24 mène à une réduction de  $2 \log_{10}$  du nombre de génomes viraux latents dans un TG ainsi qu'en la réduction de  $1 \log_{10}$  du nombre de transcrits LAT (Jacobson *et al.*, 1998).

Le rôle d'UL24 dans la neuropathogenèse est inconnu; il a été suggéré que cette protéine virale jouerait un rôle spécifique dans la réplication virale neuronale, tel les protéines viraux TK

et RR (Jacobson *et al.*, 1998). Des études *in vivo* utilisant des mutants ponctuels d'UL24 ont révélé que les fonctions nucléaires d'UL24 seraient importantes pour le rôle d'UL24 dans la neuropathogénèse du VHS-1. Malgré la présence d'un phénotype syncytiale, le virus vUL24-G121A se comporte comme un virus de type sauvage *in vivo* ; vUL24-E99A/K101 quant à lui se comporte tout comme un virus déficient en UL24 (UL24X) (Leiva-Torres *et al.*, 2010).

### 3.6 Les orthologues d'UL24

Bien qu'UL24 soit un gène ancestral conservé à travers les *Herpesvirales*, son rôle dans la biologie des autres virus de l'herpès humain a très peu été étudié. La conservation du motif d'endonucléase d'UL24 suggère un rôle central de la partie N-terminale de cette protéine pour l'infection des herpès virus ; la variabilité de la partie C-terminale d'UL24 implique un rôle précis pour l'infection des simplex virus.

#### 3.6.1 Orthologue d'UL24 chez le VHS-2

La localisation intracellulaire d'UL24 chez le VHS-2 est similaire à celle du VHS-1, soit une expression cytoplasmique, ainsi qu'une expression prédominante nucléaire ponctuelle correspondant au nucléole dans une minorité de cellules (Blakeney *et al.*, 2005, Hong-Yan *et al.*, 2001). Contrairement au VHS-1 qui n'a pas été détecté dans le virion extracellulaire (Loret *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2002b), UL24 est retrouvée dans le virion extracellulaire (Blakeney *et al.*, 2005). Un virus recombinant déficient en UL24, UL24- $\beta$ gluc, a été produit en insérant au niveau du site de restriction BglII d'UL24 une cassette d'expression de la  $\beta$ -glucuronidase, sous le contrôle du promoteur viral SV40 (Blakeney *et al.*, 2005). L'absence d'UL24 chez le VHS-2 confère un phénotype de plages syncytiales, ainsi qu'une réduction modeste des titres viraux dans au moins trois types de lignée cellulaire : les lignées épithéliales Vero et HFF, ainsi que la lignée cellulaire de type neuroblastome SK-N-SH (Blakeney *et al.*, 2005). UL24 a été identifiée comme facteur de virulence dans un modèle d'infection vaginale chez la souris ainsi que chez le cochon d'inde. En absence d'UL24, lors de l'infection aiguë chez ces deux animaux, aucune mortalité associée à une encéphalite n'est détectée, et la fréquence ainsi que la sévérité de la maladie associée à l'infection sont sévèrement affectées (Blakeney *et al.*, 2005). Chez le cochon d'inde, le génome viral latent d'UL24- $\beta$ gluc est détecté au niveau des ganglions sensitifs chez 70% des animaux; le virus peut se réactiver mais le nombre, ainsi que la sévérité des lésions récurrentes, sont sévèrement affectés (Blakeney *et al.*, 2005).

### 3.6.2 Orthologue d'UL24 chez le virus de l'herpès humain 3

La protéine exprimée à partir du cadre de lecture ouvert 35 (Orf35) du VZV possède une similarité de séquence en acide aminés de 33% comparativement à UL24 du VHS-1 (Ito *et al.*, 2005). *Orf35* est aussi orienté en sens inverse en relation avec le gène de la TK virale, *Orf36*, mais ces deux gènes ne se chevauchent pas contrairement au VHS-1 (Ito *et al.*, 2005). En contexte de transfection et d'infection, ORF35 est localisée principalement au nucléoplasme sous un patron diffus (Ito *et al.*, 2005). En utilisant une série de cinq cosmides dérivés de la souche vaccinale du VZV Oka, une délétion complète d'Orf35 a été réalisée par digestion enzymatique ; un virus de secours a été produit en insérant le gène *Orf35* et son promoteur putatif, généré par PCR, dans un site de restriction situé en amont du gène *Orf66* (Ito *et al.*, 2005). En absence de l'Orf35, une infection en culture cellulaire par le VZV résulte en une réduction de 50% de la taille des plages de lyse ainsi qu'en une légère réduction des titres viraux d'environ  $1\log_{10}$  (Ito *et al.*, 2005). Contrairement au VHS-1 et VHS-2, le VZV forme typiquement des plages syncytiales organisées possédant des projections cytoplasmiques appelées ponts viraux, et les noyaux cellulaires sont regroupés en anneaux autour d'un appareil de golgi centralisé (Ito *et al.*, 2005). L'absence d'Orf35 interfère avec la formation de plages de lyse syncytiales du VZV, où l'appareil golgi centrale est désorganisé et aucun pont viral intercellulaire n'est formé (Ito *et al.*, 2005). Enfin, l'absence d'Orf35 résulte en un patron d'expression diffus au cytoplasme de la glycoprotéine E du VZV plutôt qu'en sa localisation membranaire typique (Ito *et al.*, 2005).

La protéine Orf35 a été identifiée comme étant un déterminant de la pathogenèse du VZV dans un modèle de xénographe de peau et de cellules T chez des souris SCIDhu. L'efficacité de réplication virale est diminuée en absence d'Orf35 lors de l'infection de xénographes de cellule T ou de la peau (Ito *et al.*, 2005). L'impact de l'absence d'Orf35 sur la réplication virale *in vivo* est plus sévère lors de l'infection des cellules de la peau (Ito *et al.*, 2005). La formation de syncytia lors de l'infection est spécialement importante pour la dissémination cutanée du VZV; la dérégulation de la formation de plages syncytiales en absence d'Orf35 expliquerait l'importance différentielle de cette protéine virale au niveau de la peau plutôt que pour l'infection de cellules T. L'importance de l'Orf35 pour la neuropathogenèse du VZV demeure inconnue.

### 3.6.3 Orthologues d'UL24 chez les *betaherpesvirinae* humains

UL76, l'orthologue d'UL24 chez le HCMV, est une protéine associée aux virions extracellulaires, et possède un profil d'expression nucléaire et cytoplasmique (S. K. Wang *et al.*,

2004). L'absence d'UL76 mène à une réduction de l'efficacité de réplication virale du HCMV (S. K. Wang *et al.*, 2004). L'expression d'UL76 lors de l'infection virale mène à l'accumulation de protéines polyubiquitinées en agrégomes associées aux compartiments de répliquons viraux, et ce via une interaction avec la protéine cellulaire S5a, une sous-unité du protéasome 26S pouvant interagir avec les ubiquitines (S. R. Lin *et al.*, 2013). UL76 a aussi été identifié comme étant un régulateur d'expression génique ayant une spécificité pour certains promoteurs viraux (S. K. Wang *et al.*, 2004). À faible dose, UL76 active le promoteur majeur immédiat précoce (MIEP) ainsi que le promoteur d'UL112 ; à forte dose, UL76 inhibe l'expression génique via le promoteur MIEP, ainsi que les promoteurs UL112 et UL54 à cinétique précoce. L'infection par le HCMV de cellules exprimant UL76 de façon constitutive a révélé que cette protéine a le potentiel d'inhiber la réplication virale. Malgré la capacité de maintenir une lignée cellulaire exprimant UL76 de façon constitutive, UL76 a été identifié tout comme UL24 comme pouvant induire l'apoptose ainsi qu'inhiber la progression du cycle cellulaire (Nascimento *et al.*, 2009). De plus, les lignées cellulaires exprimant de façon stable UL76 accumulent plusieurs types d'aberrations chromosomales (Siew *et al.*, 2009). Enfin, il a été démontré en contexte de transfection et d'infection que l'expression d'UL76 mène à l'expression de l'IL8 par la cellule via une réponse de dommage à l'ADN (Costa *et al.*, 2013). La mutation du motif d'endonucléase d'UL76 réduit l'induction de l'expression de l'IL8 par la cellule. Bien que l'importance d'UL76 pour une infection *in vivo* soit inconnue, il se peut qu'UL76 soit un déterminant de la pathogenèse virale. La présence de l'IL8 amplifie la réplication virale du HCMV et agit comme chimiokine permettant au virus de recruter des neutrophiles susceptibles à l'infection, et ainsi faciliter sa dissémination à travers l'hôte.

#### **3.6.4 Orthologues d'UL24 chez les *gammaherpesvirinae***

La famille de protéine virale UL24 a été étudiée chez le virus de l'herpès murin 68 (MHV-68), un virus servant de modèle pour les gammaherpesvirus humain. Tout comme pour les alphaherpesvirus et les bêtaherpesvirus, l'expression de l'orthologue d'UL24 chez les gammaherpesvirus, Orf20 du MHV-68, mène à l'induction de l'apoptose ainsi qu'à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Nascimento *et al.*, 2009, Nascimento *et al.*, 2007). Une infection cellulaire par un virus mutant en Orf20 n'a démontré aucune réduction en l'efficacité de réplication virale en culture cellulaire, ainsi qu'aucune modulation du cycle cellulaire par le virus (Nascimento *et al.*, 2011). De plus, contrairement aux alphaherpesvirus, lors d'infection *in vivo*, l'absence de l'Orf20 n'a aucun impact sur l'établissement de la latence, et ne mène à aucune réduction des

titres viraux ; l'absence de l'Orf20 mène toutefois à un retard au niveau de la résolution de l'infection (Nascimento *et al.*, 2011).

### 3.6.5 Orthologues d'UL24 chez les virus de l'herpès non-humains

Les orthologues d'UL24 ont été étudiés chez plusieurs autres alphaherpesvirus non humains. Chez le virus de l'herpès bovin (BHV) du genre varicellovirus, la complexité de la transcription du gène UL24 est similaire à celle du VHS-1, avec plusieurs transcrits viraux partageant la même extrémité 3' (Haanes *et al.*, 1997, Whitbeck *et al.*, 1994). Le virus de l'herpès bovin (BVH) n'exprimant pas UL24 ne démontre aucune réduction significative des titres viraux en culture cellulaire (Whitbeck *et al.*, 1994). Le rôle d'UL24 chez le BHV *in vivo* est inconnu.

Chez le virus de l'herpès équin (EHV) du genre varicellovirus, la protéine orthologue d'UL24 est codée par le gène *Orf37* (Kasem *et al.*, 2010). Tout comme le BHV, l'EHV n'exprimant pas l'Orf37 ne démontre aucune réduction des titres viraux en culture cellulaire (Kasem *et al.*, 2010). Toutefois, les titres viraux sont réduits de façon significative ( $1 \log_{10}$ ) lors d'infections de neurones primaires en culture cellulaire (Kasem *et al.*, 2010). Des infections intranasales dans un modèle murin démontrent un rôle de l'Orf37 pour la pathogenèse virale. Une infection intranasale par le EHV mène à l'apparition de symptômes neurologiques et à une encéphalite virale; l'absence de la protéine codée par l'Orf37 cause un défaut sévère de la neuropathogenèse défini par l'absence de symptômes neurologiques, ainsi qu'en l'absence d'une maladie (Kasem *et al.*, 2010). Enfin, les titres viraux en absence de l'Orf37 sont significativement réduits dans le cerveau, contrairement à une réduction légère des titres viraux dans les poumons (Kasem *et al.*, 2010).

La protéine virale UL24 chez l'herpèsvirus anatide 1 (DEV), un mardivirus causant une entérite virale chez le canard, possède un patron d'expression légèrement différent d'UL24 du VHS-1. UL24 DEV est principalement localisée au niveau de la membrane nucléaire, avec une localisation cytoplasmique (Jia *et al.*, 2009). Le rôle d'UL24 DEV pour la réplication virale en culture cellulaire ou *in vivo* demeure inconnu.

### 3.7 La protéine virale UL24 comme cible thérapeutique

L'importance de la famille de protéine virale UL24 pour la biologie des herpesvirus et la neuropathogenèse virale font d'elle une cible thérapeutique intéressante. Un virus de l'herpès simplex 2 recombinant n'exprimant pas UL24, UL24- $\beta$ gluc, a été testé comme souche vaccinale chez la souris et le cochon d'inde (Visalli *et al.*, 2014). Des immunisations à fortes doses et à

faibles doses avec le virus UL24- $\beta$ gluc protègent les souris contre des infections létales avec le virus de type sauvage, peu importe la voie d'innoculation (intravaginale, intramusculaire, ou sur le coussinet de la patte) (Visalli *et al.*, 2014). L'infection avec la souche vaccinale génère des anticorps neutralisants en grande quantité ainsi qu'une réponse immunitaire de type Th1; l'immunisation réduit de façon significative l'établissement de la latence du virus de type sauvage (Visalli *et al.*, 2014).

Une souche atténuée du DEV est présentement utilisée comme vaccin chez le canard. Cependant, la protection offerte par ce virus n'est pas absolue. Une souche atténuée de salmonella typhimurium, souche AroA- SL7207 a été utilisée comme vecteur afin de livrer chez le canard un vaccin à ADN où la protéine virale UL24 est fusionné à la sous-unité B non toxique de l'entérotoxine de E.Coli (LTB) servant d'adjuvant (X. Yu *et al.*, 2012). L'administration orale du vaccin à ADN chez le canard permet de générer une réponse humorale, mucoale ainsi que cellulaire permettant de neutraliser le DEV ainsi que de diminuer de façon significative la mortalité associée à une infection avec le DEV (X. Yu *et al.*, 2012).

Enfin, le VHS-1 est une plateforme intéressante permettant de développer des virus oncolytiques; le VHS-1 possède un tropisme cellulaire large et exprime plus de 80 gènes viraux pouvant être mutés afin de moduler à volonté la pathogénicité du virus et favoriser un tropisme pour les cellules cancéreuses. Une souche virale du VHS-1, le HF10, a acquis plusieurs mutations de manière spontanée et possède un phénotype syncytiale. Ce virus est déficient en neuroinvasion et non en neurovirulence, et est un candidat potentiel pour plusieurs thérapies oncolytiques tel que pour le cancer du sein ainsi que pour le cancer de la prostate (Mori *et al.*, 2005, Nawa *et al.*, 2008, Nishiyama *et al.*, 1991, Takakuwa *et al.*, 2003). Enfin, la réplication de ce virus est restreint par la présence d'interféron de type 1, suggérant que l'une des mutations du virus cible un gène impliqué dans l'inhibition de la réponse anti-virale cellulaire (Nawa *et al.*, 2008). Le gène *UL24* de ce virus possède six mutations ponctuelles résultants en la substitution en acide aminés de l'isoleucine 191 en méthionine, se la sérine 226 en proline, et de la thréonine 239 en alanine, tous dans la partie C-terminale de la protéine. Les mutations en *UL24* pourraient potentiellement être impliquées dans le phénotype de plages syncytiales du virus ; toutefois, d'autres mutations sont aussi présentes dans les gènes *gB*, *gK* et *UL20*, pouvant conférer un phénotype de plages syncytiales. L'importance d'*UL24* pour les propriétés oncolytiques de la souche HF10 demeure inconnue.

## 4 Expression de gènes rapporteurs chez les VHS-1 recombinants

Les déterminants de la pathogenèse virale sont impliqués dans la production de titres viraux élevés, dans les mécanismes de dissémination virale menant l'établissement d'une infection aiguë ou latente dans un grand nombre de cellules, ainsi que dans la modulation de la réponse anti-virale de l'hôte. Différentes techniques de laboratoire sont à notre disponibilité afin de caractériser en profondeur la pathogenèse du VHS-1; l'homogénéisation tissulaire permet de quantifier les titres viraux, l'extraction d'acides nucléiques de tissus permet d'étudier l'établissement de la latence ou la transcription de gènes viraux par PCR, et le sectionnement de tissus permet de visualiser l'étendue de l'infection virale par marquage immunohistochimique. L'analyse de ces paramètres requiert généralement l'euthanasie de l'animal, limitant généralement la capacité d'évaluer la progression de l'infection chez un même animal à différents temps lors de l'infection virale. De plus, l'analyse de certains paramètres viraux nécessite des modifications chimiques ou physiques irréversibles de la cellule ou du tissu, rendant impossible des analyse multiparamétriques d'un même échantillon. Différents virus recombinants exprimant un gène rapporteur visible par microscopie optique ont été produits afin de faciliter l'étude de la pathogenèse virale. Ces virus permettent d'identifier les foyers d'infections lytiques ou latentes, ainsi que certaines protéines virales.

### 4.1 Stratégies de construction de virus recombinant

Un défi lors de la génération de virus recombinant exprimant un gène rapporteur est le maintien d'un phénotype de type sauvage en culture cellulaire ainsi qu'*in vivo*. Les virus, incluant les virus de l'herpès, possèdent typiquement très peu de régions géniques non-importantes, maximisant l'information génique dans un espace restreint, menant au chevauchement de cadres de lecture ouvert et de transcriptomes complexes (Fields *et al.*, 2007, Roizman *et al.*, 2007, Weller, 2011). La faible incidence de séquences inutilisées chez le VHS-1 limite les possibilités quant au choix du site d'insertion de cassettes d'expression de gènes transgéniques sans affecter de paramètres virologiques. Bien qu'il y ait très peu de région inutilisée dans le génome viral, sa longueur de 152 kb et la présence de plusieurs gènes viraux non-essentiels permettent certaines stratégies d'insertions de transgènes dans le VHS-1 (Fields *et al.*, 2007, Weller, 2011).

L'insertion d'un gène transgénique ou d'une cassette d'expression peut se faire au niveau de gènes viraux non essentiels, permettant de produire un virus viable. Cette stratégie permet l'utilisation de promoteurs et signaux de polyadénylation natifs à la région. Cette stratégie a pour avantage la capacité du transgène à utiliser ou non un promoteur viral, ainsi que les différents signaux de polyadénylation natifs, mais le virus produit ne peut être considéré comme un virus de type sauvage dû à la perte d'un gène viral. Les régions intergéniques du génome viral sont des sites d'insertion de cassettes d'expression attirants, ne modifiant aucun cadre de lecture ouvert de gènes viraux, et minimisant les chances de modifier le comportement du virus. Lors de l'insertion d'une cassette d'expression, le promoteur peut être choisi afin de moduler les niveaux d'expression ainsi que le type cellulaire dans lequel le gène est exprimé. Toutefois, il peut être dangereux de modifier des régions intergéniques car celles-ci peuvent contenir des sites de liaison à des facteurs de transcription ainsi que des signaux de polyadénylation. Enfin, il est possible d'ajouter un transgène dans le même cadre de lecture ouvert qu'un gène viral, produisant une protéine virale étiquetée (Desai *et al.*, 1998, Krautwald *et al.*, 2008). Tout comme l'insertion d'un transgène dans une région intergénique, cette approche ne détruit aucun cadre de lecture ouvert, et offre en plus la possibilité de facilement localiser la protéine virale modifiée. Toutefois, la fusion d'un gène de référence à un gène viral a le potentiel d'affecter les interactions des diverses protéines, et ainsi affecter négativement la biologie du VHS-1 (Krautwald *et al.*, 2008). Quel que soit la stratégie d'insertion d'un transgène utilisé, il est important de considérer les avantages et les risques afin de bien caractériser les virus recombinants produits, et de prévoir les applications à long terme.

## 4.2 Visualisation de l'infection lytique

L'expression de la luciférase par des virus recombinants permet la détection de foyer de réplication virale *in vivo*. La souche recombinante du VHS-1, KOS/Dlux/oriL, possède entre les gènes *UL49* et *UL50*, les gènes de la Renilla luciférase et le gène Firefly luciférase sous les promoteurs précoces *UL30* et *UL29* respectivement (Burgos *et al.*, 2006a). L'expression de la luciférase par le VHS-1 permet de visualiser des cellules infectées par bioluminescence via l'ajout du substrat, la luciférine (Burgos *et al.*, 2006a). Ce virus offre la possibilité de localiser des sites d'infections lytiques de façon non-invasive via un système de bioimagerie chez un même animal sur plusieurs jours en injectant par intraveineux ou en ajoutant de façon ectopique le substrat de la luciférase. L'intensité du signal généré par la luciférase corrèle avec la quantité de virus présent dans les tissus, permettant d'évaluer la réplication virale chez un animal de façon indirecte

(Burgos *et al.*, 2006a). Toutefois, la pathogénèse de KOS/Dlux/oriL diffère du virus de type sauvage ; les titres viraux produits sont légèrement inférieurs à ceux du virus de référence en culture cellulaire ainsi qu'*in vivo*, et la progression de la maladie en périphérie induite par ce virus est affectée négativement (Burgos *et al.*, 2006a). Un autre virus recombinant exprimant la luciférase, R8411, basé sur la souche F, possède une cassette d'expression du transgène entre les gènes *UL3* et *UL4* (Zerboni *et al.*, 2013). Ce virus permet de visualiser les sites d'infection lytiques *in vivo* tout comme KOS/Dlux/oriL. Toutefois, ce virus recombinant produit des titres viraux significativement moins élevés en culture cellulaire que le virus parental. Enfin, l'utilisation de la luciférase est associée à quelques limitations techniques, telles la dépendance du signal sur l'efficacité de la réaction enzymatique, la faible résolution spatiale du signal, ainsi que la faible intensité du signal lors de certaines infections animales (Luker *et al.*, 2002). Dans un modèle d'infection oculaire, le signal généré par la luciférase lors de l'infection du TG ne permet pas de détecter des neurones infectés à travers le bruit de fond généré par les tissus périoculaires (Luker *et al.*, 2002).

La présence d'une cassette d'expression d'une protéine fluorescente offre plusieurs avantages comparativement à la luciférase. Elle permet une excellente résolution spatiale, et peut générer un signal quantitatif par cytométrie en flux. Toutefois, les tentatives d'insertion de cassettes d'expression dans le génome du VHS-1 ont souvent affectées négativement le phénotype du virus en culture cellulaire ou *in vivo*. La souche recombinante du VHS-1, KOSeGFP, possède une cassette d'expression de la protéine fluorescente eGFP sous le promoteur majeur immédiat précoce du HCMV, insérée entre les gènes *UL26/UL26.5* et *UL27* (Balliet *et al.*, 2007). L'expression de la eGFP lors de l'infection lytique permet, tout comme KOS/Dlux/oriL, de visualiser des sites d'infection lytique, mais avec une meilleure résolution spatiale permettant d'identifier des cellules infectées individuelles. Lors d'essais de réactivation virale *ex vivo*, la présence de la eGFP permet d'identifier les neurones où l'infection de réactive. De plus, la fluorescence générée par cette protéine transgénique est conservée suite à la fixation et sectionnement de tissus, rendant cette stratégie compatible avec plusieurs essais d'immunohistofluorescence. Le virus KOSeGFP possède toutefois quelques désavantages : dans les larmes, les titres viraux du virus recombinant sont réduits par rapport au virus de référence, et la fréquence ainsi que la cinétique de réactivation virale sont réduits par rapport au virus parental (Balliet *et al.*, 2007). De plus, l'expression de la eGFP chez ce virus est instable, des virus révertant perdant la cassette d'expression de la eGFP sont générés continuellement suite à la réplication virale en culture cellulaire ainsi qu'*in vivo* (Balliet *et al.*, 2007). De plus, plusieurs tissus d'intérêt pour l'étude de la pathogénèse du VHS-1 génèrent beaucoup d'autofluorescence dans

le vert, augmentant le seuil de détection de cellules infectées par le VHS-1 (Jamme *et al.*, 2013, Mochizuki *et al.*, 1995, Monici, 2005, Teng *et al.*, 2006). Cette stratégie d'insertion d'une cassette d'expression de la eGFP a été reproduit dans la souche clinique H129 (H129-eGFP) afin de produire un virus recombinant permettant de facilement d'identifier des parcours neuronaux via la fluorescence ; ce virus possède les mêmes limitations que le virus KOSeGFP (McGovern *et al.*, 2012). Le virus R/GFP+ possède une cassette d'expression de la GFP sous le promoteur CMV, entre les gènes *UL53* et *UL54* (David *et al.*, 2012). Ce virus a été conçu comme virus de secours, produit à partir d'un virus mutant où le gène *UL53* a été remplacé par la cassette d'expression de la eGFP (delta-gKGFP) (David *et al.*, 2008, Foster *et al.*, 1998). Cette paire de virus recombinants permet de faciliter l'étude du rôle de la glycoprotéine K lors de l'infection en culture cellulaire ainsi qu'*in vivo*. Bien qu'aucune instabilité génétique de la cassette d'expression n'a été rapporté, les titres viraux produits par le virus de secours R/GFP+ sont réduits par rapport au virus de type sauvage en culture cellulaire, et son comportement *in vivo* n'a toujours pas été caractérisé (David *et al.*, 2012).

### 4.3 Visualisation des sites d'infection latente

Lors de la latence, seul le locus LAT demeure transcriptionnellement actif. L'insertion de transgènes au sein de ce locus, utilisant le promoteur LAT, permet leur expression de façon stable lors de la latence. Une série de virus recombinants produits via cette stratégie possède une séquence IRES suivi des gènes LacZ ou  $\beta$ -geo (Lachmann *et al.*, 1997, Marshall *et al.*, 2000). Ces enzymes permettent de visualiser les sites d'infections latentes par marquages histochimiques. Toutefois, cette stratégie d'insertion du transgène mène à l'absence de l'expression du transcrit majeur LAT de 2-kb, et ne peut être considéré comme possédant un phénotype de type sauvage. De plus, l'utilisation des gènes *LacZ* ou  *$\beta$ -geo* afin de visualiser les sites d'infection nécessite des modifications chimiques tissulaires afin de visualiser les sites d'infection latente et permette difficilement d'utiliser cette technique en conjonction avec la microscopie à fluorescence.

Une seconde stratégie plus complexe a été conçu pour permettre d'exprimer une protéine fluorescente verte lors de l'infection latente du VHS-1, tout en maintenant l'expression de transcrits LAT similaire au virus de type sauvage. Le virus deltaLAT-EGFP a été produit en insérant le gène de la eGFP dans la région 5' du transcrit LAT (Perng *et al.*, 2000). Par la suite, le virus LAT-EGFP a été produit en insérant le promoteur *LAT* et la région 5' du transcrit LAT manquante entre les gènes *UL37* et *UL38*. Il a été démontré que l'insertion des premier 1.5 kb du

transcrit LAT et de son promoteur dans cette région permet de rétablir la réactivation virale spontanée chez le lapin à des niveaux de type sauvage (Perng *et al.*, 1996a). La cinétique de réplication virale dans les yeux de la souris est légèrement modifiée par rapport au virus de type sauvage du fond génétique McKrae (Perng *et al.*, 2000). De plus, ces virus servent principalement de témoin afin de caractériser des virus mutants en LAT, et ne sont généralement pas caractérisés en parallèle avec le virus de souche sauvage parental (Perng *et al.*, 1996b, Perng *et al.*, 2000).

Une seconde stratégie permettant de plus facilement visualiser l'infection latente sans modifier le locus LAT est via le marquage génétique permanent des cellules infectées via le système Cré-lox. Les souris ROSA26 et ROSA26-EGFP BAC possèdent les gènes *LacZ* et *eGFP* respectivement (Giel-Moloney *et al.*, 2007, Soriano, 1999). Les promoteurs de ces gènes sont interrompus par une cassette d'expression de la néomycine flanquée par des sites de recombinaison loxP (Giel-Moloney *et al.*, 2007, Soriano, 1999). L'expression de gènes rapporteurs est activée de façon permanente suite à l'infection par un virus exprimant la cre recombinase. Cette stratégie permet de facilement détecter des cellules ayant été infectées par le VHS-1 dans le passé contrairement à certaines techniques d'hybridation *in situ* qui dépendent du nombre de génomes viraux latents ou de l'expression des transcrits LAT (M. P. Nicoll *et al.*, 2013, M. P. Nicoll *et al.*, 2012a, Wakim *et al.*, 2008). Bien que ce marquage génétique cellulaire ne permet pas de distinguer entre les infections aiguë, latente, ou en phase de réactivation, le marquage cellulaire ne dépend pas de la quantité de génomes, transcrits, ou protéines virales et offre ainsi un excellent seuil de détection.

#### **4.4 Visualisation de mécanismes moléculaires impliqués lors de l'infection virale**

Lorsque sous le contrôle d'un promoteur viral du VHS-1, l'expression d'une protéine fluorescente peut être utilisée pour caractériser les différentes cinétiques d'expression lors de l'infection virale. Deux virus recombinants exprimant la eGFP sous les promoteurs immédiat-précoce (ICP0) ou tardif (gC) ont été produits, ainsi qu'un troisième virus recombinant, exprimant la RFP et la eGFP sous les promoteurs tardifs Y1 (gB) et Y2 (gC) respectivement (Decman *et al.*, 2005, Ramachandran *et al.*, 2008). Les cassettes d'expression, insérées au lieu du gène codant pour gC, ont permis de facilement visualiser l'expression de gènes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  lors de l'infection aiguë et lors de la réactivation virale *ex vivo* dans un modèle murin. Bien que la cinétique de réplication virale de ces virus soit légèrement affectée, les titres viraux produits dans les TG,

l'établissement de la latence, ainsi que la réactivation virale sont similaires au virus de type sauvage (Decman *et al.*, 2005, Ramachandran *et al.*, 2008).

Enfin, plusieurs protéines virales ont été étiquetées à des protéines fluorescentes, permettant de visualiser divers mécanismes moléculaires. Le virus K26 possède une version de la protéine de la capsid VP26, étiquetée à la GFP (Desai *et al.*, 1998). Ce virus permet de facilement détecter les cellules où l'infection lytique est établie. De plus, la détection de la GFP sous forme de points permet de localiser facilement les capsides virales et de suivre leur déplacement lors de la sortie cellulaire (Desai *et al.*, 1998). L'étiquetage de VP26 à la GFP a aussi permis de visualiser l'entrée cellulaire ainsi que les mécanismes de transport rétrograde vers le noyau impliquant les dynéines (Dohner *et al.*, 2006). Un virus PRV recombinant, PRV-GS1236, possède la protéine VP26 fusionnée à la mRFP1, ainsi que la protéine gD fusionnée à la GFP (Antinone *et al.*, 2010b). Malgré une diminution de l'efficacité de la réplication virale suite à l'insertion des gènes pour les protéines fluorescentes, ce virus a servi d'outil important afin de suivre l'enveloppement et la sortie neuronale dans un même neurone à travers le temps. De plus, une étude a utilisé plusieurs PRV recombinants afin de visualiser les mécanismes d'infection interneuronal et de transport axonal antérograde, en visualisant des protéines virales étiquetées à des protéines fluorescentes (Feierbach *et al.*, 2007). Enfin, un virus triple fluorescent, rHSV-RYC, a été produit en étiquetant les protéines virales VP26, gH, et VP16 (de Oliveira *et al.*, 2008). Chacune de ces protéines virales correspondent à des compartiments différents lors de l'infection virale et permettent d'étudier l'interaction de ces différents compartiments. Il est toutefois risqué de modifier des protéines virales en les fusionnant à une protéine fluorescente. Une étude a démontré que la localisation intracellulaire de la TK virale varie selon le choix de la protéine fluorescente fusionnée (Soling *et al.*, 2002). De plus, il est possible que l'incorporation de protéines virales dans le virion infectieux soit inhibée suite à la fusion avec une protéine fluorescente, tel qu'il a été décrit pour UL35 (Krautwald *et al.*, 2008).

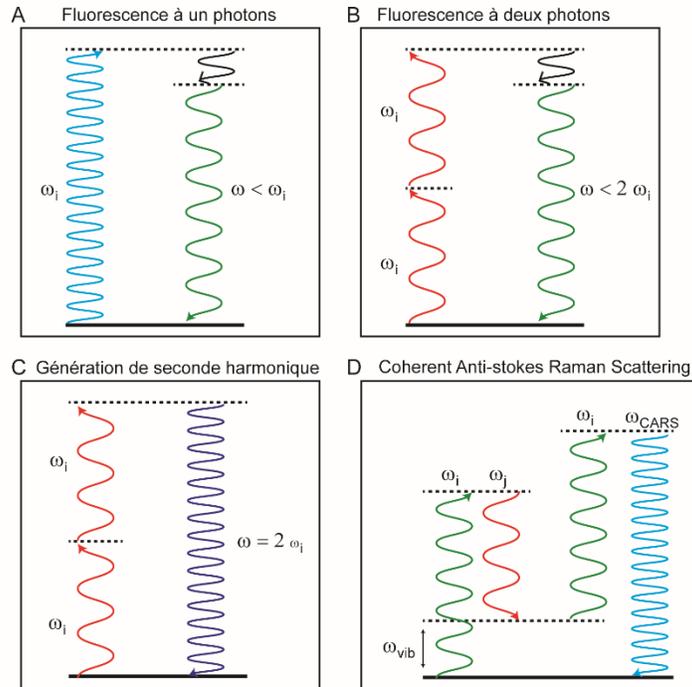
## **5 La microscopie à optique non-linéaire**

Les technologies de microscopie optique ont poussé les limites de l'imagerie cellulaire, tissulaire ainsi que l'imagerie *in vivo*. L'imagerie à optique non-linéaire, telle la microscopie à fluorescence, obtient son contraste en détectant une variation entre l'énergie des photons émis

et l'énergie des photons détectés. La microscopie à fluorescence traditionnelle est toutefois limitée par la photostabilité des molécules et l'intensité des signaux générés, ainsi que par l'épaisseur des tissus analysés (Cohen, 2010). De plus, l'énergie requise pour exciter certains fluorophores peut endommager les tissus ou les cellules vivantes, compliquant ainsi les études (B. E. Cohen, 2010). Enfin, la microscopie optique nécessite typiquement l'addition d'agents de contraste permettant de visualiser des composantes cellulaires ou tissulaires, nécessitant la modification chimique des échantillons et souvent, nécessitant leur sectionnement. La microscopie multiphotonique de nouvelle génération permet de dépasser les limites de la microscopie optique traditionnelle en visualisant différents signaux intrinsèques aux composantes cellulaires, sans ajout d'agent de contraste, tout en permettant un sectionnement optique pour des analyses tridimensionnelles de tissus non-sectionnés.

## **5.1 La microscopie à fluorescence à deux photons**

L'énergie d'un photon et sa couleur perçue sont une fonction de la longueur d'onde. Lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle acquiert de l'énergie et ses électrons entrent dans un état excité. Une fraction de cette énergie sera transformée en chaleur ou en vibrations, et un photon à plus faible énergie sera libéré. La différence entre l'énergie élevée d'un photon absorbé, et l'énergie faible d'un photon émis s'appelle le « shift Stokes » (Kitai, 2008, Ribas Gispert, 2008). En microscopie optique non-linéaire, cette perte d'énergie se visualise par un changement de couleur et est appelé fluorescence (Figure 1.9 A). Le contraste utilisé pour former une image provient de la présence ou de l'absence du fluorophore. Lors de l'imagerie de tissus épais, l'utilisation d'un seul faisceau lumineux comme source d'excitation a pour désavantage de générer de la fluorescence à travers son parcours, en périphérie du foyer focal. Ceci peut générer un signal flou, menant à une perte de la résolution de l'image.



**Figure 1.9** Principe physique de microscopie multiphotonique : La microscopie optique non-linéaire suit les principes d'absorption et de génération de photons. L'énergie d'un photon ( $\omega$ ) est indirectement proportionnelle à sa longueur d'onde. A-B) Certaines molécules absorbent l'énergie de photons puis les relâchent avec une perte d'énergie (fluorescence). C) Des molécules non-centrosymétriques, tel le collagène, ne possédant aucun centre d'inversion pour l'un de ses éléments de symétrie, peuvent absorber et combiner l'énergie de deux photons, menant à la génération d'un seul photon ayant la moitié de la longueur d'onde des photons absorbés (génération de seconde harmonique). D) Enfin, lorsque certaines molécules absorbent deux photons différents, la différence de longueur d'onde entre les deux photons peut induire un état de vibration au niveau du nuage d'électron. La molécule en vibration absorbera l'énergie d'un troisième photon, et générera un photon possédant l'énergie absorbée en plus de l'énergie de vibration (Coherent anti-Stokes Raman Scattering).

Lorsqu'une molécule absorbe deux photons simultanément, elle acquiert la totalité de leur l'énergie (Figure 1.9 B). En utilisant au moins deux sources lumineuses, il est possible de générer un signal de fluorescence en utilisant plusieurs photons ayant chacun une fraction de l'énergie requise (Xu *et al.*, 1996). La microscopie à fluorescence à deux photons permet d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation dans le spectre électromagnétique près de l'infra-rouge; pouvant pénétrer plus facilement les tissus épais (Helmchen *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation de photons à faible énergie limite les dommages possibles aux cellules et aux tissus. Enfin, puisque l'énergie des photons s'additionne uniquement au point focal là où ils se rencontrent, aucune fluorescence n'est générée en périphérie de la région d'intérêt.

## 5.2 Les signaux de seconde harmonique

La génération de signaux de seconde harmonique (SHG) survient lorsqu'une molécule non-centrosymétrique, tel le collagène ou les microtubules, absorbe deux photons ayant la même énergie, et génère un seul photon ayant leur énergie cumulative et donc la moitié de leur longueur d'onde (Figure 1.9 C) (C. P. Brown *et al.*, 2012, Gusachenko *et al.*, 2012, Haroche, 2008, Schurmann *et al.*, 2010, Stoothoff *et al.*, 2008). Lorsqu'excité par un photon, les électrons oscillent avec le champ électrique de la lumière suivant une courbe sinusoïdale. En absence d'une centrosymétrie moléculaire, les électrons oscillent préférentiellement d'un côté, créant un contexte pour que l'énergie des photons puisse se combiner. L'utilisation de filtres pour les longueurs d'onde, ainsi que la densité de molécules non-centrosymétriques dans les échantillons biologiques, permettent d'obtenir un contraste optique et une spécificité du signal suffisant pour la bioimagerie. L'avantage principal de cette technique est qu'elle nous permet de visualiser des structures cellulaires et tissulaires sans ajouts d'agents de contraste et sans modifier le tissu physiquement ou chimiquement. De plus, puisque la SHG ne requiert pas l'excitation de molécules avec de photons énergétiques, cette technique n'engendre pas de photoblanchiment, n'y a de phototoxicité (B. E. Cohen, 2010).

## 5.3 Les signaux de type troisième harmonie ou Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS)

La génération de signaux de troisième harmonie, ou « coherent anti-Stokes raman scattering » (CARS), s'effectue en faisant vibrer les électrons d'une molécule avec deux faisceaux ayant des longueurs d'ondes différentes : le faisceau servant de pompe ( $\omega_{\text{pompe}}$ ), et le faisceau appelé Stokes ( $\omega_{\text{Stokes}}$ ) (Figure 1.9 D) (Andreas, 2005, Mostaço-Guidolin *et al.*, 2010, A. Volkmer *et al.*, 2001b). Des molécules peuvent être très sensibles à une différence de longueur d'onde ( $\omega_{\text{vib}}$ ) entre ces deux faisceaux, induisant une vibration du nuage d'électron. Cet état de vibration crée une superposition de deux niveaux basaux d'énergie des électrons, pouvant leur servir de tremplin pour rejoindre un état d'excitation supérieur lorsqu'ils seront excités de nouveau par un photon. La molécule en vibration pourra alors générer un photon ayant la même énergie, ou un photon ayant gagné l'énergie de vibration. Puisque le photon généré gagne de l'énergie, la variation de sa longueur d'onde est appelé « shift anti-Stokes ». Bien que plusieurs molécules puissent générer des signaux de type CARS, les nuages d'électrons possèdent des longueurs d'onde d'oscillation ( $\omega_{\text{vib}}$ ) spécifiques à leur environnement, définis par les liaisons covalentes

entre atomes. Les électrons entourant les liens CH<sub>2</sub> (lipide) et OH<sub>2</sub> (eau) peuvent facilement générer des signaux CARS. Ainsi, ce type de microscopie obtient son contraste en ajustant les longueurs d'onde pour les cibles voulues. Tout comme pour la génération de seconde harmonique, la densité de ces molécules permet de moduler l'intensité du signal observé, et ainsi l'analyse d'échantillons biologiques complexes.

## **6 Applications de technologies de microscopie non-linéaire multimodale**

La microscopie multimodale est la combinaison de différentes techniques d'imagerie à optique linéaire et non-linéaire. Ce type de microscopie en est à ses débuts, limité par la nouveauté de leur application, par l'accès à ces technologies, ainsi que par la disponibilité commerciale d'agent de contraste pouvant être utilisé pour générer des signaux SHG et CARS.

### **6.1 Analyse de l'anatomie tissulaire et de la physiologie cellulaire et animale**

La microscopie multimodale a été utilisée afin d'observer sous un nouvel angle l'anatomie tissulaire animal. Le cytoplasme de plusieurs cellules peut générer de l'autofluorescence, tandis que les microtubules et le collagène peuvent tous les deux générer des signaux élevés de SHG. Enfin, les structures riches en liens CH<sub>2</sub>, telle la gaine de myéline, peut générer des signaux de type CARS très élevés. Les différentes structures d'un œil de porc ont été visualisées en microscopie multimodale, permettant de caractériser qualitativement la cornée, le limbus, et la sclera (Teng *et al.*, 2006). Les cellules épithéliales ont pu être distinguées l'une de l'autre via leur autofluorescence. Grâce à la microscopie SHG, il a été démontré que la densité ainsi que l'orientation du collagène dans l'œil varie avec la profondeur du tissu (Teng *et al.*, 2006). Une étude similaire a été réalisée en analysant la densité et l'orientation du collagène dans les tendons (Gusachenko *et al.*, 2012). Il a été confirmé que l'étirement mécanique du tendon correspond à l'alignement des fibres de collagène. La microscopie CARS, ciblant les liens C-H présent dans la membrane plasmique, a permis la visualisation de la croissance d'axones de neurones primaires en culture, ainsi que de visualiser des cellules musculaires en culture dans des matrices artificielles extracellulaires (Brackmann *et al.*, 2012, Loverde *et al.*, 2011). Ce type d'imagerie sera très utile lors de la caractérisation de cultures de cellules en contexte de biomatériaux, ayant pour but de générer des organes *ex vivo*. De plus, des tissus neuronaux peuvent être visualisés par la

microscopie CARS afin de retrouver les régions riches en axones myélinisés, puisque ceux-ci possède une densité anormalement élevée de membranes plasmiques contrairement au reste du tissu (Evans *et al.*, 2007).

La résolution spatiale de la microscopie multiphotonique non-linéaire permet d'observer plusieurs structures intracellulaires. Les microtubules, étant non-centrosymétriques, peuvent générer des signaux SHG. Une étude a observé des signaux de SHG générés dans les axones de neurones, mais non dans des dendrites et du corps cellulaire neuronale, dû spécifiquement à la polarisation des microtubules (Dombeck *et al.*, 2003). Puisque ce type de microscopie ne nécessite aucune fixation des tissus ou agents de contraste, des études comme celle-ci permettront de mieux comprendre l'implication des microtubules dans le développement des neurones et de leurs axones *in vivo*. La microscopie CARS, pouvant cibler les liens CH<sub>2</sub>, peut être utilisée pour étudier le métabolisme des lipides ainsi que le trafic membranaire (Le *et al.*, 2010). La combinaison de CARS et de la fluorescence a démontré que les corps lipidiques appelés « lipid droplets » interagissent avec des organelles cellulaires, et que la lipolyse de ces structures implique la protéine cellulaire CGI-58 (Nan *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2007). De plus, la microscopie CARS combinée à la spectroscopie CARS, permet de caractériser la composition lipidique de membranes cellulaires, et de détecter les radeaux lipidiques (Slipchenko *et al.*, 2009). Cette technologie pourra avoir des répercussions majeures dans les études de mouvement membranaire en contexte de communication intercellulaire et de transport de récepteurs par radeaux lipidiques lors de la réponse immunitaire.

La microscopie multimodale peut aider à la compréhension de divers mécanismes physiologiques. Par microscopie CARS, l'absorption des lipides par le petit intestin peut être visualisée en temps réel, pouvant par exemple aider les études liées à l'obésité (J. Zhu *et al.*, 2009). En utilisant comme modèle *C.elegans*, ce type de microscopie a permis de visualiser en temps réel le métabolisme des lipides d'un organisme vivant (Hellerer *et al.*, 2007). Enfin, la microscopie et spectroscopie CARS ont été combinés pour mieux caractériser la peau et les poils humains, ainsi que pour visualiser en temps réel la diffusion d'huiles appliqués au niveau de l'oreille d'une souris (Evans *et al.*, 2005, Slipchenko *et al.*, 2009, Zimmerley *et al.*, 2009a, Zimmerley *et al.*, 2009b). Ces études ouvrent la porte à la caractérisation de l'absorption et de l'efficacité de crèmes ou de médicaments appliqués de façon ectopique sur des tissus humains. De plus, la microscopie multimodale de la peau permettra de mieux comprendre les modifications tissulaires engendrées par la réponse physiologique aux dommages causés par le soleil.

## 6.2 Diagnostique biomédicale

Le développement de tumeurs cancéreuses peut altérer la matrice extra-cellulaire, telle la modification de la longueur et l'orientation des fibres de collagène dans les tissus. La microscopie multimodale, via la détection de SHG généré par le collagène, peut être utilisée afin de visualiser l'apparition de tumeurs chez des patients, de façon non-invasive contrairement aux biopsies (Perentes *et al.*, 2009a, Perentes *et al.*, 2009b). Cette microscopie a déjà été utilisée pour le diagnostic du cancer des ovaires et de la prostate (Adur *et al.*, 2014, Birk *et al.*, 2014, Keikhosravi *et al.*, 2014, Nadiarnykh *et al.*, 2010). De plus, des corps lipidiques intracellulaires ont été observés dans différents types de cancer (Ramos *et al.*, 1974, Sijens *et al.*, 1996). Une étude a démontré via la microscopie CARS que les hauts niveaux de lipides intracellulaires corrèlent avec les capacités métastatiques et invasives des cellules cancéreuses (Le *et al.*, 2009, H. W. Wang *et al.*, 2009). Enfin, la combinaison de microscopie CARS et de SHG a démontré que l'environnement péri-tumoral est caractérisé par une augmentation drastique de cellules lipidiques et d'une augmentation de la densité de collagène (Le *et al.*, 2007b). Ces résultats corrèlent avec des études ayant démontré qu'un environnement riche en lipide facilite la dissémination de cellules cancéreuses. Ces avancements permettront de pousser les capacités à identifier les tumeurs à risque de produire des métastases chez les humains.

Au niveau du col de l'utérus, la matrice extracellulaire doit être remodelée lors de la gestation afin de rester fermée lors de la grossesse, et de se dilater lors de l'accouchement (Leppert, 1995, Timmons *et al.*, 2010). Près de 13% des accouchements sont considérés prénatales, et la détection de femmes à risque demeure compliquée (Spong, 2007). L'analyse du cervix par un endoscope pouvant visualiser les signaux de SHG permet de vérifier le statut des fibres de collagène, et pourrait aider à prédire les cas d'accouchements prénataux (Zhang *et al.*, 2012).

Le diagnostic de maladies cardiovasculaires peut aussi bénéficier de la microscopie multimodale. Suite à un infarctus, les muscles cardiaques peuvent subir une fibrose, changeant le niveau de collagène ainsi que la souplesse du muscle. En combinant la visualisation de l'autofluorescence des muscles cardiaques, ainsi que les signaux SHG, la fibrose dans un modèle animal a pu être quantitativement évaluée (Caorsi *et al.*, 2013). La microscopie CARS a aussi été utilisée en combinaison avec la microscopie SHG afin de détecter et de caractériser des plaques de gras associées à l'athérosclérose dans les vaisseaux sanguins (Le *et al.*, 2007a, H. W. Wang *et al.*, 2008). Ces nouvelles technologies de microscopie pourraient s'avérer très importante en

clinique considérant l'incidence importante de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires dans les pays développés.

### 6.3 Analyse des interactions hôte-pathogènes

La visualisation de corps lipidiques par microscopie CARS a ouvert la porte à plusieurs études avec le virus de l'hépatite C (HCV), connu pour induire les « lipid droplets » (Lyn *et al.*, 2009). L'interaction entre le génome à ARN du HCV et les lipides de la cellule a été étudiée en culture cellulaire en combinant la microscopie à fluorescence avec la microscopie CARS. Cette stratégie a aussi permis de caractériser l'impact de certaines drogues sur les corps lipidiques lors de l'infection, améliorant nos connaissances sur les interactions entre le HCV et la cellule. Enfin, par fluorescence à deux photons, des cellules infectées par le VHS-1 ont pu être visualisées dans un ganglion neuronal complet (Ma *et al.*, 2014). Lors de l'infection de souris ROSA-YFP par un VHS-1 recombinant exprimant la recombinaise Cre, les cellules ayant été infectées exprimeront la protéine fluorescente jaune (YFP). La capacité de détecter la YFP en profondeur, sans sectionner le tissu, permet de facilement quantifier le nombre de cellules où la latence a été établie. Enfin, malgré les avancements en microscopie multiphotonique et les multiples avantages, la microscopie CARS, la microscopie SHG, ainsi que la fluorescence n'ont toujours pas été combinés afin d'étudier des infections virales en contexte tissulaire.

## 7 Hypothèse de travail

Au début de ce projet, peu d'information était disponible quant à l'importance d'UL24 lors de l'infection *in vivo*. Il était connu que, dans un modèle d'infection oculaire chez la souris, le virus déficient en UL24 (UL24X) produit des titres viraux 10 fois inférieurs à ceux du virus de type sauvage KOS, tel ce qui est observé dans des lignées cellulaires épithéliales. En contrepartie, les titres viraux chutent de 4 log<sub>10</sub> dans les TG à 3 jpi en absence d'UL24, et l'efficacité de réactivation virale *ex vivo* est réduite de près de 70% lors d'un essai d'explantation de TG. L'hypothèse avait été émise qu'UL24 serait un facteur important pour la réplication virale dans un neurone. Bien qu'un virus témoin de secours ait été produit pour la souche parentale à UL24X, *tkLTRZ-1*, aucun virus de secours direct pour UL24X n'a été caractérisé.

Au laboratoire, nous avons produit et caractérisé des virus recombinants possédant des mutations ponctuelles dans le cadre de lecture ouvert d'*UL24*. Ces mutations ciblaient des acides aminés hautement conservés, dont certains sont impliqués au niveau du site catalytique du motif

d'endonucléase. Nous avons démontré avec ces virus recombinants que le motif d'endonucléase d'UL24 est important pour la neuropathogénèse du VHS-1. Nous avons aussi démontré que l'absence de la protéine virale UL24 mène à une diminution drastique de la maladie zosteriforme associée à l'infection par le VHS-1 chez la souris. Enfin, la caractérisation *in vivo* des mutants ponctuels a démontré que l'on peut dissocier génétiquement le phénotype syncytial associé à UL24, du défaut dans la neuropathogénèse, appuyant l'hypothèse qu'UL24 est une protéine multifonctionnelle (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Malgré ces avancés, les mécanismes impliqués dans la réduction des titres viraux dans les TG en absence d'UL24 demeuraient inconnus.

Nous avons formulé comme première hypothèse de travail qu'UL24 serait un déterminant de la dissémination virale vers les tissus neuronaux. Une combinaison de virologie moléculaire, de cultures de cellules neuronales, d'expériences *in vivo*, et d'analyses immunohistologiques a été utilisé pour tester cette hypothèse. Le premier objectif de ce projet était de construire et de caractériser un virus témoin pour UL24X, UL24X-Rescue. Nous avons ensuite caractérisé le rôle d'UL24 dans des neurones immortalisés et dans des neurones primaires. Enfin, nous avons effectué plusieurs infections *in vivo* afin de caractériser le rôle d'UL24 dans la dissémination de l'infection de la cornée vers le TG.

Dans un deuxième temps, suite à la réalisation de nombreuses infections *in vivo*, nous avons formulé comme hypothèse de travail que l'utilisation de virus recombinants exprimant une protéine fluorescente permettra une stratégie d'analyse de déterminants de la pathogénèse du VHS-1 plus poussée. Notre second objectif a été d'établir une stratégie de production de virus recombinants exprimant une RFP, conservant un phénotype de type sauvage et exprimant une RFP de façon stable, afin de développer une stratégie d'imagerie tissulaire combinant la microscopie multiphotonique multimodale et des virus exprimant une protéine fluorescente. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire du docteur François Légaré de l'IRNS-EMT. Nous avons d'abord produit et caractérisé deux isolats indépendants du virus vUs7-8mCherry, possédant une cassette d'expression de la RFP mCherry entre les gènes viraux *Us7* et *Us8*. Nous avons ensuite démontré la capacité de visualiser des foyers infectieux par microscopie à fluorescence dans des coupes histologiques de la cornée et dans le TG. Enfin, en collaboration avec le laboratoire du dr Légaré de l'INRS-Énergie Matériaux Télécommunications, nous avons mis au point et optimisé une plateforme de microscopie multimodale permettant de combiner la microscopie à fluorescence à deux photons, la microscopie SGH, et la microscopie CARS, pour visualiser une infection virale dans un tissu non-sectionné, sans ajout d'agents de contraste.



## CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION

### Résumé de la première publication

#### Manuscrit soumis au Journal of General Virology

**Titre : La mutation d'UL24 interfère avec la dissémination de l'infection aiguë du virus herpès simplex 1 de la cornée vers le ganglion trigéminal.**

Le virus de l'herpès simplex 1 infecte initialement les cellules épithéliales de la muqueuse, pour ensuite infecter les neurones sensitifs menant ultimement à l'établissement d'une infection latente dans les ganglions trigéminaux (TG). *UL24* est un gène hautement conservé des *Herpesviridae* qui a été identifié comme un déterminant de la pathogenèse chez plusieurs *alphaherpesvirinae* mais les mécanismes impliqués demeurent inconnus. Dans un modèle murin d'infection oculaire, un virus déficient en UL24 montre une réduction 1 log<sub>10</sub> des titres viraux dans le surfactant oculaire tandis que les titres viraux dans les TG sont souvent sous le seuil de détection de nos expériences. De plus, l'efficacité de la réactivation à partir de la latence est aussi drastiquement réduite. Nous avons alors investigué comment UL24 contribue à l'infection aiguë du TG. Nos résultats comparant l'impact d'UL24 sur les titres viraux dans les tissus oculaires comparativement à ceux présents dans le surfactant oculaire n'ont pas révélé un défaut au niveau du relâchement du virus à partir de la cornée. Nous avons aussi observé que le défaut de la réplication virale dans des neurones embryonnaires primaires en absence d'UL24 n'était pas plus sévère que celui dans des lignées épithéliales. En fait, des analyses histologiques ont révélé que l'infection avec un virus déficient en UL24 mène à une réduction significative du nombre de neurones infectés de façon productive à 3 jpi. De plus, il y avait une réduction significative du nombre de neurones positifs pour de l'ADN viral à 2 jpi suite à l'infection par UL24X, comparativement à l'infection avec le virus de secours témoin. Nos résultats appuient un modèle où UL24 agirait sur la dissémination virale de l'infection de la cornée vers les TG.

## **Contribution des auteurs**

*Pierre-Alexandre Rochette* : Conception et réalisation des manipulations (sauf pour les expériences de la figure 3a-c), préparation des figures et rédaction du manuscrit.

*Amélie Bourget* : Réalisation des expériences pour la figure 3a-c.

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

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

Pierre-Alexandre Rochette<sup>‡</sup>, Amélie Bourget<sup>‡\*</sup>, and Angela Pearson<sup>‡#</sup>

<sup>‡</sup> Université INRS, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies,  
Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

Running title: Role of UL24 in acute infection of TG in vivo

**Summary: 250 words**

**Text: 5496 words**

**# figures: 5**

**# Corresponding Author:**

**# tables: 2**

Angela Pearson

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec H7V 1B7 CANADA

Phone: 1 (450) 687-5010

Fax: 1 (450) 686-5501

[angela.pearson@iaf.inrs.ca](mailto:angela.pearson@iaf.inrs.ca)

\* Present address: Montreal Chest Institute, McGill University Health Centre, 3650 Saint-Urbain, Montreal, Québec, CANADA H2X 2P4

## Summary

Herpes simplex virus 1 initially infects epithelial cells of the mucosa, and then goes on to infect sensory neurons leading ultimately to a latent infection in trigeminal ganglia (TG). *UL24* is a core herpesvirus gene that has been identified as a determinant of pathogenesis in several *alphaherpesvirinae*, though the underlying mechanisms are unknown. In a mouse model of ocular infection, a UL24-deficient virus exhibits a reduction in viral titers in tear films of 1 log<sub>10</sub> while titers in TG are often below the level of detection. Moreover, the efficiency of reactivation from latency is also severely reduced. Herein, we investigated how UL24 contributes to acute infection of TG. Our results comparing the impact of UL24 on viral titers in eye tissue versus in tearfilms did not reveal a general defect in virus release from the cornea. We also found that the impairment of replication seen in mouse primary embryonic neurons with a UL24-deficient virus was not more severe than that observed in an epithelial cell line. Rather, *in situ* histological analyses revealed that infection with a UL24-deficient virus led to a significant reduction in the number of acutely infected neurons at three days post-infection. Moreover, there was a significant reduction in the number of neurons positive for viral DNA at 2 days post-infection for the UL24-deficient virus as compared to that observed for wild-type or a rescue virus. Our results support a model whereby UL24 functions in the dissemination of acute infection from the cornea to neurons in the TG.

## Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) replicates in epithelial cells, then infects the ends of sensory neurons that form neuronal ganglions (Roizman *et al.*, 2007 ). HSV-1 persists in neurons as a life-long latent infection, and may reactivate, often following stress, resulting in recurrent infections (reviewed in (Roizman *et al.*, 2007 )). In healthy individuals, symptoms typically vary from cold sores to viral keratitis, and in rare cases infections can lead to a life threatening encephalitis (reviewed in (Whitley *et al.*, 2001)). In the absence of a fully competent immune system, for example people living with AIDS, neonates, or stem cell recipients, the symptoms are often severe (reviewed in (Fatahzadeh *et al.*, 2007)). Many questions remain regarding the spread of infection within the host, which has hindered the development of treatments to prevent recurrent infections.

*UL24* is highly conserved across the *herpesviridae* family (Davison, 1993, Roizman *et al.*, 2007 ). *UL24* is involved in nucleolar modifications during HSV-1 infection, and impacts the nuclear egress of capsids (Bertrand *et al.*, 2010, Bertrand *et al.*, 2008a, Lymberopoulos *et al.*, 2011). *UL24* has also been shown to induce a G2/M cell cycle block when expressed in the absence of infection (Nascimento *et al.*, 2009). Following infection of an epithelial-derived cell line, a *UL24*-deficient HSV-1 strain produces 5 to 10 times fewer infectious virions, and exhibits reduced plaque size as well as a temperature sensitive syncytial phenotype (Jacobson *et al.*, 1989b, Sanders *et al.*, 1982, Tognon *et al.*, 1991).

*In vivo*, HSV-1 *UL24* has been shown to be important for pathogenesis (Jacobson *et al.*, 1998). Mice infected with a *UL24*-null virus exhibit a reduction in viral titers in trigeminal ganglia (TG) of up to 4 log<sub>10</sub>, a 2 log<sub>10</sub> reduction in viral DNA and a 1 log<sub>10</sub> reduction in *lat* transcripts present in latently infected TG, a drastic reduction in the severity of disease, as well as a reduction in the frequency of reactivation from latency in explant assays (Jacobson *et al.*, 1998, Leiva-Torres *et al.*, 2010). Reduced pathogenesis has also been observed for *UL24* mutants of other alphaherpesviruses, such as HSV-2 (Blakeney *et al.*, 2005), equine herpes virus (Kasem *et al.*, 2010), and varicella zoster virus (Ito *et al.*, 2005). The exact mechanisms through which *UL24* modulates pathogenesis is unknown.

In this study, we tested the hypothesis that the large reduction in viral titers in mouse TG observed with a *UL24*-deficient virus is a result of a defect in the dissemination of infection from the cornea to neurons of the TG.

## Results

### Construction and characterization of a UL24X rescue virus

UL24X contains stop codons in all three reading frames such that translation is blocked at codon 44. This design ensures that the mutant retains wild type levels of the viral thymidine kinase (TK), whose gene (*UL23*) is coded on the opposite strand and partially overlaps *UL24*. UL24X was originally constructed by homologous recombination of the appropriate transfer vector and the KOS-based strain *tkLTRZ-1* (Davar *et al.*, 1994). The latter has a *lac Z* gene inserted within *UL23*, which can be used to select for recombinants. A rescue of *tkLTRZ-1* has been described demonstrating that this rescue virus has a wild type phenotype (Jacobson *et al.*, 1998). Nevertheless, we wished to generate a direct rescue of UL24X for use in our subsequent experiments. A UL24X rescue virus was generated by homologous recombination of infectious DNA from UL24X co-transfected with the transfer vector pAG5.

To confirm that reinsertion of the wild-type *UL24* gene within UL24X could correct the temperature sensitive syncytial plaque phenotype (Jacobson *et al.*, 1989b, Tognon *et al.*, 1991), we infected Vero cells at low MOI with KOS, UL24X, or vUL24X-Rescue (Fig. 1a). Infected cells were overlaid with media containing methyl cellulose, and placed at 34 °C, 37 °C, or 39 °C for 48 hours. The three viruses formed similar plaques at 34 °C. In contrast, while UL24X produced syncytial plaques at 37 °C and at 39 °C, vUL24X-Rescue produced non-syncytial plaques similar to those of KOS at both temperatures.

We next tested the rescue virus in a one-step viral replication assay (Fig. 1b). Vero cells were infected with KOS, UL24X or vUL24X-Rescue at an MOI of 5. Although levels did not reach those observed with KOS, we found that viral yields were increased for vUL24X-Rescue as compared to UL24X, resulting in significantly higher viral titers for the rescue virus at both 12 hpi and at 24 hpi.

Importantly, we demonstrated that vUL24X-Rescue behaved similarly to KOS *in vivo*. 8-week-old CD-1 mice were infected with either  $2 \times 10^6$  or  $6 \times 10^2$  pfu per eye of KOS, UL24X or vUL24X-Rescue (Fig. 2). Viral titers in tear films were determined for days 1, 2 and 3 post-infection (Fig. 2a, b, c). We found that the average ocular viral titer for vUL24X-Rescue at an inoculum of  $2 \times 10^6$  pfu per eye was higher than that for UL24X, and similar to that for KOS. At day 3 post-infection, vUL24X-Rescue produced viral titers in the TG similar to those of KOS, and values for both viruses were significantly higher than the viral titers produced by UL24X (Fig. 2d). Moreover,

there was no statistical difference in titers obtained from mice infected with KOS or vUL24X-Rescue infected with  $6 \times 10^2$  pfu per eye.

We also found that the severity of disease was restored to wild-type levels with vUL24X-Rescue both at inocula of  $2 \times 10^6$  and  $6 \times 10^2$  pfu per eye (Table 1). Furthermore, we found no statistical difference in the number of TG that reactivated *ex vivo* from vUL24X-Rescue-infected mice as compared to KOS-infected mice, thus the defect in reactivation observed with UL24X was corrected (data not shown). These data confirm that *in vivo* defects observed for UL24X are attributable to the *UL24* mutation.

### **Importance of UL24 for viral replication in primary embryonic neurons is similar to that in epithelial-derived cell lines.**

One possible explanation for the disparity between the impact of *UL24* mutations on viral titers in the corneal epithelia and in TG would be a specific requirement of UL24 for replication in neurons. To test this hypothesis, we compared replication of KOS, vUL24X-Rescue and UL24X in mouse primary embryonic neurons (Fig. 3a). Neurons were infected at an MOI of 0.1, and total virus was harvested at 12, 24, 36, 48, and 72 hpi. We found that the reduction in titers for UL24X in neurons was of the same magnitude as the viral replication defect observed for UL24X in epithelial-derived cell lines (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989b). Moreover, we obtained similar results using neurons derived from the human neuroblastoma cell line LA-N-5. Following differentiation by retinoic acid (RA), these cells develop into cholinergic neurons with characteristic long cytosolic extensions within eight days. By day 8 post RA treatment, over 95% of the cells stained positive for the neuronal maturation marker neurofilament M indicating that they had become mature neurons (Fig. 3b). Neurons were either mock-infected, or infected with the wild type virus KOS or UL24X at an MOI of 10. At 9 hpi, cells were fixed, and immunostained for the viral single-stranded DNA-binding protein ICP8, a marker for viral replication compartments (VRC). We observed similar large VRCs in both KOS- and UL24X-infected LA-N-5 neurons (Fig. 3c). Next, differentiated LA-N-5 cells were infected with KOS or UL24X at an MOI of 10, and titers determined for 6, 12, 18, and 24 hpi (Fig. 3c). In absence of UL24, we observed a 10-fold reduction in viral titers as compared to KOS. Here too reduction was of the same magnitude as the viral replication defect observed for UL24X in epithelial-derived cell lines (Jacobson *et al.*, 1998, Jacobson *et al.*, 1989b). These data suggest that there is no inherent difference with respect to the importance of UL24 for viral replication in neurons as compared epithelial-derived cells.

## **Reduction of the ocular viral load as observed in absence of UL24 is not sufficient to explain the drastic reduction of viral titers in the TG**

Successful dissemination of HSV-1 infection from the eye to the TG depends in part on the amount of virus present in the cornea (S. H. Chen *et al.*, 2004, Leib *et al.*, 1989, Sawtell, 1998). We first verified that reduction in viral titers detected in tear films of mice infected with UL24X reflected a defect in viral replication within the cornea and not a defect in virus release from corneal epithelial cells. Mice were infected with  $2 \times 10^6$  pfu per eye of KOS, vUL24X-Rescue or UL24X. Eyes were harvested post-mortem at 2 dpi and homogenized. We found that, similar to the reduction previously observed in tear films, viral titers were reduced 10-fold in eye homogenates for mice infected with UL24X as compared to KOS and vUL24X-Rescue (data now shown). Thus, we did not observe a defect in virus release with UL24X, and therefore concluded that the magnitude of the reduction of viral titers in tear films reflected the reduction of the viral load within cornea.

We next tested if under our conditions, the 10-fold reduction of the ocular viral load as observed for UL24X was sufficient to cause the up to  $4\log_{10}$  reduction in viral titers in TG, possibly by a threshold effect. Thus, we attempted to infect mice with an amount of wild-type virus that would produce titers in tear films similar to those seen for UL24X under our standard infection conditions. We infected mice with either  $2 \times 10^6$  pfu per eye of UL24X, or with quantities of KOS virus decreasing from  $2 \times 10^6$  to  $2 \times 10^2$  pfu per eye (Fig. 4). One dpi (Fig. 4a), at a time where we would expect the impact on TG titers two days later would be the greatest, there was no significant difference between the viral titers in tear films for mice infected with KOS at  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  and  $2 \times 10^4$  pfu per eye; for each condition, titers were approximately 10 fold higher than for mice infected with UL24X at  $2 \times 10^6$  pfu per eye. At the other end of the spectrum, infecting with  $1 \times 10^3$  pfu per eye or less led to viral titers in tear films on 1 dpi that were significantly below the levels produced upon infection with  $2 \times 10^6$  pfu per eye of UL24X, with most viral titers falling below our detection threshold. Interestingly, although we were unable to detect infectious virus in tear films at 2 and 3 dpi in many of the mice that were infected with  $1 \times 10^3$  pfu per eye or less; in those where virus was detected, titers rose and surpassed levels seen with UL24X by day 3 post-infection (Fig. 4b-c). Furthermore, we found that a dose of  $2 \times 10^3$  pfu per eye of KOS was the only one tested that resulted in tear films titers that were down to levels on day one similar to those seen for UL24X inoculated at  $2 \times 10^6$  pfu per eye, and where infectious virus was detected in all mice tested. But despite this similarity to UL24X, titers in TG at 3 dpi rose to levels seen for higher inocula of KOS, far surpassing titers obtained for UL24X (Fig. 4d). Thus, we concluded that the 1

$\log_{10}$  reduction in tear film titers with UL24X was not sufficient to explain the drastic reduction in viral titers in TG. Although the similarity in titers seen with the inoculum of  $2 \times 10^3$  pfu of KOS and  $2 \times 10^6$  pfu of UL24X was lost by day 3 post-infection (Fig. 4c), we would not expect virus levels in tear films to have an impact on TG titers of the same day. The reverse strategy of using an inoculum of UL24X ( $1 \times 10^8$  pfu per eye) that was higher than that used for KOS, did not produce higher viral titers in the eye or in TG.

Although lowering the infectious dose of KOS to  $1 \times 10^3$  pfu per eye reduced the incidence of viral reactivation to levels similar to those observed for UL24X (Table 2), unlike UL24X, this reduction could be explained by a reduction in the likelihood of establishing a productive infection in the eye as demonstrated by the large number of mice infected with  $1 \times 10^3$  pfu per eye or less in which levels of virus in tear films were below the detection limit of the experiment. Similarly, we also noted a difference between UL24X and KOS with regards to the link between acute replication in the eye and the development of clinical signs. Lowering the infectious dose of KOS reduced the incidence of acute infection, but severe clinical signs were still evident in many animals, while for UL24X, acute replication in the eye was detected in all animals with hardly any clinical signs (Table 1).

These results indicate that the approximate 1  $\log_{10}$  defect in viral replication of UL24X observed in the eye cannot account for the large reduction in viral titers in TG and in clinical signs, and suggests a specific role for UL24 in the acute infection of TG.

### **UL24 is important to establish a productive infection in a high number of neurons at 3 dpi.**

The low viral titers in TG observed with UL24X could theoretically result from there being the same number of infected neurons as seen with KOS, but a lower viral yield, or due to fewer acutely infected neurons with the same or a lower viral yield than for KOS. We next tested the hypothesis that the defect was at the level of establishment of acute infection in neurons. TG were harvested from mice infected with KOS, UL24X or vUL24X-Rescue at 3 dpi, sectioned, stained using an antibody against HSV-1, and visualized by immunohistofluorescence using a stereoscope. We found that for UL24X, the size of the infected area in the TG, when one could be detected, was typically smaller than that observed for KOS or vUL24X-Rescue (Fig. 5a). Furthermore, for both KOS and vUL24X-Rescue, we often observed multiple large foci of infection per TG, which was in contrast to our observations for UL24X where we typically detected either none or a single center of infection. Moreover, all TG from KOS- and vUL24X-Rescue-infected

mice stained positive for viral lytic antigens, while for UL24X, lytic replication was detected in only half of the TG from infected mice.

For quantification purposes, sections were then analyzed by confocal microscopy. Foci of infection consisted primarily of large pseudomonopolar neurons as identified by their characteristic morphology (Krastev *et al.*, 2008, Mochizuki *et al.*, 1995). For each virus, infected neurons were quantified from individual TG harvested from at least three infected mice. We found that the average number of infected neurons per TG section for KOS and vUL24X-Rescue was approximately 7 and 6 respectively, with individual values ranging from 1 up to 16 (Fig. 5b). In contrast, in the absence of UL24, there was on average a 30-fold reduction in the number of infected neurons detected per section as compared to that observed for both KOS and vUL24X-Rescue.

### **Absence of UL24 leads to a reduced number of TG neurons staining positive for HSV-1 DNA 2 dpi**

At 3 dpi, the total number of neurons expressing late viral proteins is the cumulative result of newly infected cells from the periphery, as well as possible interneuronal dissemination of the infection within the TG. Moreover, detection of infected neurons by immunohistofluorescence using our  $\alpha$ HSV-1 antibody depends on the expression of late viral genes. Therefore, using this technique, we could miss neurons where the genome gains access to the nucleus and begins to be replicated but there is little expression of late proteins. In order to have a better idea of the number of neurons that are infected prior to extensive spread of the virus, we used *in situ* hybridization to quantify the number of infected neurons at 2 dpi (Fig. 5c-d). At this time point, we could expect that on average the virus could have replicated once in epithelial cells, and then gone on to infect neurons of the TG. Thus, infected neurons would mostly represent cells infected from the periphery. Staining of infected neurons was achieved through whole mount *in situ* hybridization to detect the HSV-1 genome. We found that in absence of UL24, the size of the infected area in the TG, when one could be detected, was typically smaller than that observed for KOS or vUL24X-Rescue (Fig 5c). For each virus, infected neurons were quantified from individual TG harvested from at least three infected mice (Fig 5d). For all the viruses tested, the number of cells for which HSV-1 DNA was detected at 2 dpi was much lower than the number of cells expressing viral proteins at 3 dpi. We found that the average number of HSV-DNA-positive neurons per TG section for KOS and vUL24X-Rescue was approximately 1.5 and 3 respectively, with individual values ranging from 0.19 up to 5. In stark contrast, we found that in the absence

of UL24, there was on average a 50 and 100 fold reduction in the number of infected neurons detected per section as compared to that observed for both KOS and vUL24X-Rescue respectively, with an average value of 0.03 and individual values ranging from 0.018 to 0.18. Thus, in the absence of UL24, reduced spread of acute infection from the cornea to neurons of the TG appears to be a major factor leading to the drastic reduction in viral titers seen in TG at 3 dpi.

## Discussion

### **Reduced viral titers in the eye cannot explain the drastic reduction of viral titers in TG seen with UL24X**

It is known that a decrease in the viral load within the cornea can impact the amount of virus reaching the TG (S. H. Chen *et al.*, 2004, Leib *et al.*, 1989, Sawtell, 1998); however, we identified inocula for KOS where titers at 1 dpi were below those for UL24X, but nevertheless resulted in TG titers that far surpassed those for UL24X. Thus, our results do not support a model whereby a reduction of viral load in tear films is the cause of the drastic reduction in viral titers observed in TG for the UL24 mutant. Rather, our results point to UL24 playing a direct role in neurovirulence.

### **A UL24 mutant replicates similarly in epithelia-derived cells, in murine embryonic neurons, and in LA-N-5-derived neurons**

HSV-1 infection of neurons depends on a select subset of genes required to compensate for the lack of robust nucleotide metabolism in these non-dividing cells, for example, the viral *ribonucleotide reductase* (D. J. Goldstein *et al.*, 1988b, Jacobson *et al.*, 1989a, Perkins *et al.*, 2002). Infection of primary mouse embryonic neurons can reveal neuronal replication defects of HSV-1 strains harboring critical mutations in such neurovirulence genes (Perkins *et al.*, 2002). We found that infection of such primary neurons in absence of UL24 led to a decrease in viral titers as compared to KOS, but this decrease of approximately 1 log<sub>10</sub> was no greater than what is observed in an epithelial cell line. Similar results were obtained after infection of neurons derived from a human neuroblastoma cell line (LA-N-5). Thus, while UL24 does seem to play a role in the efficiency of viral replication in a variety of cell types, our results do not support a model whereby UL24 is critical for productive infection in neurons.

It has recently been shown that infection of neurons at the level of the cell stroma favours an acute infection, while in contrast, infecting neurons through their axonal termini favours a latent infection (Hafezi *et al.*, 2012). This effect is possibly due to loss of specific transcription factors from the tegument of the incoming virion as it makes its way along the axon to the nucleus, thus shifting the balance between viral lytic gene expression and latency (Hafezi *et al.*, 2012, Roizman *et al.*, 1987). In our experiments, we did not restrict infection of neurons to a specific substructure of the cell. Thus, we cannot rule out the possibility of a UL24-specific function related to infection of neurons via their axonal termini. Although such a function could theoretically account for the discrepancy between the *in vivo* observations and our results obtained for UL24X infections in neuronal cultures, UL24 of HSV-1 has never been detected in extracellular virions (Loret *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2002a), and thus is unlikely to play a direct role in retrograde transport to the neuronal body following entry. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that absence of UL24 during cellular infection has an impact on tegument composition, which could ultimately impact subsequent transport within neuronal axons.

### **UL24 affects the spread of infection from the cornea to neurons of the TG**

While the 5-10 fold reduction in the efficiency of viral replication of UL24X in neurons, as observed in cell culture, undoubtedly contributes in part to the drop in viral titers in TG, it cannot by itself account for the severity of the defect in neurovirulence seen with UL24X. Rather, the huge drop in TG viral titers appears to be due to a significant reduction both in the number of neurons and in the number of TG where acute infection takes hold.

To identify infected neurons where viral replication may not have progressed to the late phase of gene expression, we also analyzed TG at 2 dpi using whole mount *in situ* hybridization targeting the HSV-1 genome. Of note, we could not distinguish between incoming and newly synthesized DNA in these experiments, thus we cannot formally rule out the possibility that the UL24 mutant entered and released its genome into neurons as efficiently as the wildtype virus, but then failed to replicate its genome. Nevertheless, this strategy enabled us identify infected neurons prior to a major contribution of any intraganglionic spread of the infection. We observed a significant decrease in the number of neurons harboring HSV-1 DNA in the absence of UL24. In all our experiments aimed at detecting HSV-1 proteins or DNA *in situ*, we never detected infected neurons in more than half of the TG isolated from UL24X-infected mice.

Our results point to UL24 being a novel player in the dissemination of HSV-1 infection from the cornea to TG neurons. Further studies will be required uncover the precise mechanism underlying the role of UL24 in the neuropathogenesis of HSV-1.

## Methods

### Viruses and cells

HSV-1 strains were propagated and titrated on Vero cells as described previously (Lymberopoulos *et al.*, 2007). Primary embryonic neurons were harvested from E16-18 CD-1 mice essentially as described previously (Jacomy *et al.*, 2006). LA-N-5 cells were maintained and differentiated with retinoic acid (RA) as described previously (D. P. Hill *et al.*, 1998). The HSV-1 strains KOS and UL24XG (Jacobson *et al.*, 1998) were originally provided by D.M. Coen (Harvard Medical School). vUL24X-Rescue was generated by homologous recombination essentially as described previously by cotransfecting UL24X-infectious DNA with the linearized transfer vector pAG5 (Griffiths *et al.*, 2003) into Vero cells using Lipofectamine (Life technologies). Screening for recombinant virus was done by PCR designed to detect the 24 bp insertion within the *UL24* open reading frame (ORF) of UL24X (5' TACGAAGCCATACGCGC and 5' GTCAACAGCGTGCCGC). The *UL24* ORF of vUL24X-Rescue was sequenced to ensure the absence of undesired mutations.

### Viral replication assays

Viral yield in primary mouse embryonic neurons was assessed in a multi-step replication assay at an MOI of 0.1. Primary neurons ( $2 \times 10^5$  cells  $\text{cm}^{-2}$ ) were seeded in duplicate in six-well Cell+ plates (Sarstedt) that were pretreated with poly-D-lysine. Viral yield in LA-N-5 neurons was assessed in a one-step replication assay. LA-N-5 cells ( $4 \times 10^4$  cells per well) were seeded in duplicate in six-well Cell+ plates, and differentiated into neurons. Neurons were infected at an MOI of 10 in 2 ml of preheated complete RPMI 1640 medium containing 1 % FBS. For viral replication assays in Vero cells,  $2.5 \times 10^5$  cells were seeded in duplicate in cell culture tubes containing 2 ml of complete DMEM medium. The following day, cells were infected at an MOI of 5. At the indicated times post-infection, cells and supernatant were collected and placed at  $-80^\circ\text{C}$ . At the end of the experiments, total virus (cell-associated and cell-free) was titrated on Vero cells. Statistical analysis was achieved using the student t-test,  $\alpha = 0.05$ .

## **Immunofluorescence on cells in culture**

LA-N-5 cells were differentiated on #1 coverslips pre-treated with 0.1 % cold water fish skin gelatin (Sigma-Aldrich). Neurons were either mock-infected or infected at an MOI of 10 for nine hours in 200  $\mu$ l of preheated RPMI 1640 medium containing 1 % FBS. At the indicated times post-RA-treatment or post-infection, cells were fixed with PBS containing 4 % (w/v) paraformaldehyde (PFA), permeabilized with chilled methanol for five minutes at -20°C, washed, and immunostained. Coverslips were mounted on slides using ProlongGold antifade reagent (Life technologies). The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-ICP8 (Abcam), rabbit polyclonal anti-Neurofilament M (Milipore), and Alexa 488-conjugated goat polyclonal antibodies directed against rabbit or mouse IgG. Nuclei were stained using Draq5 (Biostatus limited). Confocal microscopy was carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier imaging facility using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal system with an argon-krypton laser at 488 and 568 nm (diode, 638 nm) mounted on a Nikon E800 microscope using a 60x objective, with an aperture of 1.4, and a 1.6x software magnification in the Lasersharp software program (Bio-Rad). Images were prepared using Adobe Photoshop.

## **Murine model of ocular infection**

Animal experiments were conducted at the INRS-Centre for Experimental Biology in accordance with institutional good animal care practices. Ocular infection of CD-1 mice deeply anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine, analyses of acute replication in the eye and TG, and *ex vivo* reactivation following latency, were conducted essentially as described previously (Coen *et al.*, 1989, Leib *et al.*, 1989, Leiva-Torres *et al.*, 2010). Backtiters of inocula were verified following infection of the mice. Acute replication in the cornea was determined by titrating virus in pooled tear films from both eyes collected with moistened sterile cotton swabs while the mice were anaesthetized with isoflurane (Baxter). In each experiment, for each time point, titers in tear films and titers in TG were determined for at least three mice. Data points that were below the level of detection of the experiment were treated as the limit values for calculation of means. Statistical analysis was achieved using the student t-test,  $\alpha = 0.05$ . For the reactivation assays, statistical analysis was achieved using Fisher's exact test.

## **Disease scoring**

Clinical disease was assessed as described previously (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Five animals per group were followed daily for the indicated period of time.

## **Probe preparation for wholemount *in situ* hybridization**

A DIG-labeled DNA probe was used for *in situ* hybridization to detect HSV-1 genomic DNA. Three  $\mu\text{g}$  of EcoR1b plasmid (Goldin *et al.*, 1981) containing a 20 kb fragment of the HSV-1 genome were used as a template in conjunction with the High-Primed DNA labelling kit (Roche) with a 1:2 ratio of DIG-labelled dUTP to dTTP.

## **Wholemount *in situ* hybridization**

Detection of cells that stained positive for HSV-1 DNA in histological sections was achieved by wholemount *in situ* hybridization (WmISH) as described previously (Escalante *et al.*, 1995) using a DIG-labelled probe.

## **Histological sectioning**

TG were harvested at 3 dpi, washed once in PBS, and fixed overnight at 4 °C in a solution of PBS containing 3.2 % PFA (Electron Microscopy Sciences), and then stored in PBS at 4 °C. Prior to sectioning, samples were incubated at 4 °C overnight in a solution of PBS containing 30 % sucrose. TG were imbedded in freezing media (Histoprep, Fisher), and placed on dry ice for 30 minutes. Each TG was entirely processed into 8 microns sections on a Microm HM525 cryostat using replaceable blades (Edge-Rite, Thermo Scientific). All sections were serially placed on slides, and overlaid with PBS to prevent samples from drying.

## **Immunohistofluorescence**

Immediately following tissue sectioning, samples were permeabilized for 30 minutes with PBS containing 5 % NCS and 0.1% Triton X-100. Slides were dried briefly, and incubated overnight at 4 °C in a humid chamber (Sigma) with a rabbit polyclonal anti-HSV-1 (Abcam) antibody, and Hoechst (Life technologies) for nuclear staining. The next day, slides were washed

three times with PBS containing 5 % NCS, incubated for 1.5 hours at room temperature with a goat polyclonal anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa568, washed, and coverslips mounted using ProlongGold. Antibodies were diluted in PBS containing 5 % NCS.

### **Analysis of stained histological sections by fluorescence microscopy**

Low magnification imaging of whole TG sections was achieved using a stereoscope fluorescence microscopy system (Nikon SMZ800, X-Cite 120 series) and a Q-Imaging camera (01-RET-2000R-F-M-12-C) at a 6.3X optical magnification.

Quantification of the number of infected neurons per section was achieved using a high magnification epifluorescence microscope (Nikon eclipse TE2000-U) at 40X optical magnification. Neurons were identified qualitatively by the large size of the nucleus, their large cell body size, and their inherent autofluorescence that emits in the green spectrum. Neurons were identified as infected by positive anti-HSV-1 immunohistofluorescence staining. For each ganglion analyzed, the number of infected TG neurons was determined for each section produced. Results are presented as the total number of infected neurons per number of sections obtained for a given TG. Statistical analysis was achieved using the student t-test,  $\alpha = 0.05$ .

### **Analysis of histological sections after whole mount *in situ* hybridization**

Quantification of the number of infected neurons per section was achieved using a high magnification phase contrast microscope (Nikon eclipse TE2000-U). Infected neurons were identified through the appearance of a purple precipitate within the cell nucleus. For each ganglion analyzed, the number of infected TG neurons was determined for each section produced. Results are presented as the average number of infected neurons per section of the TG. Statistical analysis was achieved using the student t-test,  $\alpha = 0.05$ .

## **Acknowledgments**

We thank D. Favreau and P. Talbot (INRS-Institut Armand-Frappier) for assistance with the setup of LA-N-5 neuronal cultures. DNA sequencing was carried out by the McGill University and Génome Québec Innovation Centre. P.-A.R. is the recipient of scholarships from the Fondation Armand-Frappier (FAF) and the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec. A.B. was the recipient of scholarships from the FAF and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). This work was supported by an operating grant from CIHR (MOP 82924), by Institut Pasteur International Network—Paribas funds, and infrastructure and equipment grants from the Canada Foundation for Innovation (9991) and the National Science and Engineering Research Council (300745) to A.P.

## Tables and Figures

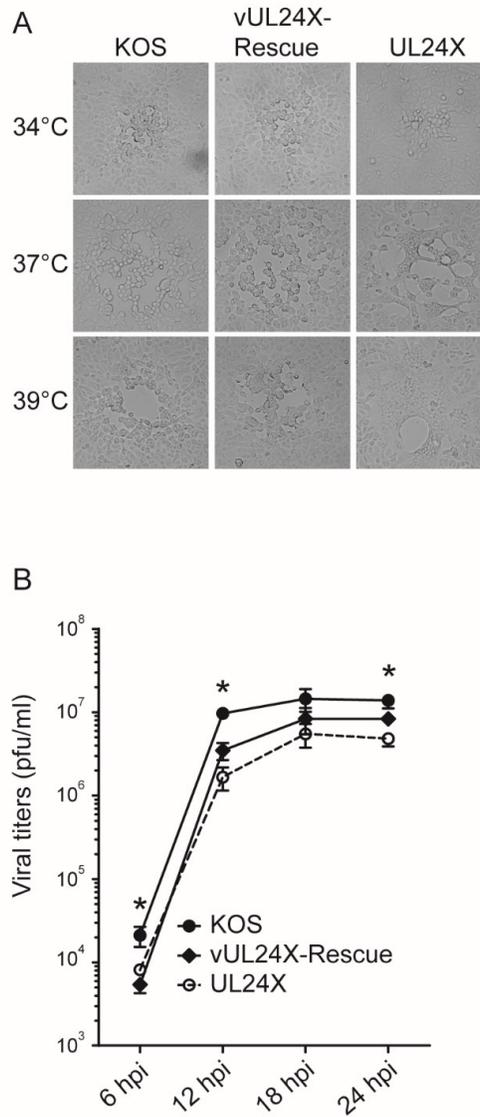
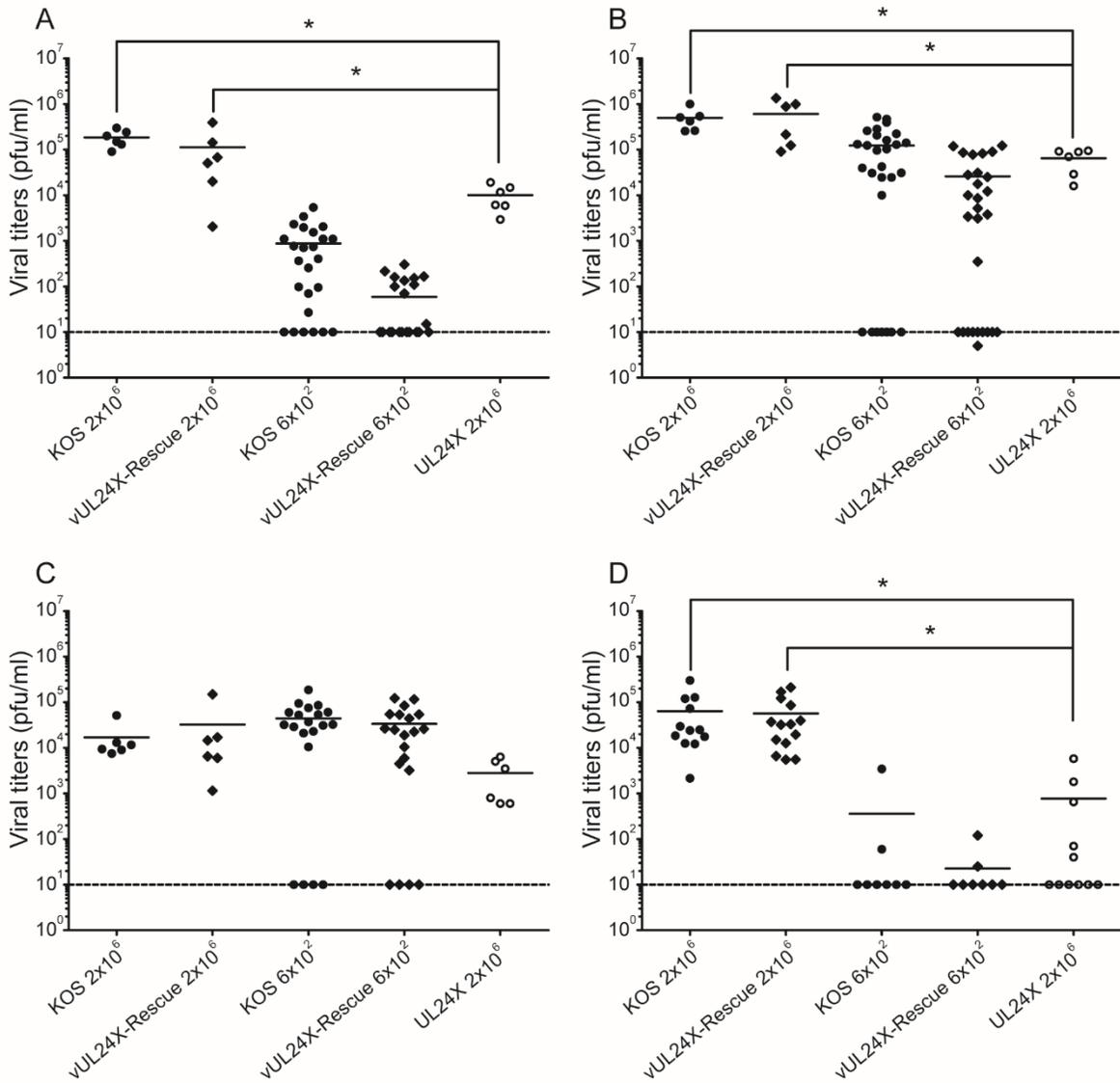
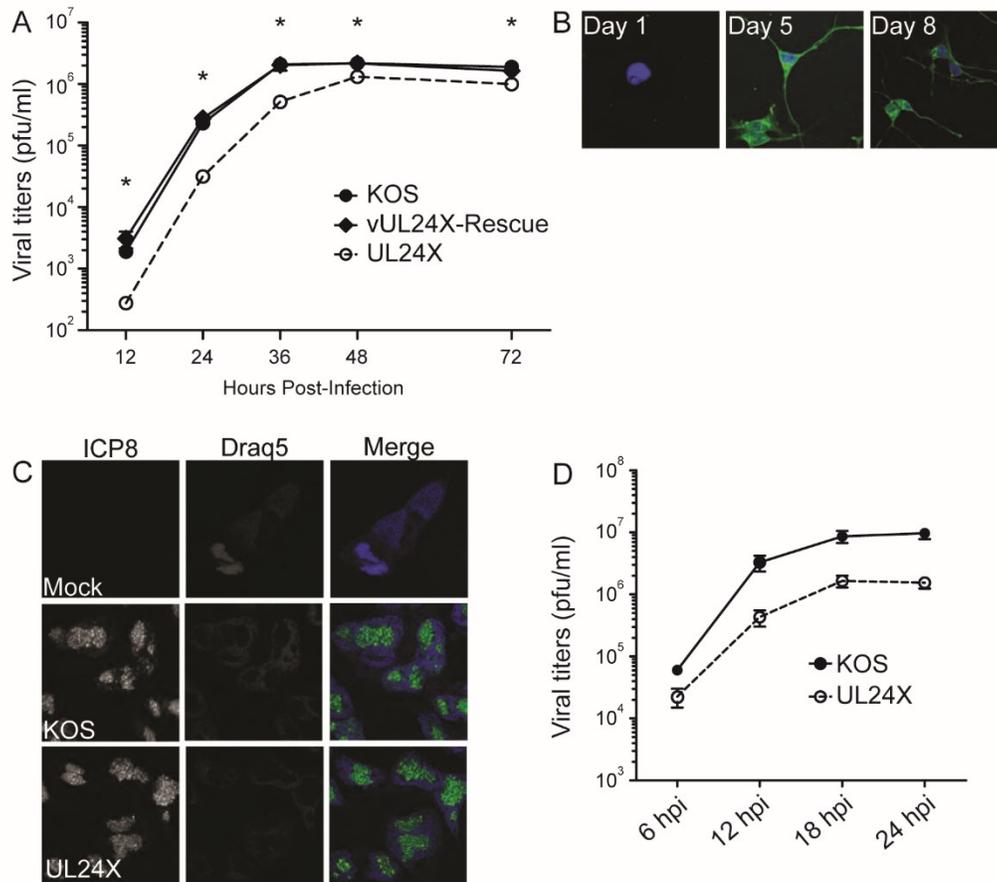


Figure 1

Characterization of a UL24X rescue virus in cell culture. A) Comparison of plaque morphology for KOS, UL24X, and vUL24X-Rescue on Vero cells at 2 dpi grown at the indicated temperatures. B) One-step replication assay comparing KOS, UL24X, and vUL24X-Rescue. Stars indicate statistically significant differences between vUL24X-Rescue and UL24X. Error bars represent the standard deviation from the mean.

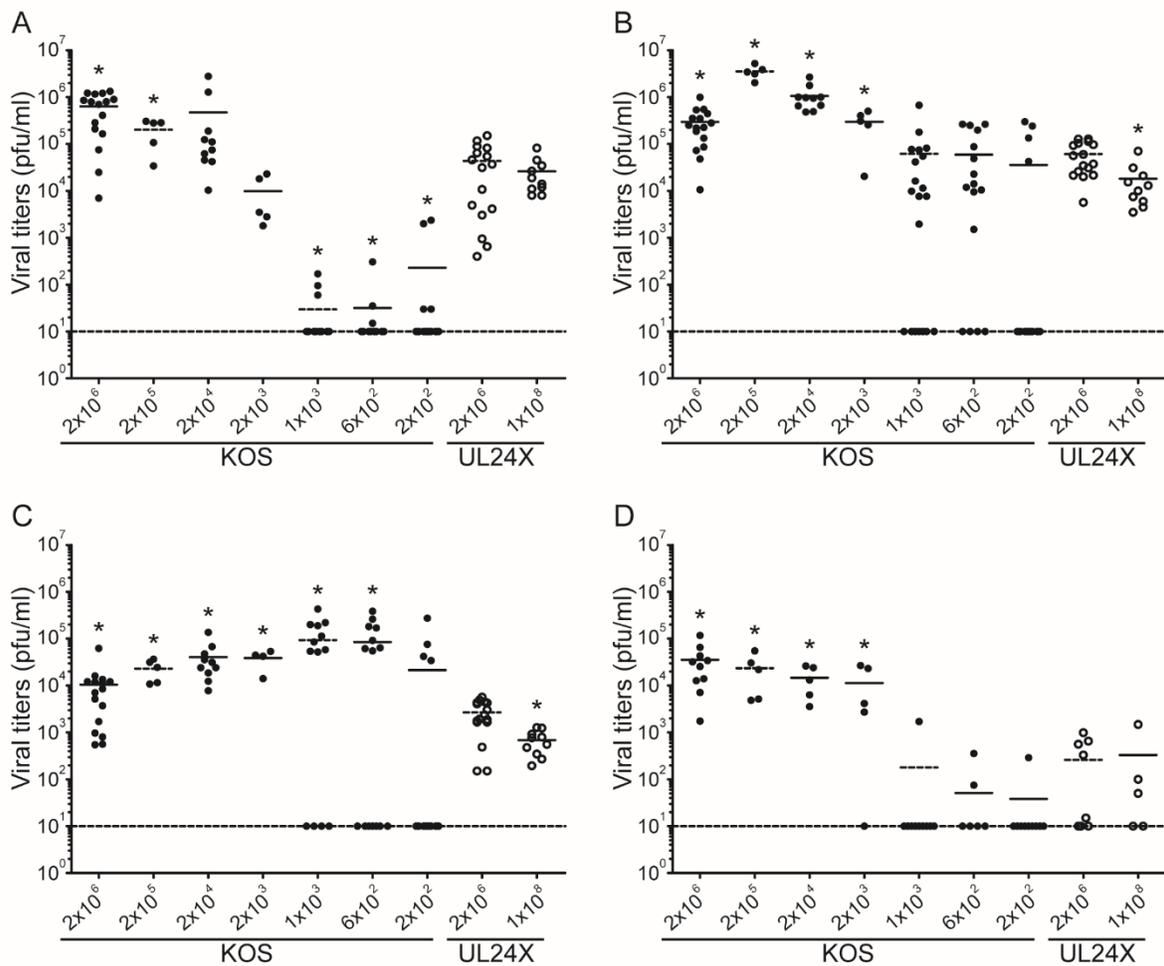


**Figure 2** Rescue of UL24X mutation corrects in vivo defects observed in the mouse ocular infection model. Viral titers in tear films are shown for A) 1 dpi, B) 2 dpi, and C) 3 dpi. D) Viral titers in homogenized TG at 3 dpi. Stars indicate a statistically significant difference. Dashed-lines indicate the detection limit of the experiment.

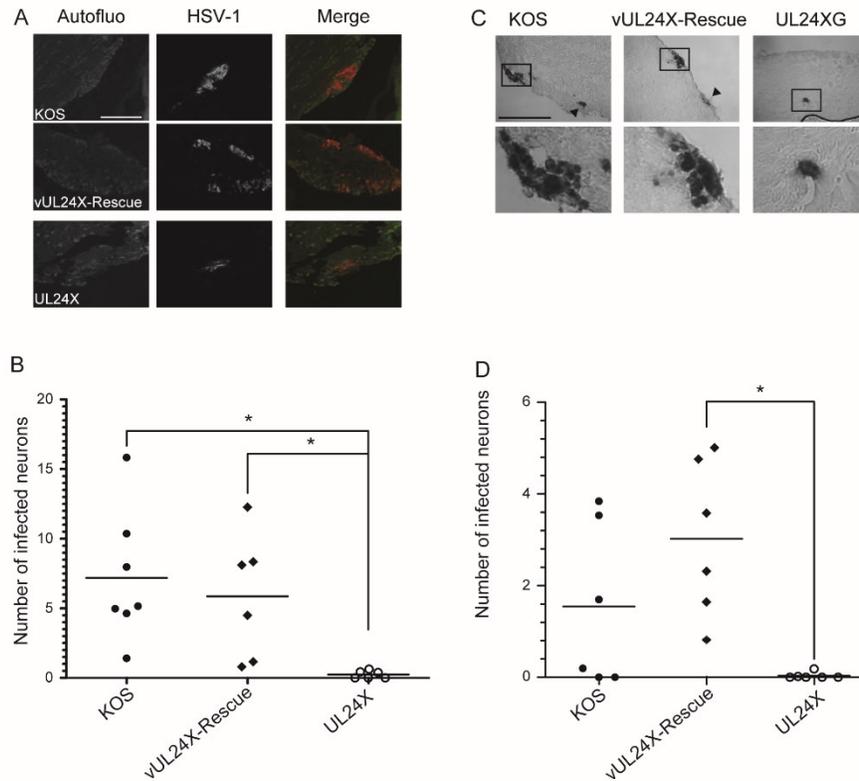


**Figure 3**

Replication of a UL24-deficient virus in neurons. **A)** Multi-step replication assay in murine embryonic neurons. Stars indicate statistically significant differences between vUL24X-Rescue and UL24X. Error bars represent the standard error. **B)** Differentiation of LA-N-5 neurons. Cells were immunostained at 1, 5, and 8 days post-treatment for the neuronal maturation marker Neurofilament M (green). Nuclei were stained with DraG5 (blue). The panels correspond to the merged confocal images. **C)** Formation of VRCs in neurons infected with KOS and UL24X. At 9 hpi, neurons were immunostained for ICP8 (green), and nuclei stained with DraG5 (blue). Merged images are shown in the right-hand panels. **D)** One-step replication assay in LA-N-5 neurons comparing UL24X to the wild-type virus KOS.



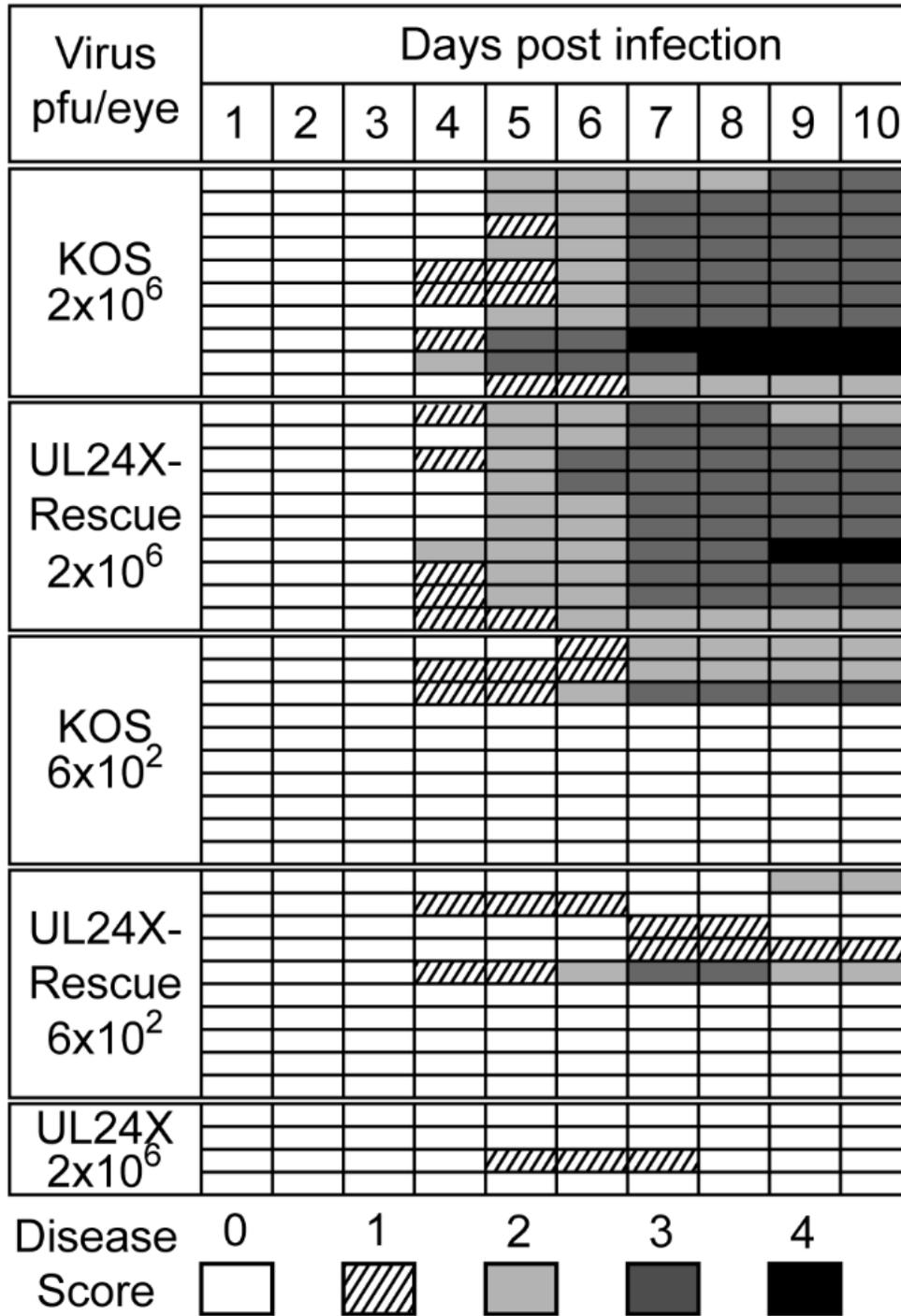
**Figure 4** Reduction of the ocular viral load as observed in absence of UL24 is not sufficient to explain the up to 4log10 reduction of viral titers in TG. The inoculum (expressed in pfu per eye of the indicated virus) used for each group is indicated at the bottom of each graph. Virus in tear films was titrated at A) 1 dpi, B) 2 dpi, and C) 3 dpi. D) Virus in homogenized TG was titrated at 3 dpi. Dashed lines represent the detection limit of the experiment. Stars indicate a statistically significant difference in viral titers obtained for the indicated group as compared to the group of mice infected with 2x10<sup>6</sup> pfu per eye of UL24X.



**Figure 5**

**UL24 is important for dissemination of the acute infection to a high number of neurons.** **A)** TG from mice infected with KOS, UL24X or vUL24X-Rescue were harvested 3 dpi, sectioned, immunostained for HSV-1, and analyzed by immunohistofluorescence. Left-hand panels show the tissue autofluorescence (green), center panels show HSV-1 infected cells (red), and merged images are shown in the right-hand panels. **B)** The number of positive neurons in (A) were quantified. Each point represents the average number of HSV-1-positive neurons per section for a given TG. Results presented were pooled from two independent experiments. Stars indicate a statistically significant difference as compared to the values obtained for UL24X. **C)** Whole TG from mice infected with KOS, UL24X or vUL24X-Rescue were harvested 2 dpi, hybridized against HSV-1 DNA and immunochemically stained (WmISH), sectioned and analyzed by phase contrast microscopy. Boxes in the upper panels indicate areas with neurons harboring HSV-1 DNA, and are enlarged in the corresponding lower panels. Arrowheads indicate other infected neurons outside the boxed area. The scale bar represents 0.5 mm. **D)** The number of positive neurons in (C) was quantified as described in (B).

Table 1 Rescue of UL24X mutation corrects disease severity *in vivo* observed in the mouse ocular infection model



**Table 2**      **Reduction of the infectious inoculum reduces the incidence of *ex vivo* viral reactivation**

Virus (pfu/eye)	Reactivated TG (%)	
	Total TG	
KOS 2x10 <sup>6</sup>	16/16	(100%) †
KOS 2x10 <sup>4</sup>	10/10	(100%) †
KOS 1x10 <sup>3</sup>	2/6	(33%)
KOS 6x10 <sup>2</sup>	2/6	(33%)
KOS 2x10 <sup>2</sup>	2/28	(7%)
UL24X 2x10 <sup>6</sup>	5/18	(27%)
UL24X 1x10 <sup>8</sup>	4/10	(40%)
MOCK	0/8	(0%)

† : Statistically different from UL24X with Fisher's exact test

## CHAPITRE 3 : SECONDE PUBLICATION

### Résumé de la seconde publication

**Titre : Visualisation de ganglions neuronaux de souris infectées par le VHS-1 via l'utilisation de la microscopie multimodale à optique non-linéaire.**

Le VHS-1 est un virus neurotrope qui cause des lésions au niveau de la peau et établit une infection latente dans les neurones du ganglion trigéminal. Suivant un stress, le virus peut se réactiver de la latence, menant à la récurrence des lésions. Les études *in situ* d'infections neuronales par le VHS-1 sont critiques à la compréhension de mécanismes impliqués dans la biologie de ce virus et de la maladie associée à l'infection ; toutefois, cela requiert normalement la fixation et le sectionnement des tissus d'intérêt suivi de traitement avec des agents de contraste afin de visualiser des structures clés, pouvant mener à des artefacts. Afin de pousser nos habiletés à étudier la pathogenèse du VHS-1, nous avons généré un virus recombinant exprimant une protéine fluorescente rouge de seconde génération (mCherry), se comportant comme un virus de type sauvage *in vivo*. En optimisant l'application d'une plateforme de microscopie multimodale à optique non-linéaire, nous avons réussi à visualiser dans des TG non-sectionnés de souris des cellules infectées par microscopie à fluorescence à deux photons, et des axones myélinisés provenant de neurones infectés et non-infectés par microscopie Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS). Ces résultats représentent le premier cas où la microscopie CARS a été combinée avec la microscopie à fluorescence à 2 photons afin de visualiser des infections virales cellulaires en profondeur dans un explant de tissu non-sectionné et démontrent l'application de la microscopie multimodale à optique non-linéaire pour la visualisation à haute résolution d'échantillons biologiques sans avoir recours à des agents de fixation et de contraste.

## **Contribution des auteurs**

*Pierre-Alexandre Rochette* : Réalisation des expériences, optimisation de la plateforme de microscopie multimodale, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

*Mathieu Laliberté* : Mise au point et optimisation de la plateforme de microscopie multimodale, rédaction de la section Matériels et Méthodes concernant la plateforme de microscopie multimodale.

*Antony Bertrand-Grenier* : Mise au point et optimisation de la plateforme de microscopie multimodale

*Marie-Andrée Houle* : Mise au point de la plateforme de microscopie multimodale.

*Marie-Claire Blache* : Optimisation de la plateforme de microscopie multimodale.

*François Légaré* : Révision et correction du manuscrit.

*Angela Pearson* : Révision et correction du manuscrit.

# **Visualization of Mouse Neuronal Ganglia Infected by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) using Multimodal Non-linear Optical Microscopy**

Pierre-Alexandre Rochette<sub>‡</sub>, Mathieu Laliberté<sub>†</sub>, Antony Bertrand-Grenier<sub>†</sub>,  
Marie-Andrée Houle<sub>†</sub>, Marie-Claire Blache<sub>†</sub>,  
François Légaré<sub>†</sub>, Angela Pearson<sub>‡</sub>

<sub>‡</sub> INRS – Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

<sub>†</sub> INRS – Centre Énergie Matériaux Télécommunications, Varennes, Québec, Canada

## **Corresponding Author :**

Angela Pearson

INRS - Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Tel.: (450) 687-5010

[angela.pearson@iaf.inrs.ca](mailto:angela.pearson@iaf.inrs.ca).

## Abstract

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a neurotropic virus that causes skin lesions and goes on to enter a latent state in neurons of the trigeminal ganglia. Following stress, the virus may reactivate from latency leading to recurrent lesions. The *in situ* study of neuronal infections by HSV-1 is critical to understanding the mechanisms involved in the biology of this virus and how it causes disease; however, this normally requires fixation and sectioning of the target tissues followed by treatment with contrast agents to visualize key structures, which can lead to artifacts. To further our ability to study HSV-1 neuropathogenesis, we have generated a recombinant virus expressing a second generation red fluorescent protein (mCherry), which behaves like the parental virus *in vivo*. By optimizing the application of a multimodal non-linear optical microscopy platform, we have successfully visualized in unsectioned trigeminal ganglia of mice both infected cells by two-photon fluorescence microscopy, and myelinated axons of uninfected surrounding cells by coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. These results represent the first report of CARS microscopy being combined with 2-photon fluorescence microscopy to visualize virus-infected cells deep within unsectioned explanted tissue, and demonstrate the application of multimodal non-linear optical microscopy for high spatial resolution biological imaging of tissues without the use of stains or fixatives.

## **Keywords**

Herpes simplex virus 1, red fluorescent protein, whole mount tissue, multimodal non-linear optical microscopy, two-photon microscopy, coherent anti-Stokes Raman scattering

## Introduction

Immunohistochemical approaches to study viral pathogenesis can be highly informative but they require harsh chemical fixation as well as thin sectioning of tissue because of the poor depth penetration of traditional light microscopy. Both of these treatments have been demonstrated to affect tissue morphology (Sillevis Smitt *et al.*, 1993), and furthermore, the three-dimensional structure of the tissue is necessarily lost. Bioluminescence strategies are useful for *in vivo* studies; however, the resolution is relatively poor. In the past years, the use of fluorescent proteins to study viral infections has grown (Balliet *et al.*, 2007, Luker *et al.*, 2002, Luker *et al.*, 2003). One advantage of this approach over immunohistochemistry is that there are no concerns of non-specific staining due to cross-reactivity of antibodies with different antigens. But traditional confocal microscopy does not permit imaging deep within tissue, therefore it typically necessitates sectioning of the tissue. In contrast, two-photon microscopy allows imaging deep (1 mm) in tissue such that intrinsically fluorescent proteins expressed within tissue can be imaged at high resolution in a three dimensional tissular context. Despite these advantages, two-photon fluorescence imaging cannot match traditional histochemistry with regards to distinguishing different tissue components. In addition to two-photon microscopy, other microscopy techniques, which are label-free, are used by the biomedical community to image tissues including second harmonic generation (C. P. Brown *et al.*, 2012, Gusachenko *et al.*, 2012, Schurmann *et al.*, 2010, Stoothoff *et al.*, 2008) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) (Andreas, 2005, Mostaçõ-Guidolin *et al.*, 2010, Andreas Volkmer *et al.*, 2001a). CARS microscopy provides an imaging contrast based on vibrational spectroscopy and is extremely powerful to image structures rich in CH<sub>2</sub> symmetric stretching modes, a chemical group which is abundant in lipids (Evans *et al.*, 2005, Folick *et al.*, 2011, Fu *et al.*, 2007, Hellerer *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2011, H. Wang *et al.*, 2005b). This type of microscopy has already been exploited to visualize lipid droplets induced by the Hepatitis C virus (HCV) in cell culture (Lyn *et al.*, 2009). In whole tissue mount, multiphoton fluorescence microscopy can be used to identify different structures by their autofluorescence, and it affords great sectioning capability (C. Y. Lin *et al.*, 2008, Teng *et al.*, 2006); however, autofluorescent properties of the tissue under study can be problematic if the emission spectra overlap with that of the fluorescent protein used for tracking of cells (Mochizuki *et al.*, 1995). Optimization of the experimental conditions for each imaging modality, as well as their compatibility, is crucial if one is to combine their respective strengths to achieve multimodal high spatial resolution imaging deep in tissue.

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a neurotropic virus. The double-strand DNA genome is contained within an icosahedral capsid surrounded by a protein rich tegument, and finally a bilipid envelope (Roizman *et al.*, 1974, Roizman *et al.*, 2007 ). During a primary infection, the virus first replicates in epithelial cells of the mucous membrane leading to skin lesions commonly referred to as cold sores (Blyth *et al.*, 1984, Summers *et al.*, 2001). Next, the virus infects the endings of sensory neurons innervating the mucosa and spreads to the trigeminal ganglia (TG). The virus can replicate within neurons of the TG, though ultimately, viral gene expression in the neuronal ganglia will diminish, and a life-long latent infection will be established (Baringer *et al.*, 1973, M. L. Cook *et al.*, 1973, Dyson *et al.*, 1987, Reichelt *et al.*, 2008). Under conditions of stress, the virus can exit latency and re-enter a productive cycle of viral replication leading to recurrent infections. While infections in healthy individuals are usually benign, ocular keratitis and viral encephalitis can occur. In immune-compromised hosts and in neonates, infections can be more severe and may lead to disseminated disease (D. Kimberlin, 2004a, Pottage *et al.*, 1995). The murine ocular infection model for HSV-1 recapitulates many of the stages of a typical infection including acute replication in the mucosa, acute replication in neurons of the TG, and the establishment of a latent infection (T. J. Hill *et al.*, 1983, Leib *et al.*, 1989). *Ex vivo* reactivation upon post-mortem harvesting of TG is also observed, and virus reactivation *in vivo* (to varying degrees) can be induced through different means (Blyth *et al.*, 1980, Neumann *et al.*, 2007, Sawtell, 2003, Sawtell *et al.*, 1992).

The goal of this study was to achieve multimodal high spatial resolution imaging deep within an HSV-1-infected TG using signals intrinsically generated by, and generated within the tissue. TG contain many myelinated neurons of various sizes, whose myelin sheathes can generate a strong and specific CARS signal (Evans *et al.*, 2005, Fu *et al.*, 2007, H. Wang *et al.*, 2005b) by virtue of their richness in symmetric CH<sub>2</sub> vibrational modes. The neuron soma generates very little CARS signal, but is strongly autofluorescent and emits in the green spectrum close to that of the commonly used green fluorescent protein (Mochizuki *et al.*, 1995). Infection of cells can be detected using a virus expressing a fluorescent reporter gene. To date, the combination of CARS and multiphoton fluorescence microscopy in the context of a viral infection has been limited to the analysis of single monolayers of cells in culture (Lyn *et al.*, 2009, Robinson *et al.*, 2010). Herein, we describe for the first time the combined use of CARS microscopy and two-photon fluorescence microscopy to visualize infected cells and components of the surrounding tissue in an unfixed and unsectioned virus-infected tissue.

## Results

### Production of vUs7-8mCherry

For our pathogenesis studies of HSV-1, we produced and characterized a recombinant strain of HSV-1 that behaves like the wild-type parental strain KOS, and that stably expresses the second generation red fluorescent protein (RFP) mCherry (Shaner *et al.*, 2004) (Figure 1). This RFP was chosen due to its stability and the fact that it functions as a true monomer. Furthermore, due to the inherent autofluorescence of neural tissue in the green spectrum, the use of an RFP minimized background signal from uninfected cells in the TG. The cloning strategy chosen was designed so as not to disrupt any viral open reading frames (ORFs) or regulatory regions of the surrounding genes. An mCherry expression cassette under control of a mammalian promoter was inserted into the intergenic region between the ORFs of the HSV-1 *Us7* and *Us8* genes. To avoid disrupting the polyadenylation of transcripts co-terminal with *Us7*, as well as to avoid interrupting the promoter of *Us8*, the *Us7* and *Us8* intergenic region was duplicated in tandem. Two independent isolates of the recombinant virus vUs7-8mCherry, a and b, were produced by homologous recombination.

### Characterization of vUs7-8mCherry *in vitro* and *in vivo*

Prior to using vUs7-8mCherry for our experiments, we tested whether the virus behaved like the parental strain both in cell culture and *in vivo*. For several HSV-1 strains in which genes for intrinsically fluorescent proteins have been inserted into the genome, stability has proven to be a problem and expression cassettes were either repressed or lost due to the recombinogenic nature of the virus (Balliet *et al.*, 2007, Foster *et al.*, 1999). In contrast, we found that vUs7-8mCherry was very stable; the mCherry expression cassette was maintained by the virus throughout multiple rounds of replication *in vitro* (data not shown). We also tested the impact of the insertion of the mCherry cassette on expression of the downstream gene *Us8*. *Us8* codes for the viral glycoprotein E (gE). To confirm that our strategy was successful in preserving wild type expression levels of gE, we assessed steady-state levels of the glycoprotein in Vero cells infected for 18 hours with vUs7-8mCherry (Figure 2 A). By Western blot analysis, we found that gE protein levels were similar for each of the isolates and the parental strain KOS. Furthermore, we found that both isolates replicated as efficiently as the wild-type virus KOS in a single-step replication assay (Figure 2 B).

We next assessed the efficiency of vUs7-8mCherry to replicate *in vivo* using a well-established murine model of ocular infection (Leib *et al.*, 1989). Mice were infected with  $2 \times 10^6$  plaque forming units (pfu) of HSV-1 per eye following light scarification of the cornea. For the first three days post infection (dpi), both isolates of vUs7-8mCherry produced viral titres in tear films similar to KOS (Figure 3 A-C). Likewise, at three dpi, the viral titres in TG for vUs7-8mCherry were similar to wild-type levels (Figure 3 D). We next tested the ability of vUs7-8mCherry to reactivate from latently infected TG in an explant assay. In this assay, TG are dissociated enzymatically, and then co-cultured on a monolayer of Vero cells. By 24 hours post dissociation, mCherry-positive neurons were readily detected using fluorescence microscopy (data not shown). Furthermore, no reduction in the frequency of reactivation as compared to KOS was observed for either independent isolate of vUs7-8mCherry (Table 1). In addition, we found that vUs7-8mCherry was stable *in vivo*, because we did not observe loss of mCherry expression following passage through mice either during acute replication or following *ex vivo* reactivation (data not shown).

### **Visualisation of infected cells by fluorescence microscopy**

Prior to imaging of infected tissues using our multimodal multiphoton platform, we assessed our ability to visualize vUs7-8mCherry-infected tissues by standard confocal microscopy. Eyeballs and TG were harvested post-mortem at two and three dpi. Tissues were fixed and processed for sectioning by cryostat, and 10  $\mu\text{m}$  sections were mounted on microscope slides (Figure 4). Many subanatomical structures were readily identifiable by their autofluorescence. The opaque sclera of the eye, as well as the clusters of pseudomonopolar neurons in the TG, naturally generate a very bright signal in the green field due to their richness in epithelial cell NADPH and cellular matrix collagen, and in lipofuscin respectively (Mochizuki *et al.*, 1995, Monici, 2005, Teng *et al.*, 2006). In contrast, autofluorescence of these tissues drops dramatically once in the red field such that corneal epithelial cells infected by vUs7-8mCherry stood out from the background (Figure 4 A). Similarly, in the TG, infected neurons were identifiable via mCherry fluorescence, which was also above the autofluorescence background signal in the red field (Figure 4 B-C). We next confirmed that we could identify the same infected region using fluorescence microscopy to visualize mCherry expressed by our recombinant virus, as we could by standard immunohistochemistry. Samples were processed for immunohistofluorescence using antiserum directed against HSV-1 and a secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Figure S1). As expected, the subcellular structures visualized by each approach differed. The soluble protein mCherry was detected in the cytoplasm and nucleus. In contrast, the HSV-1 antiserum, which

contained many antibodies directed against viral glycoproteins, stained mainly cell membranes and cytoplasmic structures. Nevertheless, the same region of the TG that was stained using the HSV-1 antiserum was detected by imaging mCherry expression, thus validating our strategy to use a virus that expresses a red fluorescent protein for detection with our platform.

### **Visualization of whole TG using multimodal non-linear optical microscopy**

One of the major advantages of two-photon fluorescent microscopy compared to traditional confocal microscopy is the ability to conduct deep tissue imaging. We next visualized sites of viral replication in whole, unfixed, infected TG using our multimodal non-linear optical microscopy platform (Figure 5). Mock-infected TGs as well as vUs7-8mCherry-infected TGs were harvested at 3 dpi, and immediately placed in ice cold PBS. The delay between time of harvest and analysis was maintained to less than 24 hours to preserve tissue architecture. TGs used for these analyses were neither fixed nor sectioned. Following harvest, a typical TG is approximately 1 mm in diameter and 1 cm in length. For imaging purposes, TG were placed on a microscope slide, overlaid with a small amount of cold PBS, and covered with a no. 1 coverslip.

Phospholipids that make up the cellular plasma membrane are rich in symmetric  $\text{CH}_2$  vibrational modes. Thus, the myelin sheath surrounding neuronal axons, which are formed by multiple layers of Schwann cell plasma membrane, are readily visualized by CARS microscopy. Although we noted that some autofluorescence signal could be detected when using the filter for CARS microscopy, we were able to clearly visualize axonal extensions and distinguish between the inside and the borders of the axons (Figure 5 A). By combining CARS microscopy with 2-photon fluorescence microscopy, which allowed us to visualize neuronal cell bodies by autofluorescence in the green spectrum, we were able to distinguish between regions dominated by axonal extensions and regions containing clusters of non-infected pseudomonopolar neurons (Figure 5 B).

We next attempted to image infected cells in their three dimensional tissular context using our microscopy platform. For imaging of intact TG, infected sites within TG were first located by two-photon fluorescent microscopy using a filter for mCherry. Cells infected with vUs7-8mCherry were readily identified deep within the TG. Through the collection of a series of Z-stacks, we reconstructed a three-dimensional projection of a cluster of infected neurons visualized through the detection of mCherry using the program NIH Image J (Figure 5 C and Video S1). Once an infected region of the TG was identified, we selected one of the focal planes to visualize using both CARS microscopy alone or combined with fluorescence microscopy (Figure 5 D, E

respectively). The autofluorescence signal was digitally subtracted from our CARS field images to put emphasis on the signal generated by myelinated axons (Figure 5 D). This particular region, dominated by neuronal cell bodies, generated CARS signal due to axons located between the cell bodies. The focal plane visualized by CARS microscopy was merged with the corresponding field obtained from two-photon microscopy (Figure 5 E). Thus, we successfully combined two-photon fluorescence microscopy with CARS imaging to visualize HSV-1-infected neurons deep in unfixed and unsectioned neurons within TG.

## Discussion

Although there has been much written about the potential of tissue imaging with multimodal multiphoton microscopy (C. Y. Lin *et al.*, 2008, Ouyang *et al.*, 2010), to the best of our knowledge, this study constitutes the first report of combining CARS microscopy and two-photon fluorescence microscopy to study viral infections deep within whole tissue mounts. Combining the two techniques enabled us to visualize distinct subanatomical structures within the TG, both in infected and uninfected regions of interest (ROI). Regions of dense bundles of myelin rich axons within TG were readily observed by CARS microscopy. In contrast, regions corresponding to large clusters of neuronal cell bodies produced smaller areas of CARS signal in between the cell bodies. When using the fluorescence imaging modality, the multimodal non-linear optical microscopy platform enabled us to visualize uninfected bodies deep within TG by virtue of their autofluorescence in the green spectrum, as well as infected cells via the expression of mCherry by the virus.

Although there have been numerous HSV-1 strains constructed that express intrinsically fluorescent proteins, few have been generated that avoid disrupting any viral ORF, and that maintain a wild-type phenotype both *in vitro* and *in vivo* (Antinone *et al.*, 2010b, Balliet *et al.*, 2007, de Oliveira *et al.*, 2008, Nagel *et al.*, 2008, Potel *et al.*, 2002, Ramachandran *et al.*, 2008, A. Snyder *et al.*, 2007). Furthermore, some were demonstrated to be unstable leading to loss of expression of the fluorescent protein after several passages (Balliet *et al.*, 2007). We have successfully engineered a recombinant HSV-1 strain that expresses mCherry all the while retaining a wild-type phenotype *in vivo*. Furthermore, we found that the virus is stable both in cell culture and following passage through mice. Thus, this virus constitutes one of a limited number of recombinant HSV-1 strains that encode an intrinsically fluorescent protein, and that are suitable for *in vivo* studies looking at pathogenesis (Nagel *et al.*, 2012, Tanaka *et al.*, 2004).

mCherry was an excellent choice for visualization of infected cells *in situ* due to the low natural fluorescence of biological samples corresponding to its visual spectrum. The mCherry signal was sufficiently above the autofluorescence background with limited photobleaching to detect both the cell bodies and the axons of many infected neurons in the tissue. Further improvement to our strategy would include having an even stronger signal to noise ratio for the multiphoton fluorescent imaging. One approach would be the use of the RFP tdTomato, for which the gene is a duplicated mTomato ORF in tandem and in frame. This intramolecular dimer is three times more brilliant than mCherry, and has been detected as deep as 1 cm within tissues, making it ideal for the study of viral dissemination within an experimental animal (Winnard *et al.*, 2006).

Finally, using the sectioning power of our microscopy platform, we recreated a three-dimensional projection of an ROI deep within the unfixed TG where infected neurons were located. In this projection, infected neurons and axons could be observed in relation to their native environment. From there, we were able to select ROIs to analyze in more detail combining fluorescence and CARS microscopy techniques. Our results demonstrate the potential of multimodal non-linear optical microscopy for studying viral infection and pathogenesis in whole tissues by combining data acquired through different imaging modalities. Furthermore, because CARS imaging is particularly well suited to studying demyelinating diseases, our platform would be ideal for investigating hypotheses of virus-induced demyelination among other virus-induced neuropathologies. Although our experiments were conducted on explanted tissue, our ability to accomplish this imaging without fixatives, stains or sectioning of the tissue demonstrates the potential for applications in *in vivo* imaging. Future improvements to the system include strategies to increase the signal to background ratio of CARS signals in biological samples, and the use of brighter intrinsically fluorescent proteins that, nevertheless, do not emit at a wavelength corresponding to high autofluorescence in different tissues.

## Materials and methods

### Ethics Statement

All animal experiments were carried out at the INRS Centre for Biological Experimentation in accordance with institutional good animal care practices, and approved by the "Comité institutionnel de protection des animaux" of Université INRS (permit #0806-04).

### Plasmid construction

To create a eukaryotic expression cassette for mCherry, the ORF was excised from the prokaryotic expression vector pRSETb-mCherry (Shaner *et al.*, 2004) with HindIII and BamHI. The resulting fragment was inserted within the multiple cloning site of a pCG-Zeo derived eukaryotic expression vector (von Messling *et al.*, 2003) containing the CMV promoter, producing the plasmid pCG-mCherry.

To minimize the impact on expression of the neighbouring genes, the *Us7* and *Us8* intergenic region was duplicated in tandem separated by a unique PmeI site. Each fragment was produced by PCR using KOS DNA as a template. The 5' fragment was obtained using the primers 5'-cccggatccctaatgccacgagcg and 5'-ggggtttaaacgagccaaagtcaacacaac. The 3' fragment was obtained using the primers 5'-cccgtttaaactgtccatttcttctccc and 5'-ccaagcttgcgagacttctgcctc. The 5' and 3' PCR fragments were digested with PmeI and either BamHI or HindII respectively. By triple ligation using T4 DNA ligase (NEB), the fragments were inserted within the pET15b plasmid that had been digested with BamHI and HindIII. The resulting plasmid, pET15b/*Us7-Us8*, was verified by standard DNA sequencing. Sequencing was carried out by the McGill University Genome Quebec Innovation Centre.

To produce the transfer vector, we next amplified the mCherry expression cassette from the plasmid pCG-mCherry using the primers 5'-ccgcgatagaattcgag and 5'-ccgcgatacgaattcttac. The plasmid pET15b/*Us7-Us8* was digested with the restriction enzyme PmeI, creating a site in which to insert the expression cassette by blunt ligation. The resulting plasmid was verified by DNA sequencing.

## **Construction of recombinant viruses**

Recombinant viruses were produced by homologous recombination essentially as described previously (Griffiths *et al.*, 2003). The virus vUs7-8mCherry was obtained by co-transfecting KOS infectious DNA and the transfer vector pET15b/Us7-Us8mCherry that had been linearized with HindIII. DNA was transfected into Vero cells using Lipofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Screening of recombinant viruses was based on expression of mCherry. Two independent isolates, originating from two independent transfections, were produced (a and b). The *Us7* and *Us8* intergenic regions of each independent isolate were sequenced to ensure the absence of undesired mutations.

## **Viruses and cells**

KOS and vUs7-8mCherry isolates were propagated on Vero cells as described previously (Coen *et al.*, 1985). The KOS strain was originally from the Priscilla Schaffer lab (Harvard Medical School). Cells were grown in DMEM containing 5% newborn calf serum (NCS), and the antibiotics penicillin and streptomycin, and maintained in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

## **Western Blotting**

Vero cells were infected with either KOS or either isolate of vUs7-8mCherry at a multiplicity of infection (MOI) of 5. At 18 hours post-infection (hpi), cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 500 mM NaCl). Proteins were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore). Proteins were detected by Western blotting using a mouse monoclonal antibody directed against HSV-1 gE (Fitzgerald) or a mouse monoclonal antibody directed against beta-Actin (Biolegend), followed by appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Bethyl and Sigma respectively). Detection was done by enhanced chemiluminescence (GE) according to the manufacturer's instructions.

## **Viral replication assays**

Viral yield was determined using one-step replication assays. Vero cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were seeded in duplicate in cell culture tubes containing 2 ml of complete medium. The next day, cells

were infected with the indicated virus at an MOI of 5. At 6, 12, 18, and 24 hpi, the respective tubes were removed from the incubator and placed at -80°C. Tubes were thawed and sonicated, and total virus (cell associated and cell free) was titrated.

### **Murine model of ocular infection**

Mouse experiments were conducted essentially as described previously (Coen *et al.*, 1989, Leib *et al.*, 1989). Seven-week old CD-1 mice were obtained from Charles River, and were acclimatized for 5-7 days. Prior to infection, mice were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of a solution of ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>; Bioniche) and xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>; Bayer) diluted in saline. Following light scarification of the cornea, 2 x 10<sup>6</sup> plaque forming units (pfu) of virus were applied in a dropwise manner in a volume of 7-10 µL to each cornea of the mice. Groups of at least five animals per virus were infected in each individual experiment. Virus titres during acute eye infection were determined from 1 to 3 d.p.i. by titrating virus in pooled tear films from both eyes collected with moistened sterile cotton swabs while the mice were anaesthetized with isofluorane (Baxter). Titres of virus in TG during acute infection were determined by titrating virus present in the pooled homogenates of both TG harvested post-mortem at 3 d.p.i. For titres in the eye, on each day in question, eye swabs were taken from three mice per virus. For titres in TG, TG were harvested from three mice for each virus per experiment. Virus reactivation following latency was assessed in an explant assay 30-40 days p.i. Individual TG were dissociated with collagenase (Invitrogen) and overlaid on a monolayer of Vero cells. Reactivation for each TG was determined by the appearance of the virus-induced cytopathic effect of the Vero cells, which was monitored for 10 days post-explant.

### **Tissue sections and confocal analysis**

Eyeballs harvested 2 d.p.i., and TG harvested at 3 d.p.i., were fixed for 24h in 4% PFA at 4°C, and stored in PBS. Prior to sectioning, samples were placed in 30% sucrose in PBS overnight at 4°C, immersed in frozen tissue embedding media Histo Prep (fisher Scientific), and frozen on dry ice until the mould was solidified. Serial 10 µM sections were prepared using a cryostat (Kryostat 1720 digital; Leitz, Midland), and mounted on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific). Cover slips were mounted using Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). The samples were visualized using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal system with an argon-krypton laser at 488

and 568 nm (diode, 638 nm) mounted on a Nikon E800 microscope. Images were prepared using Adobe Photoshop CS4 software.

### **Immunohistofluorescence analysis of TG sections**

Detection of infected cells in histological sections was achieved by immunohistofluorescence (IHF). Immediately following tissue sectioning, samples were permeabilized for 30 minutes with PBS containing 5% NCS and 0.1% Triton X-100. Slides were dried briefly using absorbent paper, and incubated overnight at 4°C in a humid chamber (Sigma) with a rabbit polyclonal anti-HSV-1 (AbCam) primary antibody at a dilution of 1:150, and Hoechst (Invitrogen life technologies) at a dilution of 1:500 for nuclear staining. The next day, slides were washed three times with PBS containing 5% NCS, and incubated for 1.5 hours at room temperature with a goat polyclonal anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa488 diluted 1:1000. All antibodies were diluted in PBS containing 5% NCS. Three additional washes were then carried out before mounting slide covers using ProlongGold antifade reagent (Invitrogen life technologies). The samples were visualized using a Zeiss Axio Observer Z1 (63X, N.A.1.4.) microscope 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. Images were prepared using Adobe Photoshop CS4 software.

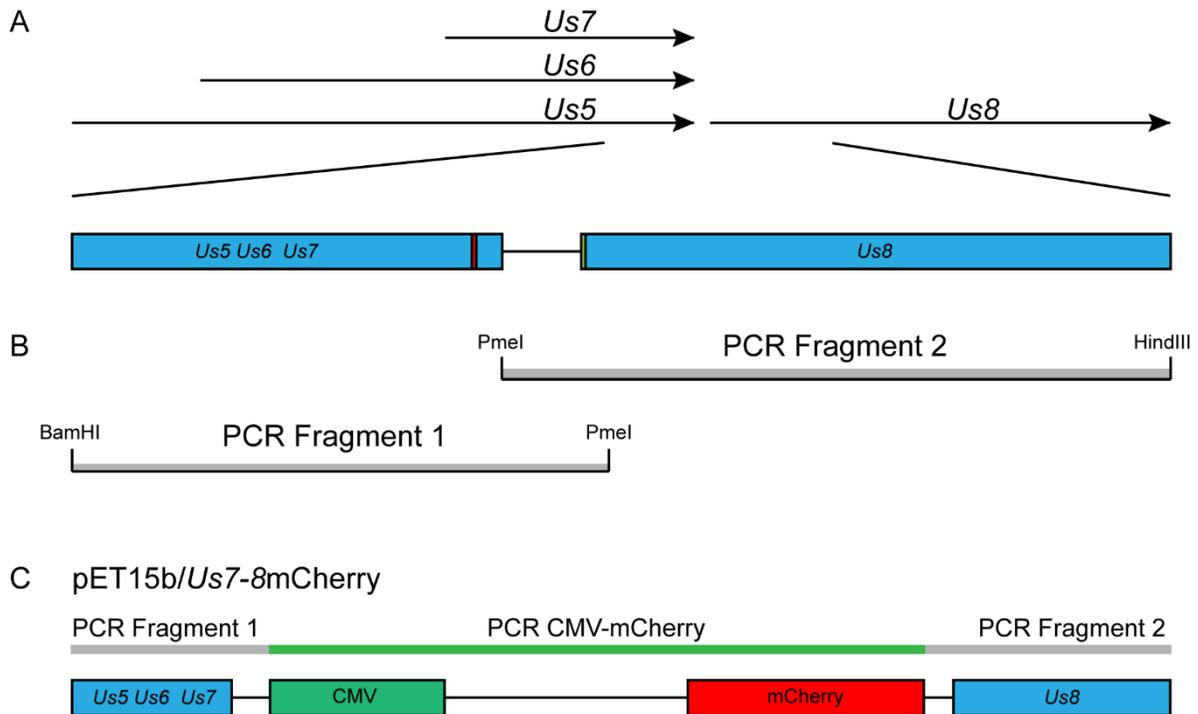
### **Multimodal non-linear optical microscopy platform**

For the multiphoton microscopy, we used a laser scanning inverted microscope (Till Photonics GmbH, Munich, Germany). The focusing objective used in our experiments was the Olympus UAPO 40XW3/340 (water immersion with a numerical aperture of 1.15). The size of the laser beams at the entrance of the XY scanner was set to ensure that the aperture of the focusing objective was completely illuminated. Its position relative to the sample was controlled by a mechanic and a piezoelectric motor for coarse and fine adjustment. Because the imaged samples were thick, the detection was performed in the backward direction. CARS and two-photon fluorescence light was then collected with the same microscope objective, and redirected to a PMT detector (model R6357, Hamamatsu Corporation, New Jersey, USA) by a dichroic mirror (model FF735-Di01-25, Semrock, Rochester, USA). Additional filters are put in front of the detector to eliminate residual laser beams and isolate the desired signal.

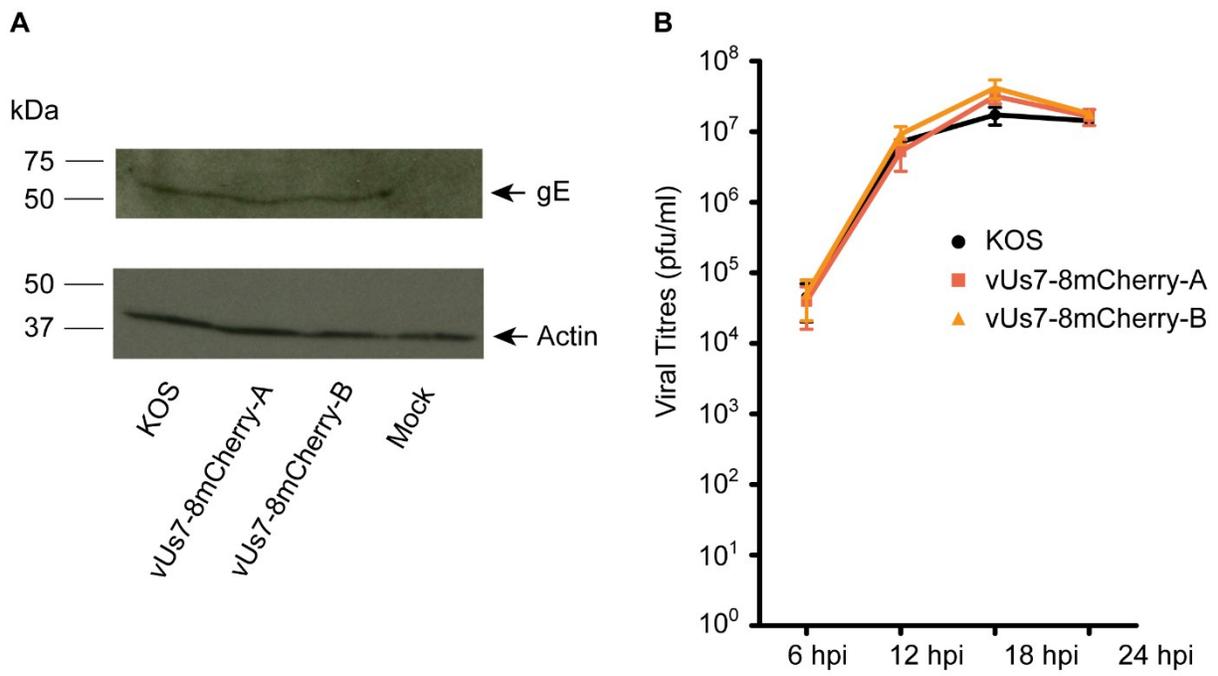
For CARS microscopy, a ~150 fs pulse duration Titanium-Sapphire oscillator (Tsunami, Spectra Physics, Santa Clara, USA) was spatially and temporally overlapped with a 15 ps pulse duration Nd:YVO<sub>4</sub> laser (Vanguard, Spectra Physics, Santa Clara, USA). The two lasers were electronically locked to have the same repetition rate (~80 MHz). The wavelength of the Titanium-Sapphire (817 nm) and of the Nd:YVO<sub>4</sub> (1064 nm) laser were set in order that their frequency difference met the symmetric CH<sub>2</sub> vibrational mode (~2845 cm<sup>-1</sup>) (Ouyang *et al.*, 2010, H. Wang *et al.*, 2005b). Before being overlap with the Nd:YVO<sub>4</sub> laser, the bandwidth of the Titanium-Sapphire spectra was reduced through a pulse shaper to around 1 nm to obtain a pulse duration of around 1 ps thus increasing the spectral resolution and the ratio of the resonant CARS signal to the non-resonant CARS background (Cheng *et al.*, 2001, Cheng *et al.*, 2002, A. Volkmer *et al.*, 2001b).

For two-photon fluorescence microscopy (Denk *et al.*, 1990, Helmchen *et al.*, 2005), a ~130 fs pulse duration optical parametric oscillator (OPO) pumped by the Titanium-Sapphire oscillator was used (Opal, Spectra Physics, Santa Clara, USA). We set the output wavelength at 1180 nm to be as close as possible to the 2-photon excitation peak of the mCherry fluorophore (Shaner *et al.*, 2004). Due to the fact that the Titanium-Sapphire wavelength used for the OPO pumping (775 nm) is not the same as the one for CARS microscopy, two-photon excitation and CARS microscopy techniques were used alternately.

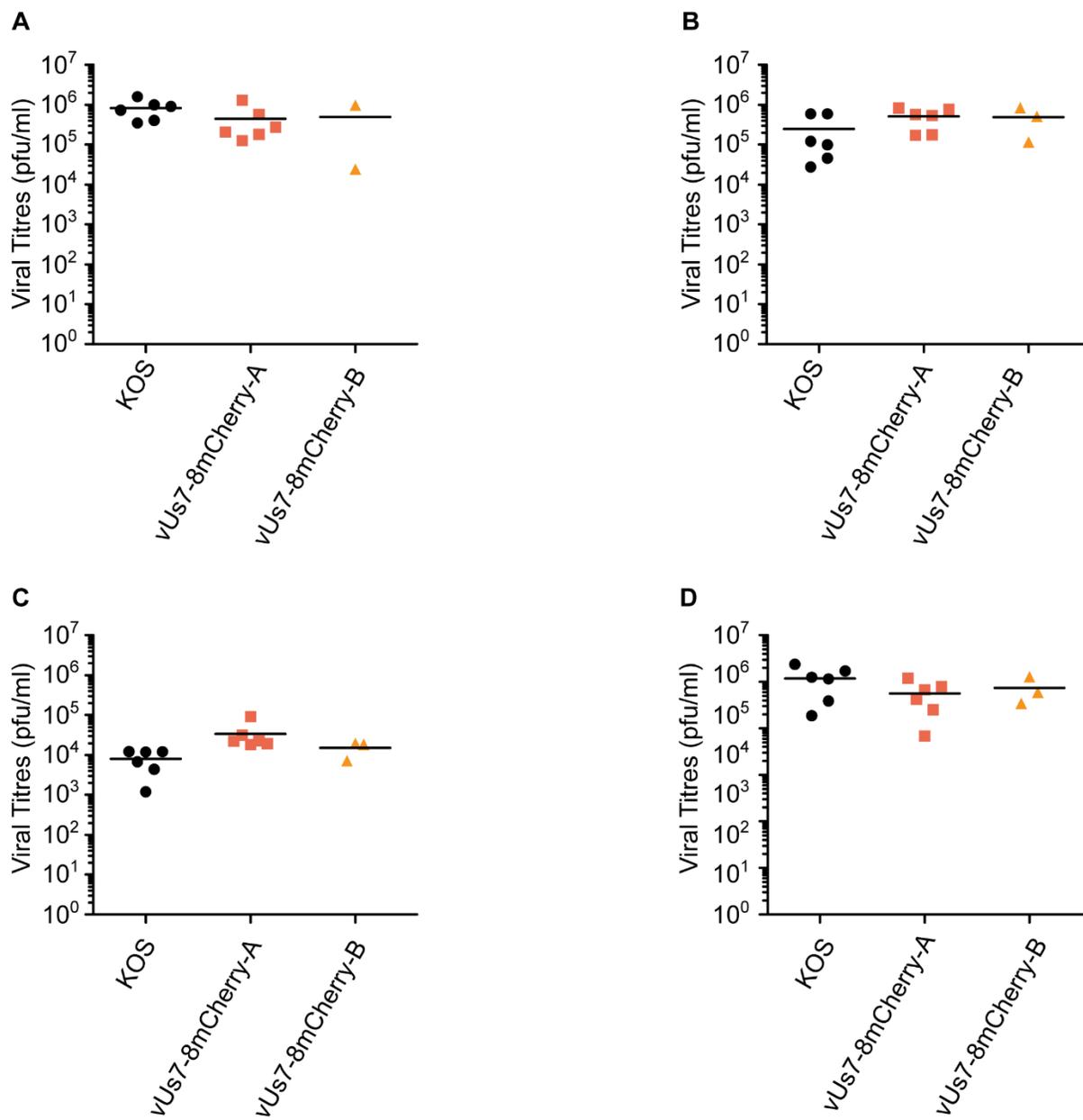
## Tables and Figures



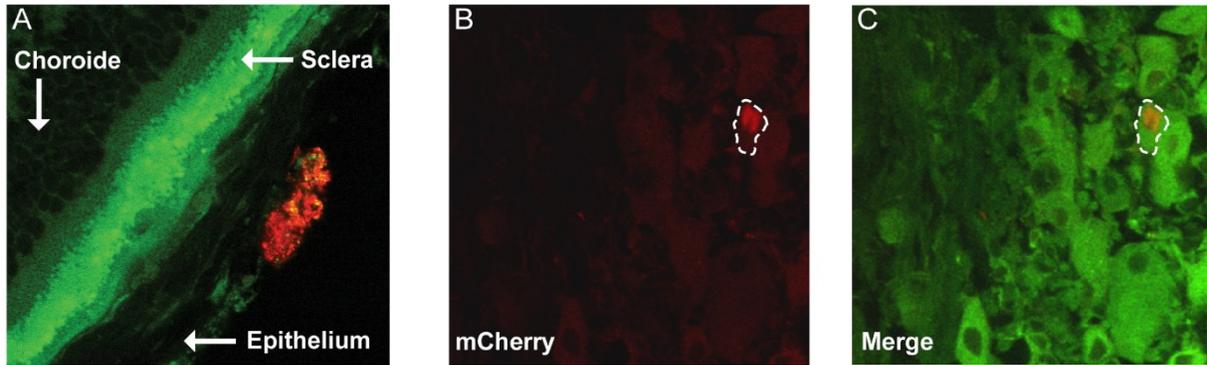
**Figure 1.** Production of a recombinant strain of HSV-1 expressing a red fluorescent protein : The region between the viral genes *Us7* and *Us8* was chosen as the site of insertion of an expression cassette for the red fluorescent protein mCherry. (A) The arrows indicate the open reading frames (ORF) of viral genes present in the locus. The area of interest modified by PCR involves the end of the transcribed region of the viral genes *Us5*, *Us6*, and *Us7*, as well as the beginning of the transcribed region of the viral gene *Us8*, both indicated by blue boxes. The red box indicates the location of the Poly A signal shared by *Us5*, *Us6*, and *Us7*. The green box indicates the location of the *Us8* start codon. The line between the *Us5-7* and the *Us8* boxes indicates the intergenic site flanked by both transcribed regions. (B) The intergenic region was duplicated in tandem following amplification by two PCR reactions. The grey boxes represent each of the fragments generated by PCR. The restriction sites embedded within the primers used for the PCR are indicated at the ends of each fragments. (C) The transfer vector was produced following the insertion of a mCherry expression cassette between the duplicated intergenic region of *Us7* and *Us8*. The thin grey rectangles represent the PCR fragments. The thin green rectangle represents the mCherry expression cassette. The blue boxes represent the viral ORFs of genes *Us5*, *Us6*, *Us7*, and *Us8*. The green box represents the CMV promoter. The red box represents the mCherry ORF. Diagrams are not to scale.



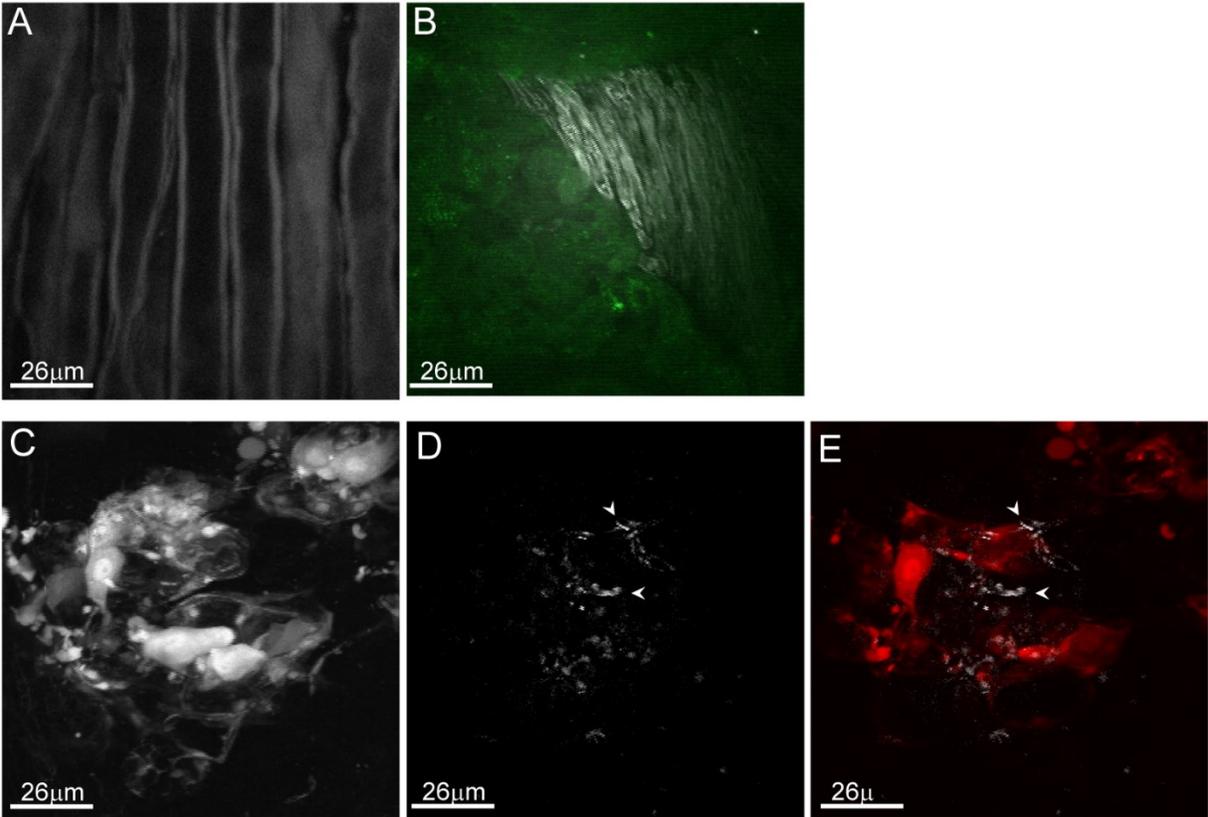
**Figure 2** Characterization of vUs7-8mCherry : (A) Western blot showing expression of the viral protein Us8 (gE) in Vero cells infected by vUs7-8mCherry (isolates a and b) (top panel). The blot was stripped and reprobred for beta-Actin as a loading control (bottom panel). The positions of molecular mass markers are indicated to the left of each panel. Arrows to the right of the panels mark the position of the protein. (B) One-step replication analysis of vUs7-8mCherry (a and b) compared to the wild-type virus KOS. Anova statistical tests revealed no significant differences in the values obtained for vUs7-8mCherry and KOS.



**Figure 3** Insertion of the mCherry expression cassette between *Us7* and *Us8* does not alter virus phenotype *in vivo* : Both independent isolates of vUs7-8mCherry were tested *in vivo* in parallel with the wild-type virus KOS as a control. Titers of virus present in tear films of mice at 1 (A), 2 (B) and 3 (C) days p.i. (D) Titers of virus present in the TG of mice harvested at 3 days p.i. Anova statistical tests revealed no significant differences in the values obtained for vUs7-8mCherry and KOS.



**Figure 4.** Identification of cells infected by vUs7-8mCherry in histological sections : (A) Eyes of mice infected with vUs7-8mCherry-a were harvested at 2 days p.i., and analyzed by standard confocal microscopy. Structures of the eye are indicated by the white arrows. The red indicates a group of cells infected by vUs7-8mCherry-a. (B) TG of mice infected with vUs7-8mCherry were harvested at 3 days p.i.; an infected neuron is visualized by confocal microscopy using the red field. (C) Merge image showing the autofluorescence of the TG in green field and the red field showing an infected cell. The white dashed line outlines an infected neuron.



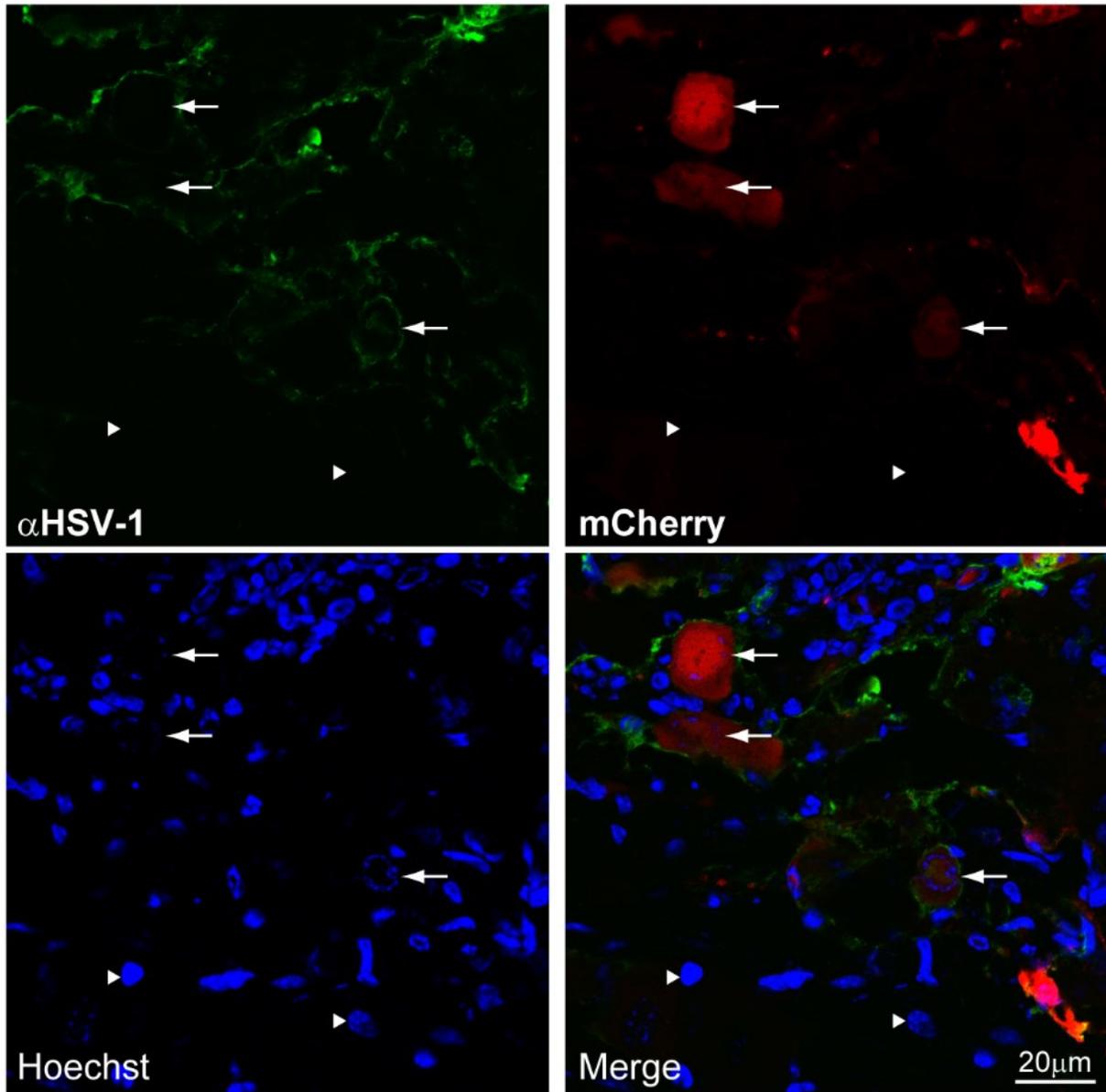
**Figure 5** Visualization of a non-sectioned infected TG with a multimodal non-linear imaging platform : (A) Myelinated axons as visualized by CARS microscopy. (B) Merge of the CARS signal (white) with the autofluorescence of tissue corresponding to a cluster of neuron bodies (green). (C) Visualization of infected cells through detection of mCherry fluorescence. The image represents the sum of all focal planes taken at 2 microns interval through the TG. (D) CARS imaging of one of the focal planes visualized in (C) from which the autofluorescence background was subtracted. (E) Merge of mCherry fluorescence (red) with the corresponding focal plane of CARS microscopy (white) in (D). White arrowheads indicate a myelinated axon visualized by CARS microscopy.

**Table 1. Expression of mCherry does not reduce viral ex vivo reactivation frequency**

Virus	# TG reactivated		TG dissociated	(%)
	TG dissociated			
KOS	10/14			(86%)
Mock	0/4			(0%) *
vUs7-8mCherry-a	10/10			(100%) †
vUs7-8mCherry-b	8/8			(100%) †

\*:  $p < 0.0001$  compared to KOS (Fisher's exact test)

†:  $p > 0.1$  compared to KOS (Fisher's exact test)



**Figure S1** Identification of cells infected with vUs7-8mCherry in TG sections : TG from mice infected with vUs7-8mCherry were harvested 3 dpi, sectioned, immunostained for HSV-1, and analyzed by confocal microscopy. Shown are infected cells as visualized by immunohistofluorescence using anti-HSV-1 serum (top left panel), and by detection of mCherry fluorescence (top right panel). Nuclei were stained with Hoechst, which labels DNA (bottom left panel). Merged images are shown in the bottom right panel. Arrows point to nuclei of infected cells, arrowheads point to nuclei of non-infected cells. The scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

**Video S1** Three dimensional reconstitution through two-photon fluorescence microscopy of neurons within TG infected by vUs7-8mCherry : Trigeminal ganglia cells infected by vUs7-8mCherry were visualized by two-photon fluorescence microscopy. Images were taken at every 2 microns using optical sectioning, for a total depth of 88 microns. Using the NIH image J software with signal intrapotation, the 44 images taken were used to reconstruct a three-dimensional image of a region of interest.

**Link:**

<http://www.plosone.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0105103.s002>



# CHAPITRE 4 : DISCUSSION

## 4. Discussion

### 4.1. Importance d'UL24 pour la neuropathogénèse du VHS-1

Notre étude avait pour objectif d'approfondir notre compréhension du rôle d'UL24 dans la neuropathogénèse du VHS-1 en élucidant les mécanismes menant à la réduction des titres viraux lors de l'infection aiguë du TG. Une étude antérieure avait émis l'hypothèse qu'un virus déficient en UL24 ne pouvait se répliquer correctement dans un neurone, expliquant ainsi la chute des titres viraux dans les TG en absence d'UL24 (Jacobson *et al.*, 1998). Pour répondre à cette question, nous avons généré un virus de secours d'UL24X, un témoin essentiel absent de la littérature. Sans la caractérisation d'un virus de secours d'UL24X, il est impossible de confirmer que le phénotype du virus mutant est associé à la mutation insérée dans le gène UL24, et non à la présence de mutations ailleurs dans le génome viral. La réplication virale neuronale a été caractérisée dans des cultures neuronales générées au laboratoire, tandis qu'une évaluation multiparamétrique de tissus neuronaux nous a permis d'étudier la contribution d'UL24 dans l'établissement d'une infection neuronale productive.

En second lieu, nous voulions pousser notre capacité d'étudier la pathogénèse virale au-delà des limites imposées par les techniques d'histologie et de microscopie conventionnelles. Pour ce faire, nous avons développé une stratégie permettant l'insertion d'une cassette d'expression d'une protéine fluorescente rouge dans le génome du VHS-1, tout en maintenant un phénotype de type sauvage. Ces virus ont ouvert la porte à une étude collaborative interdisciplinaire avec l'INRS-EMT en imagerie d'échantillons biologiques. En puisant dans les nouvelles technologies de bioimagerie, nous avons mis au point une plateforme de microscopie multiphotonique multimodale, permettant de visualiser divers signaux intrinsèques à l'anatomie tissulaire du TG, ainsi que le signal de fluorescence généré par une RFP exprimée à partir d'un virus recombinant.

#### 4.1.1 Caractérisation de vUL24X-Rescue

Le virus UL24X, caractérisé en 1998, a été généré dans le fond génétique de la souche KOS à partir d'un virus possédant un marqueur de recombinaison homologue, *tkLTRZ-1*

(Jacobson *et al.*, 1998). Malgré la caractérisation d'un virus de secours de *tkLTRZ-1*, aucun virus témoin pour UL24X n'avait été créé jusqu'à la production de vUL24X-Rescue. Contrairement au virus de type sauvage KOS, la proximité phylogénétique entre UL24X et UL24X-Rescue fait de ce dernier le meilleur témoin expérimental afin d'étudier l'importance d'UL24 pour la biologie du virus.

La réintroduction du gène *UL24* de type sauvage dans le génome d'UL24X a corrigé les phénotypes majeurs associés à une mutation en UL24. vUL24X-Rescue produit des plages de lyses de tailles similaires à celle de KOS et ne produit pas de plages syncytiales telle que formées par UL24X. Un essai de réplication virale à forte MOI a démontré que vUL24X-Rescue produit des titres viraux significativement supérieurs à ceux d'UL24X. Plus significativement, lors d'infection *in vivo*, les titres viraux oculaires ainsi que trigéminaux ont été rétablis suite à la réintroduction du gène *UL24* de type sauvage dans le génome d'UL24X. De plus, vUL24X-Rescue produit une maladie similaire à KOS et se réactive avec une efficacité similaire au virus de type sauvage. Malgré une réplication virale améliorée par rapport à UL24X, les titres viraux de vUL24X-Rescue ne rejoignent pas ceux de KOS dans un essai de réplication virale à forte MOI dans des cellules Vero. UL24X-Rescue est phylogénétiquement éloignée de la souche sauvage KOS, et quelques variations génétiques pourraient avoir été conservées lors de la production de virus recombinants. Puisqu'UL24X-Rescue a été produit directement à partir d'UL24X, cela justifie son utilisation, plutôt que KOS, comme témoin expérimental pour les expériences impliquant UL24X. De plus, l'observation d'un phénotype intermédiaire de vUL24X-Rescue en culture cellulaire est éclipsée par les observations faites lors d'infection *in vivo*, offrant un environnement plus robuste pour la caractérisation de paramètres virologiques.

#### **4.1.2 UL24 et la réplication virale neuronale**

Il a été rapporté que l'absence d'UL24 mène à la diminution d'au moins 4 log<sub>10</sub> des titres viraux dans les ganglions trigéminaux, et que ceci pourrait être associé à un rôle dans la réplication virale neuronale, tel que pour les protéines virales TK et RR (Field *et al.*, 1978, Jacobson *et al.*, 1998). En absence de TK, le virus est capable d'exprimer des gènes immédiat-précoces et précoces et entrer en latence, mais ne peut produire de virions infectieux dans les neurones du TG (Thompson *et al.*, 2000). Tout comme un virus déficient en TK, une mutation en *UL39* mène à l'incapacité de produire des virions infectieux dans les TG suite à l'infection de la cornée (Brandt *et al.*, 1991). En culture neuronale, l'infection par des virus déficient en l'une de ces deux protéines produit des titres viraux significativement inférieurs au virus de type sauvage

(Brandt *et al.*, 1991). L'absence d'UL24 lors de l'infection de cellules d'une lignée neuronale humaine (LA-N-5) ou de neurones primaires de souris embryonnaires mène à une réduction des titres viraux similaire à ce qui est observé dans une lignée épithéliale. Les neurones embryonnaires ont déjà été utilisés afin de faire ressortir un défaut de la réplication virale neuronale associé à RR. La protéine virale UL24 n'est donc pas un déterminant de la réplication neuronale tel TK ou RR. De plus, malgré la diminution des titres viraux, la cinétique de réplication virale d'UL24X demeure inchangée comparativement aux virus témoins ; les titres viraux de KOS, UL24X et vUL24X-Rescue varient en parallèle dans une cellule épithéliale et dans un neurone. La protéine virale UL24 possède un motif d'endonucléase de type PD-(D/E)-xK dont l'activité n'a pas été démontrée. Le motif d'endonucléase de type PD-(D/E)-xK est retrouvé dans différentes protéines cellulaires dont plusieurs impliquées dans la recombinaison homologue du génome. Des processus de recombinaison homologues sont aussi impliqués dans la réplication du génome du VHS-1, formant des embranchements de concatémères complexes. Il serait possible que via une activité d'endonucléase, UL24 soit impliquée dans les étapes tardives de la réplication du génome virale lors de la prise en charge des concatémères complexes (Figure 4.1 - 1) Cela expliquerait une réduction de l'efficacité de réplication virale en absence d'UL24, indépendamment du type cellulaire.

Lors de l'infection aiguë du TG en absence d'UL24, nous observons une très grande variabilité des titres viraux au jour 3 post-infection. La moitié des souris infectées par UL24X ne produisent aucune particule virale infectieuse dans le TG au-delà du seuil de détection de nos expériences (10 pfu/ml). En contrepartie, l'infection chez les autres souris mène à la production de titres viraux variant sur 3 ordres de grandeur. Il est fort probable que la diminution de l'efficacité de la réplication virale en absence d'UL24 contribue à la diminution des titres viraux dans les TG. Toutefois, un rôle additionnel est nécessaire afin d'expliquer la grande variabilité des titres viraux dans les TG contrairement à ce que l'on observe en périphérie.

#### **4.1.3 Relation entre l'infection périphérique et les titres viraux dans les TG**

Dans notre modèle d'infection *in vivo*, l'absence d'UL24 mène à une réduction de 1 log<sub>10</sub> des titres viraux récoltés dans le surfactant oculaire dans les premiers jours post-infection. Nous avons confirmé que la diminution des titres viraux périphériques en absence d'UL24 correspond à une réduction de la charge virale dans la cornée, et non due à un défaut dans le relâchement du virus dans le surfactant oculaire. Il est connu qu'une réduction de la charge virale en périphérie joue un rôle dans la quantité de virus pouvant rejoindre le TG lors des premiers jours de l'infection

*in vivo* (S. H. Chen *et al.*, 2004). Nous voulions tester pour la possibilité que la réduction des titres viraux périphériques en absence d'UL24 soit suffisante pour affecter de façon drastique les titres viraux dans les TG. Pour ce faire, nous avons infecté des souris avec des doses progressivement diminuées du virus de type sauvage, ou avec une dose augmentée du virus UL24X, afin d'égaliser les titres viraux de nos souches virales en périphérie. En réduisant de 2000 fois la dose infectieuse de KOS, nous avons obtenu une charge virale oculaire similaire à celle d'UL24X à 1 jour post infection, mais des titres viraux dans les TG significativement plus élevés qu'UL24X. Une réduction des titres viraux oculaires, tel qu'observée en absence d'UL24, n'est donc pas suffisante pour affecter de façon significative l'établissement d'une infection virale dans le TG. De plus, l'augmentation de 80 fois de la dose infectieuse d'UL24X n'a pu augmenter les titres viraux produits en périphérie et dans le TG. Au contraire, cette augmentation a mené à une réduction légère des titres viraux produit *in vivo*. Une toxicité cellulaire associée à une multiplicité d'infection trop élevée pourrait expliquer ces résultats. L'incapacité de produire des titres viraux dans le TG similaire à ceux d'UL24X à moins de réduire la dose infectieuse de plus de 3000 fois suggère qu'UL24 est importante pour l'établissement d'une infection productive dans le TG malgré une charge virale périphérique réduite.

#### **4.1.4 Importance d'UL24 pour l'établissement d'une infection productive dans le TG**

Une infection périphérique avec UL24X est associée avec des titres viraux dans le TG pouvant chuter sous le seuil de détection de nos expériences. Pourtant, nous avons démontré qu'UL24 n'est pas essentielle à la réplication virale neuronale, et que les titres viraux périphériques sont suffisants pour permettre la dissémination de l'infection vers les tissus neuronaux. Une analyse par immunohistofluorescence de tranches de TG récoltés à 3 jours post infection a révélé que l'absence d'UL24 diminue drastiquement l'incidence, ainsi que la taille des foyers infectieux, où une infection productive est établie. Pour notre étude quantitative de l'infection du TG, malgré le diamètre large de 20 micron de plusieurs neurones, nous voulions réduire les chances de manquer un neurone infecté. Des coupes de TG de 8 microns d'épaisseur ont été réalisés, rendant possible la détection d'un même neurone infecté sur plus d'une coupe histologique. Via cette stratégie, nous avons confirmé que l'absence d'UL24 réduit l'incidence d'une infection productive dans le TG de moitié. Par ailleurs, lorsqu'un foyer infectieux est détecté, UL24X infecte en moyenne 80 fois moins de neurones par coupe histologique produite par rapport aux virus témoins. Contrairement aux virus témoins où des centaines de neurones infectés

peuvent être détectés dans un TG, seuls quelques dizaines de neurones sont infectés par UL24X par TG. De plus, jamais plus d'un foyer infectieux n'a été détecté dans un TG infecté par UL24X à 3 jpi. Il est peu probable que ces observations soient dues à une diminution de l'intensité de l'immunomarquage contre le VHS-1. L'antisérum utilisé pour identifier des neurones infectés de façon productive par le VHS-1 possède plusieurs anticorps spécifiques contre des protéines virales tardives. L'intensité des immunomarquages réalisés est similaire en présence ou en absence d'UL24. De plus, des expériences qualitatives antécédentes au laboratoire n'ont pas détecté une réduction dans les quantités de certaines glycoprotéines virales tardives en absence d'UL24, tel qu'analysées par immunobuvardage de type Western. Donc, ces résultats appuient un modèle où la réduction sévère du nombre de neurones infectés en absence d'UL24 serait la cause principale de la chute drastique des titres viraux dans les TG à 3 jours post-infection.

Les virus de types sauvage se disséminent facilement vers le TG, produisant plusieurs foyers infectieux dans une vaste région du TG innervant la cornée. La taille du foyer infectieux à 3 jours post infection est le résultat cumulatif du nombre de neurones infecté via la périphérie, de la dissémination interneuronale, ainsi que de l'infection de nouvelles terminaisons axonales par dissémination zosteriforme. Nos résultats démontrent que l'absence d'UL24 résulte en un petit foyer infectieux à forte densité de neurones infectés, et suggèrent qu'UL24 agit en amont de l'infection d'un neurone, tel un déterminant de la dissémination de l'infection de la cornée vers le TG. Nous ne pouvons exclure qu'en absence d'UL24, l'infection rentre préférentiellement en latence, résultant en un petit foyer d'infection productive. Toutefois, puisqu'UL24 est une protéine virale tardive que l'on ne retrouve pas au niveau du virion infectieux, il serait surprenant qu'elle soit impliquée directement dans des mécanismes suivant l'infection des terminaisons axonales. Il a été suggéré que la multiplicité d'infection d'un neurone *in vivo*, affectant les niveaux de produits viraux lytiques, puisse avoir un impact sur le choix entre l'entrée en latence et l'initiation du cycle d'infection lytique (Bertke *et al.*, 2011). Une diminution de la multiplicité d'infection d'un neurone en absence d'UL24 pourrait indirectement mener à l'établissement préférentiel de l'infection latente.

#### **4.1.5 Importance d'UL24 pour la dissémination rétrograde de l'infection**

Afin de sonder la possibilité qu'UL24 soit impliquée dans la dissémination virale de la cornée vers le TG, nous avons procédé par hybridation *in situ* de TG complet contre le génome viral dans des échantillons prélevés à 2 jpi. À 2 jpi, le nombre de neurones infectés correspond à un seul cycle complet de réplication virale dans le TG, ainsi qu'aux neurones infectés directement

de la périphérie. Cette stratégie nous permet de sonder le nombre de cellules infectées à partir de la périphérie, et précèdent la contribution significative de la dissémination interneuronale de l'infection. Contrairement à la visualisation de l'infection par immunofluorescence, la détection du génome viral par hybridation *in situ* ne dépend pas de l'initiation d'une infection lytique et de l'expression de protéines virales. Tel qu'attendu, le nombre total de neurones infectés par nos trois virus expérimentaux, détecté par cette technique à 2 jpi, est significativement inférieur au nombre de neurones détectés par immunofluorescence à 3 jpi. Malgré les temps précoces à lequel les TG ont été analysés, nous avons observé une réduction significative du nombre de neurones possédant du génome viral en absence d'UL24. Contrairement aux virus témoins, jamais plus d'un foyer infectieux produit par UL24X n'a été détecté dans les TG à 2 jpi. Nos résultats démontrent un rôle important de la protéine virale UL24 dans la capacité du virus à infecter les neurones à partir de la cornée. L'importance d'UL24 dans la neuropathogénèse serait de contribuer significativement à la dissémination de l'infection *in vivo*.

Toutefois, la technique d'hybridation *in situ* ne peut distinguer entre les neurones où l'infection rentre en infection lytique, et ceux où l'infection rentre directement en latence. Des analyses par hybridation *in situ* contre des transcrits immédiats-précoce ou contre les transcrits LAT permettraient de mieux caractériser l'importance d'UL24 dans l'initiation d'infection neuronale.

#### **4.1.6 Relation entre l'infection périphérique et la maladie associée à l'infection par le VSH-1 chez la souris**

L'infection de la cornée d'une souris avec le VHS-1 cause une maladie de type inflammatoire dans la région périoculaire. Suite à l'infection du TG à partir de l'œil, l'infection se disséminera vers la périphérie causant une lésion zosteriforme pouvant provoquer une inflammation sévère, la perte de poils, ainsi que l'apparition de lésions ouvertes de la peau. La sévérité de cette maladie dépend de la quantité de virus se disséminant lors de l'infection aiguë en direction antérograde, du TG vers la peau.

Les infections avec UL24X résultent en un défaut sévère de la dissémination rétrograde de l'infection à partir de la cornée. Bien que nous observions une diminution de 50% de l'incidence de l'établissement d'une infection productive dans un TG, moins de 75% des souris infectées par UL24X développe une maladie. De plus, les lésions zosteriformes en absence d'UL24 sont très légères et se résorbent rapidement (Leiva-Torres *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous n'observons pas de retard dans l'apparition des symptômes en absence d'UL24. Ces résultats suggèrent qu'en

plus de jouer un rôle dans la dissémination rétrograde de l'infection virale, UL24 pourrait aussi être impliquée dans la dissémination antérograde de l'infection à partir du TG. La diminution de l'incidence de la maladie chez la souris produit par UL24X serait alors le résultat cumulatif de la réduction de l'efficacité de la dissémination rétrograde de l'infection, ainsi que de la dissémination antérograde.

La formation de lésions zosteriformes est un moyen important pour le virus d'accéder à de nouvelles terminaisons axonales et d'infecter un grand nombre de neurones dans le TG. En absence d'UL24, la réduction de l'incidence et de la sévérité de la maladie chez la souris pourrait contribuer à la réduction drastique du nombre de neurones infectés à 3 jpi. La protéine virale US3 contribue à l'infection d'un grand nombre de neurones via la formation de lésions zosteriformes (Asano *et al.*, 2000). En son absence, les neurones peuvent être infectés de façon efficace à partir de la périphérie, mais l'absence de lésions zosteriformes réduit significativement les chances d'infecter de nouvelles terminaisons axonales loin du dermatome initialement infecté. Toutefois, contrairement à UL24X, l'infection d'un neurone en absence d'US3 mène rapidement à l'apoptose, affectant significativement le déroulement de l'infection lytique et minimisant les chances que des virus nouvellement formés retournent à la périphérie. Un rôle d'UL24 dans la dissémination antérograde de l'infection expliquerait d'avantage la grande variabilité des titres viraux produits par UL24X dans les TG à 3 jours post infections (Figure 4.1 – 7).

Toutefois, il est possible qu'UL24X puisse se disséminer par lésions zosteriformes, mais que l'infection périphérique ne cause aucune maladie. Il a été démontré qu'un homologue d'UL24 chez le HCMV participe à la dissémination du virus en induisant de l'IL-8 afin de recruter des cellules immunitaires (Costa *et al.*, 2013, Craigen *et al.*, 1997, Murayama *et al.*, 1994, Murayama *et al.*, 1997). Via un mécanisme similaire, il serait possible qu'UL24 soit un déterminant de la maladie chez la souris en induisant l'expression d'interleukines et favorisant l'infiltration lymphocytaire des tissus périphériques. Des analyses histologiques ainsi que des essais de titration virale de la peau permettraient de déterminer la contribution d'UL24 dans la formation de lésions zosteriformes et dans l'initiation de la maladie inflammatoire.

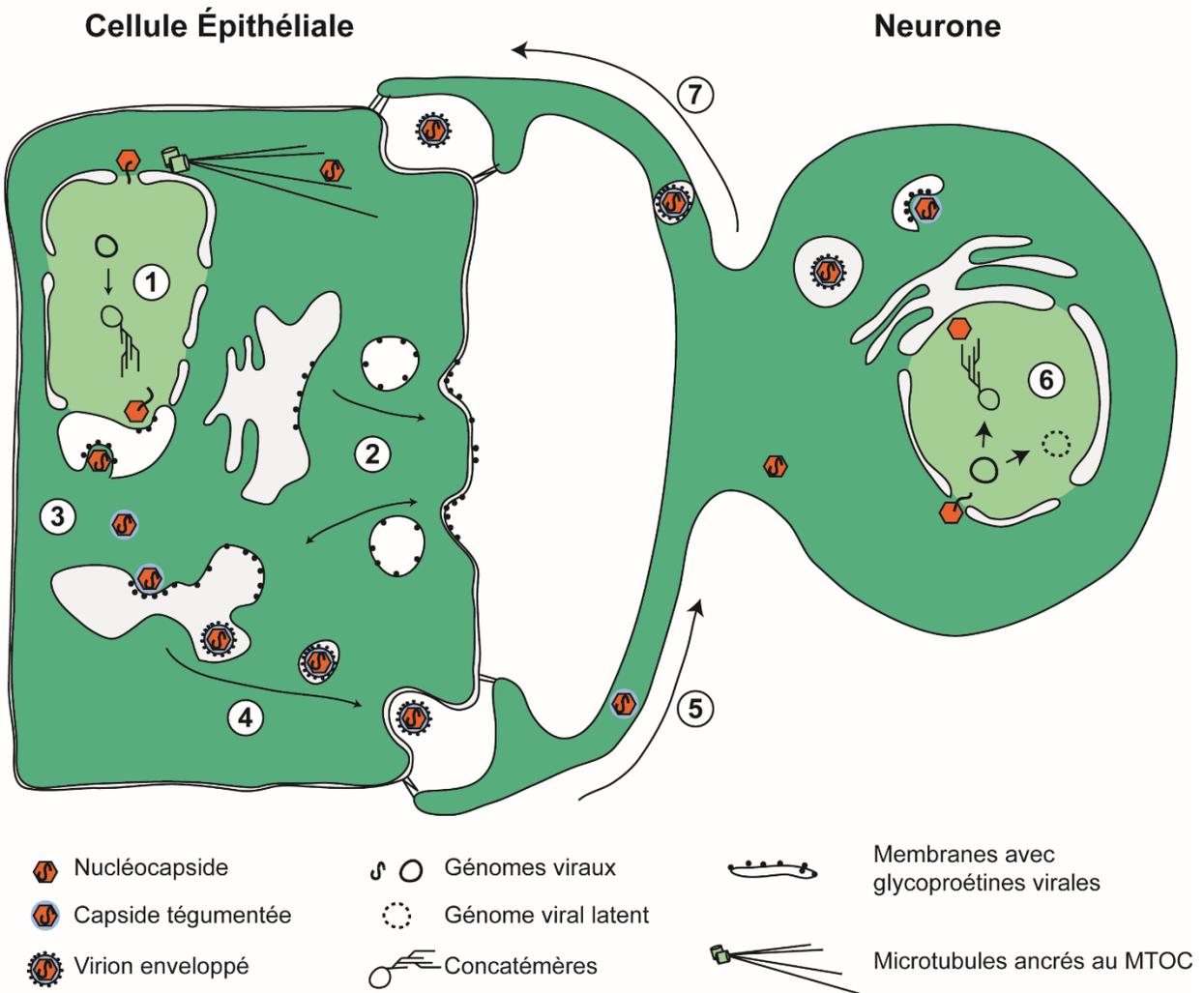
#### **4.1.7 Relation entre l'infection périphérique et la réactivation virale**

Une infection périphérique par le virus de type sauvage résulte en la dissémination de l'infection vers le TG, menant à l'établissement d'une infection latente pouvant se réactiver. En réduisant la quantité de virus de type sauvage dans l'inoculum, nous observons une réduction significative de l'incidence de la réactivation virale à partir de la latence tel qu'observé

précédemment (Chen *et al.*, 2004). Nous avons observé que la réduction de la dose infectieuse peut réduire le nombre de souris où une infection productive périphérique est établie, ce qui explique la réduction du nombre de TG associé à une réactivation virale *ex vivo*. En contrepartie, en absence d'UL24, nous observons une réduction drastique de l'incidence de la réactivation virale. Puisqu'une infection productive périphérique est établie lors de l'infection avec UL24X, contrairement aux infections avec de faibles quantités de virus KOS, la réduction de l'efficacité de la réactivation virale dépendrait d'une réduction du nombre de neurones infectés de façon latente. Il a été démontré auparavant que lors de la latence, il y a une réduction de  $2 \log_{10}$  du nombre de génomes viraux dans le TG, ainsi qu'une réduction de  $1 \log_{10}$  du nombre de transcrits LAT dans le TG (Jacobson *et al.*, 1998). Nos observations suggèrent qu'un défaut au niveau de la dissémination de l'infection en absence d'UL24 dans les temps précoces de l'infection soit suffisant pour expliquer une diminution de l'efficacité de l'établissement d'une infection latente ainsi que de la réactivation virale à partir de la latence. Enfin, il est possible qu'UL24 joue un rôle direct dans l'efficacité de réactivation virale à partir de la latence. Bien qu'UL24 soit une protéine tardive, la cinétique d'expression de gènes viraux est désorganisée lors de la réactivation à partir de la latence. Il serait intéressant de caractériser l'efficacité de réactivation virale en absence d'UL24 à partir d'un nombre égal de neurone où la latence est établie. Considérant la difficulté de normaliser des paramètres virologiques *in vivo*, tels les titres viraux périphériques, entre le virus UL24X et les virus témoins, des lignées neuronales pourraient être utilisées afin d'étudier la réactivation d'une infection virale quiescente.

#### **4.1.8 Mécanismes possibles impliquant UL24 dans la dissémination virale à partir de cellules épithéliales**

La réduction légère des titres viraux dans les neurones observés pour UL24X révèle qu'UL24 n'est pas essentielle pour le déclenchement d'une infection lytique dans ce type cellulaire. Les cellules primaires et les neurones embryonnaires peuvent faire ressortir des phénotypes associés à des mutants en des protéines impliquées dans la réplication virale



**Figure 4.1** Hypothèse impliquant UL24 dans la pathogenèse virale : La protéine virale UL24 est multifonctionnelle, elle pourrait être directement impliquée dans la réplication du génome virale (1), dans l'endocytose et le transport de vésicules contenant les glycoprotéines virales (2), dans l'enveloppement primaire (3) et secondaire (4), et dans la sortie dirigée des cellules épithéliales vers les terminaisons axonales (5). Il se peut que l'absence d'UL24 modifie la composition du virion infectieux mature, et soit indirectement impliquée dans le transport axonale rétrograde. UL24 pourrait être impliquée dans l'initiation de l'infection productive neuronale, ainsi que dans la réactivation virale à partir de la latence (6). Enfin, UL24 pourrait jouer un rôle dans la sortie dirigé du virion infectieux, des neurones vers la périphérie (7).

neuronale (TK, RR) ainsi que dans la prévention de l'arrêt de la synthèse protéique (ICP34.5). Le virus UL24X se réplique de façon efficace dans les neurones primaires, avec une cinétique similaire à celle de nos virus témoins. Le seul phénotype associé à une mutation en UL24 dépendant de la température, l'apparition de plage syncytiale, est indépendant du défaut dans la neuropathogénèse. Il serait alors improbable qu'une température plus élevée dans les TG *in vivo* que lors de nos infection en culture cellulaire explique que nous n'ayons pas observé une réduction drastique des titres viraux suite à la réplication virale dans des neurones primaires.

Dans nos expériences en culture cellulaire, les neurones sont infectés directement par leur corps cellulaire. *In vivo*, l'infection neuronale se fait principalement suite à la sortie des cellules épithéliales spécialisées de la peau. Considérant qu'en absence d'UL24, nous observons une réduction de l'incidence de l'infection productive du TG ainsi que de l'apparition de la maladie en périphérie, il est possible que cette protéine soit impliquée dans les mécanismes de dissémination virale entre cellules spécialisées dans un tissu complexe.

L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'UL24 joue un rôle dans la sortie dirigée de cellules épithéliales afin d'accéder directement aux neurones lors de la dissémination rétrograde, ou pour retourner en périphérie lors de la dissémination antérograde (Figure 4.1 - 2-4). Nous savons que l'absence d'UL24 modifie la localisation cytoplasmique des glycoprotéines virales de fusion (gB, gD, gH/gI) (Ben Abdeljelil *et al.*, 2013). Il se peut que les glycoprotéines associées à la sortie dirigée de la cellule, telle gE, soient aussi relocalisées en absence d'UL24. La glycoprotéine gE participe à la sortie dirigée de la cellule en ciblant les virions infectieux vers les jonctions serrées de cellules polarisées (Farnsworth *et al.*, 2006a, Johnson *et al.*, 2001). Lors d'infection *in vivo*, des virus déficient en gE peuvent se répliquer dans les tissus neuronaux lorsqu'infectés directement, mais ne peuvent s'y disséminer suite à l'infection périphérie, et ne produisent pas de lésions zosteriformes (Brittle *et al.*, 2004, Saldanha *et al.*, 2000, F. Wang *et al.*, 2005a). Dans un modèle de chambre de Campenot où les terminaisons axonales sont physiquement séparées des corps neuronaux, l'infection directe des corps neuronaux en absence de gE mène à la production de titres viraux élevés au sein des neurones, mais à l'incapacité du virus à se diriger vers les terminaisons axonales par transport antérograde (H. M. McGraw *et al.*, 2009b). L'infection directe de neurites, ou à partir d'une couche de cellules épithéliales non-polarisées cultivées par-dessus les terminaisons axonale, mènent tous deux à une infection productive des neurones en absence de gE (H. M. McGraw *et al.*, 2009b). Toutefois, lorsque des cellules épithéliales polarisées sont superposées aux terminaisons axonales, l'absence de la

glycoprotéine E diminue sévèrement la capacité du virion à traverser la couche de cellules épithéliales et de rejoindre les terminaisons axonales (H. M. McGraw *et al.*, 2009b). Il serait intéressant de procéder à des infections en chambre de Campenot avec un virus déficient en UL24 afin d'élucider les mécanismes de dissémination virale impliquant UL24. Il serait aussi intéressant de caractériser la localisation cellulaire de la glycoprotéine virale gE en absence d'UL24, en contexte d'infection de cellules épithéliales ou de neurones.

Malgré la localisation cytoplasmique de la glycoprotéine E, la présence de la protéine UL24 au noyau semble être importante pour ses fonctions dans la dissémination de l'infection virale. UL24 pourrait donc affecter la localisation cellulaire de gE via l'intermédiaire d'une autre protéine virale. Le complexe protéique UL31 et UL34 démontre une localisation périnucléaire (Reynolds *et al.*, 2002) ; ce complexe est associé à la membrane nucléaire ainsi qu'à la fraction nucléaire du réticulum endoplasmique. Des mutations dans le cadre de lecture ouvert d'UL34 induisent un défaut sévère de la sortie des capsides virales du noyau, ainsi qu'à un défaut important au niveau de la dissémination de l'infection (Bjerke *et al.*, 2006, Haugo *et al.*, 2011). De plus, la localisation cytoplasmique de la glycoprotéine E est aussi affectée lorsque le gène *UL34* est muté (Haugo *et al.*, 2011). Il est possible que la protéine UL24 agisse par l'intermédiaire d'UL34 afin de moduler la localisation cellulaire de gE et ainsi, participer à la sortie cellulaire des virions infectieux.

Enfin, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'UL24 joue un rôle dans l'infection neuronale suite à l'infection au niveau des terminaisons axonales. Si UL24 est impliquée directement ou indirectement dans la tégumentation ou l'acquisition de glycoprotéines virales dans l'enveloppe lipidique virale lors de l'infection, il se pourrait que le transport axonal rétrograde de la capside soit affecté ou que l'infection par UL24X à partir de la périphérie favorise d'avantage l'établissement d'une infection latente (Figure 4.1 – 5-6). Nos résultats ne peuvent présentement pas exclure cette hypothèse. Une analyse biochimique de virions extracellulaires produit en absence d'UL24 pourrait aider à répondre à cette question.

#### **4.1.9 Implication clinique de virus mutant en UL24**

Une étude portant sur l'immunité contre le VHS-2 a identifié un virus déficient en UL24 comme étant une plateforme vaccinale potentielle (Visalli *et al.*, 2014). L'infection par le VHS-2 déficient en UL24 n'induit aucune mortalité chez la souris et chez le cochon-d'inde, et génère une réponse immunitaire suffisante pour protéger ces animaux contre des infections subséquentes avec des souches de type sauvage (Visalli *et al.*, 2014). Toutefois, nos résultats suggèrent qu'une déficience en UL24 ne serait pas suffisante comme plateforme vaccinale sécuritaire chez

l'humain. L'infection en absence d'UL24 mène à l'établissement d'une infection productive dans la moitié des souris infectées par notre virus. De plus, malgré une réduction significative du nombre de neurones où les gènes lytiques peuvent être détectés, nos essais en immunofluorescence et en hybridation *in situ* ne peuvent identifier sans aucun doute les neurones où l'infection est entrée en latence. Il se pourrait que la latence en absence d'UL24 soit établit dans un nombre suffisant de neurones pour poser un risque lors de l'immunodépression en âge avancé. Toutefois, il serait intéressant de combiner des mutants en UL24 avec d'autres mutations, tel au niveau des protéines virales TK, RR ou ICP34.5, afin de produire de nouveaux virus atténués comme plateforme vaccinale.

Différentes souches ou versions mutantes du VHS-1 sont en développement pour être utilisées comme virus oncolytiques dans les traitements contre certains cancers. La mutation de déterminants de la réplication virale neuronale permet de traiter des gliomes dans le cerveau en minimisant les chances que le virus se réplique dans les neurones sains avoisinants. La première étude ayant caractérisé le rôle d'UL24 dans la pathogenèse virale avait suggéré qu'UL24 serait un déterminant de la réplication virale neuronale, expliquant la réduction des titres viraux dans les TG (Jacobson *et al.*, 1998). Notre étude démontre que la protéine virale UL24 n'est pas essentielle à la réplication virale neuronale, et que la mutation de cette protéine ne serait pas suffisante afin de produire un virus oncolytique sécuritaire. Toutefois, la protéine virale UL24 serait une candidate de choix comme cible à inclure parmi d'autres mutations dans un virus oncolytique. La mutation d'*UL24* pourrait moduler à la baisse la capacité d'un virus oncolytique à se disséminer chez un hôte. De plus, le phénotype syncytiale, parfois souhaité lors de la production de virus oncolytiques, pourrait être acquis en mutant *UL24* au lieu des autres protéines virales telles gB, gK, et UL20. À ce jour, *UL24* a été identifié comme gène muté dans le génome du virus oncolytique HF10, possédant plusieurs protéines mutées (Mori *et al.*, 2005, Takakuwa *et al.*, 2003). Nous ignorons toutefois la contribution de la mutation en *UL24* dans les propriétés oncolytiques de ce virus.

## **4.2 Visualisation de l'infection virale par bioimagerie**

### **4.2.1 Stratégie de production de virus recombinant exprimant une protéine fluorescente rouge**

L'utilisation de virus recombinant exprimant une protéine fluorescente rouge et possédant un phénotype de type sauvage nous a permis de dépasser les limites imposées par les techniques

d'histologie conventionnelles. L'expression d'une protéine fluorescente par un virus nous permet d'identifier sans marquage les cellules infectées, via l'utilisation de microscope à fluorescence. De plus, la visualisation d'une cellule infectée via l'expression d'une protéine fluorescente exprimée par le virus permet des analyses histologiques indépendantes de la disponibilité ou de la qualité d'anticorps commerciaux contre le virus.

Nous avons opté pour une stratégie permettant d'insérer une cassette d'expression pour une protéine fluorescente dans le génome viral, conçu pour réduire les impacts sur le comportement du virus. La cassette d'expression possède le gène de la protéine fluorescente rouge mCherry exprimée à partir du promoteur eukaryote CMV. Le choix d'une RFP est justifié par les longueurs d'ondes du rouge pouvant pénétrées facilement les tissus animaux épais. Des RFP de nouvelles générations ont été produites, offrant plusieurs avantages quant à la rapidité de la maturation et de la stabilité de la protéine, ainsi qu'au rendement quantique de l'intensité de la fluorescence par rapport aux RFP originales (Shaner *et al.*, 2004). De plus, une forte intensité de l'autofluorescence dans le vert existe dans les tissus d'intérêts. Un virus exprimant une RFP est donc favorable pour les études d'infection *in vivo*. Nous avons inséré la cassette d'expression de mCherry dans la région intergénique entre les gènes viraux *Us7* et *Us8*. Ceci nous a permis d'éviter de modifier le cadre de lecture ouvert d'un gène viral. De plus, nous avons dupliqué cette région intergénique en tandem afin que ces séquences flanquent la cassette d'expression. De cette façon, nous avons réduit les chances que l'insertion d'un fragment d'ADN exogène dans le génome viral éloigne des sites promoteurs importants pour l'expression des gènes viraux avoisinant la cassette d'expression.

#### **4.2.2 Caractérisation de vUs7-8mCherry**

Bien que plusieurs virus recombinants exprimant des protéines fluorescentes aient été produits, peu se sont avérés stable tout en conservant un phénotype de type sauvage (Balliet *et al.*, 2007, Burgos *et al.*, 2006a, Zerboni *et al.*, 2013). Les isolats indépendants de vUs7-8mCherry produits via notre stratégie ont conservé la cassette d'expression à travers nos expériences. Nous n'avons observé aucune apparition d'un révertant lors de nos expériences en culture cellulaire ou suite au passage chez l'animal. De plus, la présence de la cassette d'expression de la RFP mCherry n'a pas diminué l'efficacité de réplication virale en culture cellulaire ainsi qu'*in vivo*, et n'a pas diminué l'efficacité de réactivation virale à partir de la latence. Enfin, l'expression de mCherry par le virus nous a permis d'identifier rapidement les neurones où l'infection tente de se réactiver dans un essai de réactivation *ex vivo*.

Les cellules infectées par vUs7-8mCherry dans un tissu animal ont pu être facilement identifiées par microscopie à fluorescence. Suite à la production de coupes histologiques d'œil et de TG provenant de souris infectées par nos virus, nous avons pu observer un signal généré par mCherry suffisamment élevé au-dessus de l'autofluorescence du tissu. Par immunomarquage à fluorescence, nous avons confirmé que la détection de mCherry correspond à la même région du TG infecté pouvant être identifié par analyse immunohistologique traditionnelle. Tel qu'attendu, l'immunomarquage diffère du signal généré par mCherry. La protéine fluorescente rouge mCherry est une protéine soluble ; son expression sous le promoteur CMV nous permet de visualiser le cytoplasme et le noyau cellulaire de cellules où l'infection lytique est en progression. En contrepartie, l'antisérum contre le VHS-1 possède des anticorps contre plusieurs protéines virales tardives dont les glycoprotéines, et marque surtout les membranes cellulaires ainsi que des structures cytoplasmiques et nucléaires.

Le comportement de type sauvage de vUs7-8mCherry, la stabilité de l'expression de mCherry, ainsi que la facilité de visualiser des cellules infectées par microscopie à fluorescence valide l'utilisation de ce virus comme plateforme potentielle afin d'étudier la pathogenèse virale *in vivo*. Toutefois, l'utilisation du promoteur CMV hors du locus LAT ne permet pas d'utiliser l'expression de mCherry comme marqueur d'infection latente. Malgré tout, notre stratégie d'insertion d'une cassette d'expression dans la région intergénique dupliquée entre les gènes *Us7* et *Us8* peut facilement accommoder tout autre gène ou promoteur selon le besoin des études futures.

Bien que l'expression de mCherry par le virus nous ait permis d'identifier des cellules infectées, les niveaux de fluorescences associés à mCherry pouvaient approcher les niveaux d'autofluorescence de nos tissus d'intérêt. Dans l'avenir, il serait intéressant d'utiliser des virus recombinants exprimant une autre RFP, tdTomato (Shaner *et al.*, 2004), plus brillante que mCherry. L'intensité de la fluorescence de tdTomato pourrait s'avérer avantageuse comparativement à mCherry lors de la visualisation de l'infection virale dans des tissus épais puisque celle-ci permettrait de réduire le seuil de détection de cellules infectées.

#### **4.2.3 Visualisation de l'infection par microscopie multiphotonique multimodale**

Contrairement à la microscopie optique non-linéaire traditionnelle, telle la microscopie confocale monophotonique, la microscopie multiphotonique nous permet d'utiliser deux photons afin d'exciter et de visualiser une cible. L'excitation d'un fluorophore avec deux photons permet

d'utiliser deux photons possédant chacun la moitié de l'énergie requise traditionnellement par un seul photon. Puisque l'énergie des photons s'additionne dans un point spatial restreint, très peu de fluorescence est générée hors du point focal ciblé par le microscope, produisant une image très claire. Enfin, la faible énergie des photons permet au signal de pénétrer plusieurs centaines de microns dans des tissus animaux, et de minimiser le photoblanchissement (Helmchen *et al.*, 2005).

En ajustant la longueur d'onde de chaque source de photon, nous pouvons accéder à des modalités de bioimagerie inaccessible avec les microscopes monophotoniques. Des signaux de types Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) peuvent être générés en faisant vibrer les liens C-H dans les lipides en utilisant deux photons ayant des longueurs d'onde distinctes. Enfin, des signaux de seconde harmonique peuvent être générés à partir de régions riches en molécules asymétriques tel le collagène. Ces deux types de microscopie permettent de visualiser des tissus sans avoir recours à des immunohistomarquages ou à l'utilisation d'agent de contraste.

La plateforme de microscopie multimodale multiphotonique, mise au point et optimisée en collaboration avec le dr François Légaré de l'INRS-EMT, nous a permis de visualiser des régions intra-tissulaires du TG sans modifications physiques ou chimiques du tissu. Pour la première fois, nous avons combiné les signaux de types CARS, de seconde harmonique, ainsi que la microscopie à fluorescence, afin de visualiser un foyer d'infection virale au centre d'un ganglion trigéminal. La gaine de myéline, riche en lipides, a pu être facilement détectée via la génération de signaux CARS. La microscopie à fluorescence à deux photons nous a permis de visualiser les corps neuronaux par leur autofluorescence, ainsi que les cellules infectées via la détection de mCherry. De plus, les longueurs d'onde utilisées pour exciter mCherry ont pu générer un signal de seconde harmonique au niveau de la surface du TG, riche en collagène. La résolution optique de cette plateforme de microscopie nous a aussi permis de facilement distinguer, dans des neurones infectés par vUs7-8mCherry, le noyau cellulaire du cytoplasme via l'expression de la protéine soluble mCherry. Toutefois, la génération du signal CARS et l'excitation de la fluorescence de mCherry nécessite des longueurs d'onde différentes rendant difficile la possibilité d'alterner entre ces deux modalités. L'utilisation d'un fluorophore différent, ou l'ajout d'une troisième source de photons, pourrait faciliter l'imagerie multimodale d'échantillons infectés par nos virus recombinants.

La combinaison de l'utilisation de la plateforme de microscopie multimodale avec des virus exprimant une protéine fluorescente pourra pousser les limites imposées par les techniques de microscopie traditionnelles afin de mieux étudier les interactions hôtes-pathogènes. L'infection par

certain virus peut mener à une maladie neurologique associée à la perte de la gaine de myéline (Fazakerley *et al.*, 2003). En contexte de virus recombinant exprimant une protéine fluorescente, la combinaison de la microscopie à fluorescence avec la microscopie CARS faciliterait la détection d'un neurone infecté perdant sa gaine de myéline. Le VHS-1 est couramment utilisé comme traceur de chemins neuronaux puisque celui-ci se propage principalement par voie synaptique. Présentement, la visualisation de l'ensemble des connections interneuronales nécessite la production de coupes histologiques, suivi de l'analyse par microscopie électronique, et enfin, de la reconstruction tri-dimensionnelle du connectome par ordinateur (Takemura *et al.*, 2013). La plateforme de microscopie multiphotonique multimodale nous a permis de visualiser en trois-dimension un ensemble de neurones infectés, tout en pouvant suivre le parcours complexe de leur axone. Notre stratégie, couplée aux avancements dans le domaine de la clarification d'échantillons animaux (Tomer *et al.*, 2014), pourrait accélérer plusieurs études en neuroanatomie ainsi qu'en neurophysiologie.

La microscopie multimodale pourrait de plus améliorer nos capacités d'éliminer des tissus cancéreux lors d'opérations chirurgicales. Présentement, les tumeurs et métastases peuvent être typiquement identifiées par l'apparition de tumeurs solides, ou suite à l'observation de cellules atypiques présentes dans des biopsies. Certains types de cancer peuvent être détectés *in vivo* via un immunomarquage à fluorescence lorsque ceux-ci sont associés à la surexpression de certains marqueurs à la surface des cellules. L'identification de tissus cancéreux par immunomarquage à fluorescence a facilité les opérations chirurgicales effectuées à l'aide d'un endoscope équipé d'un système de microscopie à fluorescence. Cette stratégie n'est toutefois pas possible lorsqu'un cancer n'est pas associé à une surexpression spécifique de marqueurs cellulaires. La microscopie multimodale incluant le CARS et le SGH, si intégrée dans un endoscope, pourrait être adaptée à l'humain comme outil diagnostique. La microscopie multimodale peut être utilisée pour visualiser des changements tissulaires associés à la présence de cellules cancéreuses en utilisant que des signaux intrinsèques aux tissus. De plus, en contexte de virus oncolytiques exprimant une protéine fluorescente et se répliquant préférentiellement dans des cellules cancéreuses, il serait possible d'augmenter drastiquement les chances d'identifier des tissus cancéreux sans avoir recours à des agents de contrastes. La microscopie multimodale regroupant la fluorescence, le CARS et le SGH pourra alors augmenter significativement les chances de d'identifier les tissus cancéreux lors d'opérations chirurgicales. En fin, la microscopie multimodale pourrait aussi être utilisée comme outil diagnostique chez l'humain afin d'identifier les dommages à la colonne vertébrale, ou la perte de la gaine de myéline lors de maladies infectieuses ou autoimmunitaires, tel qu'il a déjà été fait chez la souris.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les premiers résultats de cette thèse ont décrit la construction et la caractérisation du virus vUL24X-Rescue, un virus témoin directement produit à partir d'UL24X. Les résultats obtenus avec ce virus en culture cellulaire et *in vivo* ont permis de confirmer que les phénotypes observés lors d'infection avec UL24X sont associés à la mutation insérée dans le gène *UL24*. Des infections de cellules neuronales avec nos différents virus témoins et expérimentaux ont démontré que la protéine virale UL24 n'est pas essentielle à la réplication virale dans ces types cellulaires. Enfin, nos expériences *in vivo* appuient un modèle où UL24 jouerait un rôle dans la dissémination de l'infection de la périphérie vers les tissus neuronaux. Il serait intéressant de poursuivre cette étude et d'élucider les mécanismes moléculaires impliquant UL24 dans la dissémination de l'infection.

L'absence d'UL24 mène à une réduction du nombre de neurones infectés dans les TG à 3 jpi, ainsi qu'à une réduction significative de la maladie, suggérant un rôle dans la dissémination rétrograde ainsi qu'antérograde entre la périphérie et les ganglions neuronaux. Une diminution de l'efficacité de dissémination intercellulaire pourrait être associée à une relocalisation de glycoprotéines virales impliquées dans la dissémination virale, tel gE/gI. De plus, il serait aussi possible que l'absence d'UL24 altère la composition du virion extracellulaire. Il serait intéressant de caractériser l'infection virale en présence ou en absence d'UL24 dans des cellules épithéliales polarisées, formant des jonctions serrées entre les cellules et offrant un environnement intracellulaire différents des lignées épithéliales non-polarisées tel les cellules Vero. Des infections en chambres de Campenot, impliquant des neurones primaires ainsi que des cellules épithéliales polarisées, permettront de déterminer les étapes de la dissémination virale rétrograde et antérograde qui impliquent UL24.

Nos analyses *in situ* ont démontré une réduction du nombre de neurones infectés en absence d'UL24 dans les temps précoces de l'infection primaire. Il est connu qu'en absence d'UL24, l'on observe une diminution du nombre de génomes viraux latents et de transcrits LAT dans les TG lors de la latence. Nous ignorons toutefois à combien de neurones infectés de façon latente ces chiffres correspondent. Il serait intéressant de quantifier le nombre de neurones infectés de façon latente par analyse *in situ*, et déterminer la charge virale latente par neurone par PCR quantitative. Enfin, il serait intéressant de caractériser la réactivation virale *in vivo* en présence ou en absence d'UL24. Contrairement aux essais de réactivation virale *ex vivo*, la réactivation virale *in vivo* implique une architecture de tissus complexe, ainsi que la présence d'un système immunitaire compétent. L'injection intrapéritonéale de NaB chez la souris a été rapportée

comme pouvant réactiver l'infection latente, et produire une infection récurrente en périphérie. Des études *in vivo* avec UL24X en contexte d'injection de NaB permettront d'élucider le rôle d'UL24 dans la réactivation virale et dans la récurrence des infections périphériques.

De plus, nous avons établi une stratégie d'insertion de cassette d'expression dans le génome viral qui a permis d'exprimer un transgène sans perdre le phénotype de type sauvage du virus. Cette stratégie pourrait être adaptée à d'autres cassettes d'expression. Le cadre de lecture ouvert d'*UL24* chevauche celui du gène *tk* et fait partie d'une région du génome viral dont le profil de transcription est complexe. En utilisant la stratégie d'insertion mise au point lors de notre étude, il serait intéressant d'insérer d'UL24 étiquetées avec des protéines fluorescentes afin de suivre facilement sa localisation cellulaire au cours d'une infection virale dans des cellules non-fixées.

Finalement, nous avons aussi démontré comme preuve de concept la possibilité d'étudier une infection virale dans des tissus non-traités, en combinant l'utilisation d'une plateforme de microscopie multimodale avec des virus recombinants exprimant mCherry. L'expression de mCherry nous a permis de détecter des neurones infectés par microscopie à fluorescence sans avoir recours à l'immunomarquage. Toutefois, les niveaux de fluorescence de la RFP pouvaient parfois rejoindre les niveaux d'autofluorescence des tissus d'intérêts lors d'observation en microscopie confocal et en microscopie multimodale. L'utilisation de virus recombinants exprimant la RFP tdTomato, plus brillante que mCherry, permettrait de réduire significativement le seuil de détection lors de nos expériences.

Nos résultats pourraient avoir des répercussions sur différents domaines scientifiques et biomédicaux. Nous avons établi UL24 comme un nouveau déterminant de la dissémination virale. Cette protéine, conservée à travers les *Herpesviridae*, pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour des traitements ayant pour but de limiter la dissémination de l'infection des virus de l'herpès. Enfin, nous avons démontré la force de la microscopie multimodale pour visualiser des infections virales, et identifier des pistes pour améliorer cette approche.

## RÉFÉRENCES

- Ace CI, McKee TA, Ryan JM, Cameron JM & Preston CM (1989) Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression. *J. Virol.* 63(5):2260-2269.
- Adur J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Andrade LA, Carvalho HF, Bottcher-Luiz F & Cesar CL (2014) Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. *J. Biophotonics* 7(1-2):37-48.
- Aghi M, Chou TC, Suling K, Breakefield XO & Chiocca EA (1999) Multimodal cancer treatment mediated by a replicating oncolytic virus that delivers the oxazaphosphorine/rat cytochrome P450 2B1 and ganciclovir/herpes simplex virus thymidine kinase gene therapies. *Cancer Res.* 59(16):3861-3865.
- Ahmed M & Fraser NW (2001) Herpes simplex virus type 1 2-kilobase latency-associated transcript intron associates with ribosomal proteins and splicing factors. *J. Virol.* 75(24):12070-12080.
- Ahn K, Meyer TH, Uebel S, Sempe P, Djaballah H, Yang Y, Peterson PA, Fruh K & Tampe R (1996) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J.* 15(13):3247-3255.
- Akhova O, Bainbridge M & Misra V (2005) The neuronal host cell factor-binding protein Zhangfei inhibits herpes simplex virus replication. *J. Virol.* 79(23):14708-14718.
- al-Kobaisi MF, Rixon FJ, McDougall I & Preston VG (1991) The herpes simplex virus UL33 gene product is required for the assembly of full capsids. *Virology* 180(1):380-388.
- Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR & Carbone FR (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301(5641):1925-1928.
- Andreas V (2005) Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38(5):R59.
- Antinone SE & Smith GA (2010a) Retrograde axon transport of herpes simplex virus and pseudorabies virus: a live-cell comparative analysis. *J. Virol.* 84(3):1504-1512.
- Antinone SE, Zaichick SV & Smith GA (2010b) Resolving the assembly state of herpes simplex virus during axon transport by live-cell imaging. *J. Virol.* 84(24):13019-13030.
- Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayer A, Ablashi D, Lund TC, Tolar J, De Meirleir K, Montoya JG, Komaroff AL, Ambros PF & Medveczky PG (2010) The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(12):5563-5568.
- Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y & Kawaguchi Y (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
- Asano S, Honda T, Goshima F, Nishiyama Y & Sugiura Y (2000) US3 protein kinase of herpes simplex virus protects primary afferent neurons from virus-induced apoptosis in ICR mice. *Neurosci. Lett.* 294(2):105-108.
- Assouline JG, Levin MJ, Major EO, Forghani B, Straus SE & Ostrove JM (1990) Varicella-zoster virus infection of human astrocytes, Schwann cells, and neurons. *Virology* 179(2):834-844.
- Backovic M, Jardetzky TS & Longnecker R (2007) Hydrophobic residues that form putative fusion loops of Epstein-Barr virus glycoprotein B are critical for fusion activity. *J. Virol.* 81(17):9596-9600.
- Baiker A, Fabel K, Cozzio A, Zerboni L, Sommer M, Uchida N, He D, Weissman I & Arvin AM (2004) Varicella-zoster virus infection of human neural cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(29):10792-10797.

- Baines JD, Poon AP, Rovnak J & Roizman B (1994) The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J. Virol.* 68(12):8118-8124.
- Baines JD & Roizman B (1992) The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *J. Virol.* 66(8):5168-5174.
- Balan P, Davis-Poynter N, Bell S, Atkinson H, Browne H & Minson T (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. *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 6):1245-1258.
- Balliet JW, Kushnir AS & Schaffer PA (2007) Construction and characterization of a herpes simplex virus type I recombinant expressing green fluorescent protein: acute phase replication and reactivation in mice. *Virology* 361(2):372-383.
- Baringer JR & Pisani P (1994) Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann. Neurol.* 36(6):823-829.
- Baringer JR & Swoveland P (1973) Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N. Engl. J. Med.* 288(13):648-650.
- Barr DP, Belz GT, Reading PC, Wojtasiak M, Whitney PG, Heath WR, Carbone FR & Brooks AG (2007) A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection. *Eur. J. Immunol.* 37(5):1334-1342.
- Bastian TW & Rice SA (2009) Identification of sequences in herpes simplex virus type 1 ICP22 that influence RNA polymerase II modification and viral late gene expression. *J. Virol.* 83(1):128-139.
- Bateman AR, Harrington KJ, Kottke T, Ahmed A, Melcher AA, Gough MJ, Linardakis E, Riddle D, Dietz A, Lohse CM, Strome S, Peterson T, Simari R & Vile RG (2002) Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Res.* 62(22):6566-6578.
- Ben Abdeljelil N, Rochette PA & Pearson A (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.
- Benetti L & Roizman B (2004) Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(25):9411-9416.
- Bernstein DI & Stanberry LR (1986) Zosteriform spread of herpes simplex virus type 2 genital infection in the guinea-pig. *J. Gen. Virol.* 67 ( Pt 9):1851-1857.
- Bertke AS, Swanson SM, Chen J, Imai Y, Kinchington PR & Margolis TP (2011) A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro. *J. Virol.* 85(13):6669-6677.
- Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H & Pearson A (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J. Virol.* 84(1):109-118.
- Bertrand L & Pearson A (2008a) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 5):1142-1151.
- Bertrand L & Pearson A (2008b) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J. Gen. Virol.* 89 (5):1142 - 1151.
- Birk JW, Tadros M, Moezardalan K, Nadyarnykh O, Forouhar F, Anderson J & Campagnola P (2014) Second harmonic generation imaging distinguishes both high-grade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 59(7):1529-1534.
- Bjerke SL & Roller RJ (2006) Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* 347(2):261-276.
- Blakeney S, Kowalski J, Tummolo D, DeStefano J, Cooper D, Guo M, Gangolli S, Long D, Zamb T, Natuk RJ & Visalli RJ (2005) Herpes Simplex Virus Type 2 UL24 Gene Is a Virulence Determinant in Murine and Guinea Pig Disease Models. *J. Virol.* 79(16):10498-10506.

- Blyth WA, Harbour DA & Hill TJ (1980) Effect of immunosuppression on recurrent herpes simplex in mice. *Infect. Immun.* 29(3):902-907.
- Blyth WA, Harbour DA & Hill TJ (1984) Pathogenesis of zosteriform spread of herpes simplex virus in the mouse. *J. Gen. Virol.* 65 ( Pt 9):1477-1486.
- Boehmer PE & Lehman IR (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66:347-384.
- Bolovan CA, Sawtell NM & Thompson RL (1994) ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *J. Virol.* 68(1):48-55.
- Boutell C & Everett RD (2003a) The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53. *J. Biol. Chem.* 278(38):36596-36602.
- Boutell C, Orr A & Everett RD (2003b) PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J. Virol.* 77(16):8686-8694.
- Brackmann C, Dahlberg JO, Vrana NE, Lally C, Gatenholm P & Enejder A (2012) Non-linear microscopy of smooth muscle cells in artificial extracellular matrices made of cellulose. *J. Biophotonics* 5(5-6):404-414.
- Brandt CR, Kintner RL, Pumfery AM, Visalli RJ & Grau DR (1991) The herpes simplex virus ribonucleotide reductase is required for ocular virulence. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 9):2043-2049.
- Brittle EE, Reynolds AE & Enquist LW (2004) Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice. *J. Virol.* 78(23):12951-12963.
- Brown CP, Houle MA, Chen M, Price AJ, Legare F & Gill HS (2012) Damage initiation and progression in the cartilage surface probed by nonlinear optical microscopy. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 5(1):62-70.
- Brown J (2004) Effect of gene location on the evolutionary rate of amino acid substitutions in herpes simplex virus proteins. *Virology* 330(1):209-220.
- Brown JC (2007) High G+C Content of Herpes Simplex Virus DNA: Proposed Role in Protection Against Retrotransposon Insertion. *Open Biochem J* 1:33-42.
- Bruckner RC, Dutch RE, Zemelman BV, Mocarski ES & Lehman IR (1992) Recombination in vitro between herpes simplex virus type 1 a sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(22):10950-10954.
- Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW & Courtney RJ (2007) Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology* 361(2):316-324.
- Bujnicki JM & Rychlewski L (2001) The herpesvirus alkaline exonuclease belongs to the restriction endonuclease PD-(D/E)XK superfamily: insight from molecular modeling and phylogenetic analysis. *Virus Genes* 22(2):219-230.
- Burgos JS, Guzman-Sanchez F, Sastre I, Fillat C & Valdivieso F (2006a) Non-invasive bioluminescence imaging for monitoring herpes simplex virus type 1 hematogenous infection. *Microbes Infect.* 8(5):1330-1338.
- Burgos JS, Serrano-Saiz E, Sastre I & Valdivieso F (2006b) ICP47 mediates viral neuroinvasiveness by induction of TAP protein following intravenous inoculation of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Neurovirol.* 12(6):420-427.
- Cameron JM, McDougall I, Marsden HS, Preston VG, Ryan DM & Subak-Sharpe JH (1988) Ribonucleotide reductase encoded by herpes simplex virus is a determinant of the pathogenicity of the virus in mice and a valid antiviral target. *J. Gen. Virol.* 69 ( Pt 10):2607-2612.
- Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L & Lopez M (2000) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.* 10(5):305-319.
- Campanot RB (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(10):4516-4519.
- Caorsi V, Toepfer C, Sikkil MB, Lyon AR, MacLeod K & Ferenczi MA (2013) Non-linear optical microscopy sheds light on cardiovascular disease. *PLoS ONE* 8(2):e56136.

- Card JP, Rinaman L, Lynn RB, Lee BH, Meade RP, Miselis RR & Enquist LW (1993) Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J. Neurosci.* 13(6):2515-2539.
- Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Moore RY & Enquist LW (1991) Two alpha-herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 6(6):957-969.
- Cardone G, Newcomb WW, Cheng N, Wingfield PT, Trus BL, Brown JC & Steven AC (2012) The UL36 tegument protein of herpes simplex virus 1 has a composite binding site at the capsid vertices. *J. Virol.* 86(8):4058-4064.
- Carr DJ, Harle P & Gebhardt BM (2001) The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226(5):353-366.
- Cartier A, Komai T & Masucci MG (2003) The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp. Cell Res.* 291(1):242-250.
- Cartier A & Masucci MG (2004) Differential regulation of MHC class-I-restricted and unrestricted cytotoxicity by the Us3 protein kinase of herpes simplex virus-1. *Scand. J. Immunol.* 60(6):592-599.
- Cavalcoli JD, Baghian A, Homa FL & Kousoulas KG (1993) Resolution of genotypic and phenotypic properties of herpes simplex virus type 1 temperature-sensitive mutant (KOS) tsZ47: evidence for allelic complementation in the UL28 gene. *Virology* 197(1):23-34.
- Chabaud S, Sasseville AM, Elahi SM, Caron A, Dufour F, Massie B & Langelier Y (2007) The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 2):384-394.
- Chang YE, Poon AP & Roizman B (1996) Properties of the protein encoded by the UL32 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 70(6):3938-3946.
- Chapman TL, You I, Joseph IM, Bjorkman PJ, Morrison SL & Raghavan M (1999) Characterization of the interaction between the herpes simplex virus type I Fc receptor and immunoglobulin G. *J. Biol. Chem.* 274(11):6911-6919.
- Chen SH, Pearson A & Coen DM (2004) Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. *J. Virol.* 78(1):520-523.
- Chen X, Li J, Mata M, Goss J, Wolfe D, Glorioso JC & Fink DJ (2000) Herpes simplex virus type 1 ICP0 protein does not accumulate in the nucleus of primary neurons in culture. *J. Virol.* 74(21):10132-10141.
- Cheng JX, Volkmer A, Book LD & Xie XS (2001) An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. *J. Phys. Chem. B* 105(7):1277-1280.
- Cheng JX, Volkmer A & Xie XS (2002) Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 19(6):1363-1375.
- Clement C, Popp MP, Bloom DC, Schultz G, Liu L, Neumann DM, Bhattacharjee PS & Hill JM (2008) Microarray analysis of host gene expression for comparison between naive and HSV-1 latent rabbit trigeminal ganglia. *Mol. Vis.* 14:1209-1221.
- Cockrell SK, Sanchez ME, Erazo A & Homa FL (2009) Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *J. Virol.* 83(1):47-57.
- Coen DM, Fleming HE, Jr., Leslie LK & Retondo MJ (1985) Sensitivity of arabinosyladenine-resistant mutants of herpes simplex virus to other antiviral drugs and mapping of drug hypersensitivity mutations to the DNA polymerase locus. *J. Virol.* 53(2):477-488.

- Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG, Leib DA, Bogard CL, Schaffer PA, Tyler KL & Knipe DM (1989) Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(12):4736-4740.
- Cohen BE (2010) Biological imaging: Beyond fluorescence. *Nature* 467(7314):407-408.
- Cohen GH (1972) Ribonucleotide reductase activity of synchronized KB cells infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 9(3):408-418.
- Colgin MA, Smith RL & Wilcox CL (2001) Inducible cyclic AMP early repressor produces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in neurons in vitro. *J. Virol.* 75(6):2912-2920.
- Collins WJ & Johnson DC (2003) Herpes simplex virus gE/gI expressed in epithelial cells interferes with cell-to-cell spread. *J. Virol.* 77(4):2686-2695.
- Confer DL, Vercellotti GM, Kotasek D, Goodman JL, Ochoa A & Jacob HS (1990) Herpes simplex virus-infected cells disarm killer lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(9):3609-3613.
- Conley AJ, Knipe DM, Jones PC & Roizman B (1981) Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J. Virol.* 37(1):191-206.
- Cook ML & Stevens JG (1973) Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect. Immun.* 7(2):272-288.
- Cook WJ & Coen DM (1996) Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1 UL24 mRNA Expression via Differential Polyadenylation. *Virology* 218(1):204-213.
- Costa H, Nascimento R, Sinclair J & Parkhouse RM (2013) Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response. *PLoS Pathog.* 9(9):e1003609.
- Craigien JL, Yong KL, Jordan NJ, MacCormac LP, Westwick J, Akbar AN & Grundy JE (1997) Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 92(1):138-145.
- Da Costa X, Kramer MF, Zhu J, Brockman MA & Knipe DM (2000) Construction, phenotypic analysis, and immunogenicity of a UL5/UL29 double deletion mutant of herpes simplex virus 2. *J. Virol.* 74(17):7963-7971.
- Danaher RJ, Jacob RJ & Miller CS (1999) Establishment of a quiescent herpes simplex virus type 1 infection in neurally-differentiated PC12 cells. *J. Neurovirol.* 5(3):258-267.
- Darby G, Field HJ & Salisbury SA (1981) Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir-resistance. *Nature* 289(5793):81-83.
- Dasgupta A & Wilson DW (2001) Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 7):1561-1567.
- Davar G, Kramer MF, Garber D, Roca AL, Andersen JK, Bebrin W, Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Knipe DM, Breakefield XO & et al. (1994) Comparative efficacy of expression of genes delivered to mouse sensory neurons with herpes virus vectors. *J. Comp. Neurol.* 339(1):3-11.
- David AT, Baghian A, Foster TP, Chouljenko VN & Kousoulas KG (2008) The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein K(gK) is essential for viral corneal spread and neuroinvasiveness. *Curr. Eye Res.* 33(5):455-467.
- David AT, Saied A, Charles A, Subramanian R, Chouljenko VN & Kousoulas KG (2012) A herpes simplex virus 1 (McKrae) mutant lacking the glycoprotein K gene is unable to infect via neuronal axons and egress from neuronal cell bodies. *MBio* 3(4):e00144-00112.
- Davison AJ (1993) Herpesvirus Genes. *Rev. Med. Virol.* 3(4):237-244.
- Davison AJ (2002) Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86(1-2):69-88.
- Davison AJ (2010) Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 143(1):52-69.
- de Oliveira AP, Glauser DL, Laimbacher AS, Strasser R, Schraner EM, Wild P, Ziegler U, Breakefield XO, Ackermann M & Fraefel C (2008) Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics. *J. Virol.* 82(10):4974-4990.

- Decman V, Kinchington PR, Harvey SA & Hendricks RL (2005) Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J. Virol.* 79(16):10339-10347.
- DeLuca NA, Courtney MA & Schaffer PA (1984) Temperature-sensitive mutants in herpes simplex virus type 1 ICP4 permissive for early gene expression. *J. Virol.* 52(3):767-776.
- Denk W, Strickler JH & Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248(4951):73-76.
- Desai P & Person S (1998) Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J. Virol.* 72(9):7563-7568.
- Devireddy LR & Jones CJ (2000) Olf-1, a neuron-specific transcription factor, can activate the herpes simplex virus type 1-infected cell protein 0 promoter. *J. Biol. Chem.* 275(1):77-81.
- Dohner K, Radtke K, Schmidt S & Sodeik B (2006) Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: Efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. *J. Virol.* 80(16):8211-8224.
- Dombek DA, Kasischke KA, Vishwasrao HD, Ingelsson M, Hyman BT & Webb WW (2003) Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(12):7081-7086.
- Du T, Zhou G & Roizman B (2011) HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(46):18820-18824.
- Du T, Zhou G & Roizman B (2012) Induction of apoptosis accelerates reactivation of latent HSV-1 in ganglionic organ cultures and replication in cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(36):14616-14621.
- Dufour F, Bertrand L, Pearson A, Grandvaux N & Langelier Y (2011a) The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus 1 and 2 protect cells against poly(I . C)-induced apoptosis. *J. Virol.* 85(17):8689-8701.
- Dufour F, Sasseville AM, Chabaud S, Massie B, Siegel RM & Langelier Y (2011b) The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNFalpha- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* 16(3):256-271.
- Dutch RE, Bruckner RC, Mocarski ES & Lehman IR (1992) Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral alpha sequences. *J. Virol.* 66(1):277-285.
- Duus KM, Hatfield C & Grose C (1995) Cell surface expression and fusion by the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex: analysis by laser scanning confocal microscopy. *Virology* 210(2):429-440.
- Dyson H, Shimeld C, Hill TJ, Blyth WA & Easty DL (1987) Spread of herpes simplex virus within ocular nerves of the mouse: demonstration of viral antigen in whole mounts of eye tissue. *J. Gen. Virol.* 68 ( Pt 12):2989-2995.
- Efstathiou S & Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res.* 111(2):108-119.
- Eide L & McMurray CT (2005) Culture of adult mouse neurons. *Biotechniques* 38(1):99-104.
- Elboim M, Grodzovski I, Djian E, Wolf DG & Mandelboim O (2013) HSV-2 specifically down regulates HLA-C expression to render HSV-2-infected DCs susceptible to NK cell killing. *PLoS Pathog.* 9(3):e1003226.
- Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L & Schaeffer HJ (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(12):5716-5720.
- Ellermann-Eriksen S (2005) Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol. J.* 2:59.

- Enquist LW, Tomishima MJ, Gross S & Smith GA (2002) Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Vet. Microbiol.* 86(1-2):5-16.
- Escalante R & Loomis WF (1995) Whole-mount in situ hybridization of cell-type-specific mRNAs in Dictyostelium. *Dev. Biol.* 171(1):262-266.
- Evans CL, Potma EO, Puoris'haag M, Cote D, Lin CP & Xie XS (2005) Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(46):16807-16812.
- Evans CL, Xu X, Kesari S, Xie XS, Wong ST & Young GS (2007) Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy. *Opt. Express* 15(19):12076-12087.
- Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T & Orr A (2006) PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J. Virol.* 80(16):7995-8005.
- Everett RD & Zafiroopoulos A (2004) Visualization by live-cell microscopy of disruption of ND10 during herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 78(20):11411-11415.
- Farnsworth A, Goldsmith K & Johnson DC (2003) Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD and gE/gI Serve Essential but Redundant Functions during Acquisition of the Virion Envelope in the Cytoplasm. *J. Virol.* 77(15):8481-8494.
- Farnsworth A & Johnson DC (2006a) 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. *J. Virol.* 80(7):3167-3179.
- Farnsworth A & Johnson DC (2006b) 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. *J. Virol.* 80(7):3167-3179.
- Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R & Johnson DC (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(24):10187-10192.
- Fatahzaideh M & Schwartz RA (2007) Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 57(5):737-763; 764-736.
- Fazakerley JK & Walker R (2003) Virus demyelination. *J. Neurovirol.* 9(2):148-164.
- Feierbach B, Bisher M, Goodhouse J & Enquist LW (2007) In vitro analysis of transneuronal spread of an alphaherpesvirus infection in peripheral nervous system neurons. *J. Virol.* 81(13):6846-6857.
- Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P & Margolis TP (2002) Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(2):978-983.
- Ferenczy MW, Ranayhossaini DJ & Deluca NA (2011) Activities of ICP0 involved in the reversal of silencing of quiescent herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 85(10):4993-5002.
- Field HJ & Wildy P (1978) The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice. *J. Hyg. (Lond.)* 81(2):267-277.
- Fields BN, Knipe DM & Howley PM (2007) *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5th
- Flamand L, Komaroff AL, Arbuckle JH, Medveczky PG & Ablashi DV (2010) Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. *J. Med. Virol.* 82(9):1560-1568.
- Folick A, Min W & Wang MC (2011) Label-free imaging of lipid dynamics using Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21(5):585-590.

- Foster TP & Kousoulas KG (1999) Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J. Virol.* 73(10):8457-8468.
- Foster TP, Rybachuk GV & Kousoulas KG (1998) Expression of the enhanced green fluorescent protein by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an in vitro or in vivo marker for virus entry and replication. *J. Virol. Methods* 75(2):151-160.
- Fraser KA & Rice SA (2007) Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 triggers loss of serine 2-phosphorylated RNA polymerase II. *J. Virol.* 81(10):5091-5101.
- Fu Y, Wang H, Huff TB, Shi R & Cheng JX (2007) Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of myelin degradation reveals a calcium-dependent pathway in lyso-PtdCho-induced demyelination. *J. Neurosci. Res.* 85(13):2870-2881.
- Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M & Mettenleiter TC (2002a) The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J. Virol.* 76(13):6729-6742.
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, Enquist LW & Mettenleiter TC (2002b) Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J. Virol.* 76(16):8208-8217.
- Fukuhara H, Ino Y, Kuroda T, Martuza RL & Todo T (2005) Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res.* 65(23):10663-10668.
- Fuller AO & Lee WC (1992) Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.* 66(8):5002-5012.
- Fuller AO, Santos RE & Spear PG (1989) Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J. Virol.* 63(8):3435-3443.
- Fuller AO & Spear PG (1987) Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84(15):5454-5458.
- Geenen K, Favoreel HW, Olsen L, Enquist LW & Nauwynck HJ (2005) The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* 331(1):144-150.
- Giel-Moloney M, Krause DS, Chen G, Van Etten RA & Leiter AB (2007) Ubiquitous and uniform in vivo fluorescence in ROSA26-EGFP BAC transgenic mice. *Genesis* 45(2):83-89.
- Gill N, Davies EJ & Ashkar AA (2008) The role of toll-like receptor ligands/agonists in protection against genital HSV-2 infection. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59(1):35-43.
- Gobeil PA & Leib DA (2012) Herpes simplex virus gamma34.5 interferes with autophagosome maturation and antigen presentation in dendritic cells. *MBio* 3(5):e00267-00212.
- Goldin AL, Sandri-Goldin RM, Levine M & Glorioso JC (1981) Cloning of herpes simplex virus type 1 sequences representing the whole genome. *J. Virol.* 38(1):50-58.
- Goldstein DJ & Weller SK (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 DJ & Weller SK (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. *J. Virol.* 62(1):196-205.
- Goldstein JN & Weller SK (1998) In vitro processing of herpes simplex virus type 1 DNA replication intermediates by the viral alkaline nuclease, UL12. *J. Virol.* 72(11):8772-8781.
- Golembewski EK, Wales SQ, Aurelian L & Yarowsky PJ (2007) The HSV-2 protein ICP10PK prevents neuronal apoptosis and loss of function in an in vivo model of neurodegeneration associated with glutamate excitotoxicity. *Exp. Neurol.* 203(2):381-393.

- Griffiths A & Coen DM (2003) High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J. Virol.* 77(3):2282-2286.
- Grubor-Bauk B, Arthur JL & Mayrhofer G (2008) Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J. Virol.* 82(22):11073-11083.
- Gusachenko I, Tran V, Goulam Houssen Y, Allain JM & Schanne-Klein MC (2012) Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching. *Biophys. J.* 102(9):2220-2229.
- Haanes EJ, Chen CC & Lowery DE (1997) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a portion of the bovine herpesvirus genome encoding genes homologous to HSV-1 UL25, UL26 and UL26.5. *Virus Res.* 48(1):19-26.
- Hafezi W, Lorentzen EU, Eing BR, Muller M, King NJ, Klupp B, Mettenleiter TC & Kuhn JE (2012) Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002679.
- Halford WP, Gebhardt BM & Carr DJ (1996) Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J. Virol.* 70(8):5051-5060.
- Hambleton S & Gershon AA (2005) Preventing varicella-zoster disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(1):70-80.
- Han ZQ, Assenberg M, Liu BL, Wang YB, Simpson G, Thomas S & Coffin RS (2007) Development of a second-generation oncolytic Herpes simplex virus expressing TNFalpha for cancer therapy. *J. Gene Med.* 9(2):99-106.
- Hann LE, Cook WJ, Uprichard SL, Knipe DM & Coen DM (1998) The Role of Herpes Simplex Virus ICP27 in the Regulation of UL24 Gene Expression by Differential Polyadenylation. *J. Virol.* 72(10):7709-7714.
- Hannah BP, Cairns TM, Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Eisenberg RJ & Cohen GH (2009) Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J. Virol.* 83(13):6825-6836.
- Hannah BP, Heldwein EE, Bender FC, Cohen GH & Eisenberg RJ (2007) Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Virol.* 81(9):4858-4865.
- Hardy WR & Sandri-Goldin RM (1994) Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J. Virol.* 68(12):7790-7799.
- Harland J, Papanastassiou V & Brown SM (2002) HSV1716 persistence in primary human glioma cells in vitro. *Gene Ther.* 9(17):1194-1198.
- Haroche S (2008) Essay: Fifty years of atomic, molecular and optical physics in Physical Review Letters. *Phys. Rev. Lett.* 101(16):160001.
- Haugo AC, Szpara ML, Parsons L, Enquist LW & Roller RJ (2011) Herpes Simplex Virus 1 pUL34 Plays a Critical Role in Cell-to-Cell Spread of Virus in Addition to Its Role in Virus Replication. *J. Virol.* 85(14):7203-7215.
- Hay KA, Gaydos A & Tenser RB (1995) The role of herpes simplex thymidine kinase expression in neurovirulence and latency in newborn vs. adult mice. *J. Neuroimmunol.* 61(1):41-52.
- Hayward GS, Jacob RJ, Wadsworth SC & Roizman B (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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(11):4243-4247.
- He B, Gross M & Roizman B (1997) The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(3):843-848.
- He J, Bazan NG & Bazan HE (2010) Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91(4):513-523.

- Heinicke LA, Wong CJ, Lary J, Nallagatla SR, Diegelman-Parente A, Zheng X, Cole JL & Bevilacqua PC (2009) RNA dimerization promotes PKR dimerization and activation. *J. Mol. Biol.* 390(2):319-338.
- Hellerer T, Axang C, Brackmann C, Hillertz P, Pilon M & Enejder A (2007) Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(37):14658-14663.
- Helmchen F & Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2(12):932-940.
- Heming JD, Huffman JB, Jones LM & Homa FL (2014) Isolation and characterization of the herpes simplex virus 1 terminase complex. *J. Virol.* 88(1):225-236.
- Hill DP & Robertson KA (1998) Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2(3):183-190.
- Hill JM, Garza HH, Jr., Helmy MF, Cook SD, Osborne PA, Johnson EM, Jr., Thompson HW, Green LC, O'Callaghan RJ & Gebhardt BM (1997) Nerve growth factor antibody stimulates reactivation of ocular herpes simplex virus type 1 in latently infected rabbits. *J. Neurovirol.* 3(3):206-211.
- Hill TJ, Blyth WA, Harbour DA, Berrie EL & Tullo AB (1983) Latency and other consequences of infection of the nervous system with herpes simplex virus. *Prog. Brain Res.* 59:173-184.
- Ho DY & Mocarski ES (1989) Herpes simplex virus latent RNA (LAT) is not required for latent infection in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(19):7596-7600.
- Hocevar BA, Burns DJ & Fields AP (1993) Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *J. Biol. Chem.* 268(10):7545-7552.
- Holland LE, Sandri-Goldin RM, Goldin AL, Glorioso JC & Levine M (1984) Transcriptional and genetic analyses of the herpes simplex virus type 1 genome: coordinates 0.29 to 0.45. *J. Virol.* 49(3):947-959.
- Honess RW, Buchan A, Halliburton IW & Watson DH (1980) Recombination and linkage between structural and regulatory genes of herpes simplex virus type 1: study of the functional organization of the genome. *J. Virol.* 34(3):716-742.
- Honess RW & Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14(1):8-19.
- Hong-Yan Z, Murata T, Goshima F, Takakuwa H, Koshizuka T, Yamauchi Y & Nishiyama Y (2001) Identification and characterization of the UL24 gene product of herpes simplex virus type 2. *Virus Genes* 22(3):321-327.
- Hook LM, Lubinski JM, Jiang M, Pangburn MK & Friedman HM (2006) Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin M antibody. *J. Virol.* 80(8):4038-4046.
- Hoppe S, Schelhaas M, Jaeger V, Liebig T, Petermann P & Knebel-Morsdorf D (2006) Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells. *J. Gen. Virol.* 87(Pt 12):3483-3494.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E & Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
- Hoshino Y, Dalai SK, Wang K, Pesnicak L, Lau TY, Knipe DM, Cohen JI & Straus SE (2005) Comparative efficacy and immunogenicity of replication-defective, recombinant glycoprotein, and DNA vaccines for herpes simplex virus 2 infections in mice and guinea pigs. *J. Virol.* 79(1):410-418.
- Hoshino Y, Pesnicak L, Dowdell KC, Burbello PD, Knipe DM, Straus SE & Cohen JI (2009) Protection from herpes simplex virus (HSV)-2 infection with replication-defective HSV-2 or glycoprotein D2 vaccines in HSV-1-seropositive and HSV-1-seronegative guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 200(7):1088-1095.

- Hoshino Y, Pesnicak L, Dowdell KC, Lacayo J, Dudek T, Knipe DM, Straus SE & Cohen JI (2008) Comparison of immunogenicity and protective efficacy of genital herpes vaccine candidates herpes simplex virus 2 dl5-29 and dl5-29-41L in mice and guinea pigs. *Vaccine* 26(32):4034-4040.
- Hsia SC, Bedadala GR & Balish MD (2011) Effects of thyroid hormone on HSV-1 gene regulation: implications in the control of viral latency and reactivation. *Cell Biosci* 1(1):24.
- Hsia SC, Pinnoji RC, Bedadala GR, Hill JM & Palem JR (2010) Regulation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression by thyroid hormone receptor in cultured neuronal cells. *J. Neurovirol.* 16(1):13-24.
- Huang J, Lazear HM & Friedman HM (2011) Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus. *Virology* 409(1):12-16.
- Huff JL & Barry PA (2003a) B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. *Emerg. Infect. Dis.* 9(2):246-250.
- Huff JL, Eberle R, Capitanio J, Zhou SS & Barry PA (2003b) Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 1):83-92.
- Hung SL, Peng C, Kostavasili I, Friedman HM, Lambris JD, Eisenberg RJ & Cohen GH (1994) The interaction of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway. *Virology* 203(2):299-312.
- Hunsperger EA & Wilcox CL (2003) Capsaicin-induced reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in sensory neurons in culture. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 5):1071-1078.
- Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H & Todo T (2006) Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. *Clin. Cancer Res.* 12(2):643-652.
- Ito H, Sommer MH, Zerboni L, Baiker A, Sato B, Liang R, Hay J, Ruyechan W & Arvin AM (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. *J. Virol.* 79(8):4819-4827.
- Jacobson JG, Chen S-H, Cook WJ, Kramer MF & Coen DM (1998) Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* 242(1):161-169.
- Jacobson JG, Leib DA, Goldstein DJ, Bogard CL, Schaffer PA, Weller SK & Coen DM (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 JG, Martin SL & Coen DM (1989b) A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J. Virol.* 63(4):1839-1843.
- Jacobson JG, Ruffner KL, Kosz-Vnenchak M, Hwang CB, Wobbe KK, Knipe DM & Coen DM (1993) Herpes simplex virus thymidine kinase and specific stages of latency in murine trigeminal ganglia. *J. Virol.* 67(11):6903-6908.
- Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE & Talbot PJ (2006) Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* 349(2):335-346.
- Jamme F, Kascakova S, Villette S, Allouche F, Pallu S, Rouam V & Refregiers M (2013) Deep UV autofluorescence microscopy for cell biology and tissue histology. *Biol. Cell.* 105(7):277-288.
- Jaworski J, Mioduszezewska B, Sanchez-Capelo A, Figiel I, Habas A, Gozdz A, Proszynski T, Hetman M, Mallet J & Kaczmarek L (2003) Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro. *J. Neurosci.* 23(11):4519-4526.
- Jayachandra S, Baghian A & Kousoulas KG (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. *J. Virol.* 71(7):5012-5024.
- Jia R, Cheng A, Wang M, Zhu D, Ge H, Xin H, Liu F, Luo Q, Guo Y, Qi X, Yin Z & Chen X (2009) Cloning, expression, purification and characterization of UL24 partial protein of duck enteritis virus. *Intervirology* 52(6):326-334.
- Johnson DC, Webb M, Wisner TW & Brunetti C (2001) Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J. Virol.* 75(2):821-833.
- Johnson DC, Wisner TW & Wright CC (2011) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *J. Virol.* 85(10):4910-4926.
- Jones CA, Taylor TJ & Knipe DM (2000) Biological properties of herpes simplex virus 2 replication-defective mutant strains in a murine nasal infection model. *Virology* 278(1):137-150.
- Jones NG, Kemenes I, Kemenes G & Benjamin PR (2003) A persistent cellular change in a single modulatory neuron contributes to associative long-term memory. *Curr. Biol.* 13(12):1064-1069.
- Jurak I, Hackenberg M, Kim JY, Pesola JM, Everett RD, Preston CM, Wilson AC & Coen DM (2014) Expression of herpes simplex virus 1 microRNAs in cell culture models of quiescent and latent infection. *J. Virol.* 88(4):2337-2339.
- Kalema N, Boon SD, Cattamanchi A, Davis JL, Andama A, Katagira W, Everett C, Walter N, Byanyima P, Kaswabuli S, Worodria W & Huang L (2012) Oral antimicrobial rinse to reduce mycobacterial culture contamination among tuberculosis suspects in Uganda: a prospective study. *PLoS ONE* 7(7):e38888.
- Kang W, Mukerjee R, Gartner JJ, Hatzigeorgiou AG, Sandri-Goldin RM & Fraser NW (2006) Characterization of a spliced exon product of herpes simplex type-1 latency-associated transcript in productively infected cells. *Virology* 356(1-2):106-114.
- Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T, Tsujimura K, Madbouly H, Yamaguchi T, Ohya K & Fukushi H (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400(2):259-270.
- Kastrukoff LF, Lau AS & Thomas EE (2012) The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae* 3:4.
- Keikhosravi A, Bredfeldt JS, Sagar AK & Eliceiri KW (2014) Second-harmonic generation imaging of cancer. *Methods Cell Biol.* 123:531-546.
- Kibler PK, Duncan J, Keith BD, Hupel T & Smiley JR (1991) Regulation of herpes simplex virus true late gene expression: sequences downstream from the US11 TATA box inhibit expression from an unreplicated template. *J. Virol.* 65(12):6749-6760.
- Kim M, Osborne NR, Zeng W, Donaghy H, McKinnon K, Jackson DC & Cunningham AL (2012) Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 188(9):4158-4170.
- Kimberlin D (2004a) Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 11 Suppl 2:65A-76A.
- Kimberlin DW (2004b) Neonatal herpes simplex infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):1-13.
- Kimberlin DW (2004c) Neonatal HSV infections: the global picture. *Herpes* 11(2):31-32.
- Kitai A (2008) *Luminescent materials and applications*. John Wiley, Hoboken, NJ  
<http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://books.scholarsportal.info/viewdoc.html?id=/ebooks/ebooks2/wiley/2011-12-13/3/9780470985687>  
<http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470985687> (Consulté e Date Accessed)
- Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR & Hendricks RL (2008) Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322(5899):268-271.

- Knizewski L, Kinch L, Grishin NV, Rychlewski L & Ginalski K (2006) Human Herpesvirus 1 UL24 Gene Encodes a Potential PD-(D/E)XK Endonuclease. *J. Virol.* 80(5):2575-2577.
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ & Hendricks RL (1999) Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J. Immunol.* 162(5):2895-2905.
- Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, Maurer UE, Grunewald K, Miller RJ, Osten P & Spear PG (2009) Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(42):17916-17920.
- Kramer MF & Coen DM (1995) Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 69(3):1389-1399.
- Kramer MF, Cook WJ, Roth FP, Zhu J, Holman H, Knipe DM & Coen DM (2003) Latent herpes simplex virus infection of sensory neurons alters neuronal gene expression. *J. Virol.* 77(17):9533-9541.
- Krastev D, Paloff A, Hinova D, Apostolov A, Ovcharoff W & Krastev N (2008) [Ganglion trigeminale]. *Khirurgiia (Sofia)* (3):55-58.
- Kratchmarov R, Taylor MP & Enquist LW (2012) Making the case: married versus separate models of alphaherpes virus anterograde transport in axons. *Rev. Med. Virol.* 22(6):378-391.
- Kratchmarov R, Taylor MP & Enquist LW (2013) Role of Us9 phosphorylation in axonal sorting and anterograde transport of pseudorabies virus. *PLoS ONE* 8(3):e58776.
- Krause PR & Klinman DM (1995) Efficacy, immunogenicity, safety, and use of live attenuated chickenpox vaccine. *J. Pediatr.* 127(4):518-525.
- Krause PR & Klinman DM (2000) Varicella vaccination: evidence for frequent reactivation of the vaccine strain in healthy children. *Nat. Med.* 6(4):451-454.
- Krautwald M, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W & Mettenleiter TC (2008) Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 6):1346-1351.
- Kristie TM, Vogel JL & Sears AE (1999) Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(4):1229-1233.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S & Colonna M (2004) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103(4):1433-1437.
- Kumel G, Kaerner HC, Levine M, Schroder CH & Glorioso JC (1985) Passive immune protection by herpes simplex virus-specific monoclonal antibodies and monoclonal antibody-resistant mutants altered in pathogenicity. *J. Virol.* 56(3):930-937.
- Kummer M, Turza NM, Muhl-Zurbes P, Lechmann M, Boutell C, Coffin RS, Everett RD, Steinkasserer A & Prectel AT (2007) Herpes simplex virus type 1 induces CD83 degradation in mature dendritic cells with immediate-early kinetics via the cellular proteasome. *J. Virol.* 81(12):6326-6338.
- Kwong AD, Kruper JA & Frenkel N (1988) Herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* 62(3):912-921.
- Lacaille VG & Androlewicz MJ (1998) Herpes simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen processing (TAP) heterodimer. *J. Biol. Chem.* 273(28):17386-17390.
- Lachmann RH & Efstathiou S (1997) Utilization of the herpes simplex virus type 1 latency-associated regulatory region to drive stable reporter gene expression in the nervous system. *J. Virol.* 71(4):3197-3207.
- Lamberti C & Weller SK (1996) The herpes simplex virus type 1 UL6 protein is essential for cleavage and packaging but not for genomic inversion. *Virology* 226(2):403-407.
- Langelier Y, Bergeron S, Chabaud S, Lippens J, Guilbault C, Sasseville AM, Denis S, Mosser DD & Massie B (2002) The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 11):2779-2789.

- Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R & Glorioso JC (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J. Virol.* 72(7):6119-6130.
- Lazarov NE (2002) Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog. Neurobiol.* 66(1):19-59.
- Le TT, Huff TB & Cheng JX (2009) Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* 9:42.
- Le TT, Langohr IM, Locker MJ, Sturek M & Cheng JX (2007a) Label-free molecular imaging of atherosclerotic lesions using multimodal nonlinear optical microscopy. *J. Biomed. Opt.* 12(5):054007.
- Le TT, Rehner CW, Huff TB, Nichols MB, Camarillo IG & Cheng JX (2007b) Nonlinear optical imaging to evaluate the impact of obesity on mammary gland and tumor stroma. *Mol. Imaging* 6(3):205-211.
- Le TT, Yue S & Cheng JX (2010) Shedding new light on lipid biology with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Lipid Res.* 51(11):3091-3102.
- Leach NR & Roller RJ (2010) Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology* 406(1):127-137.
- Lee HC, Chouljenko VN, Chouljenko DV, Boudreaux MJ & Kousoulas KG (2009) The herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD) cytoplasmic terminus and full-length gE are not essential and do not function in a redundant manner for cytoplasmic virion envelopment and egress. *J. Virol.* 83(12):6115-6124.
- Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG & Mettenleiter TC (2009) Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83(2):896-907.
- Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J & Ferguson TA (2009) Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. *J. Virol.* 83(23):12164-12171.
- Leib DA, Coen DM, Bogard CL, Hicks KA, Yager DR, Knipe DM, Tyler KL & Schaffer PA (1989) Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J. Virol.* 63(2):759-768.
- Leiva-Torres GA, Rochette PA & Pearson A (2010) Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 5):1109-1116.
- Leopardi R, Michael N & Roizman B (1995) Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box. *J. Virol.* 69(5):3042-3048.
- Leppert PC (1995) Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin. Obstet. Gynecol.* 38(2):267-279.
- Leuzinger H, Ziegler U, Schraner EM, Fraefel C, Glauser DL, Heid I, Ackermann M, Mueller M & Wild P (2005) Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J. Virol.* 79(20):13047-13059.
- Li H, Dutoir A, Fu X & Zhang X (2007) Induction of strong antitumor immunity by an HSV-2-based oncolytic virus in a murine mammary tumor model. *J. Gene Med.* 9(3):161-169.
- Liedtke W, Opalka B, Zimmermann CW & Lignitz E (1993) Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *J. Neurol. Sci.* 116(1):6-11.
- Lillycrop KA, Estridge JK & Latchman DS (1993) The octamer binding protein Oct-2 inhibits transactivation of the herpes simplex virus immediate-early genes by the virion protein Vmw65. *Virology* 196(2):888-891.

- Lim RS, Suhaim JL, Miyazaki-Anzai S, Miyazaki M, Levi M, Potma EO & Tromberg BJ (2011) Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic mice using hyperspectral CARS imaging. *J. Lipid Res.* 52(12):2177-2186.
- Lin CY, Hovhannisyan V, Wu JT, Lin CW, Chen JH, Lin SJ & Dong CY (2008) Label-free imaging of *Drosophila* larva by multiphoton autofluorescence and second harmonic generation microscopy. *J. Biomed. Opt.* 13(5):050502.
- Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD & Mossman KL (2004) The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* 78(4):1675-1684.
- Lin SR, Jiang MJ, Wang HH, Hu CH, Hsu MS, Hsi E, Duh CY & Wang SK (2013) Human cytomegalovirus UL76 elicits novel aggresome formation via interaction with S5a of the ubiquitin proteasome system. *J. Virol.* 87(21):11562-11578.
- Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, McGrath Y, Thomas SK, Thornton M, Bullock P, Love CA & Coffin RS (2003) ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 10(4):292-303.
- Liu H, Yuan SJ, Chen YT, Xie YB, Cui L, Yang WZ, Yang DX & Tian YT (2013) Preclinical evaluation of herpes simplex virus armed with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pancreatic carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 19(31):5138-5143.
- Lium EK, Panagiotidis CA, Wen X & Silverstein S (1996) Repression of the alpha0 gene by ICP4 during a productive herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 70(6):3488-3496.
- Loiacono CM, Myers R & Mitchell WJ (2002) Neurons differentially activate the herpes simplex virus type 1 immediate-early gene ICP0 and ICP27 promoters in transgenic mice. *J. Virol.* 76(5):2449-2459.
- Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G & Peterson PK (2002) Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 2:S171-179.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-8618.
- Loveverde JR, Ozoka VC, Aquino R, Lin L & Pfister BJ (2011) Live imaging of axon stretch growth in embryonic and adult neurons. *J. Neurotrauma* 28(11):2389-2403.
- Luker GD, Bardill JP, Prior JL, Pica CM, Piwnica-Worms D & Leib DA (2002) Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J. Virol.* 76(23):12149-12161.
- Luker GD, Prior JL, Song J, Pica CM & Leib DA (2003) Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *J. Virol.* 77(20):11082-11093.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R & Iwasaki A (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198(3):513-520.
- Lundberg P, Welander PV, Edwards CK, 3rd, van Rooijen N & Cantin E (2007) Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J. Virol.* 81(3):1451-1460.
- Lymberopoulos MH, Bourget A, Abdeljelil NB & Pearson A (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 MH & Pearson A (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.
- Lyn RK, Kennedy DC, Sagan SM, Blais DR, Rouleau Y, Pegoraro AF, Xie XS, Stolow A & Pezacki JP (2009) Direct imaging of the disruption of hepatitis C virus replication complexes by inhibitors of lipid metabolism. *Virology* 394(1):130-142.

- Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR & Tschärke DC (2014) Lytic gene expression is frequent in HSV-1 latent infection and correlates with the engagement of a cell-intrinsic transcriptional response. *PLoS Pathog.* 10(7):e1004237.
- Mann SL, Meyers JD, Holmes KL & Corey L (1984) Prevalence and incidence of herpesvirus infections among homosexually active men. *J. Infect. Dis.* 149(6):1026-1027.
- Marchetti ME, Smith CA & Schaffer PA (1988) A temperature-sensitive mutation in a herpes simplex virus type 1 gene required for viral DNA synthesis maps to coordinates 0.609 through 0.614 in UL. *J. Virol.* 62(3):715-721.
- Maresova L, Pasička TJ & Grose C (2001) Varicella-zoster Virus gB and gE coexpression, but not gB or gE alone, leads to abundant fusion and syncytium formation equivalent to those from gH and gL coexpression. *J. Virol.* 75(19):9483-9492.
- Marfurt CF, Cox J, Deek S & Dvorscak L (2010) Anatomy of the human corneal innervation. *Exp. Eye Res.* 90(4):478-492.
- Margolis TP, Dawson CR & LaVail JH (1992) Herpes simplex viral infection of the mouse trigeminal ganglion. Immunohistochemical analysis of cell populations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33(2):259-267.
- Marshall KR, Lachmann RH, Efstathiou S, Rinaldi A & Preston CM (2000) Long-term transgene expression in mice infected with a herpes simplex virus type 1 mutant severely impaired for immediate-early gene expression. *J. Virol.* 74(2):956-964.
- Martuza RL, Mallick A, Markert JM, Ruffner KL & Coen DM (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252(5007):854-856.
- McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE & Telford EA (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* 247(3):443-458.
- McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE & Taylor P (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69 ( Pt 7):1531-1574.
- McGeoch DJ, Rixon FJ & Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117(1):90-104.
- McGovern AE, Davis-Poynter N, Rakoczy J, Phipps S, Simmons DG & Mazzone SB (2012) Anterograde neuronal circuit tracing using a genetically modified herpes simplex virus expressing EGFP. *J. Neurosci. Methods* 209(1):158-167.
- McGraw HM, Awasthi S, Wojcechowskyj JA & Friedman HM (2009a) Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not Us9. *J. Virol.*:JVI.00633-00609.
- McGraw HM & Friedman HM (2009b) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E mediates retrograde spread from epithelial cells to neurites. *J. Virol.* 83(10):4791-4799.
- McMillan TN & Johnson DC (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. *J. Virol.* 75(4):1928-1940.
- McNab AR, Desai P, Person S, Roof LL, Thomsen DR, Newcomb WW, Brown JC & Homa FL (1998) The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J. Virol.* 72(2):1060-1070.
- Melchjorsen J, Rintahaka J, Soby S, Horan KA, Poltjajainen A, Ostergaard L, Paludan SR & Matikainen S (2010) Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways. *J. Virol.* 84(21):11350-11358.
- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(4):423-429.

- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2009) Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 143(2):222-234.
- Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ & Cohen GH (2005) Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 79(11):6655-6663.
- Mo C, Lee J, Sommer MH & Arvin AM (2003) Varicella-zoster virus infection facilitates VZV glycoprotein E trafficking to the membrane surface of melanoma cells. *J. Med. Virol.* 70 Suppl 1:S56-58.
- Mochizuki Y, Park MK, Mori T & Kawashima S (1995) The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zoolog Sci* 12(3):283-288.
- Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11:227-256.
- Morfin F & Thouvenot D (2003) Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J. Clin. Virol.* 26(1):29-37.
- Mori I, Liu B, Goshima F, Ito H, Koide N, Yoshida T, Yokochi T, Kimura Y & Nishiyama Y (2005) HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness and protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microbes Infect.* 7(15):1492-1500.
- Morissette G & Flamand L (2010) Herpesviruses and chromosomal integration. *J. Virol.* 84(23):12100-12109.
- Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J & Smiley JR (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J. Virol.* 74(14):6287-6299.
- Mostaço-Guidolin LB, Sowa MG, Ridsdale A, Pegoraro AF, Smith MSD, Hewko MD, Kohlenberg EK, Schattka B, Shiomi M, Stolow A & Ko ACT (2010) Differentiating atherosclerotic plaque burden in arterial tissues using femtosecond CARS-based multimodal nonlinear optical imaging. *Biomed. Opt. Express* 1(1):59-73.
- Mott KR & Ghiasi H (2008) Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(12):1859-1867.
- Mou F, Forest T & Baines JD (2007) US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J. Virol.* 81(12):6459-6470.
- Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F & Tervo TM (2003) Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76(5):521-542.
- Murayama T, Kuno K, Jisaki F, Obuchi M, Sakamuro D, Furukawa T, Mukaida N & Matsushima K (1994) Enhancement human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *J. Virol.* 68(11):7582-7585.
- Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar KS, Higashi H, Mukaida N & Matsushima K (1997) Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J. Virol.* 71(7):5692-5695.
- Nadiarnykh O, LaComb RB, Brewer MA & Campagnola PJ (2010) Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by Second Harmonic Generation imaging microscopy. *BMC Cancer* 10:94.
- Nagel CH, Dohner K, Binz A, Bauerfeind R & Sodeik B (2012) Improper tagging of the non-essential small capsid protein VP26 impairs nuclear capsid egress of herpes simplex virus. *PLoS ONE* 7(8):e44177.
- Nagel CH, Dohner K, Fathollahy M, Strive T, Borst EM, Messerle M & Sodeik B (2008) Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J. Virol.* 82(6):3109-3124.
- Nan X, Potma EO & Xie XS (2006) Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Biophys. J.* 91(2):728-735.

- Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D, Rouse BT & Kumaraguru U (2008) Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *J. Virol.* 82(21):10820-10831.
- Naranjo JR, Mellstrom B, Carrion AM, Lucas JJ, Foulkes NS & Sassone-Corsi P (1997) Peripheral noxious stimulation induces CREM expression in dorsal horn: involvement of glutamate. *Eur. J. Neurosci.* 9(12):2778-2783.
- Nascimento R, Costa H, Dias JD & Parkhouse RM (2011) MHV-68 Open Reading Frame 20 is a nonessential gene delaying lung viral clearance. *Arch. Virol.* 156(3):375-386.
- Nascimento R, Dias JD & Parkhouse RM (2009) The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex. *Arch. Virol.* 154(7):1143-1149.
- Nascimento R & Parkhouse RM (2007) Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 5):1446-1453.
- Nawa A, Luo C, Zhang L, Ushjima Y, Ishida D, Kamakura M, Fujimoto Y, Goshima F, Kikkawa F & Nishiyama Y (2008) Non-engineered, naturally oncolytic herpes simplex virus HSV1 HF-10: applications for cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 8(3):208-221.
- Ndjamen B, Farley AH, Lee T, Fraser SE & Bjorkman PJ (2014) The herpes virus Fc receptor gE-gI mediates antibody bipolar bridging to clear viral antigens from the cell surface. *PLoS Pathog.* 10(3):e1003961.
- Netter FH (1999) *Atlas d'anatomie humaine, 2e édition.* Canada, Maloine
- Neumann DM, Bhattacharjee PS & Hill JM (2007) Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. *J. Virol.* 81(11):6106-6110.
- Nicola AV, McEvoy AM & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77(9):5324-5332.
- Nicoll JA, Love S & Kinrade E (1993) Distribution of herpes simplex virus DNA in the brains of human long-term survivors of encephalitis. *Neurosci. Lett.* 157(2):215-218.
- Nicoll MP & Efstathiou S (2013) Expression of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts does not influence latency establishment of virus mutants deficient for neuronal replication. *J. Gen. Virol.* 94(Pt 11):2489-2494.
- Nicoll MP, Proenca JT, Connor V & Efstathiou S (2012a) Influence of herpes simplex virus 1 latency-associated transcripts on the establishment and maintenance of latency in the ROSA26R reporter mouse model. *J. Virol.* 86(16):8848-8858.
- Nicoll MP, Proenca JT & Efstathiou S (2012b) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(3):684-705.
- Nishiyama Y, Kimura H & Daikoku T (1991) Complementary lethal invasion of the central nervous system by nonneuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Virol.* 65(8):4520-4524.
- Nogueira ML, Wang VE, Tantin D, Sharp PA & Kristie TM (2004) Herpes simplex virus infections are arrested in Oct-1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(6):1473-1478.
- O'Hare P & Goding CR (1988) Herpes simplex virus regulatory elements and the immunoglobulin octamer domain bind a common factor and are both targets for virion transactivation. *Cell* 52(3):435-445.
- Ogasawara M, Suzutani T, Yoshida I & Azuma M (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. *J. Virol.* 75(3):1427-1436.
- Ohara PT, Tauscher AN & LaVail JH (2001) Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea. *Brain Res.* 899(1-2):260-263.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U & Helenius A (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20(13):4922-4931.

- Orvedahl A, Alexander D, Talloczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA & Levine B (2007) HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1(1):23-35.
- Oswald DJ, Lee A, Trinidad M, Chi C, Ren R, Rich CB & Trinkaus-Randall V (2012) Communication between corneal epithelial cells and trigeminal neurons is facilitated by purinergic (P2) and glutamatergic receptors. *PLoS ONE* 7(9):e44574.
- Ouyang H, Sun W, Fu Y, Li J, Cheng JX, Nauman E & Shi R (2010) Compression induces acute demyelination and potassium channel exposure in spinal cord. *J. Neurotrauma* 27(6):1109-1120.
- Pan D, Flores O, Umbach JL, Pesola JM, Bentley P, Rosato PC, Leib DA, Cullen BR & Coen DM (2014) A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency. *Cell Host Microbe* 15(4):446-456.
- Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R & Brown M (2002) The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther.* 9(6):398-406.
- Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ & Markert JM (2000) Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(5):2208-2213.
- Parker JN, Meleth S, Hughes KB, Gillespie GY, Whitley RJ & Markert JM (2005) Enhanced inhibition of syngeneic murine tumors by combinatorial therapy with genetically engineered HSV-1 expressing CCL2 and IL-12. *Cancer Gene Ther.* 12(4):359-368.
- Parris DS, Cross A, Haarr L, Orr A, Frame MC, Murphy M, McGeoch DJ & Marsden HS (1988) Identification of the gene encoding the 65-kilodalton DNA-binding protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 62(3):818-825.
- Patel AH & MacLean JB (1995) The product of the UL6 gene of herpes simplex virus type 1 is associated with virus capsids. *Virology* 206(1):465-478.
- Paustian T (2011) *Through the microscope*. University of Wisconsin-Madison), [www.microbiologytext.com](http://www.microbiologytext.com)
- Pearson A & Coen DM (2002a) Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 76(21):10821-10828.
- Pearson A & Coen DM (2002b) Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 76(21):10821-10828.
- Pearson A, Knipe DM & Coen DM (2004) ICP27 Selectively Regulates the Cytoplasmic Localization of a Subset of Viral Transcripts in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells. *J. Virol.* 78(1):23-32.
- Penfold ME, Armati P & Cunningham AL (1994) Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(14):6529-6533.
- Pereira RA, Simon MM & Simmons A (2000) Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J. Virol.* 74(2):1029-1032.
- Perentes JY, Duda DG & Jain RK (2009a) Visualizing anti-tumor immune responses in vivo. *Dis. Model. Mech.* 2(3-4):107-110.
- Perentes JY, McKee TD, Ley CD, Mathiew H, Dawson M, Padera TP, Munn LL, Jain RK & Boucher Y (2009b) In vivo imaging of extracellular matrix remodeling by tumor-associated fibroblasts. *Nat. Methods* 6(2):143-145.
- Peri P, Mattila RK, Kantola H, Broberg E, Karttunen HS, Waris M, Vuorinen T & Hukkanen V (2008) Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Viol. J.* 5:140.

- Perkins D, Pereira EF & Aurelian L (2003) The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) functions as a dominant regulator of apoptosis in hippocampal neurons involving activation of the ERK survival pathway and upregulation of the antiapoptotic protein Bag-1. *J. Virol.* 77(2):1292-1305.
- Perkins D, Pereira EF, Gober M, Yarowsky PJ & Aurelian L (2002) The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J. Virol.* 76(3):1435-1449.
- Perng GC, Ghiasi H, Slanina SM, Nesburn AB & Wechsler SL (1996a) The spontaneous reactivation function of the herpes simplex virus type 1 LAT gene resides completely within the first 1.5 kilobases of the 8.3-kilobase primary transcript. *J. Virol.* 70(2):976-984.
- Perng GC, Slanina SM, Ghiasi H, Nesburn AB & Wechsler SL (1996b) A 371-nucleotide region between the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) LAT promoter and the 2-kilobase LAT is not essential for efficient spontaneous reactivation of latent HSV-1. *J. Virol.* 70(3):2014-2018.
- Perng GC, Slanina SM, Ghiasi H, Nesburn AB & Wechsler SL (2001) The effect of latency-associated transcript on the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation phenotype is mouse strain-dependent. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 5):1117-1122.
- Perng GC, Slanina SM, Yukht A, Ghiasi H, Nesburn AB & Wechsler SL (2000) The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits. *J. Virol.* 74(4):1885-1891.
- Petermann P, Haase I & Knebel-Morsdorf D (2009) Impact of Rac1 and Cdc42 signaling during early herpes simplex virus type 1 infection of keratinocytes. *J. Virol.* 83(19):9759-9772.
- Poon AP & Roizman B (1993) Characterization of a temperature-sensitive mutant of the UL15 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 67(8):4497-4503.
- Posavad CM & Rosenthal KL (1992) Herpes simplex virus-infected human fibroblasts are resistant to and inhibit cytotoxic T-lymphocyte activity. *J. Virol.* 66(11):6264-6272.
- Potel C, Kaelin K, Gautier I, Lebon P, Coppey J & Rozenberg F (2002) Incorporation of green fluorescent protein into the essential envelope glycoprotein B of herpes simplex virus type 1. *J. Virol. Methods* 105(1):13-23.
- Pottage JC, Jr. & Kessler HA (1995) Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance. *Infect. Agents Dis.* 4(3):115-124.
- Preston CM & Nicholl MJ (1997) Repression of gene expression upon infection of cells with herpes simplex virus type 1 mutants impaired for immediate-early protein synthesis. *J. Virol.* 71(10):7807-7813.
- Preston VG, Coates JA & Rixon FJ (1983) Identification and characterization of a herpes simplex virus gene product required for encapsidation of virus DNA. *J. Virol.* 45(3):1056-1064.
- Purifoy DJ, Lewis RB & Powell KL (1977) Identification of the herpes simplex virus DNA polymerase gene. *Nature* 269(5629):621-623.
- Rahn E, Petermann P, Hsu MJ, Rixon FJ & Knebel-Morsdorf D (2011) Entry pathways of herpes simplex virus type 1 into human keratinocytes are dynamin- and cholesterol-dependent. *PLoS ONE* 6(10):e25464.
- Ramachandran S, Knickelbein JE, Ferko C, Hendricks RL & Kinchington PR (2008) Development and pathogenic evaluation of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing two fluorescent reporter genes from different lytic promoters. *Virology* 378(2):254-264.
- Ramos CV & Taylor HB (1974) Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathologic analysis of 13 examples. *Cancer* 33(3):812-819.
- Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R & Brown M (2000) Toxicity evaluation of replication-competent herpes

- simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7(10):859-866.
- Rand KH, Rasmussen LE, Pollard RB, Arvin A & Merigan TC (1977) Cellular immunity and herpesvirus infections in cardiac-transplant patients. *N. Engl. J. Med.* 296(24):1372-1377.
- Rao P, Pham HT, Kulkarni A, Yang Y, Liu X, Knipe DM, Cresswell P & Yuan W (2011) Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J. Virol.*
- Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E & Fitzgerald KA (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11(5):395-402.
- Read GS & Summers WC (1982) In vitro transcription of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79(17):5215-5219.
- Reichelt M, Zerboni L & Arvin AM (2008) Mechanisms of varicella-zoster virus neuropathogenesis in human dorsal root ganglia. *J. Virol.* 82(8):3971-3983.
- Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnaes-Hansen F, Ulhoi BP, Holm TH, Mogensen TH, Owens T, Nyengaard JR, Thomsen AR & Paludan SR (2012) TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *J. Clin. Invest.* 122(4):1368-1376.
- Remillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G & Lippe R (2009) Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic* 10(8):1074-1083.
- Reynolds AE, Fan Y & Baines JD (2000) Characterization of the U(L)33 gene product of herpes simplex virus 1. *Virology* 266(2):310-318.
- Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ & Baines JD (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. *J. Virol.* 76(17):8939-8952.
- Ribas Gispert J (2008) *Coordination chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim. xl, 600 p. p
- Rice SA, Long MC, Lam V, Schaffer PA & Spencer CA (1995) Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *J. Virol.* 69(9):5550-5559.
- Robinson I, Ochsenkuhn MA, Campbell CJ, Giraud G, Hossack WJ, Arlt J & Crain J (2010) Intracellular imaging of host-pathogen interactions using combined CARS and two-photon fluorescence microscopies. *J. Biophotonics* 3(3):138-146.
- Rochette PA, Laliberte M, Bertrand-Grenier A, Houle MA, Blache MC, Legare F & Pearson A (2014) Visualization of mouse neuronal ganglia infected by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) using multimodal non-linear optical microscopy. *PLoS ONE* 9(8):e105103.
- Roizman B (1979) The organization of the herpes simplex virus genomes. *Annu. Rev. Genet.* 13:25-57.
- Roizman B & Furlong D (1974) The replication of herpes viruses. *Comprehensive Virology* 3:175.
- Roizman B, Knipe DM & Whitley RJ (2007) Herpes Simplex Viruses. *Fields Virology*, Knipe DM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Vol 2. p 3177
- Roizman B & Pellett PE (2001) The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. *Fields Virology*, Knipe DM & Howley PM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Vol 2. p 3280
- Roizman B & Sears AE (1987) An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:543-571.
- Ryckman BJ & Roller RJ (2004) Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J. Virol.* 78(1):399-412.

- Saldanha CE, Lubinski J, Martin C, Nagashunmugam T, Wang L, van Der Keyl H, Tal-Singer R & Friedman HM (2000) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E domains involved in virus spread and disease. *J. Virol.* 74(15):6712-6719.
- Salmon B & Baines JD (1998a) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging: association of multiple forms of U(L)15-encoded proteins with B capsids requires at least the U(L)6, U(L)17, and U(L)28 genes. *J. Virol.* 72(4):3045-3050.
- Salmon B, Cunningham C, Davison AJ, Harris WJ & Baines JD (1998b) The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J. Virol.* 72(5):3779-3788.
- Samaniego LA, Webb AL & DeLuca NA (1995) Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. *J. Virol.* 69(9):5705-5715.
- Sanders PG, Wilkie NM & Davison AJ (1982) Thymidine kinase deletion mutants of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 63(2):277-295.
- Sawtell NM (1998) The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J. Virol.* 72(8):6888-6892.
- Sawtell NM (2003) Quantitative analysis of herpes simplex virus reactivation in vivo demonstrates that reactivation in the nervous system is not inhibited at early times postinoculation. *J. Virol.* 77(7):4127-4138.
- Sawtell NM & Thompson RL (1992) Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J. Virol.* 66(4):2150-2156.
- Schaffer PA, Aron GM, Biswal N & Benyesh-Melnick M (1973) Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus type 1: isolation, complementation and partial characterization. *Virology* 52(1):57-71.
- Schumacher AJ, Mohni KN, Kan Y, Hendrickson EA, Stark JM & Weller SK (2012) The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog.* 8(8):e1002862.
- Schurmann S, von Wegner F, Fink RH, Friedrich O & Vogel M (2010) Second harmonic generation microscopy probes different states of motor protein interaction in myofibrils. *Biophys. J.* 99(6):1842-1851.
- Scott ES & O'Hare P (2001) Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 75(18):8818-8830.
- Sears AE, Hukkanen V, Labow MA, Levine AJ & Roizman B (1991) Expression of the herpes simplex virus 1 alpha transinducing factor (VP16) does not induce reactivation of latent virus or prevent the establishment of latency in mice. *J. Virol.* 65(6):2929-2935.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE & Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22:6.
- Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC & Tenney DJ (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J. Virol.* 75(2):687-698.
- Sheldrick P & Berthelot N (1975) Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 39 Pt 2:667-678.
- Shen W, Sa e Silva M, Jaber T, Vitvitskaia O, Li S, Henderson G & Jones C (2009) Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J. Virol.* 83(18):9131-9139.
- Shimeld C, Tullo AB, Hill TJ, Blyth WA & Easty DL (1985) Spread of herpes simplex virus and distribution of latent infection after intraocular infection of the mouse. *Arch. Virol.* 85(3-4):175-187.

- Shivkumar M, Milho R, May JS, Nicoll MP, Efsthathiou S & Stevenson PG (2013) Herpes simplex virus 1 targets the murine olfactory neuroepithelium for host entry. *J. Virol.* 87(19):10477-10488.
- Siew VK, Duh CY & Wang SK (2009) Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations. *J. Biomed. Sci.* 16:107.
- Sijens PE, Levendag PC, Vecht CJ, van Dijk P & Oudkerk M (1996) 1H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR Biomed.* 9(2):65-71.
- Sillevis Smitt PA, van der Loos C, Vianney de Jong JM & Troost D (1993) Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum. *Acta Histochem.* 95(1):13-21.
- Simmons A & Nash AA (1984) Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *J. Virol.* 52(3):816-821.
- Singh M, Carlson JR, Briones M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Barackman J, Ott G & O'Hagan D (1998) A comparison of biodegradable microparticles and MF59 as systemic adjuvants for recombinant gD from HSV-2. *Vaccine* 16(19):1822-1827.
- Skepper JN, Whiteley A, Browne H & Minson A (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J. Virol.* 75(12):5697-5702.
- Slipchenko MN, Le TT, Chen H & Cheng JX (2009) High-speed vibrational imaging and spectral analysis of lipid bodies by compound Raman microscopy. *J. Phys. Chem. B* 113(21):7681-7686.
- Sloan DD & Jerome KR (2007) Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. *J. Virol.* 81(22):12504-12514.
- Sloan DD, Zahariadis G, Posavad CM, Pate NT, Kussick SJ & Jerome KR (2003) CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J. Immunol.* 171(12):6733-6741.
- Smiley JR, Duncan J & Howes M (1990) Sequence requirements for DNA rearrangements induced by the terminal repeat of herpes simplex virus type 1 KOS DNA. *J. Virol.* 64(10):5036-5050.
- Snyder A, Bruun B, Browne HM & Johnson DC (2007) A herpes simplex virus gD-YFP fusion glycoprotein is transported separately from viral capsids in neuronal axons. *J. Virol.* 81(15):8337-8340.
- Snyder A, Polcicova K & Johnson DC (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 A, Wisner TW & Johnson DC (2006) Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J. Virol.* 80(22):11165-11177.
- Sodeik B, Ebersold MW & Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136(5):1007-1021.
- Soling A, Simm A & Rainov N (2002) Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag. *FEBS Lett.* 527(1-3):153-158.
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21(1):70-71.
- Spong CY (2007) Prediction and prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Obstet. Gynecol.* 110(2 Pt 1):405-415.
- Sprague ER, Martin WL & Bjorkman PJ (2004) pH dependence and stoichiometry of binding to the Fc region of IgG by the herpes simplex virus Fc receptor gE-gI. *J. Biol. Chem.* 279(14):14184-14193.
- St Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A & Hendricks RL (2011) Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 186(7):3927-3933.

- Stanberry LR, Myers MG, Stephanopoulos DE & Burke RL (1989) Preinfection prophylaxis with herpes simplex virus glycoprotein immunogens: factors influencing efficacy. *J. Gen. Virol.* 70 ( Pt 12):3177-3185.
- Stegen C, Yakova Y, Henaff D, Nadjar J, Duron J & Lippe R (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.
- Steiner I, Spivack JG, Lirette RP, Brown SM, MacLean AR, Subak-Sharpe JH & Fraser NW (1989) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection. *EMBO J.* 8(2):505-511.
- Stoothoff WH, Bacskai BJ & Hyman BT (2008) Monitoring tau-tubulin interactions utilizing second harmonic generation in living neurons. *J. Biomed. Opt.* 13(6):064039.
- Stow ND (1985) Mutagenesis of a herpes simplex virus origin of DNA replication and its effect on viral interference. *J. Gen. Virol.* 66 ( Pt 1):31-42.
- Stow ND & Davison AJ (1986) Identification of a varicella-zoster virus origin of DNA replication and its activation by herpes simplex virus type 1 gene products. *J. Gen. Virol.* 67 ( Pt 8):1613-1623.
- Straus SE, Corey L, Burke RL, Savarese B, Barnum G, Krause PR, Kost RG, Meier JL, Sekulovich R, Adair SF & et al. (1994) Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* 343(8911):1460-1463.
- Straus SE, Savarese B, Tigges M, Freifeld AG, Krause PR, Margolis DM, Meier JL, Paar DP, Adair SF, Dina D & et al. (1993) Induction and enhancement of immune responses to herpes simplex virus type 2 in humans by use of a recombinant glycoprotein D vaccine. *J. Infect. Dis.* 167(5):1045-1052.
- Straus SE, Wald A, Kost RG, McKenzie R, Langenberg AG, Hohman P, Lekstrom J, Cox E, Nakamura M, Sekulovich R, Izu A, Dekker C & Corey L (1997) Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J. Infect. Dis.* 176(5):1129-1134.
- Streilein JW, Dana MR & Ksander BR (1997) Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol. Today* 18(9):443-449.
- Stutz A, Golenbock DT & Latz E (2009) Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119(12):3502-3511.
- Stylianou J, Maringer K, Cook R, Bernard E & Elliott G (2009) Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway. *J. Virol.* 83(10):5204-5218.
- Subak-Sharpe JH & Dargan DJ (1998) HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes* 16(3):239-251.
- Subramanian RP & Geraghty RJ (2007) Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(8):2903-2908.
- Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y & Arase H (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(2):866-871.
- Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y & Kawaguchi Y (2008) Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 82(11):5198-5211.
- Summers BC, Margolis TP & Leib DA (2001) Herpes simplex virus type 1 corneal infection results in periocular disease by zosteriform spread. *J. Virol.* 75(11):5069-5075.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T & et al. (1997) A role

- for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386(6622):292-296.
- Taharaguchi S, Kobayashi T, Yoshino S & Ono E (2002) Analysis of regulatory functions for the region located upstream from the latency-associated transcript (LAT) promoter of pseudorabies virus in cultured cells. *Vet. Microbiol.* 85(3):197-208.
- Taharaguchi S, Yoshino S, Amagai K & Ono E (2003) The latency-associated transcript promoter of pseudorabies virus directs neuron-specific expression in trigeminal ganglia of transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 8):2015-2022.
- Takakuwa H, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimata H, Nakao A, Nawa A, Kurata T, Sata T & Nishiyama Y (2003) Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. *Arch. Virol.* 148(4):813-825.
- Takemura SY, Bharioke A, Lu Z, Nern A, Vitaladevuni S, Rivlin PK, Katz WT, Olbris DJ, Plaza SM, Winston P, Zhao T, Horne JA, Fetter RD, Takemura S, Blazek K, Chang LA, Ogundeyi O, Saunders MA, Shapiro V, Sigmund C, Rubin GM, Scheffer LK, Meinertzhagen IA & Chklovskii DB (2013) A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature* 500(7461):175-181.
- Tan AY, Connett CJ, Connett GJ, Quek SC, Yap HK, Meurice F & Lee BW (1996) Use of a reformulated Oka strain varicella vaccine (SmithKline Beecham Biologicals/Oka) in healthy children. *Eur. J. Pediatr.* 155(8):706-711.
- Tanaka M, Kodaira H, Nishiyama Y, Sata T & Kawaguchi Y (2004) Construction of recombinant herpes simplex virus type I expressing green fluorescent protein without loss of any viral genes. *Microbes Infect.* 6(5):485-493.
- Tang S, Bertke AS, Patel A, Wang K, Cohen JI & Krause PR (2008) An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(31):10931-10936.
- Tang S, Patel A & Krause PR (2009) Novel less-abundant viral microRNAs encoded by herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating ICP34.5 and ICPO mRNAs. *J. Virol.* 83(3):1433-1442.
- Taus NS & Baines JD (1998a) Herpes simplex virus 1 DNA cleavage/packaging: the UL28 gene encodes a minor component of B capsids. *Virology* 252(2):443-449.
- Taus NS & Mitchell WJ (2001) The transgenic ICP4 promoter is activated in Schwann cells in trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 75(21):10401-10408.
- Taus NS, Salmon B & Baines JD (1998b) The herpes simplex virus 1 UL 17 gene is required for localization of capsids and major and minor capsid proteins to intranuclear sites where viral DNA is cleaved and packaged. *Virology* 252(1):115-125.
- Teng SW, Tan HY, Peng JL, Lin HH, Kim KH, Lo W, Sun Y, Lin WC, Lin SJ, Jee SH, So PT & Dong CY (2006) Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(3):1216-1224.
- Tengelsen LA, Pederson NE, Shaver PR, Wathen MW & Homa FL (1993) Herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation require the product of the UL28 gene: isolation and characterization of two UL28 deletion mutants. *J. Virol.* 67(6):3470-3480.
- Thoelen S, De Clercq N & Tornieporth N (2001) A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. *Vaccine* 19(17-19):2400-2403.
- Thomas DL, Lock M, Zabolotny JM, Mohan BR & Fraser NW (2002) The 2-kilobase intron of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript has a half-life of approximately 24 hours in SY5Y and COS-1 cells. *J. Virol.* 76(2):532-540.

- Thompson RL & Sawtell NM (2000) Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 within Trigeminal Ganglia Is Required for High Frequency but Not High Viral Genome Copy Number Latency. *J. Virol.* 74(2):965-974.
- Timmons B, Akins M & Mahendroo M (2010) Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol. Metab.* 21(6):353-361.
- Tognon M, Guandalini R, Romanelli MG, Manservigi R & Trevisani B (1991) Phenotypic and genotypic characterization of locus Syn 5 in herpes simplex virus 1. *Virus Res.* 18(2-3):135-150.
- Tomer R, Ye L, Hsueh B & Deisseroth K (2014) Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat. Protoc.* 9(7):1682-1697.
- Tsavachidou D, Podrzucki W, Seykora J & Berger SL (2001) Gene array analysis reveals changes in peripheral nervous system gene expression following stimuli that result in reactivation of latent herpes simplex virus type 1: induction of transcription factor Bcl-3. *J. Virol.* 75(20):9909-9917.
- Turcotte S, Letellier J & Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* 79(14):8847-8860.
- Turk SR, Kik NA, Birch GM, Chiego DJ, Jr. & Shipman C, Jr. (1989) Herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase null mutants induce lesions in guinea pigs. *Virology* 173(2):733-735.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM & Cullen BR (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.
- Umbach JL, Wang K, Tang S, Krause PR, Mont EK, Cohen JI & Cullen BR (2010) Identification of viral microRNAs expressed in human sacral ganglia latently infected with herpes simplex virus 2. *J. Virol.* 84(2):1189-1192.
- Valensi JP, Carlson JR & Van Nest GA (1994) Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J. Immunol.* 153(9):4029-4039.
- Valyi-Nagy T, Deshmane S, Dillner A & Fraser NW (1991) Induction of cellular transcription factors in trigeminal ganglia of mice by corneal scarification, herpes simplex virus type 1 infection, and explantation of trigeminal ganglia. *J. Virol.* 65(8):4142-4152.
- Valyi-Nagy T, Sheth V, Clement C, Tiwari V, Scanlan P, Kavouras JH, Leach L, Guzman-Hartman G, Dermody TS & Shukla D (2004) Herpes simplex virus entry receptor nectin-1 is widely expressed in the murine eye. *Curr. Eye Res.* 29(4-5):303-309.
- van Dyck E, Buve A, Weiss HA, Glynn JR, Brown DW, De Deken B, Parry J & Hayes RJ (2004) Performance of commercially available enzyme immunoassays for detection of antibodies against herpes simplex virus type 2 in African populations. *J. Clin. Microbiol.* 42(7):2961-2965.
- van Velzen M, Jing L, Osterhaus AD, Sette A, Koelle DM & Verjans GM (2013) Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog.* 9(8):e1003547.
- Visalli RJ, Natuk RJ, Kowalski J, Guo M, Blakeney S, Gangolli S & Cooper D (2014) Vaccination with a HSV-2 UL24 mutant induces a protective immune response in murine and guinea pig vaginal infection models. *Vaccine* 32(12):1398-1406.
- Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 79(15):9566-9571.
- Volkmer A, Cheng J-X & Sunney Xie X (2001a) Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 87(2):023901.
- Volkmer A, Cheng JX & Xie XS (2001b) Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 87(2).

- von Messling V, Springfield C, Devaux P & Cattaneo R (2003) A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. Virol.* 77(23):12579-12591.
- Wadsworth S, Jacob RJ & Roizman B (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J. Virol.* 15(6):1487-1497.
- Wagenaar F, Pol JM, Peeters B, Gielkens AL, de Wind N & Kimman TG (1995) The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 7):1851-1859.
- Wakim LM, Jones CM, Gebhardt T, Preston CM & Carbone FR (2008) CD8(+) T-cell attenuation of cutaneous herpes simplex virus infection reduces the average viral copy number of the ensuing latent infection. *Immunol. Cell Biol.* 86(8):666-675.
- Walker HK (1990) Cranial Nerve V: The Trigeminal Nerve.
- Wang F, Tang W, McGraw HM, Bennett J, Enquist LW & Friedman HM (2005a) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein e is required for axonal localization of capsid, tegument, and membrane glycoproteins. *J. Virol.* 79(21):13362-13372.
- Wang H, Fu Y, Zickmund P, Shi R & Cheng JX (2005b) Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues. *Biophys. J.* 89(1):581-591.
- Wang HW, Fu Y, Huff TB, Le TT, Wang H & Cheng JX (2009) Chasing lipids in health and diseases by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Vib. Spectrosc.* 50(1):160-167.
- Wang HW, Le TT & Cheng JX (2008) Label-free Imaging of Arterial Cells and Extracellular Matrix Using a Multimodal CARS Microscope. *Opt. Commun.* 281(7):1813-1822.
- Wang SK, Duh CY & Wu CW (2004) Human cytomegalovirus UL76 encodes a novel virion-associated protein that is able to inhibit viral replication. *J. Virol.* 78(18):9750-9762.
- Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R & Paludan SR (2006) Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* 80(10):5059-5064.
- Weber PC, Challberg MD, Nelson NJ, Levine M & Glorioso JC (1988) Inversion events in the HSV-1 genome are directly mediated by the viral DNA replication machinery and lack sequence specificity. *Cell* 54(3):369-381.
- Webre JM, Hill JM, Nolan NM, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, Hsia V, Neumann DM, Foster TP, Lukiw WJ & Thompson HW (2012) Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:612316.
- Weigler BJ, Hird DW, Hilliard JK, Lerche NW, Roberts JA & Scott LM (1993) Epidemiology of cercopithecine herpesvirus 1 (B virus) infection and shedding in a large breeding cohort of rhesus macaques. *J. Infect. Dis.* 167(2):257-263.
- Weller SK (2011) *Alphaherpesviruses : molecular virology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. x, 448 p. p
- Weller SK, Lee KJ, Sabourin DJ & Schaffer PA (1983) Genetic analysis of temperature-sensitive mutants which define the gene for the major herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein. *J. Virol.* 45(1):354-366.
- Weller SK, Seghatoleslami MR, Shao L, Rowse D & Carmichael EP (1990) The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is not essential for viral DNA synthesis: isolation and characterization of a lacZ insertion mutant. *J. Gen. Virol.* 71 ( Pt 12):2941-2952.
- Weller SK, Spadaro A, Schaffer JE, Murray AW, Maxam AM & Schaffer PA (1985) Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 5(5):930-942.
- Whitbeck JC, Lawrence WC & Bello LJ (1994) Characterization of the Bovine Herpesvirus 1 Homolog of the Herpes Simplex Virus 1 UL24 Open Reading Frame. *Virology* 200(1):263-270.

- White JM, Delos SE, Brecher M & Schornberg K (2008) Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43(3):189-219.
- Whitley RJ & Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.
- Whitlow Z & Kristie TM (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. *J. Virol.* 83(18):9591-9595.
- Wilcox CL, Smith RL, Freed CR & Johnson EM, Jr. (1990) Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro. *J. Neurosci.* 10(4):1268-1275.
- Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, Loepfe E, Ackermann M, Mueller M & Walther P (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* 79(2):1071-1083.
- Wild P, Senn C, Manera CL, Sutter E, Schraner EM, Tobler K, Ackermann M, Ziegler U, Lucas MS & Kaech A (2009) Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy. *J. Virol.* 83(1):408-419.
- Wilkinson DE & Weller SK (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. *J. Virol.* 78(9):4783-4796.
- Wilkinson R, Leaver C, Simmons A & Pereira RA (1999) Restricted replication of herpes simplex virus in satellite glial cell cultures clonally derived from adult mice. *J. Neurovirol.* 5(4):384-391.
- Winnard PT, Jr., Kluth JB & Raman V (2006) Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer. *Neoplasia* 8(10):796-806.
- Wittels M & Spear PG (1991) Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 18(2-3):271-290.
- Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ & Sodeik B (2006) The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* 7(2):227-237.
- Wong RJ, Patel SG, Kim S, DeMatteo RP, Malhotra S, Bennett JJ, St-Louis M, Shah JP, Johnson PA & Fong Y (2001) Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum. Gene Ther.* 12(3):253-265.
- [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)
- Wylie KM, Schrimpf JE & Morrison LA (2009) Increased eIF2 $\alpha$  phosphorylation attenuates replication of herpes simplex virus 2 vhs mutants in mouse embryonic fibroblasts and correlates with reduced accumulation of the PKR antagonist ICP34.5. *J. Virol.* 83(18):9151-9162.
- Wysocka J & Herr W (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem. Sci.* 28(6):294-304.
- Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM & Webb WW (1996) Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(20):10763-10768.
- Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T, Satouchi K, Hirose F & Osumi T (2007) CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J. Lipid Res.* 48(5):1078-1089.
- Yu D, Sheaffer AK, Tenney DJ & Weller SK (1997) Characterization of ICP6::lacZ insertion mutants of the UL15 gene of herpes simplex virus type 1 reveals the translation of two proteins. *J. Virol.* 71(4):2656-2665.
- Yu D & Weller SK (1998a) Genetic analysis of the UL 15 gene locus for the putative terminase of herpes simplex virus type 1. *Virology* 243(1):32-44.

- Yu D & Weller SK (1998b) Herpes simplex virus type 1 cleavage and packaging proteins UL15 and UL28 are associated with B but not C capsids during packaging. *J. Virol.* 72(9):7428-7439.
- Yu X, Jia R, Huang J, Shu B, Zhu D, Liu Q, Gao X, Lin M, Yin Z, Wang M, Chen S, Wang Y, Chen X & Cheng A (2012) Attenuated Salmonella typhimurium delivering DNA vaccine encoding duck enteritis virus UL24 induced systemic and mucosal immune responses and conferred good protection against challenge. *Vet. Res.* 43:56.
- Zabransky A, Andreansky M, Hruskova-Heidingsfeldova O, Havlicek V, Hunter E, Ruml T & Pichova I (1998) Three active forms of aspartic proteinase from Mason-Pfizer monkey virus. *Virology* 245(2):250-256.
- Zerboni L, Che X, Reichelt M, Qiao Y, Gu H & Arvin A (2013) Herpes simplex virus 1 tropism for human sensory ganglion neurons in the severe combined immunodeficiency mouse model of neuropathogenesis. *J. Virol.* 87(5):2791-2802.
- Zhang Y, Akins ML, Murari K, Xi J, Li MJ, Luby-Phelps K, Mahendroo M & Li X (2012) A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(32):12878-12883.
- Zheng K, Xiang Y, Wang X, Wang Q, Zhong M, Wang S, Fan J, Kitazato K & Wang Y (2014) Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate herpes simplex virus 1 entry into neuronal cells. *MBio* 5(1):e00958-00913.
- Zhong M, Zheng K, Chen M, Xiang Y, Jin F, Ma K, Qiu X, Wang Q, Peng T, Kitazato K & Wang Y (2014) Heat-shock protein 90 promotes nuclear transport of herpes simplex virus 1 capsid protein by interacting with acetylated tubulin. *PLoS ONE* 9(6):e99425.
- Zhu J, Lee B, Buhman KK & Cheng JX (2009) A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging. *J. Lipid Res.* 50(6):1080-1089.
- Zhu Q & Courtney RJ (1994) Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* 204(2):590-599.
- Zimmerley M, Lin CY, Oertel DC, Marsh JM, Ward JL & Potma EO (2009a) Quantitative detection of chemical compounds in human hair with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.* 14(4):044019.
- Zimmerley M, McClure RA, Choi B & Potma EO (2009b) Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy. *Appl. Opt.* 48(10):D79-87.
- Ziyal IM, Sekhar LN, Ozgen T, Soylemezoglu F, Alper M & Beser M (2004) The trigeminal nerve and ganglion: an anatomical, histological, and radiological study addressing the transtrigeminal approach. *Surg. Neurol.* 61(6):564-573; discussion 573-564.
- Zolini GP, Lima GK, Lucinda N, Silva MA, Dias MF, Pessoa NL, Coura BP, Cartelle CT, Arantes RM, Kroon EG & Campos MA (2014) Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *J. Neuroinflammation* 11:20.

## **ANNEXE I**



## Introduction

La souris est un excellent modèle d'étude de la pathogenèse du VHS-1, permettant d'étudier l'infection primaire ainsi que l'établissement de la latence (Leib *et al.*, 1989). Toutefois, dans ce modèle, l'infection latente ne peut se réactiver de façon spontanée et produire des infections récurrentes en périphérie. À ce jour, seule la réactivation virale *in vivo* par injection de Butyrate de Sodium (NaB), un inhibiteur des histone déacétylases, a permis de générer une infection récurrente en périphérie (Neumann *et al.*, 2007). Les approches immunohistochimiques utilisées pour étudier les infections récurrentes neuronales et périphériques peuvent être très valables, mais nécessitent des modifications tissulaires chimiques, ainsi que physiques, souvent irréversibles et pouvant modifier la morphologie des échantillons (Sillevis Smitt *et al.*, 1993).

Récemment, nous avons mis au point une stratégie permettant de visualiser l'infection virale via l'expression de la protéine fluorescente rouge mCherry, sans que la présence de celle-ci ne modifie le comportement du virus (Rochette *et al.*, 2014). Cette approche s'est avérée un succès, permettant d'exprimer la protéine fluorescente rouge mCherry de façon stable sans modifier le comportement du virus en culture cellulaire ou *in vivo*. Toutefois, les niveaux de fluorescences associés à l'infection par vUs7-8mCherry pouvaient approcher le seuil de détection dans certaines de nos expériences. Pour contourner le problème, nous avons généré un virus recombinant exprimant la protéine fluorescente rouge tdTomato, plus brillante que mCherry, puisque le gène codant pour celle-ci est dupliqué en tandem dans le même cadre de lecture ouvert (Shaner *et al.*, 2004). L'intensité de la fluorescence générée par tdTomato est favorable à la visualisation de l'infection dans des tissus animaux épais. De plus, la brillance de tdTomato permet de facilement identifier des neurones infectés malgré l'autofluorescence dans le rouge et dans le vert associées à certaines cellules. Enfin, puisque la cassette d'expression de tdTomato est située hors du locus LAT, son expression nous permet de suivre l'entrée de l'infection en latence, ainsi que l'augmentation de l'expression de gènes viraux suite à l'injection de NaB. Dans cette étude, nous décrivons pour la première fois l'utilisation d'un virus exprimant tdTomato afin d'étudier à la fois l'infection aiguë et récurrente *in vivo*.

## Matériel et Méthodes

### Construction de plasmide

La création d'une cassette d'expression eucaryote pour le gène *tdTomato* s'est effectuée tel que décrit précédemment (Rochette *et al.*, 2014) avec les modifications suivantes. Le cadre de lecture de *tdTomato* a été excisé par digestion à partir du plasmide pRSETb-*tdTomato* (Shaner *et al.*, 2004) avec les enzymes HindIII et BamHI. Ce fragment a été inséré dans le site de clonage multiple du vecteur d'expression eucariote pCG-Zeo contenant le promoteur CMV (von Messling *et al.*, 2003), produisant le plasmide pCG-*tdTomato*. La cassette d'expression, amplifiée par PCR avec les amorces décrites précédemment (Rochette *et al.*, 2014), a été insérée dans le plasmide pET15b/Us7-Us8 (Rochette *et al.*, 2014), produisant le vecteur de transfert pET15b/Us7-Us8-*tdTomato*. Le séquençage a été réalisé par le Centre d'Innovation de Génome Québec de l'Université McGill avec les amorces décrites précédemment (Rochette *et al.*, 2014), en plus de l'amorce 5'-ccgcgatcacgaattcttac.

### Production de virus recombinants

La production de virus recombinants exprimant *tdTomato* s'est effectuée par recombinaison homologe (Griffiths *et al.*, 2003) tel que décrit précédemment (Rochette *et al.*, 2014), avec les modifications suivantes. Les virus vUs7-8-*tdTomato* ont été produits en co-transfectant de l'ADN infectieux de la souche KOS avec le vecteur de transfert pET15b/Us7-Us8-*tdTomato*, linéarisé avec HindIII. Le criblage s'est basé sur l'expression de *tdTomato*. Deux isolats indépendants de vUs7-8-*tdTomato* ont été produits (c et d).

### Virus et cellules

Les aliquots de KOS et de vUs7-8-*tdTomato* ont été produits sur des cellules Vero tel que décrit précédemment (Rochette *et al.*, 2014).

## **Essais de réplication virale**

L'efficacité de réplication virale a été déterminée par essai de réplication virale tel que décrit précédemment (Rochette *et al.*, 2014), avec les modifications suivantes. Un essai de réplication virale « multi-step » a été réalisé avec un MOI de 0.01, les cellules ont été récoltées et le virus a été titré à 12, 24, 36, 48, et 72 hpi.

## **Model murin d'infection oculaire**

Les expériences chez la souris ont été réalisées tel que décrit précédemment (Coen *et al.*, 1989, Leib *et al.*, 1989) avec les modifications suivantes. Des souris de 7 semaines de souche CD-1 et Balb/C ont été obtenues de Charles River, et ont été acclimatées sur une période de 5 jours. L'infection de souris CD-1 au niveau de la cornée a été réalisée avec un inoculum de  $2 \times 10^6$  pfu par œil, et l'infection de souris Balb/c au niveau de la cornée a été réalisée avec un inoculum de  $2 \times 10^5$  pfu par œil. La réactivation virale *in vivo* a été induite par injection intrapéritonéale de 1200 mg / kg de NaB entre 30 et 40 jpi.

## **Visualisation de foyer infectieux *in vivo* par microscopie à fluorescence**

Des souris infectées par vUs7-8tdTomato ont été euthanasiées à 3 jpi. La visualisation des foyers infectieux *in vivo* a été effectuée avec un système à faible magnification de stéréoscopie à fluorescence (Nikon SMZ800, X-Cite 120 series). Les photos ont été obtenues avec une caméra Q-Imaging (01-RET-2000R-F-M-12-C) avec une magnification optique de 1X à 6.3X.

## **Plateforme de microscopie optique non-linéaire**

La visualisation de l'infection virale dans le TG par microscopie multimodale a été réalisée tel que décrit précédemment (Rochette *et al.*, 2014).

## **Analyse de l'infection neuronale par cytométrie en flux**

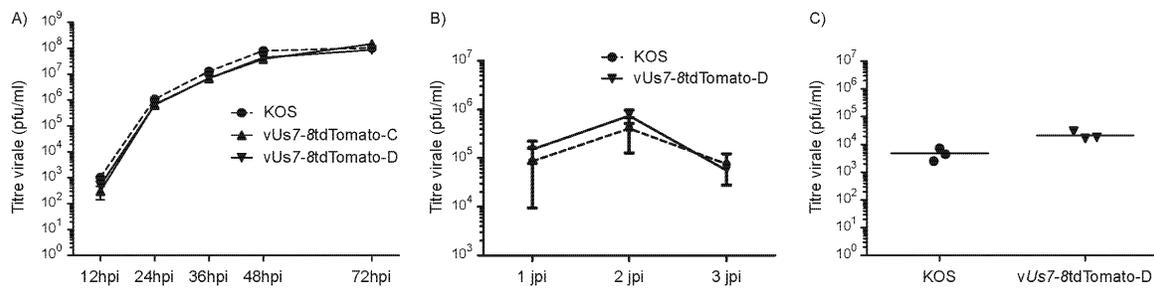
Des TG non-infectés ont été récoltés à 3 jpi, et des TG infectés ont été récoltés à 3 jpi, entre 30 et 40 jpi, ainsi qu'à 1 jour post injection de NaB ou de PBS tel qu'indiqué. Chaque TG a été récolté et dissocié enzymatiquement avec de la protéinase K et de la trypsine à 37 °C, et fixé dans du PFA 3.2 % à température pièce pour une période de 30 minutes. Les cellules dissociées ont été resuspendues dans du PBS et conservé à 4 °C. L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée avec un système BD LSRFortessa SORP, les données ont été acquises avec le logiciel BD FACSDIVA Software (BD), et analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo Enterprise). La fluorescence en rouge a été visualisée à une longueur d'onde de 612 nm, et la fluorescence en vert a été visualisée à une longueur d'onde de 519 nm.

## Résultats

### **vUs7-8tdTomato se comporte comme un virus de type sauvage**

La stratégie utilisée pour introduire une cassette d'expression de la RFP mCherry nous a permis de conserver un phénotype de type sauvage. Via cette même stratégie, nous avons introduit une cassette d'expression exprimant la RFP tdTomato, entre les gènes *Us7* et *Us8*. Tel que pour vUs7-8mCherry, la présence de la cassette d'expression de tdTomato n'a pas réduit les titres viraux produits en culture cellulaire. Des cellules Vero ont été infectées à faible MOI avec le virus de type sauvage KOS, ainsi qu'avec deux isolats du virus recombinant exprimant tdTomato, vUs7-8tdTomato, afin de caractériser l'efficacité de la réplication virale sur plusieurs cycles d'infection (Figure 1A). Les titres viraux ont été quantifiés à 12, 24, 36, 48, et 72 heures post-infection (hpi). L'infection *in vivo* de vUs7-8tdTomato a été caractérisée dans le modèle murin d'infection oculaire (Figure 1B et 1C).

Les souris Balb/C sont plus susceptibles à une infection neuronale aiguë par le VHS-1, que les souris de souche CD-1. L'utilisation de cette souche de souris pourrait permettre d'augmenter les chances de détecter une infection neuronale productive lors de l'infection aiguë ainsi que suite à la réactivation de l'infection virale à partir de la latence. Des souris de souche Balb/C ont été infectées avec  $2 \times 10^6$  pfu par œil suite à la scarification légère de la cornée.



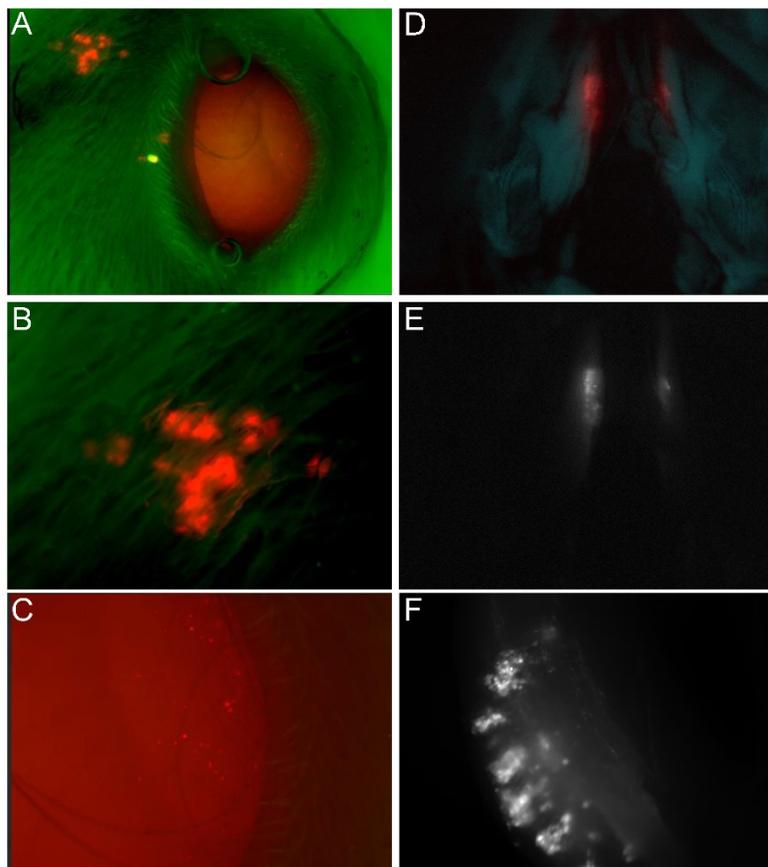
**Figure 1** **Caractérisation de vUs7-8tdTomato : A) Essai de réplication virale à faible multiplicité d'infection dans des cellules Vero comparant la souche sauvage KOS avec deux isolats indépendants de vUs7-8tdTomato (C et D). B) Caractérisation de la réplication virale *in vivo* en quantifiant le virus dans le surfactant oculaire pour les trois premiers jours de l'infection, et C) en quantifiant le virus produit dans les TG à 3 jours post infection. Les bars d'erreur représentent l'erreur standard.**

Le virus présent dans le surfactant oculaire a été titré à 1, 2 et 3 jours post-infection (jpi) (Figure 1B), et le virus présent dans les ganglions trigéminaux homogénéisés a été titré à 3 jpi (Figure 1C). Le virus vUs7-8tdTomato s'est répliqué comme un virus de type sauvage *in vivo*. Tout comme pour vUs7-8mCherry, la présence de la cassette d'expression de tdTomato n'a pas diminué la sévérité de la maladie en périphérie. De plus, dans un essai de réactivation virale *ex vivo*, une infection virale s'est réactivée dans 100% des ganglions trigéminaux provenant de souris infectées par vUs7-8tdtomato (10 TG provenant de 5 souris infectées par vus7-8tTomato). Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'infection de souris de souche CD-1 où une infection virale latente s'est réactivée à partir des 16 TG prélevés de 8 souris infectées par vUs7-8tdTomato.

## Visualisation de l'infection par vUs7-8tdTomato en microscopie à fluorescence

Les tissus animaux génèrent de hauts niveaux d'autofluorescence dans le vert. De plus, les yeux de certaines souris, dont les souris de souche Balb/c et CD-1, génèrent de hauts niveaux d'autofluorescences dans le rouge. Contrairement à mCherry et à la protéine fluorescente verte eGFP, la RFP tdTomato est optimale pour la visualisation de l'infection dans des tissus animaux épais, ou en contexte de ces types d'autofluorescence élevée. Une souris de souche CD-1, a été observé post-mortem 3 jours suivant l'infection par vUs7-8tdTomato en microscopie à fluorescence, sous un stéréoscope à faible magnification (Figure 2). Des foyers infectieux au

niveau de la région périoculaire peuvent être facilement identifiés sous le poils de la souris (Figure 2A et B). La fluorescence générée par tdTomato permet de plus de visualiser quelques cellules infectées au niveau de la cornée, malgré l'autofluorescence élevée en rouge (Figure 2C). Suite à l'ouverture de la boîte crânienne, les ganglions trigéminaux ainsi que les différents tissus présents au niveau de la base du crâne peuvent être visualisés via leur autofluorescence (Figure 2D). L'expression de tdTomato nous a permis de rapidement identifier les régions infectées d'un TG, correspondant à la branche oculaire (Figure 2D et E). Enfin, des neurones infectés par vUs7-8tdTomato, regroupés en foyers infectieux, ont pu être facilement visualisés à 3 jpi dans des TG non-sectionnés (Figure 2F).



**Figure 2** Visualisation de l'infection par vUs7-8tdTomato : A-C) Les foyers infectieux périphériques in vivo de vUs7-8tdTomato ont été visualisés en microscopie à fluorescence. Les images représentent l'infection par le virus en rouge, superposé à l'autofluorescence des tissus en vert, à une magnification de 4X. D-E) La base du crâne d'une souris infectée par vUs7-8tdTomato a été observée en microscopie à fluorescence. La fluorescence associée à tdTomato a été superposée à l'autofluorescence en vert du tissu (D) ou a été visualisée seule (E), à une magnification de 4X. F) Les foyers infectieux produits par vUs7-8tdTomato au sein d'un TG ont été visualisés par microscopie à fluorescence, à une magnification totale de 16X.



L'injection intrapéritonéale de NaB chez des souris infectées de façon latente est la seule technique ayant été démontré comme pouvant réactiver l'infection *in vivo* et mener à une infection périphérique récurrente chez la souris en contexte d'un système immunitaire compétent. Suite à l'établissement de la latence des virus de type sauvage KOS et Souche 17, nous avons pu détecter quelques particules virales infectieuses dans les TG. Afin de mieux comprendre l'impact du NaB sur l'expression génique virale précédant la production de particule virale infectieuse, des TG provenant de souris infectées par vUs7-8tdTomato ont été analysés en cytométrie en flux dans une étude préliminaire (Figure 3). Les cellules du TG génèrent des hauts niveaux d'autofluorescence en vert et en rouge, variant proportionnellement l'une avec l'autre (Figure 3A, cadre de gauche). Une analyse de TG dissociés prélevés à 3 jpi révèle une grande population de cellules générant de la fluorescence en rouge, associée à tdTomato, disproportionnellement élevée comparativement à l'autofluorescence normale des cellules (Figure 3A, cadre du centre). De plus, l'analyse par cytométrie en flux de TGs prélevés suite à l'établissement de la latence, à 30 jpi, nous a permis d'identifier une faible population de cellules où la latence est en animation, tentant de se réactiver (Figure 3A, cadre de droite). L'injection de NaB a induit une augmentation significative du nombre de cellules exprimant des niveaux élevés de fluorescence dans le rouge dans la moitié des TG prélevés (Figure 3B).

## Conclusions

Ces résultats sont les premiers à caractériser la réactivation virale *in vivo* par NaB en contexte d'un virus exprimant une protéine fluorescente. Tout comme pour vUs7-8mCherry, malgré la présence d'une cassette d'expression, le virus vUs7-8tdTomato a conservé un phénotype de type sauvage. Le gène codant pour la protéine tdTomato contient la séquence de la RFP Tomato dupliquée en tandem dans le même cadre de lecture ouvert. Tout comme pour l'expression de mCherry, la stabilité de l'expression de tdTomato par vUs7-8tdTomato a démontré le potentiel de notre stratégie d'insertion de cassette d'expression pour s'adapter à des cassettes d'expression de grandes tailles. Il serait donc possible d'y insérer des cassettes d'expression de protéines virales ou cellulaires étiquetées avec des protéines fluorescentes sans craindre pour la stabilité de l'expression des transgènes due à leur taille.

L'intensité de la fluorescence associée à tdTomato nous a permis de visualiser des foyers infectieux au niveau de l'œil et de la peau chez des souris via un système de microscopie à fluorescence à faible magnification. Il serait intéressant de caractériser l'étendu de la

dissémination de l'infection aiguë par lésion zosteriforme en périphérie par vus7-8tdTomato, chez une même souris sur plusieurs jours.

Nous avons aussi démontré la capacité d'étudier la réactivation virale *in vivo* suite à l'injection de NaB en visualisant la fluorescence associée à tdTomato. La RFP est exprimée à partir du promoteur eucaryote CMV. Il serait intéressant de produire des variantes de vUs7-8tdTomato dont la RFP est sous le contrôle de promoteurs viraux de différentes classes cinétiques. Ceci permettrait d'étudier spécifiquement l'induction de gènes viraux  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , lors de la réactivation virale *in vivo*. Il serait intéressant d'effectuer ces expériences dans différents modèles d'infection *in vivo*, en utilisant différentes souches de souris, permissives ou non à l'infection récurrente induite suite à l'injection de NaB. Nous pourrions identifier à quel moment un blocage pourrait avoir lieu, voir même identifier les protéines cellulaires, présentes dans les souches de souris moins permissives, impliquées dans l'inhibition de la réactivation virale *in vivo*.

Finalement, considérant les avantages qu'offre l'utilisation de vUs7-8tdTomato lors de la caractérisation d'infections virales *in vivo*, il serait intéressant d'insérer des mutations en UL24 dans ce virus. Ceci nous permettrait de pousser la caractérisation du rôle d'UL24 dans la pathogenèse virale, en ajoutant la caractérisation de l'apparition et de la progression de l'infection périphérique à travers le temps par microscopie à fluorescence, ainsi qu'en étudiant l'infection latente et récurrente *in vivo* par cytométrie en flux.

## References

- Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H & Pearson A (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J. Virol.* 84(1):109-118.
- Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG, Leib DA, Bogard CL, Schaffer PA, Tyler KL & Knipe DM (1989) Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(12):4736-4740.
- Griffiths A & Coen DM (2003) High-frequency phenotypic reversion and pathogenicity of an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant. *J. Virol.* 77(3):2282-2286.
- Jacobson JG, Chen S-H, Cook WJ, Kramer MF & Coen DM (1998) Importance of the Herpes Simplex Virus UL24 Gene for Productive Ganglionic Infection in Mice. *Virology* 242(1):161-169.
- Kastrukoff LF, Lau AS & Thomas EE (2012) The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae* 3:4.
- Leib DA, Coen DM, Bogard CL, Hicks KA, Yager DR, Knipe DM, Tyler KL & Schaffer PA (1989) Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J. Virol.* 63(2):759-768.
- Leiva-Torres GA, Rochette PA & Pearson A (2010) Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 5):1109-1116.
- Neumann DM, Bhattacharjee PS & Hill JM (2007) Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. *J. Virol.* 81(11):6106-6110.
- Rochette PA, Laliberte M, Bertrand-Grenier A, Houle MA, Blache MC, Legare F & Pearson A (2014) Visualization of mouse neuronal ganglia infected by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) using multimodal non-linear optical microscopy. *PLoS ONE* 9(8):e105103.
- Sedarati F & Stevens JG (1987) Biological basis for virulence of three strains of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 68 ( Pt 9):2389-2395.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE & Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22:6.
- Sillevis Smitt PA, van der Loos C, Vianney de Jong JM & Troost D (1993) Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum. *Acta Histochem.* 95(1):13-21.
- von Messling V, Springfield C, Devaux P & Cattaneo R (2003) A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. Virol.* 77(23):12579-12591.



## **ANNEXE II**

## Liste de publications

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

**Rochette P.-A., Bourget A. et Pearson A.** (Submitted) Journal of General Virology.

Visualization of mouse neuronal ganglia infected by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) using multimodal non-linear optical microscopy.

**Rochette P.-A., Laliberté M., Bertrand-Grenier, A., Houle, M.-A., Blache, M.-C., Légaré, F., et Pearson A..** (2014) PloS One. doi: 10.1371/journal.pone.0105103.

The UL24 protein of herpes simplex virus 1 affects the sub-cellular distribution of viral glycoproteins involved in fusion

**Ben Abdeljelil, N., Rochette P.-A., et Pearson A.** (2013) Virology. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.021

Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication *in vivo* and reactivation.

**Leiva-Torres, G.A., Rochette P.-A., et Pearson.** (2010) doi: 10.1099/vir.0.017921-0