Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus Herpès simplex type 1 (HSV1) après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal

Antoine Rousseau

▶ **To cite this version:**

Antoine Rousseau. Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus Herpès simplex type 1 (HSV1) après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal. Virologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS339 . tel-02885752

HAL Id: tel-02885752

https://theses.hal.science/tel-02885752

Submitted on 1 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2019SACLS339

Thèse de doctorat

Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus Herpès simplex type 1 après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 03/10/2019, par

Antoine ROUSSEAU

Composition du Jury :

Cécile Goujard PUPH, Université Paris-Sud (INSERM U1018)	Présidente
Marc Labetoulle PUPH, Université Paris-Sud (IMVA-IDMIT UMR1184)	Directeur
Françoise Brignole-Baudouin MCUPH, Sorbonne Université (Paris 5 / Paris 6), (INSERM/CNRS/S12 IdV)	Rapporteure
Vincent Vieillard DR2, Sorbonne Université (Paris 6), UMRS CR7/INSERM U1135/CNRS 8255	Rapporteur
Christophe Baudouin PUPH, Université Versailles Saint-Quentin (S12 IdV)	Examinateur
Catherine Creuzot-Garcher PUPH, Université de Dijon	Examinateure
David Boutolleau MCUPH, Sorbonne Université, INSERM, (iPLESP)	Examinateur
Roger Le Grand DR, Université Paris-Sud (IMVA-IDMIT UMR1184)	Examinateur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très profondément Monsieur Marc Labetoulle d'avoir dirigé ce travail, qui, tout en restant dans la thématique de notre équipe, inaugure une nouvelle direction prometteuse. Sa conception humaniste de la médecine et des sciences, et son énergie à toute épreuve sont pour moi une source d'inspiration. Sa confiance et son soutien constant sont un grand honneur et une aide précieuse.

Je remercie très vivement Madame Cécile Goujard d'avoir accepté de présider ma thèse. Ses connaissances cliniques et théoriques de l'immunologie et des maladies infectieuses, notamment virales, seront autant d'atouts pour la présidence de ce jury. Je la prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Françoise Brignole-Baudouin et Monsieur Vincent Vieillard d'avoir accepté la lourde tâche d'être les rapporteurs de ce travail, du temps qu'ils y ont consacré et de leur bienveillance. L'expertise de Madame Brignole-Baudouin dans les techniques d'investigation immunologique, et celle de Monsieur Vieillard en immuno-virologie sont un grand apport pour l'analyse de ce travail. Qu'ils reçoivent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Je remercie Madame Catherine Creuzot-Garcher et Monsieur Christophe Baudouin d'avoir accepté d'examiner ce rapport. Le dynamisme pédagogique et la multiplicité des domaines d'expertise de Madame Creuzot-Garcher, de même que la curiosité et l'intuition scientifiques de Monsieur Baudouin sont pour moi des exemples. Qu'ils soient assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie également Monsieur David Boutolleau, dont les travaux menés avec Madame Sonia Burrel sur les résistances des herpèsvirus constituent un apport majeur dans ce domaine. C'est un très grand honneur de travailler avec eux pour certains de nos axes de recherche clinique.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Roger Le Grand, qui a accueilli notre équipe au sein d'IDMIT, nous permettant ainsi de trouver l'environnement scientifique indispensable pour développer les aspects immuno-virologiques de nos thématiques de recherche. Ses conseils avisés, son soutien constant et son engagement au quotidien représentent à mes yeux un modèle et un moteur.

Je voudrais remercier très chaleureusement Monsieur Oscar Haigh, qui a rejoint notre équipe il y a 2 ans. Il a mis toute son expertise en immunologie et tout son engagement au service de ce projet. Ce travail n'aurait pas été possible sans son soutien et son aide constants. Je lui exprime ici toute ma gratitude et mon amitié, et lui souhaite tout le meilleure pour la magnifique aventure qui l'attend… Thanks and all the best M8 !

Je remercie Nolwenn Poccardi, ma prédécesseure, qui a initié le travail sur la protection contre HSV-1 induite par des souches atténuées. Cela a été un plaisir de travailler à ses côtés. Je lui souhaite tout le meilleur dans sa nouvelle carrière.

Je remercie très chaleureusement toute l'équipe d'IDMIT, pour son accueil et son aide constante. Isabelle Mangeot et Frédéric Ducancel, tout d'abord, qui nous ont guidé, et nous guident toujours dans notre nouvelle institution. Pauline Maisonnasse et Delphine Desjardins, avec qui j'ai partagé mon bureau la première année et qui m'ont tant aidé à m'intégrer, Pascal Morin, Deborâh Le Gal et Sébastien Jacquin sans qui nous n'aurions pas pu reprendre nos travaux expérimentaux. Pierre Roques, Nathalie Bosquet, Bruno Vaslin, Frédéric Martinon et Benoit Favier toujours bienveillants et disponibles, et enfin les autres thésards, en particulier Julien, Sixtine, Laura, Jean-Louis et Candie, toujours prêts à aider et à échanger des informations utiles…

Je remercie également toute l'équipe de virologie moléculaire et structurale du CNRS, notamment Yves Gaudin, qui m'a accueilli avec bienveillance avant le déménagement de l'équipe vers le CEA.

Je remercie aussi toute l'équipe du Service d'Ophtalmologie de Bicêtre pour son soutien pendant mes années de Thèse de Science : Emmanuel Barreau et Mohamed M'garrech, praticiens hospitaliers dans le service, aux côtés desquels c'est un plaisir et un honneur de travailler.
Les chefs de clinique avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant cette thèse : Anne-Laurence Best, une excellente ophtalmologiste, une enseignante impliquée et une collègue en or, sur qui j'ai toujours pu compter pendant ces années passées entre la recherche et les soins, Jérémie Bénichou, que je connais depuis peu, mais dont le bon esprit et la motivation sont bien agréables au quotidien, Marine Legrand, devenue depuis « ultraMarine », à qui je souhaite tout le meilleur pour la suite.
Les différents internes que j'ai encadré au cours de ces années de thèse, et sur qui j'ai pu également compter, notamment Benjamin S, Hugo, Pierre-Emmanuel, Arnaud, Benjamin M. Je peux en témoigner, le futur de l'ophtalmologie française est prometteur !
L'ensemble de l'équipe paramédicale du Service d'ophtalmologie de Bicêtre (infirmières, aide-soignantes, orthoptistes, secrétaires médicales) : une équipe exceptionnelle de gentillesse, de dévouement et d'humanité, qui ont largement contribué à ma volonté et à ma fierté de servir l'Hôpital Public.

A mes parents, qui m'ont tout donné, et que je ne pourrai jamais assez remercier,

A ma sœur Agnès que j'aime très fort, et à Simon, mon neveu qui cartonne !

A ma belle-famille, que j'ai de la chance d'avoir et qui m'a si bien accueilli,

A mes amis, que j'ai tellement hâte de retrouver…

Aux 3 amours de ma vie : Julie, ma femme adorée, sans qui rien ne serait possible, Esther et Ellie, mes filles chéries, mes étoiles magnifiques,

A la vie !

Abbréviations

ACV : Aciclovir
ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Anticorps
APC : Cellule présentatrice d'antigène
ATRX : *alpha-thalassemia/mental retardation syndrome protein*
ATRX : *ATP-dependent helicase*
CCL : C-C motif Ligand
CD : *Cluster of Differenciation*
cGAS / STING : *cGMP–AMP synthase (cGAS)–stimulator of interferon genes (STING)*
CMC : Carboxyméthylcellulose
CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
CMV : Cytomegalovirus
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CSF-1 : *Colony stimulating factor 1*
CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen* 4
CXCL : *C-X-C motif Ligand*
DAI : *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*
Daxx : *Death domain-associated protein 6*
DC : Cellule dendritique
DHX9 / DHX36 : *DEAH box proteins 9 / 36*
DMEM : *Dubelcco's modified eagle medium*
E: *Early*
EBV : Epstein-Barr Virus
ECP : eosinophilic cationic protein
EPO : éosinopéroxydase
FSC : *Forward scatter*
gB, C, D, H, L : glycoprotéines d'enveloppe B,C, D, H, L
GCV : Ganciclovir
GM-CSF : *Granulocyte / Macrophage-colony stimulating Factor*
HCF1 : *Host Cell Factor*
HHV6 / HHV7 / HHV8 : *Human Herpesvirus* 6,7,8
HSV1 / HSV2 : Herpes simplex virus 1 et 2
HVEM : Herpesvirus Entry Mediator
ICP : *Infected Cell Protein*
IE : *Immediate Early*
IFI 16 : IFN-*γ-Inducible protein*
IFN : Interféron
IFNAR : *IFN-Alpha receptor*
IHP : Inhibiteur d'hélicase-primase
IL : Interleukine
IR_S, IR_L : *Inverted Repeat short / Inverted repeat long*
ISG : *IFN inducible genes*
J.p.i. : jour post infection
JAK/STAT : *Janus Kinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription* (*STAT)*
JNK : cJun N-terminal Kinase

KIR : *Killer cell Inhibitory immunoglobulin-like Receptor*
L : *Late*
LAP : Latency Active Promoter
LAT : *Latency Associated Transcript*
LT : Lymphocytes T
LTCD4 : Lymphocytes T CD4+
LTCD8 : Lymphocytes T CD8+
MBP : protéine basique majeure / *Major Basic Protein*
MDA : *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*
mDC : Cellule dendritique myéloïde
miARN : micro-ARN
MIC : *MHC class I polypeptide-related sequence A and B*
MIP : Macrophage Inflammatory Protein
MOI : Multiplicité d'infection
MPO : myéloperoxydase
ncARN : ARN non codant
NEMO : NFκB Essential Modulator
NK : *Natural killer*
OAS : Oligoadenylate Synthetase
Oct1 : *Octamer Binding Protein 1*
PAF : *Platelet Activating Factor*
PAMPS : *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PCR : *Polymerase Chain reaction*
PD-1 : *Programmed cell Death-1*
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PE : Polynucléaire neutrophile
PML : Promyelocytic Leukemia
PML-NB : PML-*Nuclear body*
PNN : Polynucléaire neutrophile
PRR : *Pathogen recognition receptors*
RANTES : *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*
RE réticulum endoplasmique
RIG-I: *Retinoic acid-Inducible Gene I*
ROS : *Reactive oxygen species* / espèce réactive de l'oxygène
RT : *Reverse Transcriptase*
SNC : Système nerveux central
SSC : *Side scatter*
STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription* 1
TAP : *Transporter associated with antigen processing*
TG : Ganglion trigéminé
TIM3 : *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
TK : Thymidine kinase
TLR : *Toll Like Receptor*
TRAIL-TRAIL récepteur : *TNF apoptosis inducing ligand*)
TRIF : TLR-*domain-containing adaptor inducing* IFN-β
TR_S, TR_L : *Terminal Repeat short / Terminal repeat long*
U_L : *Unique long*

ULBP : UL16 binding protein
U_S : *Unique hort*
UV : ultraviolet
VACV : Valaciclovir
VHS : *Virus host hutoff*
VP16 : *Viral protein 16*
VZV : Varicelle-zona-virus

Table des matières

Chapitre I : Données bibliographiques

1 Pathogénie et traitements des infections à HSV-1……13

1.1 Physiopathologie de l'infection à HSV-1……13

1.2 Manifestations cliniques liées à HSV-1……...14

1.2.1 Manifestations cliniques extra-oculaires liées à HSV-1……14

1.2.1.1 Gingivo-stomatite herpétique……14

1.2.1.2 Herpès labial……...14

1.2.1.3 Encéphalite herpétique……..14

1.2.1.4 Infections néonatales et congénitales……15

1.2.2 Atteintes oculaires à HSV-1 : clinique et épidémiologie……16

1.3 Traitements anti-herpétiques actuels : principes et limites ……17

1.3.1 Inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase virale……17

1.3.2 Inhibiteurs non nucléosidiques de l'ADN polymérase virale……18

1.3.3 Inhibiteurs du complexe hélicase primase……..18

1.3.4 Limites des traitements des atteintes herpétiques oculaires……19

2 Les Herpesviridae et HSV-1……23

2.1 Les *Herpesviridae*……..23

2.2 HSV-1 : Structure……23

2.3 HSV-1 : Cycle réplicatif……..25

2.4 HSV-1 : Latence et réactivation……29

2.4.1 Latence……...….30

2.4.1.1 Etablissement de la latence……..…30

2.4.1.2 Régulation épigénétique de la latence……31

2.4.1.3 Les LAT (*Latency Associated Transcripts*) ……32

2.4.2 Réactivation……36

2.5 Modèles d'études du cycle d'HSV-1……38

2.5.1 Modèles *in vitro*……...38

2.5.2 Modèles animaux : *généralités*……39

2.5.3 Le modèle murin oro-oculaire……40

2.6 Rôle des corps nucléaires PML dans l'alternance latence / réactivation……44

3 La réponse immunitaire anti-HSV-1……49

3.1 Réponse immune innée……49

3.1.1 Réponse interféron……49

3.1.2 Rôle des cellules *Natural Killer* dans l'immunité innée anti-HSV-1……52
3.1.2.1 Rappels sur les cellules *Natural Killer* (NK)……52
3.1.2.2 Rôle des NK dans l'immunité innée anti-HSV-1……54
3.1.3 Rôle des polynucléaires neutrophiles dans l'immunité innée anti-HSV-1……58
3.1.3.1 Rappels sur les PNN……58
3.1.3.2 Rôle des PNN dans l'immunité innée anti-HSV-1……59
3.1.4 Rôle des polynucléaires éosinophiles dans l'immunité innée anti-HSV-1……61
3.1.4.1 Rappels sur les PNE……61
3.1.4.2 Rôle des PNE dans l'immunité innée anti-HSV-1……62
3.1.5 Mécanismes d'échappement d'HSV-1 à la réponse immune innée……63
3.1.5.1 Protéines virale diminuant la réponse interféron……63
3.1.5.2 Mécanismes d'échappement aux NK……64
3.2 Présentation de l'antigène : la transition vers la réponse adaptative……64
3.2.1 Monocytes / Macrophages……64
3.2.1.1 Généralités……64
3.2.1.2 Rôle dans l'immunité innée anti-HSV-1…… .66
3.2.2 Cellules dendritiques……68
3.2.2.1 Généralités……68
3.2.2.2 Rôle dans l'immunité innée anti-HSV-1……70
3.3 Réponse immunitaire adaptative…… 71
3.3.1 Réponse humorale……71
3.3.2 Réponse cellulaire……72
3.3.3 Mécanismes d'échappement d'HSV-1 à la réponse immune adaptative……73

4 Stratégies vaccinales anti-HSV-1……74
4.1 Vaccins anti-VZV……74
4.1.1 Vaccins vivants atténués……74
4.1.1.1 Vaccins anti-varicelle……74
4.1.1.2 Vaccins anti-zona……75
4.1.2 Vaccins sous-unitaires……75
4.2 Tentatives de vaccins anti-HSV-1……76
4.2.1 Vaccins inactivés……76
4.2.2 Vaccins sous-unitaires……76
4.2.3 Vaccins vivants atténués……77
4.2.3.1 Vaccins non réplicatifs……77
4.2.3.2 Vaccins réplicatifs……79

Chapitre II : Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus Herpès simplex type 1 après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal

1 Résultats obtenus récemment par l'équipe : vers un vaccin anti-HSV-1 efficace ?.....82

2 Objectifs de la thèse……82

3 Matériel et méthodes……..85
3.1 Virus et cellules……...85
3.1.1 Virus……85
3.1.2 Cellules……85
3.2 Préparation des concentrés viraux……...86
3.2.1 Infection des cellules……..86
3.2.2 Récolte des cellules……....86
3.2.3 Détermination du titre des concentrés viraux……..86
3.3 Techniques d'expérimentation animale……...88
3.3.1 Animaux utilisés……..88
3.3.2 Inoculation des animaux, surveillance clinique et biologique……..88
3.3.3 Groupes d'étude……..89
3.3.4 Sacrifices des animaux / points limites……...90
3.4 Analyse de la réponse immunitaire……..90
3.4.1 Prélèvements des échantillons……90
3.4.2 Cytométrie en flux multiparamétrique……..91
3.4.2.1 Préparation des tissus……..91
3.4.2.2 Immunomarquages de surface……....92
3.4.2.3 Protocole de cytométrie en flux multiparamétrique (CMF)…..92
3.4.2.4 Analyse des données……93
3.4.3 Détection et quantification des chémokines inflammatoires……....93
3.4.3.1 Préparation des homogénats tissulaires……....93
3.4.3.2 Principe du kit LEGENDplex……..…...94
3.4.3.3 Réalisation du test……95
3.4.3.4 Analyses de données……..…96
3.4.4 Etude cytologique des infiltrats……96
3.4.4.1 Isolement des cellules immunitaires de la lèvre et du TG par CMF….96
3.4.4.2 Centrifugation et étude cytologique……96
3.4.5 Analyses statistiques……97

4 Résultats……98
4.1 Définition des populations en cytométrie en flux (CMF) ……98
4.2 Phénomènes immunologiques au site d'inoculation……99
4.2.1 L'infiltrat immunitaire global (cellules $CD45^+$) apparait plus précocement et disparait plus vite dans les lèvres infectées par SC16 du groupe réinfection……99
4.2.2 L'infection préalable par TK_{del} induit des modifications qualitatives, quantitatives et dynamiques des sous-types immunitaires au site de la réinfection par SC16……101
4.2.3 L'infiltrat immunitaire dans les lèvres réinfectées est orienté vers une réponse adaptative……104
4.2.4 Les concentrations de chémokines inflammatoires sont diminuées lors d'une réinfection par SC16……105
4.3 Phénomènes immunologiques dans les TG……108
4.3.1 L'infiltrat immunitaire est diminué du côté de la réinfection par SC16……108
4.3.2 Certaines types cellulaires sont absents des TG ipsilatéraux à la réinfection par SC16……109
4.3.3 Les lymphocytes T prédominent dans les TG, avec une cinétique différente lors de la réinfection par SC16……112
4.3.4 Les chémokines inflammatoires induites par l'infection des TG par SC16 sont nettement diminuées lors de la réinfection……113
4.4 Comparaison en cytologie des infiltrats dans la lèvre et le TG……116

5 Discussion……118
5.1 Pourquoi un délai de 4 jours pour obtenir une protection par TK_{del} ? ……118
5.2 Effet de la primo-infection par TK_{del} la sur la cinétique de l'infiltrat……119
5.3 Différents profils d'inflammation au site d'inoculation……120
5.4 Différents profils d'inflammation dans les TG……121
5.5 Le modèle expérimental influence les résultats des études immunologiques portant sur l'infection par HSV-1, et notamment le rôle des PNN……121
5.6 Les polynucléaires éosinophiles pourraient être impliqués dans le contrôle de l'infection par HSV-1……123
5.7 La primo-infection par TK_{del} renforce l'immunosurveillance dans la lèvre……124
5.8 La souche non neurovirulente TK_{del} : avantages et inconvénients……125

Conclusion et perspectives……127
Références……130

Annexes

Article 1 : HSV-1 replication, ocular disease and reactivations from latency are restricted unilaterally after inoculation of virus into the lip.

Article 2 : Local immune alterations associated with a non-neurovirulent modified strain of HSV-1-mediated protection in a oro-ocular model of HSV-1 disease.

Chapitre I : Données bibliographiques

1 Pathogénie et traitements des infections à Herpès simplex 1 (HSV-1)

1.1 Physiopathologie de l'infection à HSV-1

Ce virus enveloppé, donc fragile dans le milieu extérieur, se transmet le plus souvent par un contact direct, ou par l'intermédiaire des gouttelettes de Pflügge, au niveau de la muqueuse oro-pharyngée. Après une réplication dans les cellules épithéliales au site de la primo-infection (asymptomatique dans la presque totalité des cas [1]), le virus pénètre dans les terminaisons nerveuses sensitives innervant le site d'inoculation. La capside virale non enveloppée est alors transportée de façon rétrograde via les protéines du cytosquelette jusqu'au noyau des neurones sensitifs du ganglion trigéminé (TG)[2 3]. Dans un même ganglion nerveux, le virus peut entrer en latence dans certains neurones, et/ou engager une infection lytique dans d'autres neurones. Cette réplication peut entrainer une propagation vers d'autres sites neurologiques, ce qui explique que les réactivations peuvent avoir lieu dans d'autres tissus que ceux touchés par la primo-infection (notamment les tissus oculaires et cérébraux).

Spontanément ou à la faveur de divers stimuli tels que la fièvre, l'immunodépression, le stress ou une infection intercurrente, le virus peut se réactiver dans les neurones où il se trouve en latence [4]. Les particules virales ainsi produites sont alors transportées de manière antérograde via les axones vers les territoires innervé par ces neurones, où la reprise de la réplication peut entraîner des manifestations cliniques (**Figure 1**).

La primo-infection herpétique a le plus souvent lieu durant les deux premières décennies de la vie. Aux États-Unis, la séro-prévalence chez les 14-19 ans avoisine les 30%, elle passe à 41% chez les 20-29 ans, 54% chez les 30-39 ans, tandis qu'elle atteint 60% chez les 40-49 ans [5].

A l'âge adulte, la quasi-totalité des individus hébergent HSV-1 dans le TG, y compris ceux dont la sérologie est négative [6]. La fréquence des réactivations herpétiques et leur gravité résultent de la combinaison de plusieurs facteurs : la virulence de la souche virale, la réponse immunitaire de l'hôte et le niveau d'exposition aux stimuli de réactivation virale.

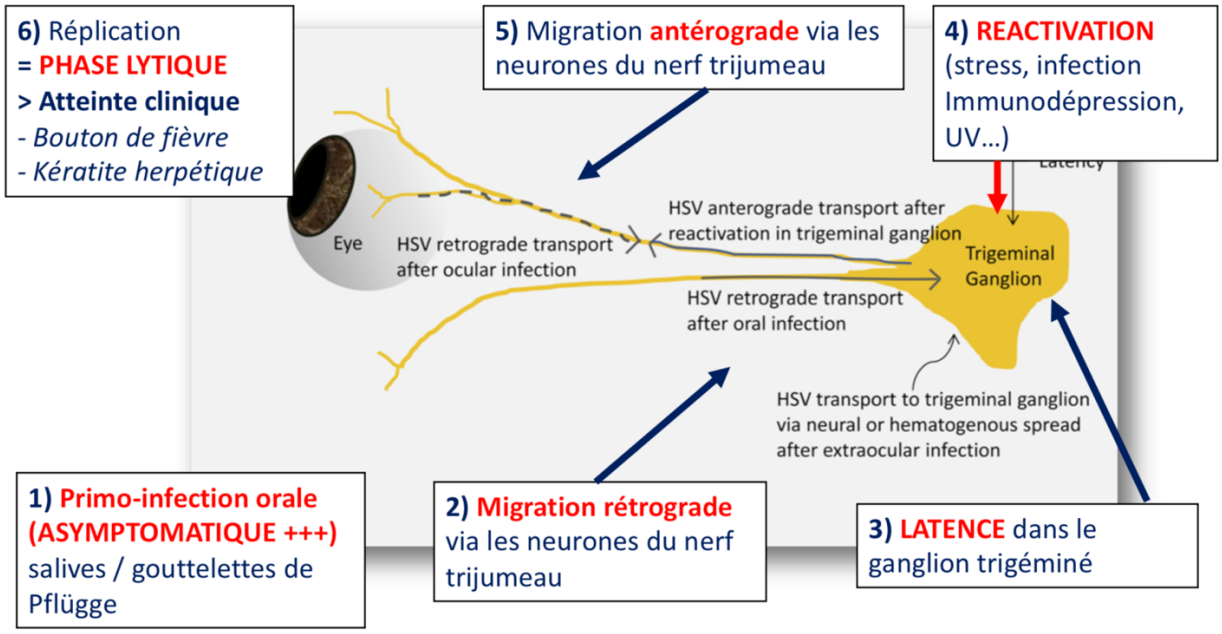


Figure 1 : physiopathologie humaine de l'infection à HSV-1, modifié d'après [4].

1.2 Manifestations cliniques liées à HSV-1

1.2.1 Manifestations cliniques extra-oculaires liées à HSV-1

1.2.1.1 Gingivo-stomatite herpétique

Comme vu plus haut, la primo-infection est asymptomatique dans 94% des cas. Dans les 6% restant, elle est le plus souvent responsable d'une **gingivo-stomatite**, touchant le plus souvent des enfants âgés de moins de 5 ans, avec atteinte buccale diffuse et dysphagiante, associée à des signes généraux (fièvre et adénopathies).

1.2.1.2 Herpès labial

L'herpès labial est de loin la manifestation clinique la plus fréquente d'HSV-1. Il s'agit toujours de récurrences cliniques liées à une réactivation virale. L'herpès labial, qui se manifeste sous la forme d'une éruption localisée, érythémato-vésiculeuse, généralement douloureuse, et récidivante, concerne 20 à 40% de la population [7]. Malgré les récurrences, l'herpès labial ne laisse habituellement aucune séquelle.

1.2.1.3 Encéphalite herpétique

Elle résulte de la propagation virale dans d'autres systèmes neurologiques, non sensitifs, mais reliés au site de primo-infection. Cette manifestation d'HSV-1 est fort heureusement très rare

(incidence annuelle estimée entre 2 et 4 cas par million). Elle occupe toutefois la première place en termes de fréquence et de sévérité au sein des encéphalites virales. Elle touche le plus souvent des enfants et jeunes adultes apparemment immunocompétents avec un taux de mortalité de 70% sans traitement, et des séquelles souvent lourdes. Elle peut résulter d'une **primo-infection ou d'une réactivation** [8 9]. Elle survient à tout âge, avec une incidence plus élevée chez les enfants de moins de 3 ans (primo-infection) ou chez les adultes de plus de 50 ans (récurrences probables). Elle se caractérise, dans sa forme classique, par une encéphalite aiguë nécrosante temporale. Le début est rapide, avec en moins de 48h l'apparition d'une fièvre et de céphalées, puis de troubles mnésiques, phasiques et d'hallucinations. Les manifestations cliniques évoluent ensuite vers des convulsions et des paralysies précédant le coma. Les patients survivants à l'encéphalite herpétique gardent souvent des séquelles neurologiques sévères et permanentes. Seule une infime minorité de personnes infectées par HSV-1 développe une encéphalite herpétique. Des mutations de certains gènes intervenant dans l'immunité innée, et en particulier dans ceux impliqués dans la réponse interféron (IFN), ont été identifiées chez des patients et/ou leur famille présentant des encéphalites causées par HSV-1. Les gènes mis en cause sont les gènes UNC-93B [10], TLR 3 (*Toll-Like Receptor 3*) [11], TRIF (*TLR-domain-containing inducing* IFN-β [12], NEMO (*NFκB Essential Modulator*) [13],codant pour des protéines de la voie de signalisation TLR3, ainsi que le gène codant pour STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) [14]. Les patients ayant des anomalies dans un de ces gènes partagent un même phénotype cellulaire : une déficience de production d'IFN de type I ou III par la cellule infectée par HSV-1, ce qui donne lieu à une réplication virale plus intense et une mort cellulaire plus importante.

1.2.1.4 Infections néonatales et congénitales

L'herpès néonatal est une infection potentiellement létale. Sa fréquence est de l'ordre de 10 cas pour 1000 000 naissances, avec 14 000 cas par an dans le monde [15]. On distingue classiquement 3 formes cliniques, les formes localisées dermatologiques / buccales ou oculaires, les formes limitées au système nerveux central et les formes disséminées [16].

Si HSV-2 est globalement majoritaire (contamination *per-partum* lors du passage de la filière génitale), HSV-1 est plus fréquent en Amérique du Nord et en Europe [15] (transmission *post-partum* par des lésions orales ou cutanées) et cause généralement des formes disséminées sévères [16].

Les infections limitées à la peau ont un bon pronostic. En revanche, le taux de mortalité atteint 15% chez les enfants atteints d'encéphalites, et de près de 60% chez les enfants ayant une dissémination systémique du virus, et ce malgré une prise en charge thérapeutique adaptée. Les enfants survivant aux encéphalites et aux infections disséminées peuvent présenter des séquelles, telles que des convulsions, un retard psychomoteur, des troubles cognitifs, voire une cécité [16].

L'infection congénitale à HSV peut également avoir des conséquences dramatiques. Elle peut comporter des atteintes cutanées (aplasie cutanée, lésions hyper ou hypo pigmentées), neurologiques (calcifications intracérébrales, hydro-anencéphalie, microcéphalie) ou oculaires (séquelles de choriorétinite, microphtalmie, cataracte, atrophie optique)[16].

1.2.2 Atteintes oculaires à HSV-1 : clinique et épidémiologie

Les pathologies oculaires d'origine herpétique représentent un vrai problème de santé publique par leur fréquence (incidence annuelle de 31/100 000 habitants, prévalence de 150/100 000, soit environ 18 000 épisodes d'herpès oculaire par an en France et 90 000 patients concernés) [17], et par leur caractère souvent invalidant, allant de la gêne fonctionnelle à la baisse d'acuité visuelle définitive. Le risque de développer une réactivation oculaire est estimé à 1% pour une vie d'homme [18]. L'herpès oculaire est d'ailleurs la principale cause infectieuse de cécité acquise (unilatérale) dans les pays industrialisés [4].

Les manifestations herpétiques oculaires les plus fréquentes sont les kératites (épithéliale, stromale ou endothéliale (**Figure 2**)), qui sont **unilatérales** dans plus de 90% des cas [19]. Les autres atteintes du segment antérieur sont les conjonctivites (dont la fréquence est sous-estimée [19]) et les blépharites (se manifestant comme des bouquets de vésicules au niveau des paupières). Plus exceptionnelles, les rétinites nécrosantes à HSV-1 ont une physiopathologie différente (propagation du virus par le nerf optique [20]), le pronostic visuel est souvent réservé [20].

Les récidives **touchent toujours le même œil**, les kératites finissent par entraîner une opacification cornéenne avec un risque d'acuité visuelle inférieure à 1/10 atteignant 11% après 20

ans d'évolution [18]. Les formes stromales et endothéliales ont un moins bon pronostic. En cas de baisse visuelle profonde, seule la greffe de cornée permet de recouvrer la vue. Les kératites herpétiques représentent d'ailleurs environ 10% des indications de greffe de cornée en France [21].

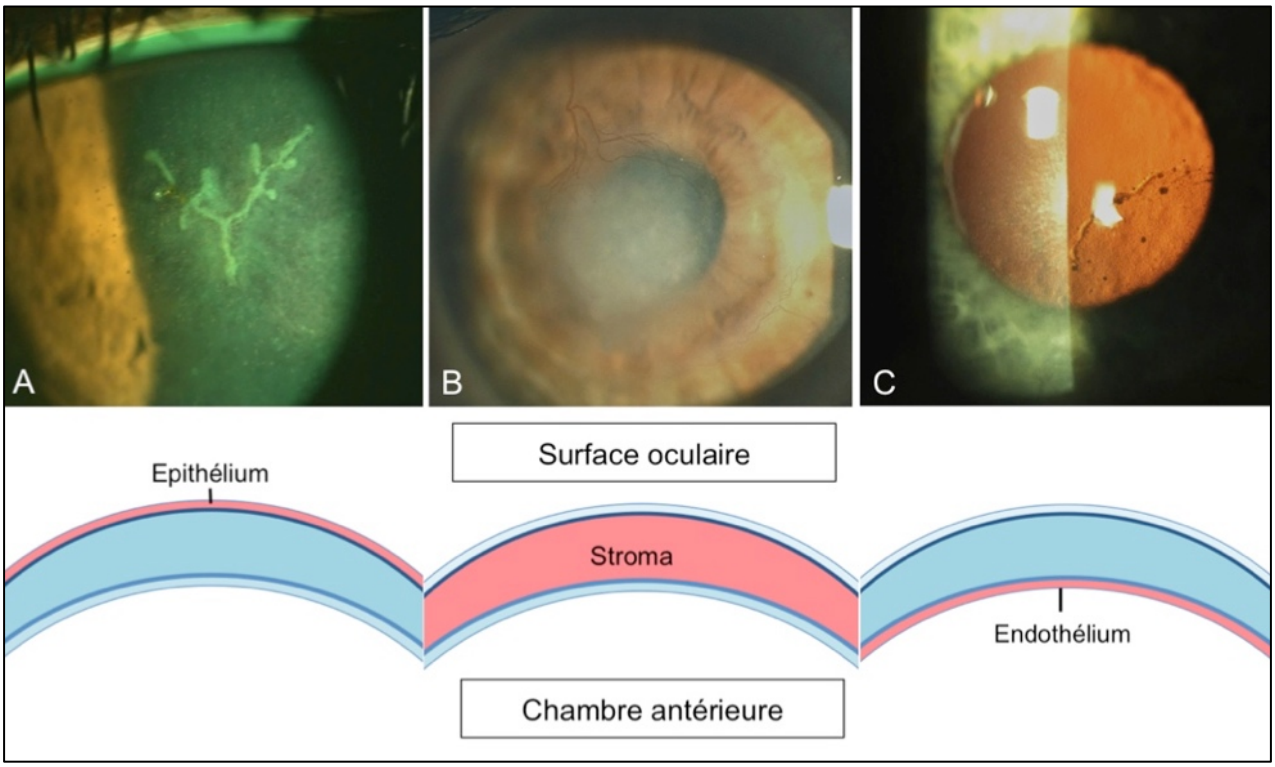


Figure 2 : Les principales formes cliniques de kératites. En haut, photos en lampe à fente. **A) Kératite épithéliale** dans une forme « dendritique » après instillation de collyre à la fluorescéine. **B) Kératite stromale :** opacification centrale avec néovaisseaux cornéens. **C) Kératite endothéliale** avec précipités rétro-cornéens.

Les kératites herpétiques, par leur caractère récidivant, leurs conséquences visuelles, et les anomalies chroniques de la surface oculaire qui les accompagnent, entrainent une altération majeure de la **qualité de vie des patients**, qui persiste entre les récurrences [22].

1.3 Traitements anti-herpétiques actuels : principes et limites

1.3.1 Inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase virale

C'est la classe la plus utilisée. La molécule de référence est l'**aciclovir** (ACV), un analogue de la déoxyguanosine qui fonctionne comme un terminateur de chaîne, et nécessite, pour devenir actif, une triple phosphorylation dont la première ne peut être réalisée que par la **thymidine kinase** (TK) virale [23]. Son action est par conséquent très spécifique des cellules infectées, ce qui explique

sa très bonne tolérance clinique et biologique. L'ACV existe sous forme orale, intraveineuse, ou en pommade ophtalmique. La biodisponibilité par voie orale de l'ACV est modeste (de l'ordre de 15 à 30%) et très sensible au bol alimentaire [24]. Pour y remédier, le **valaciclovir** (VACV) a été développé par ajout d'une valine sur le noyau de l'aciclovir, qui est désesterifiée lors du passage du système digestif vers le sang. Cette propriété augmente la biodisponibilité après ingestion orale, mais c'est finalement de l'ACV qui passe dans la circulation systémique. L'ACV et le VACV ont prouvé leur efficacité curative clinique pour réduire la durée des poussées oculaires et leurs conséquences [25]. Donné à titre préventif, l'ACV (et le VACV par extension) permet de diviser par deux la fréquence des récidives herpétiques [26].

Le **ganciclovir** (GCV) est un autre analogue nucléosidique dont l'activité antivirale repose également sur une phosphorylation par la TK virale. Dans le cadre des kératites herpétiques, Il est utilisé par voie topique, dans le traitement des formes épithéliales de kératite herpétique.

La **trifluridine** est un analogue pyrimidique qui inhibe l'ADN polymérase de façon compétitive, mais ne nécessite pas de phosphorylation par la TK virale. Elle est donc active contre les virus porteurs de mutations sur la TK **(cf. 1.3.4)**. Sa toxicité, liée à sa faible spécificité pour les cellules infectées, limite son utilisation au traitement topique des kératites herpétiques épithéliales.

1.3.2 Inhibiteurs non nucléosidiques de l'ADN polymérase virale

Ils sont utilisés en seconde ligne, en raison de leur toxicité potentielle. Ils permettent de traiter les patients dont le virus porte des mutations de résistance sur le gène de la TK virale **(cf. 1.3.4)**.

Le **foscarnet** est un analogue du pyrophosphate qui inhibe la polymérase de nombreux herpèsvirus. Il est utilisé par voie intraveineuse dans les formes sévères et/ou résistantes d'atteinte oculaire herpétique [23].

Le **cidofovir** est un analogue nucléotidique possédant un large spectre antiviral, sa toxicité rend exceptionnelle son utilisation pour les atteintes oculaires herpétiques [23].

1.3.3 Inhibiteurs du complexe hélicase primase

Les inhibiteurs du complexe hélicase-primase (IHP) agissent en empêchant la fixation du complexe IHP sur l'ADN viral, inhibant ainsi son déroulement et son positionnement et au final la réplication de l'ADN [23]. Plusieurs IHP sont en cours de développement, le plus avancé étant le

pritélivir. Ce dernier s'est révélé efficace dans un essai de phase 2 pour réduire la durée d'excrétion et la durée des épisodes cliniques d'herpès génital lié à HSV2 [27]. Bien qu'actif sur HSV-1, il n'existe aucun résultat clinique disponible concernant l'emploi du pritélivir dans les atteintes liées à HSV-1.

1.3.4 Malgré ces différentes possibilités, le traitement des atteintes oculaires herpétiques est limité par trois facteurs :

1) Une pharmacologie défavorable :

Le caractère avasculaire de la cornée rend difficile la pénétration, après administration systémique, du médicament sur le site même de l'infection, surtout quand elle concerne les couches profondes de la cornée (peu de passage via les larmes ou l'humeur aqueuse).

2) L'apparition de résistances à l'ACV, favorisées par le traitement prophylactique :

Ce phénomène pourrait être lié à l'utilisation de plus en plus fréquente d'ACV et de VACV, notamment dans le traitement préventif des atteintes oculaires d'origine herpétique. La fréquence des souches biologiquement résistantes semble augmenter de manière préoccupante. En 2008, sur des prélèvements effectués sur 173 patients immunocompétents atteints de kératites herpétiques, Duan *et al.* retrouvaient 6% d'isolats résistants à l'ACV [28]. Plus récemment, van Velzen *et al.* analysaient la proportion de virus résistants dans des isolats issus de prélèvements oculaires de 78 cas de kératites herpétiques. Les isolats étaient considérés comme résistants à l'ACV si >28% des souches virales constituant les isolats étaient résistants. Au total, et selon cette définition, 26% des isolats étaient résistants à l'ACV. La prise d'un traitement prophylactique au cours des 12 derniers mois constituait le facteur de risque principal de l'apparition de telles résistances [29]. Dans un autre travail sur des patients atteints d'uvéite herpétique, les mêmes auteurs retrouvaient des souches d'HSV-1 résistantes à l'ACV dans l'humeur aqueuse, avec dans certains cas des résistances croisées au GCV [30].

Nous avons participé à 2 études menées par le service d'Ophtalmologie du CHU de Bicêtre, en collaboration avec les services de virologie du CHU Pitié-Salpétrière (Centre National de Référence Herpèsvirus) et du CHU Paul Brousse sur les résistances des kératites herpétiques aux traitement par ACV/VACV.

Dans l'étude KERAVIR 1 [31], nous avons inclus des patients qui présentaient des récidives malgré un traitement prophylactique bien conduit. Les patients avaient dans un premier temps : i) un interrogatoire complet évaluant leur compliance au traitement et ii) un prélèvement oculaire (larmes, grattage épithélial ou humeur aqueuse) avec recherche par PCR d'HSV-1 et VZV, et recherche génotypique de résistance (par séquençage des gènes de la Thymidine Kinase et de l'ADN polymérase [32]) en cas de prélèvement positif. Les patients recevaient ensuite une dose de charge de VACV puis un dosage de l'aciclovirémie plasmatique était réalisé, au pic ou à la vallée de la concentration. Sur les 43 patients inclus, 6 avaient une PCR positive pour HSV-1, dont 5 (83%), était lié à un virus résistant à l'ACV. La durée de la maladie oculaire herpétique était significativement plus importante chez les patients porteurs de virus résistants. Les problèmes de compliance ne concernaient que 5% des patients. Concernant les dosages plasmatiques, ils étaient sous le seuil habituel de sensibilité à l'ACV d'HSV-1 dans près de 10% des cas (**Figure 3**).

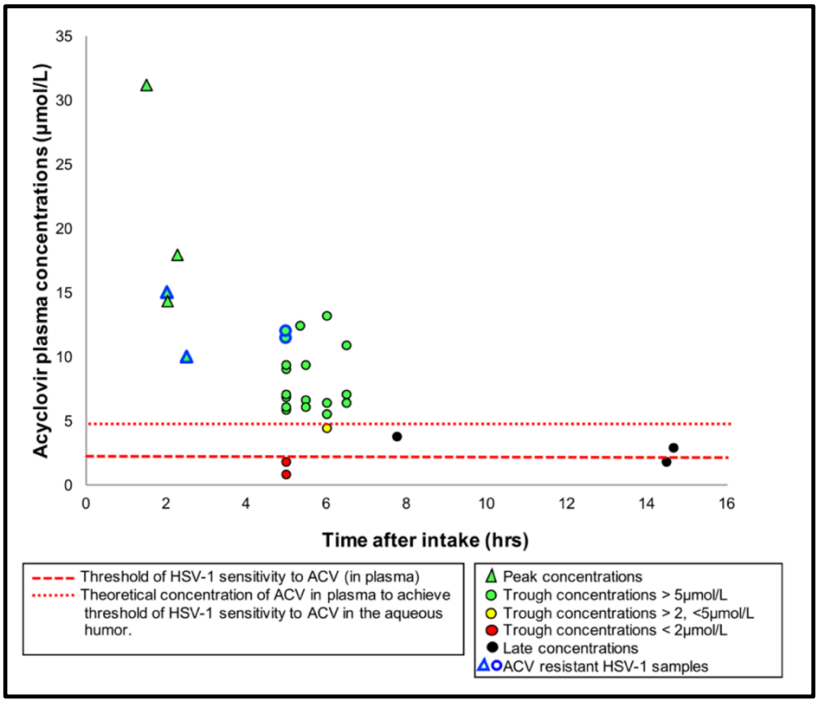


Figure 3 : Concentrations plasmatiques d'ACV des patients de l'étude KERAVIR 1, d'après [31]. Les triangles représentent les concentrations au pic et les cercles à la vallée. La ligne en tiret représente la concentration efficace 50% au-delà de laquelle les souches d'HSV-1 sont considérées comme résistantes (2µmol/L). La ligne en pointillé représente la concentration plasmatique théoriquement requise pour obtenir une concentration de 2µmol/L dans l'humeur aqueuse (5µmol/L). Les formes entourées en bleu désignent les échantillons des patients avec des souches résistantes à l'ACV.

Dans l'étude KERAVIR 2 (manuscrit en préparation, résultats présentés lors du congrès de l'*European Association for Vision and Eye Research* / EVER, à Nice, en octobre 2018, [33]), nous avons étudié les données virologiques et cliniques des cas de kératites herpétiques récidivantes avec isolement d'une souche d'HSV-1 résistante à l'ACV (résistance génotypique). Nous avions comme base initiale les données virologiques du service de virologie de la Pitié-Salpétrière, et récupérions ensuite les données cliniques auprès des différents centres prescripteurs. Sur les 18 cas inclus, la durée de la maladie oculaire herpétique (durée entre le premier épisode et le diagnostic de résistance) était de 29,8±20,4 années, avec plus de 10 récurrences chez 15 patients (83%). La recherche de résistance était motivée par des récurrences malgré un traitement préventif bien conduit dans 13 cas (72%) et par une résistance au traitement curatif dans 5 cas (28%). La résistance à l'ACV était liée à une mutation du gène de la TK dans 15 cas (83%) et de l'ADN polymérase dans 3 cas (17%). Chez les patients immunocompétents (N=12, 67%), le nombre de récurrences précédant le diagnostic de résistance était significativement plus important que chez les patients immunodéprimés (16±3,5 versus 11±6 versus $p < 0,05$). Ces résultats suggèrent d'une part que les résistances se développent après de nombreuses années et un nombre important de récurrences (donc une exposition importante aux traitements préventifs et curatifs) et d'autre part que l'immunodépression favorise la sélection de souches résistantes, comme c'est le cas dans d'autres pathologies liées à HSV-1 [34].

3) L'impossibilité de traiter efficacement les greffons cornéens :

La greffe de cornée réunit à elle seule trois facteurs majeurs de réactivation de HSV-1 : traumatisme chirurgical important avec section de l'ensemble des nerfs cornéens sur 360°, réaction inflammatoire, immunodépression locale induite par les collyres aux corticoïdes et/ou à la ciclosporine prescrits dans la période post-opératoire. Or, on sait aussi que 10% à 40% des greffons de banque hébergent du génome du virus HSV-1, conséquence possible d'une excrétion oculaire asymptomatique de virions d'HSV-1 [35] et/ou d'une hypothétique latence cornéenne [36]. Plusieurs auteurs ont ainsi démontré la transmission d'une infection à HSV-1 au receveur d'une greffe de cornée par l'intermédiaire d'un greffon cornéen infecté [37-40]. L'ensemble de ces données souligne le risque majeur d'infection précoce du greffon dans les suites d'une transplantation.

D'ailleurs, dès 1995, Mietz *et al.* avaient évoqué le rôle possible de l'herpès dans l'échec précoce des greffes de cornée, en retrouvant le virus dans des greffons n'ayant jamais récupéré leur transparence après l'intervention, alors même qu'il n'y avait pas eu de suspicion clinique de maladie herpétique oculaire [41]. Cockerham *et al.* ont ensuite démontré la présence de génome d'HSV-1 dans 33% des greffons en situation d'échec primaire de la greffe [42]. Au total, les récurrences herpétiques surviennent sur près d'un greffon sur 2 dans les suites d'une transplantation [43], avec une survie du greffon en cas de récurrence de l'ordre de 20% à 5 ans [44].

Pour résumer, ces données indiquent d'une part qu'une proportion importante de rejet ou d'échec de greffe est liée au virus HSV-1, et d'autre part que le greffon peut lui même être un vecteur de l'infection. Dans tous les cas, l'infection des greffons peut survenir de façon rapide après le geste et mettre en danger le pronostic fonctionnel du tissu transplanté, voire être impliquée dans les mécanismes de rejet de greffe [38 41 42].

2 Les Herpesviridae et le virus HSV-1

2.1 Les *Herpesviridae*

Les *Herpesviridae* sont des virus ubiquitaires, enveloppés, à ADN double brin. Ils peuvent infecter la majorité des espèces animales. Tous les *Herpesviridae* partagent au moins quatre propriétés biologiques: i) La nécessité d'une machinerie enzymatique complexe pour le déroulement du cycle réplicatif, ii) L'assemblage de la capside virale dans le noyau, iii) l'effet cytopathogène lié au cycle réplicatif, iv) La capacité à entrer en latence dans certaines cellules de l'hôte [45].

Les *Herpesviridae* sont divisés en trois sous-familles, en fonction de leur taille, de la structure de leur génome, de leur tropisme cellulaire et de leurs conditions de culture *in vitro* :

- Les *Alphaherpesvirinae* ont un large spectre d'hôte, un cycle réplicatif très court, diffusent très rapidement en culture, lysent efficacement les cellules infectées, sont pour la plupart neurotropes et ont la capacité d'entrer en latence dans les neurones sensitifs. Deux genres d'*Alphaherpesvirinae* sont impliqués en pathologie humaine : les *Simplexvirus* (HSV-1 et 2) et les *Varicellovirus* (VZV).

- Les *Betaherpesvirinae* ont un spectre d'hôte étroit, un cycle réplicatif lent, une croissance lente en culture et un effet cytopathogène de type cytomégalique. Ils établissent leur latence dans les cellules des glandes sécrétoires, les cellules lymphocytaires et le foie. Les *Betaherpesvirinae* isolés chez l'humain, sont le CMV, HHV-6 et HHV-7.

- Les *Gammaherpesvirinae* sont caractérisés par un spectre d'hôte étroit et un cycle réplicatif lent. Ils entrent en latence dans les lymphocytes B ou T. Les *Gammaherpesvirinae* isolés chez l'humain, sont EBV et HHV-8 [46].

2.2 HSV-1 : structure

Le virion 180 à 220nm de diamètre. **L'enveloppe**, d'origine cellulaire, est formée lors de l'exocytose des particules virales. Elle porte les glycoprotéines virales qui jouent un rôle essentiel dans l'infection et le cycle viral. **Le tégument** est constitué d'une vingtaine de protéines (dont VP16, essentielle à l'initiation de la réplication, voire de la réactivation) et d'ARN messagers (ARNm).

La capside, icosaédrique, est formée de 162 capsomères constitués de protéines (la protéine majeure et les protéines mineures) [46] organisées en pentons et en hexons [47] (**Figure 4**).

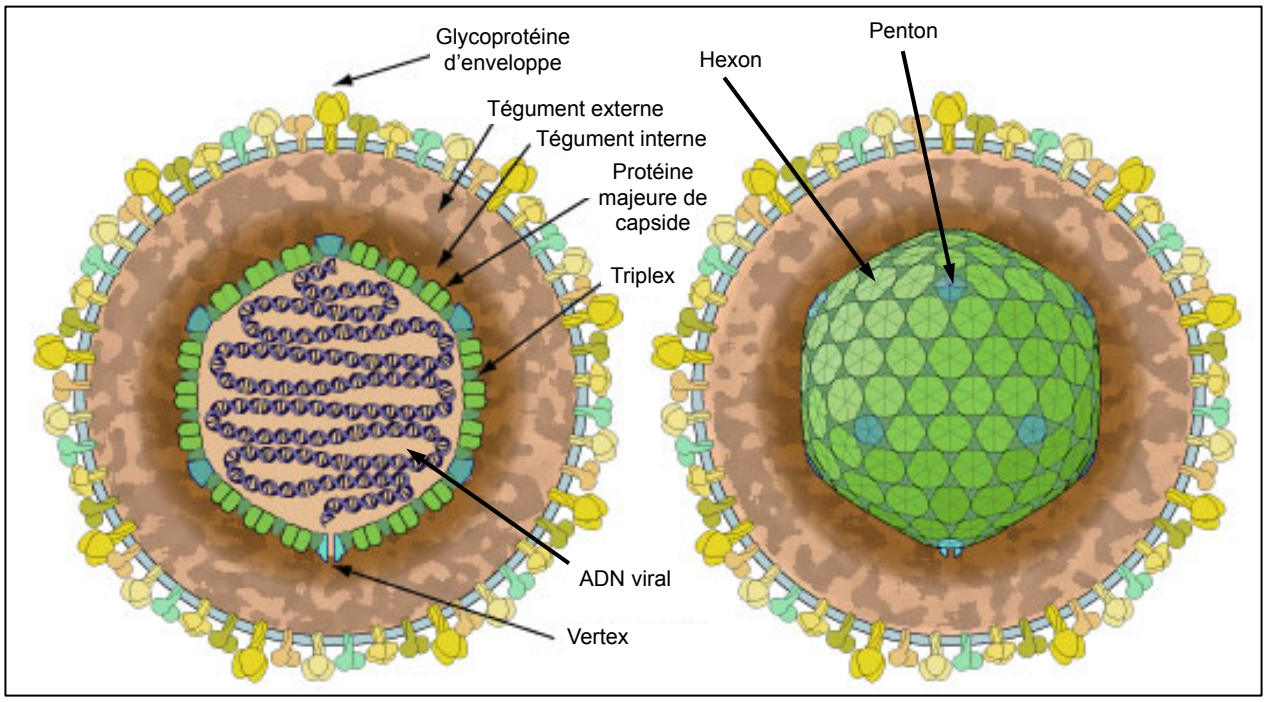


Figure 4 : Représentation schématique d'un virion d'Herpès simplex virus. Reproduit et modifié d'après [48].

Le génome d'HSV-1 est composé de 152 000 paires de base, avec un taux de GC (proportion de bases étant soit une guanine, soit une cytosine) élevé (68%). Il est constitué d'une région unique courte (U_S pour *Unique Short*), d'une région unique longue (U_L pour *Unique Long*) et de séquences inversées répétées (TR_L et IR_L, IR_S et TR_S pour *Terminal* ou *Inverted Repeat short* et *long*), présentes en deux exemplaires dans chaque génome. Le génome peut ainsi être retrouvé sous quatre formes isomériques distinctes, en quantités équivalentes, du fait des inversions relatives des fragments U_L et U_S. Les deux brins d'ADN ont une capacité de codage. Le génome d'HSV-1 code une centaine d'ARNm dont plus de 80 codent des protéines identifiées [46] (**Figure 5**).

Concernant la nomenclature, les protéines codées par les gènes d'HSV-1 sont nommées selon leur fonction, quand elle est connue, ou selon leur emplacement sur le génome. A titre d'exemple, la TK virale peut aussi être dénommée UL23.

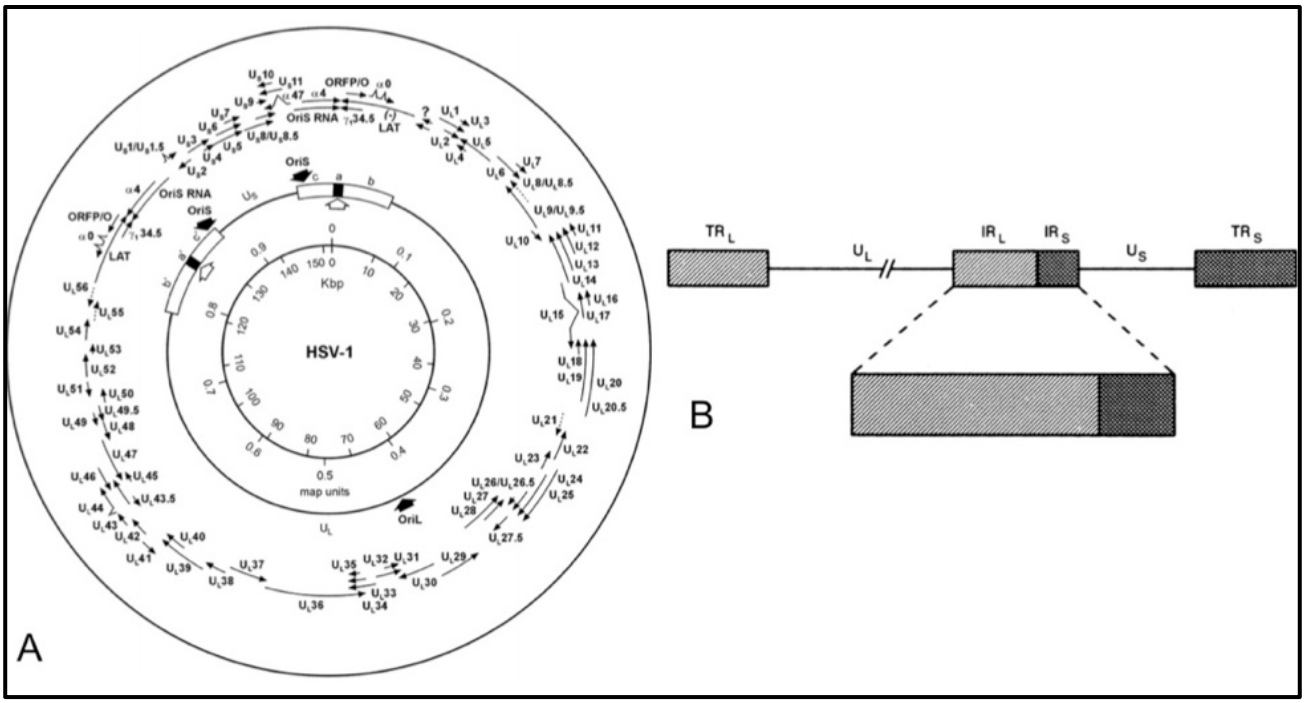


Figure 5 : A) Représentation du génome d'HSV-1. (D'après Roizman *et al.* [49]). B) Schéma simplifié représentant le génome de façon linéaire. U_L et U_S désignent les séquences uniques longues et courtes. TR et IR représentent les séquences inversées répétées (D'après Liesegang *et al.* [50]).

2.3 HSV-1 : Cycle réplicatif

HSV-1 est capable d'infecter et de se multiplier dans de nombreux types cellulaires, en particulier les cellules épithéliales et les neurones, mais également certaines populations du système immunitaire.

- Fixation à la membrane cellulaire :

Parmi les 12 glycoprotéines d'enveloppe, 6 jouent un rôle majeur dans l'entrée du virus dans la cellule (gC, gD, gB, gH, gK, gL). Les glycoprotéines gC et gB sont impliquées dans la liaison du virus à la cellule, gD, gB, gH, gL sont requises pour la fusion membranaire permettant l'entrée du virus dans la cellule. Dans un premier temps, HSV-1 interagit de manière réversible avec les résidus héparanes sulfates présents à la surface cellulaire via gB et gC. Le rôle de la protéine gK pour l'entrée dans la cellule a été démontré récemment. [51].

Dans un second temps, gD se fixe sur d'autres récepteurs membranaire (HVEM pour *Herpesvirus Entry Mediator*, nectine 1 et nectine 2), ce qui induit des changements conformationnels déclenchant la fusion des membranes virales et cytoplasmiques.

- Fusion des membranes et pénétration intracellulaire :

Le changement de conformation de gD entraine la fixation de gB et de l'hétérodimère gH-gL. Ce complexe induit ensuite la fusion des membranes virales et cytoplasmiques, puis la libération de la capside dans le cytoplasme. Toutefois, le mécanisme d'entrée d'HSV-1 dans les cellules dépend du type cellulaire et peut également avoir lieu par macropinocytose [52].

- Transport de la capside et libération de l'ADN viral dans le noyau :

Après pénétration intracellulaire, la capside et certaines protéines du tégument (VP16 et VHS, pour *viral host shutoff*) sont transportées jusqu'aux pores nucléaires par les microtubules et le cytosquelette. Le complexe UL36/UL37, contenu dans le tégument interne, permet le transport et l'orientation des capsides [53], notamment dans les axones des neurones infectés. La capside se fixe ensuite au pore nucléaire puis libère l'ADN viral dans le noyau. L'ADN se circularise et se localise au niveau des corps nucléaires PML ou (PML-NB pour *Promyelocytic Leukemia-Nuclear Body*, parfois retrouvés sous le terme ND10) [54], habituellement associés à une répression des séquences géniques situées dans leur environnement [55]. Cependant, au cours de la phase de réplication et en début de réactivation, la protéine ICP0 de HSV-1 induit la transcription du génome viral en activant la dégradation PML-NB et des protéines sp100 [54] (jouant un rôle essentiel dans la répression de la transcription, que nous verrons plus en détail en **2.6**) permettant ainsi l'enclenchement de la cascade de réplication.

- Transcription du génome et traduction des transcrits :

La transcription du génome viral suit une séquence rigoureusement régulée. Les protéines immédiatement précoces (IE pour *Immediate Early*, ou α) sont synthétisées les premières, suivies des protéines précoces (E pour *Early* ou β) puis tardives (L pour *Late*, ou γ). L'expression des gènes IE commence dès la deuxième heure de l'infection. Il existe 5 protéines IE : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 (ICP pour *Infected Cell Polypeptide*) [56]. Les promoteurs des gènes IE ont tous la séquence TAATGARAT en amont du site de coiffe, reconnue par le facteur de transcription cellulaire Oct1(*Oct pour Octamer binding protein 1*) [46]. Le complexe Oct1/ADN viral est ensuite reconnu par le complexe réunissant la protéine de tégument VP16 (*Viral Protein 16*) et le facteur cellulaire HCF1 (*Host Cellular Factor*). Cette liaison induit la transcription des gènes IE. Quatre des 5 protéines IE

sont des protéines transactivatrices qui agissent au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel pour contrôler l'expression des gènes E et L. ICP0 et ICP4 sont des **activateurs majeurs** de l'expression des gènes d'HSV-1. ICP27 agit en inhibant la maturation des ARN cellulaires. ICP22 est requise pour une réplication efficace dans certains types cellulaires, elle modifie l'ADN polymérase II cellulaire et optimise l'expression d'ICP0. L'expression des gènes E atteint son maximum entre 5 et 7 heures après l'infection. Les transcrits des gènes E ne sont produits qu'en présence d'une quantité importante de protéines IE. Les protéines E sont majoritairement impliquées dans la réplication de l'ADN viral (UL30 : domaine catalytique de l'ADN polymérase virale, UL42 : facteur de processivité de l'ADN polymérase virale, UL29 : protéine de liaison à l'ADN). Certaines contrôlent le métabolisme des nucléotides (UL23 : TK, UL39/40 : ribonucléotide réductase). La réplication virale ne débute que lorsque le taux de ces protéines est suffisant dans le cellule [57]. Les protéines L sont principalement impliquées dans la structure du virion, il s'agit en particulier des protéines de capside, de matrice et des glycoprotéines de surface.

- Réplication de l'ADN viral :

La réplication de l'ADN viral débute à partir de la troisième heure après l'infection et se produit jusqu'à 12 heures post-infection, le maximum ayant lieu tardivement après l'infection.

Le génome d'HSV-1 contient 3 origines de réplication [57] (**Figure 5**). Deux origines de réplication ori_{S1} et ori_{S2} sont situées respectivement entre les gènes codant ICP4 et ICP22 et les gènes codant les protéines ICP4 et ICP47, dans les séquences répétées inversées IR_S, c'est à dire assez proche du gène codant pour ICP0. La 3ème origine de réplication (ori_L), est localisée dans le milieu de la séquence UL entre les gènes codant pour l'ADN polymérase et la protéine ICP8. La fonctionnalité de ces 3 origines de réplication n'est pas complètement connue. Sept gènes viraux (UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42, UL52) sont essentiels pour la synthèse de l'ADN viral *in vitro* [58]. Le gène UL9 code pour une protéine capable de se lier aux origines de réplication, celle-ci recrute ICP8, codée par UL29. A ce couple, se fixe le complexe hélicase/primase (UL5, UL8 et UL52) qui va séparer les 2 brins d'ADN. La synthèse est alors réalisée par l'ADN polymérase, hétérodimère formée d'UL30 (domaine catalytique) et UL42 (facteur de processivité). La sous-unité UL30 possède une activité exonucléase 3'-5' permettant une réplication haute fidélité. En premier

lieu, l'ADN polymérase initie des cycles de réplication bidirectionnels en mode thêta puis en cercles roulants conduisant à la formation de concatémères, qui seront clivés lors de l'encapsidation.

- Assemblage des capsides et empaquetage de l'ADN viral :

Ils ont lieu de façon concomitante dans le noyau des cellules infectées. L'assemblage de la capside virale requiert la protéine majeure de capside VP5, les trois autres protéines de capside et la protéine d'échafaudage nécessaire pour l'assemblage, mais absente de la capside mature. Le complexe VP5-protéine d'échafaudage se lie aux autres protéines pour former des sous-unités qui s'assemblent en pro-capside. La maturation de la pro-capside passe par le clivage de la protéine d'échafaudage, le clivage de l'ADN concatémérique au niveau des séquences TR_L et son empaquetage dans la capside.

- Sortie des capsides du noyau, transport à la membrane plasmique et bourgeonnement :

Les capsides fusionnent ensuite avec l'enveloppe nucléaire externe ou le réticulum endoplasmique puis sont libérées nues, dans le cytoplasme. Elles sont ensuite ré-enveloppées lors du bourgeonnement avec les vésicules de l'appareil de Golgi et transportées jusqu'à la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent pour libérer les particules infectieuses matures (**Figure 6**). Elles sont ensuite libérées dans l'espace extracellulaire par exocytose. Il est classique de considérer que la sortie des virions provoque la lyse de la cellule infectée, mais ces données sont discutées, notamment en ce qui concerne les neurones (site de la latence).

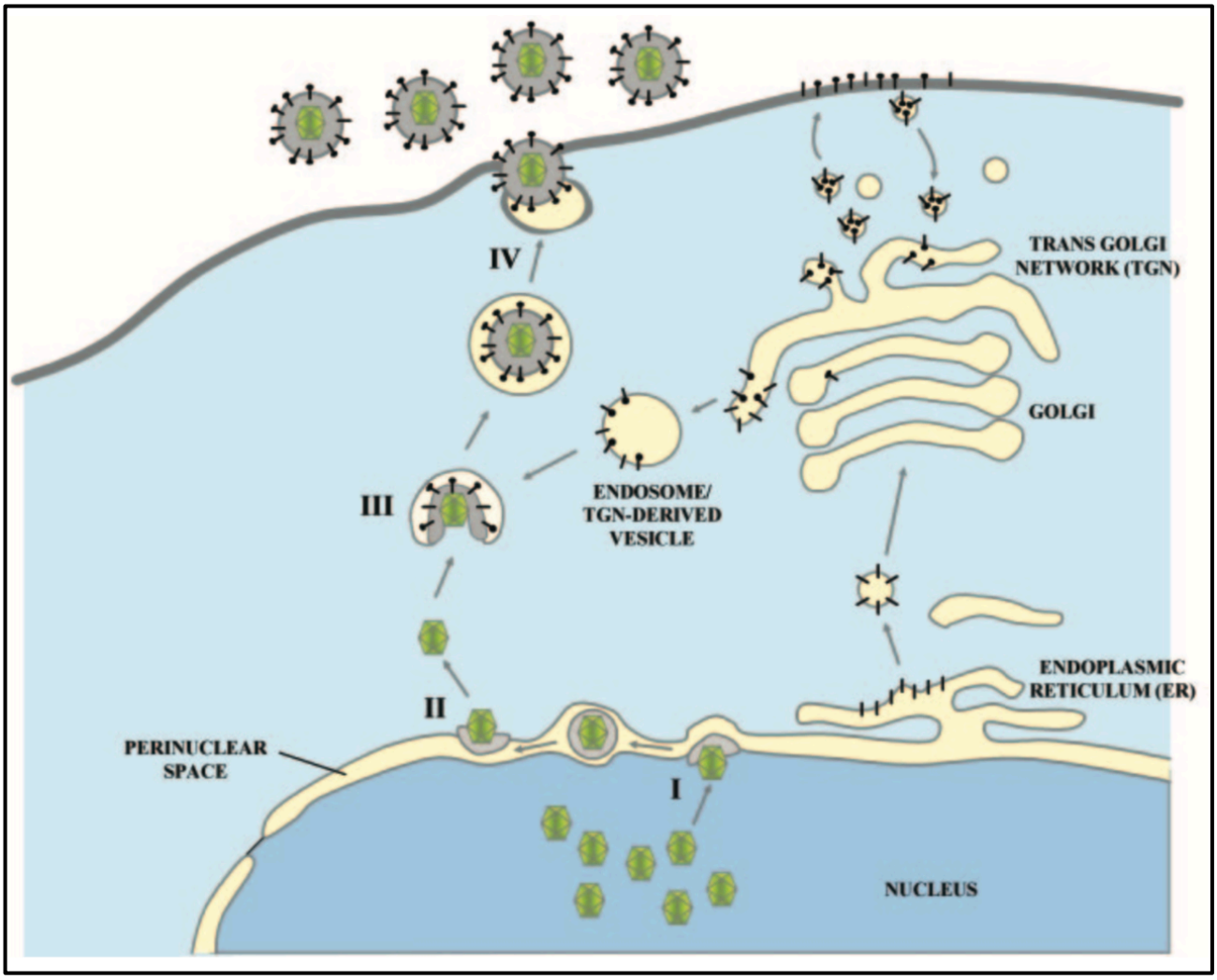


Figure 6, d'après [59] : Représentation schématique de la formation des virions et de leur sortie. I) Les capsides matures bourgeonnent dans l'espace péri-nucléaire. II) Elles sont libérées, nues, dans le cytoplasme, puis III) ré-enveloppées par fusion avec des vésicules cytoplasmiques. IV) Sortie dans l'espace extracellulaire.

2.4 HSV-1 : latence et réactivation

HSV-1 induit chez l'homme une infection persistante qui alterne entre phases de latence et de réactivation.

- *La latence* virale se définit par la présence du génome viral dans la cellule, sans production de nouvelles particules infectieuses. Dans le cas particulier d'HSV-1, le génome est sous forme épisomale, c'est à dire un ADN double brin extra-chromosomique circulaire, associé à des nucléosomes, majoritairement en état d'hétérochromatine. On considère classiquement que lors de la latence, aucun produit de gène viral (ARN ou protéine), n'est synthétisé en quantités significatives, à l'exception des transcrits associés à la latence (ou LAT pour *Latency Associated Transcripts*). Il existe cependant un certain niveau de production d'autres transcrits, majoritairement

immatures, pendant la période de latence [60 61]. Contrairement à l'infection productive, l'infection herpétique latente n'a jusqu'à présent été détectée que dans les neurones, en particulier ceux des ganglions sensitifs. Concernant HSV-1, on sait depuis les années 60-70 que la latence a essentiellement lieu dans les TG [62].

- *La réactivation* se caractérise par une production rapide de virus dans le ganglion sensitif qui héberge le virus en latence. La réactivation peut avoir lieu spontanément ou sous l'influence de stimuli tels que le froid, l'immunodépression (et notamment l'exposition aux corticoïdes), les traumatismes, l'inflammation et les rayonnements ultraviolets. La probabilité de réactivation semble corrélée au nombre de copies de génomes présent dans le noyau des neurones hébergeant le virus [63].

Les mécanismes d'établissement et de maintien de la latence ainsi que de la réactivation herpétique sont encore incomplètement compris, nous détaillerons ci-dessous les concepts actuellement admis pour comprendre ces phénomènes.

2.4.1 Latence

L'infection latente permet au virus de persister dans les noyaux des neurones sensitifs, tout en étant à l'abri du système immunitaire de l'hôte, avant d'engager une période de réactivation, source de contamination potentielle d'un nouvel hôte.

2.4.1.1 Établissement de la latence

Après son entrée dans les neurones sensitifs, le virus peut engager un cycle lytique (qui pourra conduire à une infection latente ultérieure), ou entrer directement en latence. Les mécanismes biologiques exacts participant à la mise en place de l'infection latente restent incomplètement élucidés, de même que ceux concourant au maintien de cet état.

L'entrée en latence pourrait résulter de l'absence d'expression des gènes viraux, ou de l'expression à un niveau insuffisant de gènes IE pour activer les gènes viraux ultérieurs (E et L). Cette régulation serait notamment liée à la disponibilité des facteurs de transcription cellulaire dans le site de latence de HSV-1. En effet, les facteurs de transcription cellulaires (c-jun, c-fos, et Oct-1) nécessaires à l'expression des gènes viraux IE sont absents ou présents en très faible quantité dans les neurones [64 65]. A l'inverse, ces cellules expriment d'autres facteurs de transcription (Oct-2, et

N-Oct-3) qui pourraient entrer en compétition pour la liaison avec VP16 sur le complexe Oct-1/TAATGARAT [66]. L'absence ou la diminution de l'efficacité de VP16 entrainerait une diminution des niveaux d'expression d'ICP0 et d'ICP4, indispensables à l'initiation de l'infection lytique. En outre, HCF1 (*Host Cell Factor 1*), protéine cellulaire indispensable pour l'expression des gènes IE, est localisée dans le cytoplasme des neurones sensitifs, et n'est transportée dans le noyau que sous certaines conditions de stress [67]. HCF1 étant responsable de l'import nucléaire de VP16, il est possible que VP16 ne pénètre pas (ou très peu) dans le noyau des neurones infectés [68]. Il en résulte que le complexe VP16/Oct-1/HCF1 ne peut se former, ce qui conduit à l'absence d'expression des gènes IE et à l'établissement de la latence au sein de ces neurones.

2.4.1.2 Régulation épigénétique de la latence

Contrairement à ce qui se produit chez certains membres des *Beta* et *Gammaherpesvirinae*, l'expression des gènes lytiques pendant la latence des *Alphaherpesvirinae* n'est pas régulée par la méthylation de l'ADN [69 70]. Dans le cas particulier d'HSV-1, cette régulation se fait notamment par des modifications post-traductionnelles sur les histones, placés à des positions clefs sur les promoteurs de gènes viraux.

Pendant la phase lytique, la présence de VP16 dans le noyau conduit au recrutement de facteurs remodelant les histones situées sur les promoteurs des gènes IE (ICP0, ICP27…). Ces histones sont associées à des marqueurs d'euchromatines (acétylation des histones H3 sur les résidus K9 et K14, di- et tri-méthylation des résidus K4) [69 71-73], favorables à une activité transcriptionnelle.

Pendant la latence, le domaine LAT est la seule région du génome de HSV-1 enrichie en marqueurs d'euchromatine [74]. L'expression du LAT promeut l'assemblage de marques d'hétérochromatine sur les histones situées sur les promoteurs des gènes IE (di et tri-méthylation sur K9, tri-méthylation sur K27). Les promoteurs des gènes lytiques, et plus particulièrement le promoteur d'ICP0 et d'UL30 (codant pour le site catalytique de l'ADN polymérase), sont également pauvres en marqueurs d'euchromatine [69 71], et riches en marques d'hétérochromatines constitutives et facultatives [73 75], impliquant une répression de leur transcription.

Ainsi, bien que plusieurs transcrits viraux soient produits lors de l'infection latente, leur taux d'expression est très faible et ne permet pas de production de particules virales infectieuses. Seuls les LAT s'accumulent abondamment dans le noyau des neurones infectés. Nous détaillerons plus loin **(cf. 2.4.1.3.2)** comment les LAT exercent une régulation épigénétique de l'expression des gènes lytiques.

2.4.1.3 Les LAT (*Latency Associated Transcripts*)

Formation et structure

L'importance des LAT dans la balance latence / réactivation a été évoqué dans de nombreux travaux, sans toutefois que le mécanisme central de la régulation ne soit complètement élucidé. Le gène codant pour les LAT sont à l'origine d'un premier transcrit de 8,3 kb, rapidement épissé pour générer le LAT_{2kb} (intron résultant de l'épissage, **Figure 7**). Sa stabilité inhabituelle dans une structure en lasso (lariat) est expliquée par la présence d'une séquence non consensus au site de branchement [76]. Un mécanisme d'épissage alternatif aboutit aussi au $LAT_{1,5kb}$, de structure semblable au LAT_{2kb}. Si ce dernier peut être produit dès la phase de réplication active et dans toutes les cellules, le $LAT_{1,5kb}$ n'a jusqu'à présent été observé que dans les neurones pendant la période d'infection latente.

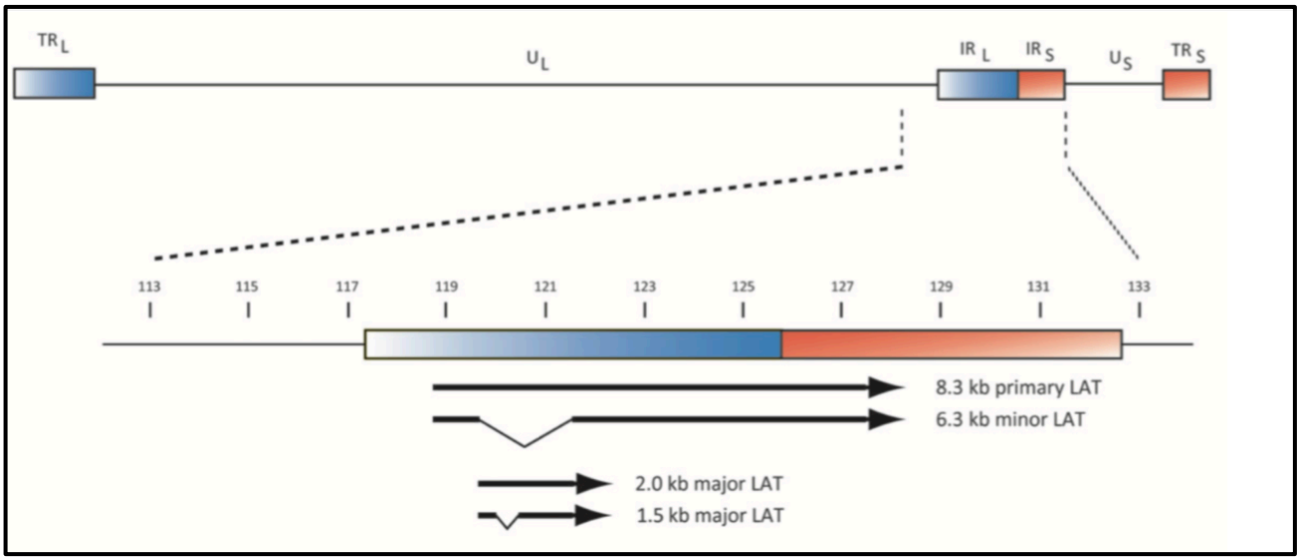


Figure 7, d'après [77] : Organisation schématique du génome de HSV-1 au niveau du locus LAT, d'après. Le gène codant les LAT est à l'origine d'un transcrit primaire instable de 8,3kb, qui s'épisse pour générer un intron stable, le LAT2kb ou le LAT1,5kb.

Fonctions des LAT

Si les LAT ne sont pas essentiels pour l'établissement de l'infection latente, son maintien ou la réactivation virale, des études i*n vivo* ont montré que les virus mutants LAT- présentent une capacité réduite d'établir la latence et de réactiver [78 79], et l'intervention des LAT dans plusieurs aspects de l'infection latente a été bien démontrée. Plus précisément, les LAT sont associés : i) à la régulation de l'apoptose, ii) à la modulation de l'immunité de l'hôte, iii) au maintien de l'infection latente en agissant comme précurseurs de miARN et iv) à la régulation épigénétique de l'expression des gènes lytiques.

- Régulation de l'apoptose

Les mutants LAT- ont une capacité diminuée à entrer en latence et à se réactiver, ainsi qu'une majoration de la neuro-virulence, en comparaison aux souches sauvages [79]. Les LAT joueraient donc un rôle dans la neuroprotection lors de l'infection aiguë, qui pourrait être liée à leurs fonctions de régulation de l'apoptose. En effet, les LAT inhibent l'apoptose *in vitro* (protection de l'apoptose des cellules transfectées avec le gène du LAT) mais également *in vivo* (neuroprotection dans les TG de souris et de lapin) [80-82]. L'expression des LAT est capable d'inhiber les caspase 8 et caspase 9 induites lors de l'apoptose, mais également plusieurs composant de la voie JAK/STAT (*Janus kinase / STAT*) impliqués dans l'apoptose [80 82 83]. Cette fonction anti-apoptotique du LAT favorise la survie des neurones infectés lors de la phase aiguë, et permet ainsi d'augmenter le nombre de neurones infectés de façon latente ainsi que la capacité de réactivation des virus latents.

- Modulation de l'immunité de l'hôte ***(cf. 4.3)***

L'infection par HSV-1 s'accompagne d'une sélection de clones de lymphocytes T $CD8^+$ ($LTCD8^+$) spécifiques résidant dans les TG infectés de façon latente, qui jouent un rôle clef dans le contrôle de la réactivation virale. Durant la latence, les $LTCD8^+$ retenus dans les TG de lapins infectés par une souche d'HSV-1 exprimant le LAT (LAT+) présentent une grande quantité de marqueurs d'épuisement tels que PD-1 (*programmed cell death-1*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) et CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen* 4) [84]. Ces marqueurs sont retrouvés en quantité plus faible dans les TG infectés par un virus LAT-. Ces $LTCD8^+$ épuisés

ont une diminution de leur capacité de cytotoxicité, de production d'IFN-γ et de TNF-α [85]. En revanche, ils reconnaissent une plus large sélection d'épitopes viraux [84]. Les LAT permettent donc de construire un plus large répertoire de LTCD8$^+$ mais en contrepartie, ces LTCD8$^+$ spécifiques s'épuisent, et sont donc moins cytotoxique sur les neurones, mais plus « permissifs » pour les réactivations virales.

- Les LAT encodent des microARN (miARN) maintenant la latence

En effet, les LATs codent pour plusieurs miARN identifiés *in silico*, et dont l'expression a été confirmée *in vivo* (analyse à partir de TG de souris infectées de façon latente et de TG humains prélevés *post-mortem*) [86 87]. Ces miARN sont codés au sein du LAT primaire de 8,3kb. Des études *in vitro* ont montré que certains miARN de HSV-1 sont impliqués dans la diminution de l'expression de deux protéines virales IE : ICP0 et ICP4 [86], toutes deux considérés comme de puissants activateurs transcriptionnels. Leur répression par ces miARN pourrait faciliter l'établissement et/ou le maintien de la latence.

Les fonctions de ces miARN ont été étudiées *in vivo*. Pour cela, des souris ont été infectées avec des souches de HSV-1 délétées dans le promoteur du gène LAT. Kramer *et al.* constataient une réduction considérable de l'accumulation des miARN dérivés du LAT dans les TG de souris infectées à la phase de latence. Toutefois, ces souches mutantes se répliquaient de manière comparable au virus sauvage dans les tissus infectés et pouvaient établir une latence dans les TG [88]. Ces miARN ne semblent donc pas indispensables pour l'établissement de la latence.

- Régulation épigénétique de la latence et de l'expression des gènes lytiques

Comme vu plus haut, la latence et la réactivation sont régulées par des modifications épigénétiques dont certaines sont directement sous le contrôle des LAT.

En effet, en agissant comme un régulateur épigénétique de type ncARN (ARN non codant), les LAT remodèlent la chromatine virale pour la maintenir dans un état répressif défavorable à la transcription. Ils sont impliqués dans la mise en place de modifications post-traductionnelles au niveau des histones, induisant ainsi la répression de l'expression de gènes lytiques [73 75]. Des études de l'infection latente dans **un modèle murin** ont montré que les virus HSV-1 mutants LAT- présentent une diminution de l'association d'hétérochromatine facultative et constitutive sur les

promoteurs des gènes lytiques. Le LAT faciliterait ainsi l'assemblage de l'hétérochromatine sur ces promoteurs lors de l'entrée en latence [73 75]. En outre, la comparaison de la capacité de réactivation d'une souche sauvage d'HSV-1 avec une souche délétée pour le promoteur du LAT révèle que l'expression du LAT limite la capacité de réactivation de HSV-1 (en plus de réduire sa capacité à entrer en latence), via un mécanisme de répression transcriptionnelle des gènes lytiques du virus [89].

En revanche, les études **sur le lapin** suggèrent un rôle opposé des LAT. En effet, chez le lapin, le LAT interagit avec le génome viral pour le maintenir dans un état transcriptionnel actif [90].

S'il semble clair que le LAT exerce un rôle important dans la régulation épigénétique de la latence virale, il est toutefois difficile de porter des conclusions définitives à partir de ces deux modèles, d'autant plus qu'HSV-1 est un pathogène humain strict (le lapin et la souris ne sont pas des hôtes naturels) (**cf. 2.5**).

- La balance latence/réactivation est dynamique

La répression de l'expression des gènes lytiques n'est pas absolue pendant la latence : des transcrits lytiques sont en effet retrouvés en faible quantité dans les ganglions sensitifs qui hébergent l'infection latente, tels que ICP0 [61], ICP4 [91] ainsi que ICP27, gD et ICP8 [92]. La traduction de ces transcrits lytiques n'a en revanche pas encore été détectée dans les ganglions sensitifs infectés de façon latente. La présence de nombreux LTCD8$^+$ activés spécifiques d'HSV-1, dans ces tissus, suggère que ces transcrits pourraient, au moins en partie, être traduits [93].

Les mécanismes expliquant la présence de transcrits lytiques dans les neurones infectés par le virus latent restent encore débattus. Ils pourraient être résiduels de réactivations complètes mais associées à une production virale trop faible pour être détectée [94], ou encore résulter de réactivations contrôlées par l'hôte [95]. Enfin, ils pourraient provenir d'une expression stochastique à bas bruit, mais continue, de gènes lytiques. Dans tous les cas, cela incite à définir la latence comme une balance dynamique entre un maintien par le système immunitaire de l'hôte et la réactivation « spontanée ». Kumar *et al.* ont d'ailleurs montré dans une étude portant sur 45 volontaires sains, sans antécédent herpétique labial ou oculaire, soumis à une recherche d'HSV-1 par PCR sur les larmes et la salive matin et soir pendant 30 jours, qu'un de ces 60 prélèvements

était positif dans 86% pour les larmes et dans 79% sur la salive, traduisant une excrétion asymptomatique épisodique, mais finalement fréquente… [35].

- La latence est hétérogène au niveau tissulaire

Au sein d'un même ganglion sensitif, le nombre de génomes viraux par neurone infecté varie de 1 à plus de 1000 copies, avec une moyenne de 10 à 100 copies de génome viral [96]. Cette disparité influence également la capacité de réactivation virale au sein de chaque neurone : les neurones hébergeant un plus grand nombre de copies de génome viral sont plus aptes à réactiver [97].

2.4.2 Réactivation

Sous l'influence de divers stimuli tels qu'une exposition aux rayonnements UV, la chaleur, les autres causes de stress neuronal, une baisse de l'immunité locale ou systémique, une inflammation locale, la latence (qui est définitive chez certains hôtes expérimentaux) peut être interrompue avec reprise du cycle réplicatif : c'est la réactivation. Il semble que le stress cellulaire soit essentiel pour initier l'expression des gènes d'HSV-1 au niveau du ou des neurone(s) au sein du(des)quel(s) se produit ce phénomène [98]. La reprise du cycle viral conduit à la synthèse de capsides virales matures qui sont transportées de façon antérograde le long des axones/dendrites jusqu'aux sites périphériques. Les virions sont alors libérés et se répliquent dans ces tissus périphériques, ce qui se traduit par la **récurrence**, qui est la traduction clinique de la réactivation (**Figure 1**).

Les mécanismes conduisant à la réactivation virale sont très différents de ceux d'une infection *de novo*, même si les conséquences *in fine* sont identiques, c'est-à-dire l'initiation de la phase lytique. La réactivation virale présente deux différences majeures en comparaison à l'infection *de novo*. Tout d'abord, le génome viral est associé à une structure chromatinienne plus compacte, et de nombreuses modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour permettre une dé-répression de l'expression des gènes viraux [99]. De plus, les activateurs transcriptionnels provenant de facteurs du tégument, tels que VP16, sont absents. La réactivation repose donc sur des mécanismes alternatifs à ceux de l'infection *de novo*.

La réactivation virale se décompose en deux phases décrites grâce à des modèles *in vitro (cf. 2.5.1)* : la première phase, ou phase d'animation, correspond à la transcription simultanée des gènes IE, E et L sans qu'il y ait de réplication de l'ADN viral. Plusieurs protéines virales sont alors synthétisées, dont VP16 [100] (**Figure 8**). L'expression des gènes viraux lors de cette phase est indépendante de la présence de VP16 et peut s'effectuer en présence d'inhibiteurs d'histones déméthylases, ce qui indique que la transcription virale peut s'accomplir sans le retrait des modifications répressives sur les histones [98].

La phase suivante (dite de synthèse), est enclenchée lorsqu'une quantité suffisante de protéines virales est accumulée [100]. L'expression des gènes viraux est alors similaire à la cascade régulée de l'expression des gènes viraux observés lors de la primo-infection (**Figure 8**). La réplication du génome viral aboutit à la production de particules virales infectieuses. La phase de synthèse dépend de l'activité de VP16, et s'accompagne du remodelage de la chromatine sur le génome viral. La synthèse de VP16 *de novo* est indispensable pour l'initiation efficace de la reprise du cycle lytique dans les neurones lors de la réactivation [101]. Cette protéine virale joue un rôle de déclencheur de la réactivation sur un modèle murin, la protéine ICP0 étant quant à elle nécessaire pour la progression vers un cycle productif. VP16 et ICP0, sont d'ailleurs étroitement impliquées dans le remodelage de la chromatine. VP16 permet de recruter des remodeleurs de chromatines, tels que CBP et p300, sur les promoteurs viraux des gènes lytiques [102]. Elle a ainsi un rôle actif dans le relâchement de la structure chromatinienne sur les promoteurs des gènes lytiques.

ICP0 influe également sur la régulation de l'état de la chromatine virale. Cette protéine induit une perte des marques d'hétérochromatines (méthylation de H3K9) sur le génome viral. Elle est aussi associée à une augmentation des marques d'euchromatine (acétylation) sur les histones présentes au niveau des promoteurs des gènes lytiques [103]. L'interaction d'ICP0 avec des histones déacétylases [104] ainsi qu'avec des composants du complexe de répression transcriptionnelle CoREST/REST [105] induit une perte de l'activité inhibitrice de ces protéines cellulaires et une augmentation de l'activité transcriptionnelle virale.

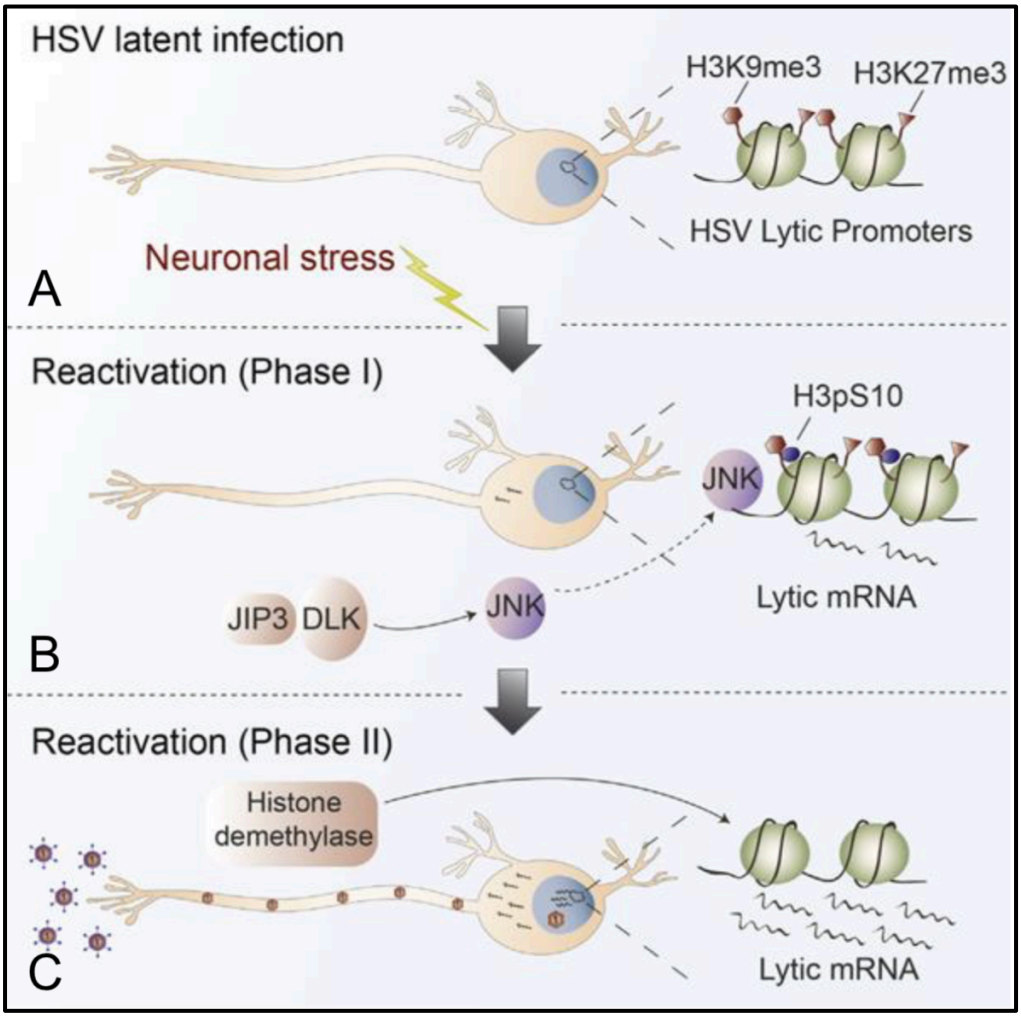


Figure 8, d'après [98] : Les 2 phases de la réactivation, A) Latence : les promoteurs des gènes lytiques sont associés à des marques d'hétérochromatines (H3K9me3, H3K27me3), avec répression de leur transcription. B) Première phase de de réactivation : activation de la cJun N-terminal kinase (JNK). La JNK phosphoryle les histones sur les promoteurs des gènes lytiques. La dé-répression permet une transcription simultanée des gènes IE, E et L sans réplication de l'ADN viral. C) Seconde phase de la réactivation : remodelage de la chromatine par des histones déméthylases, conduisant à la transcription régulée des gènes viraux et *in fine* à la production de particules virales infectieuses.

2.5 Modèles d'études du cycle d'HSV-1

2.5.1 Modèles *in vitro*

La première modélisation *in vitro* de la latence d'HSV-1 a été effectuée sur des neurones des ganglions spinaux embryonnaires de rats [106]. Après culture dans un milieu contenant de l'ACV (visant à réprimer le cycle lytique) et infection *ex-vivo*, les neurones contenaient du génome d'HSV-1 sans particule virale infectieuse ni ARN de protéines de la phase lytique avec une accumulation nucléaire de LAT. Plus tard, 2 autres groupes ont mis au point des systèmes ayant les avantages de

i) permettre l'étude de populations neuronales pures, ii) la possibilité d'infecter quasiment toutes les cellules en culture et iii) de pouvoir servir de plateformes pour tester l'effet de petites molécules iv) de suivre l'alternance latence/réactivation de manière longitudinale.

Dans le premier, les neurones de ganglions spinaux embryonnaires de rats sont infectés en présence d'ACV [100]. Après quelques jours, les neurones restants présentent les caractéristiques d'une infection latente. C'est ce modèle qui a permis de montrer que la réactivation pouvait être envisagée en 2 phases, tel que nous l'avons vu plus haut [107].

Le second implique des neurones de TG murin, a l'avantage d'être plus représentatif des différents phénotypes de neurones sensitifs présents dans le TG humain [108] et ne nécessite pas l'utilisation d'ACV.

2.5.2 Modèles animaux : généralités

Les expérimentations sur HSV-1 chez l'animal sont indispensables pour mieux comprendre la globalité des interactions complexes entre l'hôte et le virus, et ses implications dans l'alternance latence/ réactivation. En effet, les *Alphaherpevirinae* sont parmi les virus mammifères les plus anciens, qui ont co-évolué avec leurs hôtes naturels depuis plusieurs millions d'année [109]. Ce niveau d'adaptation a été nécessaire pour l'établissement d'une infection persistant tout au long de la vie de l'hôte, mais également pour établir des relations étroites entre le virus et son hôte au niveau moléculaire. Néanmoins, les *Alphaherpevirinae* peuvent être utilisés pour infecter expérimentalement un certain nombre d'espèces différentes de leur hôte naturel.

Les animaux les plus fréquemment utilisés pour étudier l'infection herpétique *in vivo* sont la souris et le lapin. L'étude de la latence / réactivation est plus aisée chez la souris car dans ce modèle, le virus ne se réactive pas spontanément, contrairement à ce qui est observé chez le lapin (multiples réactivations subintrantes). Chez la souris, la réactivation de HSV-1 peut en revanche être induite, notamment suite à un stress thermique [110], un traitement par butyrate de sodium (qui inhibe l'histone dé-acétylase [111]) ou encore par la mise en culture des organes infectés (explants) de façon latente (réactivations *ex vivo*) [112 113].

Le modèle murin le plus utilisé dans la littérature repose sur une primo-infection par scarification cornéenne puis adsorption d'une suspension virale sur la cornée lésée. Dans ce modèle,

certains marqueurs de réplication virale, tels que des transcrits viraux codant des protéines IE, E et L de la phase lytique, peuvent persister bien au-delà de la phase de primo-infection. Ils sont régulièrement retrouvés lors de la phase de latence précoce (28 jours post inoculation, J28 p.i.) et même à des temps de latence plus tardifs (J100 p.i.) [114]. Ce modèle ne parait donc pas le plus adéquat pour étudier les phénomènes de latence / réactivation, eu égard à la présence persistante et paradoxale de ces marqueurs de réplication virale à des temps où ils devraient avoir disparus. En outre, la primo-infection par scarification cornéenne est très éloignée des conditions de l'infection humaine, puisque chez l'homme, la primo-infection passe presque exclusivement par une inoculation orale (**cf 1.1**) [1].

2.5.3 Le modèle murin oro-oculaire

Notre équipe d'accueil a développé un modèle murin d'infection herpétique oro-oculaire (OO), qui présente l'avantage unique de reproduire en grande partie l'histoire naturelle de l'infection chez l'homme : primo-infection par voie orale (inoculation labiale) puis latence du virus dans les deux TG, comme chez l'homme. De plus, les atteintes oculaires (notamment les réactivations) ne sont observées que d'un côté (celui de l'inoculation), alors même que du génome viral latent est bien retrouvé dans les deux TG de façon symétrique en phase d'infection latente (sans expression protéique), associés à des LAT [60].

Pathogénèse virale et propagation du virus dans le modèle murin oro-oculaire

Le modèle murin d'infection herpétique OO a été décrit initialement avec la souche sauvage SC16 de HSV-1, isolée à partir d'un patient par Hill et al. en 1975 [115]. Plusieurs des résultats acquis depuis l'ont été avec des souches génétiquement modifiées à partir de cet arrière-fond génétique. Après inoculation dans la lèvre supérieure gauche, le virus se propage sur les fibres nerveuses sensitives, pour atteindre le TG gauche (ipsilatéral au côté d'inoculation) à J4 p.i. Les neurones du TG sont responsables de l'innervation sensitive de la face et correspondent au site principal de la latence de HSV-1, c'est pourquoi nos études sont centrées principalement sur cet organe nerveux. Le virus peut ensuite se propager depuis le TG gauche vers le système nerveux central (SNC), où HSV-1 peut être détecté par immunomarquage à partir de J6 p.i. [116]. A cette date, le noyau du tractus solitaire, l'area postrema, le locus coeruleus et l'hypothalamus, tous connectés au système trigéminal, sont

infectés des deux côtés. Suite à l'infection bilatérale de ces structures médianes, le virus se propagerait vers le TG droit (controlatéral au site d'infection) où il est retrouvé à J6 p.i. Par ailleurs, depuis les TG, le virus migre de façon antérograde vers le ganglion ciliaire puis l'œil. Dans notre modèle, les animaux présentent des signes généraux d'infection à partir de J4 p.i., puis des signes d'infection oculaire (mydriase, opacités ulcères et néovascularisation cornéenne, blépharite) entre J6 et J10 p.i., mais uniquement du côté de l'inoculation **(Figure 9).**

Figure 9 : Signes cliniques oculaires dans le modèle oro-oculaire. A) Néovascularisation cornéenne. B) Ulcère cornéen avec opacification, croûtes et blépharite. C) Ulcère avec néovascularisation.

Le virus pourrait aussi directement atteindre théoriquement le TG droit via la propagation le long des fibres sensitives innervant la bouche, suite à une multiplication virale locale au site d'inoculation niveau (lèvre supérieure gauche) avec passage de virus dans la salive puis dans des zones buccales connectées au TG droit.

Cependant, même si cette voie de diffusion est possible, elle n'est certainement pas majoritaire dans la mesure où l'injection du virus dans la lèvre gauche est faite en profondeur (sous cutanéomuqueuse), limitant ainsi la propagation virale dans la sphère buccale.

Par ailleurs, les sites d'infection herpétique dans les jours qui suivent l'inoculation sont difficilement compatibles avec une diffusion par voie hématogène car tous les essais d'inoculation

intraveineuse de virus chez la souris et le lapin ont conduit à des atteintes principalement hépatiques et pulmonaires, mais une diffusion très limitée (voire absente) dans le système nerveux central [117-119]. De ce fait, la propagation du virus dans les TG et dans le SNC dans notre modèle ne résulte probablement pas de la diffusion hématogène du virus, et les zones cérébrales atteintes sont toutes connectées aux voies trigéminées ou sympathiques connectées à la bouche, sans atteinte primitive du cerveau, comme cela est observé dans les exceptionnelles encéphalites virales.

Le virus se propage de façon simultanée, le long des voies sympathiques jusqu'au ganglion cervical supérieur (SCG) gauche où il arrive dès J2 p.i. (**Figure 10**). Il se propage ensuite jusqu'à la colonne intermédiolatérale (IML) dans la moelle épinière gauche (entre J6 et J8 p.i), puis droite entre J8 et J10. Depuis l'IML, le virus gagne le SCG droit et infecte différentes structures du SNC de manière bilatérale, les noyaux du tractus solitaires les noyaux paraventriculaires, supra chiasmatiques et amygdaloïdes de l'hypothalamus et la *zona incerta*. Il est à noter que plusieurs de ces structures sont aussi liées à la rétine, de façon directe, ce qui pourrait expliquer la survenue d'atteintes rétiniennes en clinique humaine [20].

La propagation du virus depuis la lèvre est expliquée par la capacité du virus à se propager selon le réseau transynaptique (réseau de neurones connectés entre eux par des synapses). Mais il faut également prendre en compte la propagation entre deux neurones adjacents situés dans une même structure anatomique mais sans connexion synaptique (transfert local), en particulier par le biais d'une infection des cellules gliales [20].

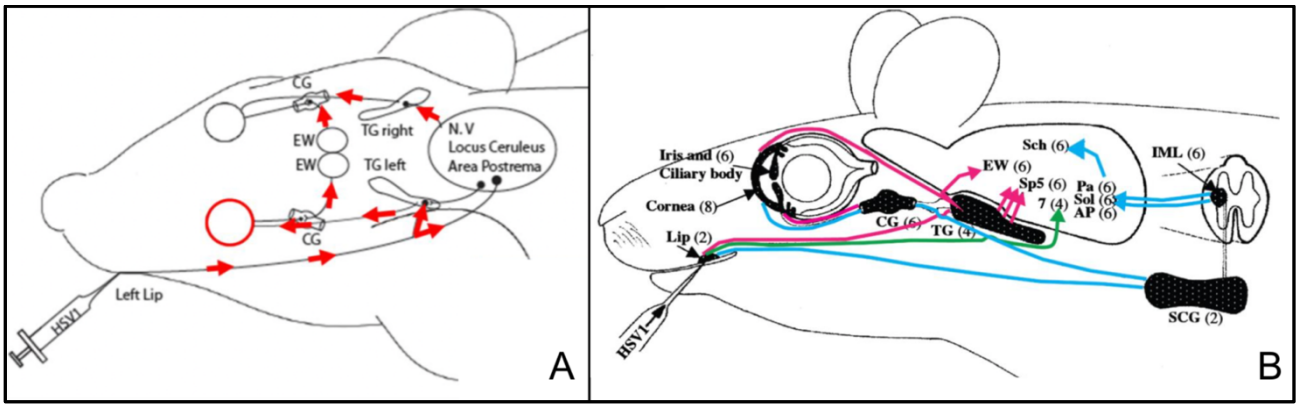


Figure 10 : Voies de propagation nerveuses de HSV-1 dans le modèle murin oro-oculaire. A) Voies sensitives de propagation suite à une inoculation labiale gauche (flèches rouges). Le virus infecte d'abord le TG gauche, puis se propage dans l'area postrema, le noyau du tractus solitaire, le locus coeruleus avant d'atteindre le TG droit. Il peut également emprunter une voie alternative en se propageant à des zones de la sphère buccale connectée au TG droit, induisant ainsi sa propagation dans cet organe. B) Ensemble des voies de propagation virales. Les voies nerveuses autonomes sont représentées en bleu, les voies sensitives en rose et les voies motrices en vert. (SCG : ganglion cervical supérieur ; IML : colonne intermédiolatérale ; AP : area postrema ; Sol : noyau du tractus solitaire ; Pa : noyau paraventriculaire ; Sch : noyau suprachiasmatique ; Sp5 : noyau du tractus spinal trigéminal ; CG : ganglion ciliaire ; EW : noyau d'Edinger-Westphal). D'après [120].

Latence dans le modèle oro-oculaire

Les sites de latence sont identifiés dans ce modèle par l'expression des LAT en l'absence de production de particules virales infectieuses à J28 p.i. L'expression des LAT peut être détectée par hybridation *in situ* sur des coupes de souris infectées par la souche sauvage SC16 ou par la souche modifiée LβA (le gène *LacZ* étant inséré dans le locus LAT) [116 120]. L'utilisation de ces deux souches a permis de montrer que HSV-1 peut entrer en latence dans de nombreux sites neurologiques, et plus particulièrement dans les tissus à la fois connectés à la sphère oropharyngée et à la sphère oculaire. Ainsi, tous les tissus neurologiques ayant hébergé du virus lors de la phase aiguë sont susceptibles d'héberger du génome viral latent. Ces données ont été complétées par des études en PCR quantitative. Le nombre de copies d'ADN viral latent et surtout celui des transcrits LAT varient considérablement en fonction du tissu étudié [60 61]. Ainsi, l'expression des LAT est nettement plus importante dans les neurones sensitifs du TG, que dans les neurones sympathiques du SCG, moteurs du noyau du nerf facial ou encore dans les neurones de l'hypothalamus. Cette disparité se retrouve également entre les TG gauche et droit : alors que la charge virale latente (nombre de copies de génomes) est statistiquement similaire entre les deux TG, la production des LAT est plus

importante du côté inoculé (côté gauche), de même que le nombre de neurones exprimant ces LAT [60 61]. Or, l'expression de ces derniers est étroitement associée à la possibilité ultérieure de réactivation virale. A l'inverse, une infection herpétique sans expression des LAT est considérée comme peu réactivable [79].

2.6 Rôle des corps nucléaires PML dans l'alternance latence / réactivation

Les corps nucléaires PML ou PML-NB (parfois retrouvés sous le terme ND10) ont un rôle essentiel dans la régulation de l'alternance latence / réactivation. Ils font l'objet d'une attention très particulière dans la communauté scientifique.

Comme expliqué plus haut, dès son entrée dans le noyau des cellules infectées, l'ADN viral se circularise et se localise au niveau des PML-NB [54], habituellement associés à une répression des séquences géniques situées dans leur environnement [55]. Les PML-NB sont constitués de la protéine PML, mais également de la protéine sp100, des protéines Daxx et ATRX (des protéines chaperonnes impliquées dans l'assemblage des histones 3.3 sur la chromatine) [121].

Au cours de la phase de réplication et en début de réactivation, la protéine ICP0 de HSV-1 induit la transcription du génome viral en activant la dégradation PML-NB (et notamment certains de leurs composants tels que la protéines sp100). A l'inverse, le nombre de PML-NB augmente sous l'effet de l'IFN de type I [54].

L'interaction des PML-NB avec le génome d'HSV-1, les interactions entre ces structures nucléaires, les protéines virales, les IFN ont été décrites beaucoup plus en détail [122-124]. Les mécanismes biologiques cellulaires intimes de ces interactions a en effet constitué la thématique de recherche de l'équipe de Patrick Lomonte (CNRS, Lyon), depuis plusieurs années. Nous avons eu la chance de collaborer à ces travaux, qui se sont notamment appuyés sur le modèle OO développé dans notre équipe. Nous verrons ci-dessous rapidement les résultats des trois dernières études publiées sur le sujet.

Première étude : le positionnement du génome d'HSV-1 et son association avec les PML-NB régule la transcription de LAT en phase de latence

En combinant des approches d'hybridation *in situ* avec des sondes d'ARN de LAT fluorescents et de microscopie en haute résolution, sur 2 modèles murins (le modèle OO, ainsi qu'un modèle d'infection par scarification cornéenne), Catez *et al.* ont d'abord décrit deux types de distribution nucléaire des génomes viraux **en latence** (à J28 p.i.) : présence d'un génome unique (modèle *single latent*) ou bien de génomes multiples (*multiple latent*) (**Figure 11)** [122].

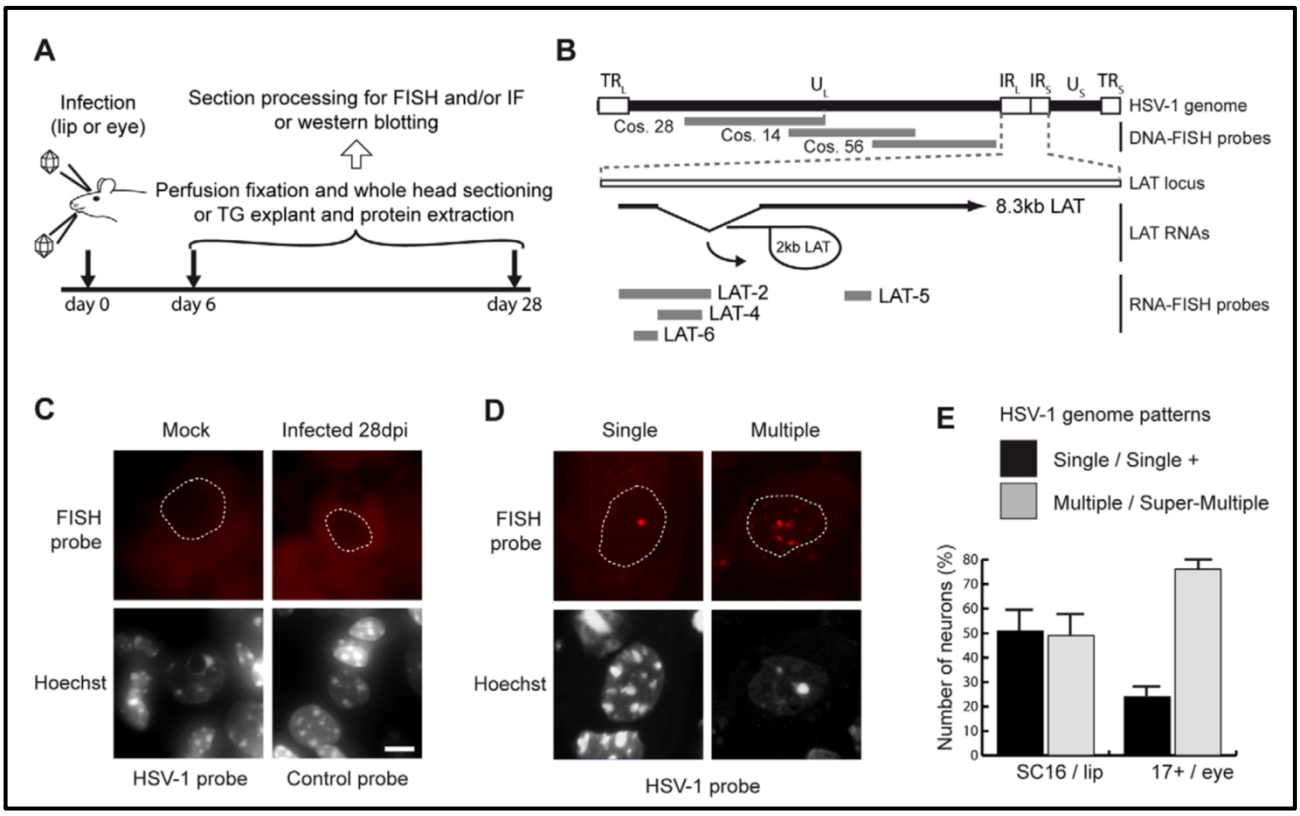


Figure 11, d'après [122] : Détection *in situ* du génome de HSV-1 sur des sections de TG de souris infectées à la phase de latence. A) Modèles d'infection latente, oro-oculaire ou par scarification cornéenne. B) Représentation schématique du génome d'HSV-1 et du locus de LAT et des sondes d'hybridation in situ. C) Contrôles d'hybridation *in situ* sur des souris non infectées. Les pointillés indiquent la position du noyau. D) Les modèles de génome viraux unique (*single latent*) et multiple (*multiple latent*) au sein des noyaux. E) proportion des 2 modèles en fonction des modèles murins d'infection utilisés.

L'imagerie cellulaire en microscopie à fluorescence confirmait l'association des génomes viraux aux PML-NB (**Figure 12**).

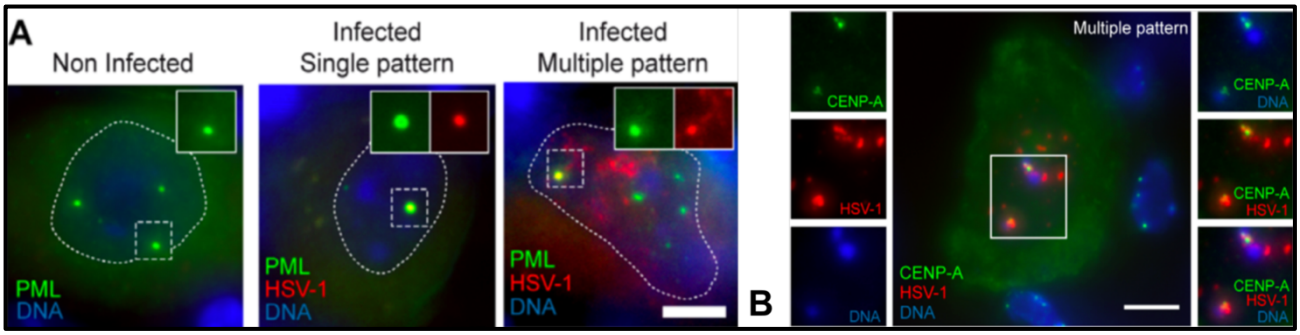


Figure 12, d'après [122] : Coupes sur TG de souris à J28 p.i. de l'inoculation labiale. A) Co-localisation en immuno-FISH du génome d'HSV-1 et des protéines PML dans le noyau B) Co-localisation du génome d'HSV-1 et des centromères.

La reconstruction en 3D des images a permis de déterminer que dans la configuration *single latent*, les génomes viraux sont entourés par les protéines répressives PML, mais également Daxx et ATRX. Dans cette configuration, il n'y a pas (ou très peu) d'expression de LAT. En revanche, dans la configuration *multiple latent*, la distribution des génomes est plus hétérogène : les génomes viraux sont soit associés aux centromères ou aux PML-NB, soit non associés (**Figure 13**).

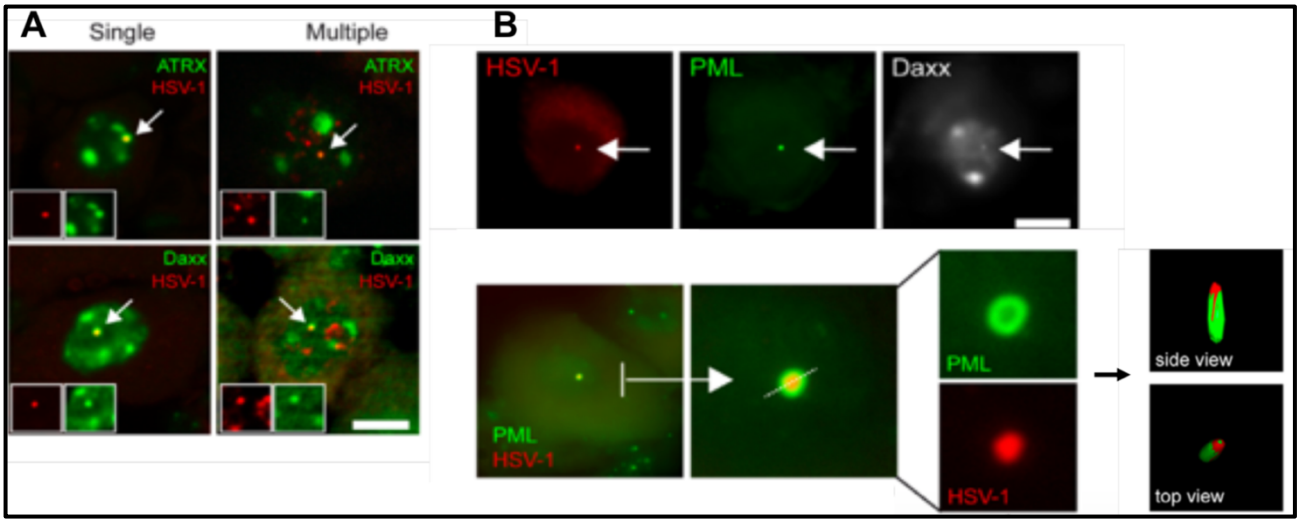


Figure 13, d'après [122] : A) Coupes de TG de souris infectées à la phase latente colorée par immuno-DNA-FISH avec de anticorps anti-ATRX, anti-Daxx et une sonde d'ADN d'HSV-1. Le génome d'HSV-1 est associé aux composants majeurs des PML-NB. B) Analyse en microscopie confocale d'un PML-NB contenant le génome de HSV-1 montrant que l'AND est à l'intérieur du PML-NB (Mesure de la fluorescence en 2D et reconstruction en 3D).

Pendant la phase d'établissement de la latence (entre J6 et J28 p.i.), une augmentation du nombre de PML est observée dans les TG de souris infectées. L'expression des LAT est augmentée dans les noyaux avec génomes multiples, ce qui confortait d'une part l'hétérogénéité de cette

expression, et sa relation avec le nombre de copie de génome viral. Enfin, à l'aide de souris KO pour PML, Catez *et al.* ont confirmé le rôle des PML et des PML-NBs dans le développement des 2 types de distribution des génomes nucléaires et leur rôle sur l'expression de LAT.

Cette étude montrait donc que des domaines nucléaires impliquant les PML-NBs et les centromères sont impliqués dans le contrôle de la latence, et jouent un rôle clef dans les interactions hôte/virus.

- Seconde étude : L'établissement de la latence est déterminé par les interactions du génome avec l'environnement nucléaire

Dans ce travail, Maroui et al. se sont intéressés plus particulièrement à **la phase aigüe**, et donc aux phénomènes liés à **l'établissement de la latence** [124]. Avec des outils similaires, et en utilisant le modèle OO, ils ont montré qu'à la phase aigüe, les génomes viraux ont également 2 types de distribution nucléaire : des compartiments de réplication uniques ou bien des localisations multiples et disséminées dans le nucléoplasme (« *multiple acute* »), similaires à ceux retrouvés en phase d'infection latente. Dans le type *multiple acute*, les génomes viraux sont constamment associés à la protéine PML dans des PML-NB contenant de l'ADN viral (nommées vDCP-NB pour *viral DNA containing* PML-NB). Afin de déterminer les facteurs viraux et cellulaires favorisant la distribution du génome associé à la latence, ils ont utilisé des souris sauvages ou KO pour le récepteur de l'IFN de type I, et un virus sauvage ou délété pour ICP4 (une protéine IE considérée comme un transactivateur viral majeur de HSV-1). Ils ont montré que l'incapacité du virus à initier un cycle lytique, combiné à son incapacité à synthétiser ICP0 étaient les 2 facteurs viraux essentiels à la formation des vDCP-NB. De plus, la formation des localisations multiples (*multiple acute*) est favorisée par la voie de l'IFN de type I. Enfin, l'analyse de TG humains infectés de façon latente a retrouvé une organisation des génomes viraux similaire à celle observée chez la souris, et notamment de la formation de vDCP-NB. Cette étude confortait le rôle majeur des PML-NB dans l'établissement et le contrôle de la latence chez l'homme.

- Troisième étude : Les PML-NB induisent une chromatinisation et donc la latence du génome d'HSV-1 via une interaction avec l'hisone 3.3 et ses protéines chaperonnes

- Dans ce travail, Cohen et al. sont allés encore plus en profondeur dans la mécanistique de cette régulation épigénétique et du rôle des PML-NB [123]. Ils ont utilisé pour cela un modèle *in vitro* d'infection de fibroblastes dans lesquels HSV-1 ne peut se répliquer. Ils ont montré que les vDCP-NB contiennent les histones H3.3 associés à 2 complexes de protéines chaperonnes de ces histones (le complexe DAXX/ATRX et le complexe HIRA). Ils ont ensuite vérifié qu'HIRA était également associé avec les vDCP-NB *in vivo*, en l'occurrence dans les neurones des TG de souris infectées à la phase latente. De plus, les vDCP-NB associés aux génomes latents étaient chromatinisés exclusivement avec un H3.3 triméthylé sur K9, indiquant une interaction des chaperonnes de H3.3 avec de multiples loci viraux et un silençage transcriptionnel de HSV-1. Seule une inactivation simultanée des 2 complexes de chaperonne de l'histone 3.3 (le complexe DAXX/ATRX et le complexe HIRA) avait un impact sur la fixation d'H3.3 sur le génome viral. En revanche, la déplétion de PML (étude sur TG infectés de souris $PML^{-/-}$) impactait directement la chromatinisation du génome viral avec H3.3. Les auteurs confirmaient par ailleurs que les génomes viraux contenus dans les vDCP-NB ne sont pas définitivement réprimés dans la mesure où la déstabilisation des vDCP-NB par ICP0 permet la reprise d'un cycle réplicatif. Cette étude a donc démontré l'existenc e d'une régulation spécifique de la chromatinisation du génome viral dans les vDCP-NB, dépendante de H3.3, et impliquant ces 2 complexes (DAXX/ATRX et HIRA). Le rôle des PML-NB dans la régulation de l'alternance latence-réactivation passe donc par une chromatinisation du génome d'HSV-1 impliquant l'histone 3.3 et ses chaperonnes.

3 La réponse immunitaire anti-HSV-1

3.1 Réponse immune innée anti-HSV-1

Comme vu en **1.1 et 1.2**, la grande majorité des primo-infections par HSV-1 est asymptomatique. Cette constatation clinique suggère que les infections par HSV-1 peuvent être rapidement et efficacement reconnues et prises en charges par la réponse innée, et ce bien avant qu'une réponse spécifique soit établie [125].

3.1.1 Réponse interféron

La réponse IFN joue un rôle primordial dans l'immunité anti-HSV-1. Bien que les IFN de type I (α et β) soient les principaux effecteurs, les IFN de type II (γ) et de type III (λ) ont également leur importance.

Le rôle essentiel de la réponse IFN est d'ailleurs corroboré par l'identification de défauts dans la voie de signalisation de l'IFN de type I dans des familles de patients souffrant d'infections sévères et/ou particulièrement fréquentes à HSV-1, notamment d'encéphalites herpétiques [126]. Cette voie de signalisation est activée par la reconnaissance de PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) par des détecteurs ou « senseurs » regroupés sous le terme de PRR (*Pathogen Recognition Receptors*).

Senseurs membranaires d'HSV-1

Plusieurs types de PRR peuvent détecter l'infection à HSV-1 (**Figure 15**) [127 128]. Les TLR sont des senseurs membranaires reconnaissant des acides nucléiques viraux ou des protéines virales.

Les **TLR2**, présents à la surface des cellules, reconnaitraient certaines glycoprotéines d'enveloppe d'HSV-1 (non identifiées). Ce mécanisme serait mis en jeu dans les cellules microgliales du système nerveux central (cerveau et TG notamment) [128 129].

Les **TLR3** sont présents dans les endosomes, et reconnaissent des ARN double brins qui correspondent, dans le cas d'HSV-1, à des ARNm complémentaires transcrits à partir de séquences codantes orientées dans des directions opposées, ou des structures doubles brins formées à partir d'ARN simple brins [128]. Leur implication est essentielle dans le SNC, des mutations de TLR3 ayant

été mises en évidence dans des familles de patients sujets aux encéphalites herpétiques [11].

Les **TLR9** sont présents dans les endosomes, et en particulier dans les cellules dendritiques plasmactyoïdes, et notamment dans le TG. Ils reconnaissent l'ADN double brin d'HSV-1 [129].

Senseurs cytosoliques

Certains détectent l'ARN viral, c'est le cas de RIG-I (*Retinoic acid- Inducible Gene I*) ou MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein* [128]. D'autres détectent l'ADN viral, tels que DAI (*DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors*) et IFI16 (*Interferon gamma inducible protein* 16), mais également - Ku70, l'ARN polymérase de type III, les protéines DDX60 / DHX36 / DHX9 (*DEAH box proteins 9 / 36)* [128], et le système cGAS/STING (*cGMP–AMP synthase (cGAS)–stimulator of interferon genes (STING)*) récemment impliqué dans la détection d'HSV-1 par la microglie cérébrale [130].

Senseurs nucléaires

Les structures PML-NB peuvent être considérés comme des senseurs nucléaires. Les travaux menés par Alandijani *et al.* à l'aide de virus mutants ont montré qu'à faible multiplicité d'infection (MOI), et en l'absence d'ICP0 (inhibiteur des PML-NBs), les PML-NBs trappent l'ADN viral, bloquent la réplication dès leur entrée dans le noyau, et déclenchent les ISGs, indépendamment des senseurs cytoplasmiques tels qu'IFI16, démontrant que l'entrée du virus dans le noyau et suffisante pour induire une réponse innée robuste. A plus forte MOI, les complexes ADN viral / PML-NB et ADN viral / IFI16 s'associent à ICP4 et induisent des gènes inductibles par l'IFN (ISG pour *IFN inducible genes*), mais dépendent de l'activité de l'ADN polymérase virale. Ces données indiquent donc un rôle double des PML qui dépendent de l'entrée dans le noyau et de la réplication virale [131].

Suite à l'activation de ces PRR, une cascade de signalisation est enclenchée, aboutissant à la production d'INF de type I, mais également de type III, tel que l'IFN λ, de chimiokines (CXCL10) et de cytokines inflammatoires telles qu'IL6, IL12 et TNF-α (**Figure 14**) [128].

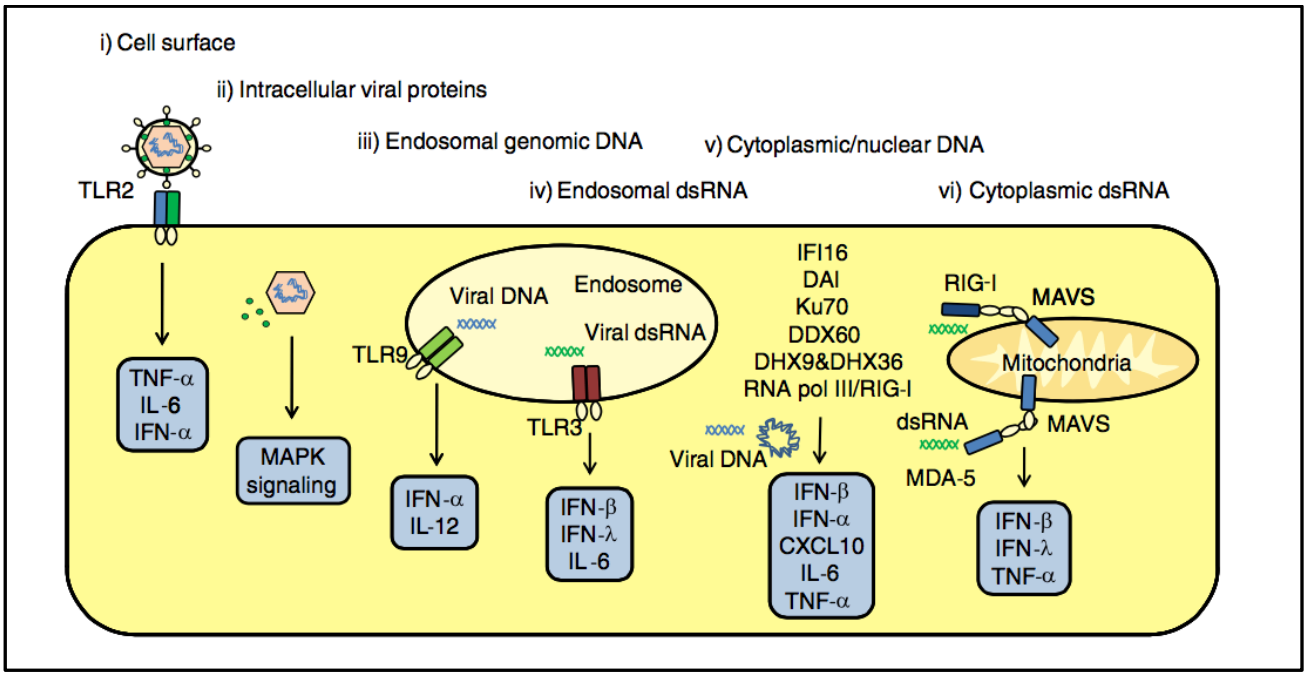


Figure 14 : Immunité anti-HSV-1 : du *sensing* aux cytokines, d'après [128].

Les **IFN de type I** sont relargués dans le milieu extracellulaire et se lient à leurs récepteurs composés de deux sous-unités, l'IFNAR1 et IFNAR2 (*Interferon-Alpha/Beta Receptors*). Cette liaison induit l'initiation de la voie JAK/STAT, et conduit à l'expression de multiples ISGs établissant ainsi un état réfractaire à l'infection virale. Les protéines codées par ces ISGs ont de nombreuses fonctions, incluant l'inhibition de l'expression de protéines virales, l'apoptose et le recrutement de cellules du système immunitaire au site d'infection.

L'activation du récepteur de **l'IFN de type III**, composé des sous-unités IL-10R2 et IFNLR1, qui active aussi la voie JAK/STAT et présente donc des conséquences biologiques similaires à celles des IFN de type I. Ainsi, le traitement des astrocytes et neurones humains par l'IFN-λ avant infection par HSV-1 inhibe la réplication du virus [132]. Le blocage du récepteur de l'IFN-α/-β par un anticorps spécifique dans ces cellules compromet l'action de l'IFN-λ sur l'inhibition de HSV-1. De ce fait, il semblerait que l'IFN-λ induise une réponse antivirale dans les cellules neuronales via l'induction de l'IFN de type I.

L'IFN-γ (type II) est produit par les cellules *Natural Killer* (NK) (réponse innée) et les lymphocytes T (réponse adaptative). Il agit également dans le contrôle de l'infection herpétique. Les souris KO pour l'IFN-γ ou pour son récepteur présentent une capacité réduite à contrôler l'infection

par HSV-1. Elles présentent une plus forte mortalité, une infection aiguë prolongée et une plus grande incidence de réactivations virales [133]. L'IFN-γ peut inhiber directement la réplication du virus, mais des études *in vitro* montrent que cette inhibition est relativement faible [134]. Pour inhiber efficacement la réplication d'HSV-1, l'IFN-γ doit agir en synergie avec les IFN de type I (α et β). A titre d'exemple, le traitement de cellules épithéliales avec de l'IFN-β ou -γ inhibe la réplication de HSV-1 d'environ 20 fois alors que le traitement combiné avec ces deux types d'IFN l'inhibe plus de 1000 fois [134]. De plus, le pré-traitement des souris avec les deux types d'IFN avant l'infection par HSV-1 réduit la réplication virale à des niveaux quasiment non détectables et protège de la pathogénie induite par le virus. Lors d'une infection herpétique sur un modèle murin utilisant des souris C57/BL6, la production d'IFN-γ dépend des TLR 2 et 9 [129]. Réciproquement, l'IFN-γ stimule l'expression des TLR 3 et donc l'activité antivirale dans les kératinocytes [135].

La protéine PML est considérée comme une ISG. Son expression est de ce fait augmentée par l'IFN [136]. Nous avons abordé en **2.3** et en **2.6** le rôle de cette protéine et des PML-NB sur la répression des gènes viraux [137]. Cependant, lors de l'infection à HSV-1, les PML-NB se désagrègent, et la protéine PML est dégradée. Nous aborderons ce mécanisme de résistance du virus face à la réponse immune innée en **3.1.4**.

3.1.2 Rôle des cellules *Natural Killer* dans l'immunité innée anti-HSV-1

3.1.2.1 Rappels sur les cellules *Natural Killer* (NK)

Généralités

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux, avec un cytoplasme riche en granules lytiques, ayant une demi vie courte, de l'ordre de 2 semaines [138].

Elles sont caractérisées chez l'homme par l'expression des molécules CD56, FcγRIIIA/CD16 (CD16) et NKp46, et par l'absence d'expression de CD3, ce qui les distingue des LT. Chez la souris, les NK expriment CD335 (équivalent de KKp46), mais peuvent également être définies par le panel $CD45^+/Ly6G^-/CD11c^-/CD11b_{low}$ [139] (**Cf. tableaux 1 et 2**). Si les NK sont le plus souvent associées à l'immunité innée, elles peuvent toutefois occuper une position clé à l'interface entre la réponse innée et la réponse adaptative. Les NK sont capables de reconnaitre des cellules infectées par des virus sans exposition préalable aux antigènes viraux [140].

Activation des NK

Dans des conditions normales, les NK expriment des récepteurs inhibiteurs, tels que le récepteur KIR-L (*Killer Ig-like receptors*), ILT-2 et CD94/NKG2a qui reconnaissent normalement les molécules du CMH-I. Les NK deviennent fonctionnels quand les stimuli activateurs dépassent l'inhibition induite par le CMH-I. Les stimuli activent les récepteurs KIR-S, des récepteurs proches des KIR-L, mais de fonction opposée [138]. Une fois activées, les NK vont devenir effectrices par différents mécanismes que nous verrons ci-dessous.

Cytotoxicité directe des cellules NK

C'est la fonction des NK la mieux connue. Elle s'exerce par différents mécanismes, globalement similaires à ceux employés par les LTCD8$^+$. Suite à la reconnaissance de la cellule cible, la cellule NK dégranule : elle libère à la synapse immunitaire le contenu de ses granules cytoplasmiques, en particulier la perforine qui forme des pores dans la membrane de la cellule cible. D'autres mécanismes cytotoxiques conduisant à la mort de la cellule cible par apoptose sont possibles : interactions Fas (sur la cible) vs Fas ligand (sur la cellule NK), interactions TRAIL-TRAIL récepteur (*TNF apoptosis inducing ligand*), libération de Granzyme B, sécrétion de TNF-α.

Production de cytokines

Les cellules NK produisent en particulier de l'IFN-γ, mais aussi du TNF-α, de l'IL-10, du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) et les chémokines : CCL3/MIP-1α (CCL pour *C-C motif Ligand* et MIP pour *Macrophage Inflammatory Protein*), CCL4/MIP-1β et CCL5/RANTES (RANTES pour *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) [141] (**voir Chapitre II, Tableau 5**) . Ces chémokines participent : i) à la régulation de la réponse inflammatoire, par exemple par le recrutement et l'activation de macrophages et de cellules dendritiques, ii) au contrôle direct de la réplication virale par la production d'IFN-γ, iii) à l'orientation de la réponse adaptative.

Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC)

Les NK sont les effecteurs majeurs de l'ADCC (via le récepteur FcγRIIIA/CD16), qui constitue leur mécanisme d'action majeur pour reconnaitre et lyser les cellules infectées par HSV-1.

3.1.2.2 Rôle des NK dans l'immunité innée anti-HSV-1

A l'instar de la réponse IFN, le rôle des NK dans la défense contre les infections à HSV-1 est essentiel [125], et leurs déficiences exposent à des infections récurrentes et gravissimes [142 143]. En effet, l'infection par HSV-1 diminue des signaux inhibiteurs et/ou augmente des signaux activateurs de NK (IFN de type I, notamment). Si l'ADCC est le mécanisme anti-HSV-1 majeur des NK (**cf. réponse immunitaire adaptative, 3.3**), le rôle des NK dans l'infection à HSV-1 pourrait commencer bien avant l'établissement d'une immunité spécifique. Le rôle des protéines virales ou cellulaires directement reconnues par les NK reste toutefois controversé. Nous verrons ci-dessous les différents mécanismes potentiellement impliqués dans des interactions directes entre HSV-1 et les NK [125] (**Figure 15**).

Signaux de contact

Les signaux de contact déclenchés par les interactions entre les récepteurs des NK et des ligands cellulaires sont indispensables à la cytotoxicité des NK. Certaines études suggèrent que des glycoprotéines de surface d'HSV-1 (gB, gD, gH/gL) pourraient directement activer les NK. Toutefois, les résultats sont contradictoires selon les modèles expérimentaux, et restent donc à confirmer [125 144 145].

Complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I)

La présentation par le CMH-I requiert l'action de la protéine TAP (*transporter associated with antigen processing*) qui transfère les antigènes cytoplasmiques vers le RE où ils sont chargés sur les molécules du CMH-I et exportés à la surface de la cellule. La protéine ICP47 d'HSV-1 (codée par le gène Us12) inhibe TAP et diminue l'expression de surface du CMH-I dans les cellules infectées, ce qui aurait pour conséquence d'activer les cellules NK [125]. Toutefois, ICP47 ne se lie que très peu à la protéine TAP murine et ne bloque pas la présentation par le CMH-I chez la souris [146], ce qui rend cette voie d'activation des NK difficile à tester *in vivo* de façon expérimentale.

Récepteur NKG2D

Il s'agit d'un récepteur des NK impliqué dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales ou infectées par des virus. Les cellules NK de patients infectés par HSV-1 ont globalement des niveaux plus élevés de NKG2D (possiblement induits par les IFN de type I) ce qui pourrait les

sensibiliser, et annuler au passage l'effet de la diminution de NKG2D à la surface des cellules infectées par HSV-1 [125] (**cf. 3.1.5.2 Mécanismes d'échappement aux NK**).

Glycoprotéines D et B

La **gD** joue un rôle essentiel dans l'entrée d'HSV-1 dans la cellule, via les récepteurs nectine et HVEM (**cf. 2.3 HSV-1 : cycle réplicatif**). Cette dernière (qui appartient à la superfamille du TNF-α) est exprimée de manière ubiquitaire par les cellules immunes humaines et murines et module les fonctions des LT. Elle semble par ailleurs jouer un rôle dans la synthèse d'IFN-α. Le récepteur HVEM pourrait donc être considéré comme un senseur en plus d'être un médiateur d'entrée. Toutefois, les résultats expérimentaux sur le rôle de la gD et d'HVEM dans l'activation des NK sont contradictoires. En effet, si l'expression de gD rend les cellules de gliomes infectées par HSV-1 résistantes au NK [147], le blocage de gD ne modifie pas les réponses des NK *in vitro* [145]. Les rôles de la gD et d'HVEM dans l'activation des NK restent donc à éclaircir [125].

La **gB** joue un rôle dans l'attachement et la fusion d'HSV-1 avec la membrane cellulaire [148]. Des recherches *in vitro* ont montré que le blocage ou l'absence d'expression de cette glycoprotéine diminuait la lyse par les NK de cellules endothéliales infectées par HSV-1 [149]. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une interaction entre TLR2 et gB sur les NK, mais n'ont pas pu démontrer l'expression de TLR2 par les NK, et ne pouvaient donc pas éliminer une activation secondaire des NK par la synthèse d'IFN secondaire à l'interaction TKLR2-gB dans les cellules infectées. D'autres études restent donc nécessaires pour confirmer le rôle de la gB dans la reconnaissance des cellules infectées par les NK [125].

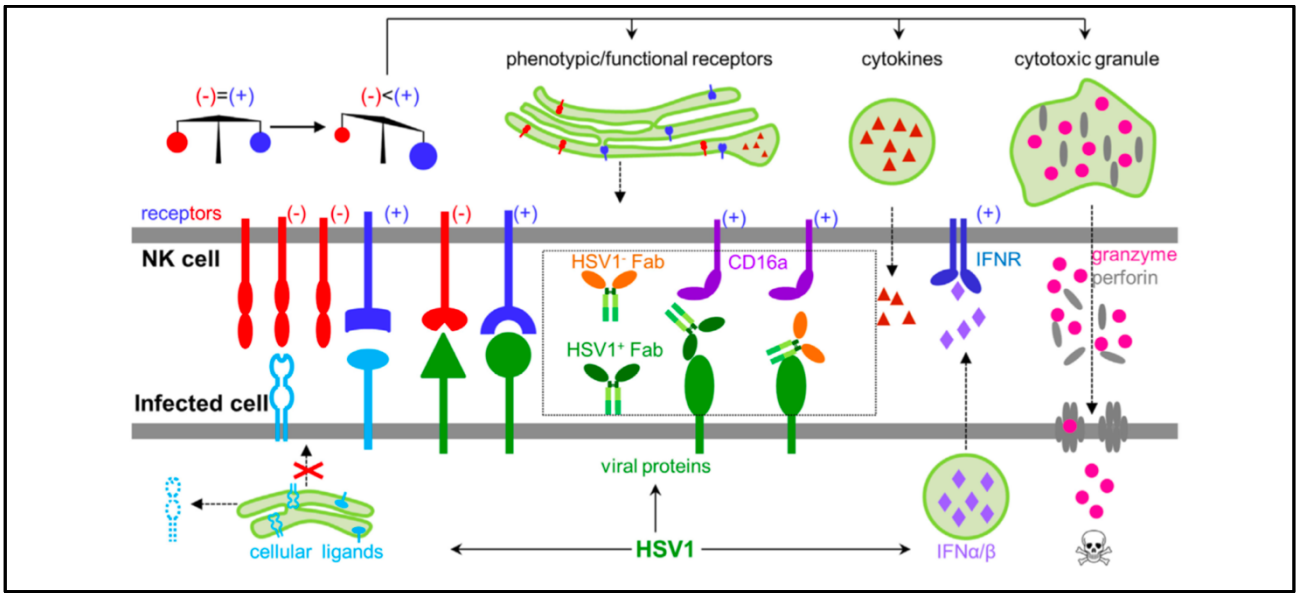


Figure 15, d'après [125]. Principes généraux de la régulation de l'activité des NK durant l'infection par HSV-1. Les NK expriment à leur surface des récepteurs inihibiteurs et activateurs qui régulent leur activité. L'infection par HSV-1 peut orienter la réponse via la sécrétion d'IFN-I qui augmente l'expression de ligands activateurs et diminuent les ligands inhibiteurs, ou par la présence d'anticorps qui vont mener à une prédominance des signaux activateurs sur les signaux inhibiteurs. Les NK activés sécrètent des cytokines, expriment des protéines fonctionnelles, et relarguent de la perforine et du granzyme pour détruire les cellules infectées.

Marqueurs de surface	Fonction biologique	Populations marquées chez l'homme	Populations marquées chez la souris
CD45	Protéine phosphatase	Cellules hématopoïétiques	Cellules hématopoïétiques
CD11b	Intégrine	Macrophages / monocytes / granulocytes / NK	Macrophages / monocytes / granulocytes / NK
CD11c	Récepteur du complément	DC	DC
CD56	Protéine d'adhésion (superfamille des Ig)	NK	-
CD335 (NKp46)	Récepteur d'activation de la cytotoxicité des NK	-	NK
CD16	Récepteur de faible affinité du fragment Fc des Ig (impliqué dans l'ADCC)	NK / macrophages / monocytes, PNN	-
Gr-1*	Fonction non définie. Gr-1 est exprimé par Ly6G et Ly6C	-	Monocytes / macrophages / DC / PNN
Ly6G	Non définie	-	PNN / PNE / PNB
Ly6C	Non définie	-	Monocytes / macrophages
CD3	Co-récepteur activant les LTCD4$^+$ et les LTCD8$^+$	LT	LT
CD4	Glycoprotéines de surface	LTCD4+ / monocytes / macrophages / DC / NK	LTCD4$^+$ / monocytes / macrophages / DC / NK
CD8	Co-récepteur activant les LTCD8$^+$	LTCD8$^+$	LTCD8$^+$
CD66b	Adhésion et activation des PNN	PNN	-
CD24	Protéine d'adhésion (sialoglycoprotéine)	PNN / LB / LT / monocytes / CD	PNN / LB / LT / monocytes / CD
CD64	Glycprotéine, récepteur aux Fc, impliquée dans l'ADCC	Monocytes, macrophages, DC, PNN activés	Monocytes, macrophages, DC

Tableau 1 : Principaux marquages de surface des cellules inflammatoires hématopoïétiques.

Type cellulaire	Principaux marqueurs de surface chez l'homme	Principaux marqueurs de surface chez la souris
LT	CD3	CD3
LTCD4$^+$	CD3, CD4	CD3, CD4
LTCD8$^+$	CD3, CD4	CD3, CD4
LB	CD19, CD20	CD45R, CD17, CD22
DC	CD11c, CD123	CD11c, CD123
NK	CD56	CD335
Macrophage/ monocyte	CD14, CD33	CD11b/Mac-1, F4/80
PNN	CD66b	Gr-1/Ly6G
PNE	CD66b CD15, CD125, CRTH2	Siglec-F, CD193

Tableau 2 : Principaux marquages de surface des cellules inflammatoires hématopoïétiques.

3.1.3 Rôle des neutrophiles dans l'immunité innée anti-HSV-1

3.1.3.1 Rappels sur les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Généralités

Les PNN sont des cellules myéloïdes dont le noyau est polylobé et le cytoplasme riche en granulations [150]. Chez l'homme, elles sont définies par la présence de CD66b et CD15 à leur surface et une granularité importante (*Side scatter* ou SCC élevé). Chez la souris, les PNN peuvent être définis en cytométrie en flux multiparamétrique par les marquages $CD45^+/Ly6G^+$ [139] (**cf. tableaux 1 et 2**). Les PNN sont généralement négatifs pour CD11c ($CD11c^-$) et positifs pour le CD11b ($CD11b^+$).

Fonction phagocytaire

Le rôle des PNN est d'éliminer le plus rapidement tous les intrus exogènes à l'organisme, ce qui implique une réponse immédiate aux facteurs d'attraction (chémokines sécrétées par les cellules endothéliales, mastocytes et macrophages) et une migration rapide dans les tissus infectés (diapédèse). La reconnaissance des cibles et l'activation se font grâce à des PRR qui sont présents à la surface des cellules phagocytaires, dans les endosomes et dans le cytosol. Parallèlement à son activation, le PNN engage automatiquement un processus de mort programmée, qui va être retardé par de nombreux facteurs présents au cours du processus inflammatoire (G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-8, IL-1β, IL-4, TNF-α à faibles concentrations…[150]).

Une fois activé, le PNN a un rôle de phagocytose : il émet des pseudopodes englobant la cellule cible avant de l'inclure dans des vacuoles cytoplasmiques où elle passe par diverses étapes de dégradation et de digestion. La fixation du PNN sur sa cible est facilitée par les opsonines (IgG1, IgG3 et dérivés du facteur C3 du complément). Ces dernières se fixent sur les récepteurs Fcγ des PNN par leur fragment Fc. La destruction des agents pathogènes phagocytés a lieu grâce à des mécanismes enzymatiques indépendants de l'oxygène (impliquant notamment perforine, granzyme et myéloperoxydase [150 151]), ou bien la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*).

Régulation du système immunitaire

Au-delà de leur fonction de phagocytose, les PNN jouent également un rôle de régulation de la réponse immune et du remodelage tissulaire. Les ROS produits dans le milieu extracellulaire modulent la signalisation intracellulaire et les fonctions des cellules présentes au site de l'inflammation comme la production de cytokines, les réponses prolifératives lymphocytaires et l'apoptose. L'IL-8, principale cytokine produite par les PNN, est responsable d'une augmentation de la migration des PNN au site inflammatoire. Certains PNN sont porteurs d'immunorécepteurs de type TCR dont l'activation permet d'augmenter leur survie et de stimuler la production d'IL-8 [150].
Les PNN contribuent aussi, par l'intermédiaire de la production de chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL5/RANTES, CCL20/MIP-3α, à recruter et activer les cellules dendritiques (ou DC pour *dendritic cells*) et LT, permettant ainsi la mise en place de la réponse adaptative [150]. L'utilité de cette fonction du PNN vis-à-vis d'un antigène spécifique est sa rapidité de réponse, permettant d'attendre le relais par la réponse classique des LT aux antigènes.
En effet, les PNN sont les premières cellules infiltrant le foyer inflammatoire, et leur production de cytokines peut être déterminante à ce stade précoce de la réponse immunitaire innée. Après élimination de l'agent pathogène, la réponse inflammatoire s'autolimite, avec diminution du nombre des PNN, la suppression de leur activation, production de protéines anti-inflammatoires, apoptose et élimination par les macrophages.

3.1.3.2 Rôle des PNN dans l'infection par HSV-1

Le rôle des PNN dans l'immunité innée anti-HSV-1 a été assez peu étudié, dans des modèles et des pathologies très différents, avec des résultats controversés sur leur rôle antiviral, comme sur leurs effets sur les organes infectés.

Rôles bénéfiques

Dans une étude sur un modèle murin de rétinite herpétique par injection intraoculaire d'HSV-1, les souris déplétées en PNN avaient une diffusion intraoculaire et des lésions de rétinite beaucoup plus étendue que les souris contrôles, associées à une charge virale intraoculaire significativement plus élevée. Ces résultats suggéraient le rôle bénéfique des PNN pour limiter l'infection herpétique oculaire [152].

Dans une étude in vitro, Hayashi *et al.* montraient le rôle potentiel des PNN dans le contrôle initial de l'infection herpétique. Des PNN cultivés en présence de surnageants de cellules épithéliales cornéennes humaines (CECH) infectées par HSV-1 sécrétaient de l'H_20_2 et de la myéloperoxydase et permettait une diminution de la réplication virale dans les CECH [153].

Sur un modèle murin de kératite herpétique, mettant en jeu des souris immunodéficientes, déplétées en neutrophiles et plus ou moins riches en $LTCD4^+$, l'infection cornéenne induisait un recrutement massif de neutrophiles qui accéléraient la clairance virale et contribuait directement ou indirectement à perpétuer une réaction inflammatoire médiée par les $LTCD4^+$ [154].

Rôles délétères

L'exemple le plus frappant du rôle délétère des PNN dans l'infection par HSV-1 est celui qu'ils jouent l'encéphalite herpétique. En effet, les lésions cérébrales sont en grande partie liées à une réaction inflammatoire incontrôlée, avec une infiltration massive de PNN à la phase aiguë de l'infection [155]. Ramakrishna *et al.* ont montré dans un modèle murin que l'INF-γ diminuait la sécrétion de G-CSF, avec pour conséquence une apoptose plus rapide des PNN, mais également l'augmentation de l'IL10 par les LT et une meilleure survie des souris [156]. Les auteurs plaçaient ainsi ces interactions antagonistes G-CSF / INF-γ au centre de la régulation de la réponse inflammatoire dans l'encéphalite à HSV-1.

Dans une publication récente sur un modèle de kératite herpétique sur des souris dépourvues de mastocytes, infectées par scarification cornéenne, Royer *et al.* montraient que l'infiltration cornéenne par les PNN était très augmentée par la déplétion mastocytaire. Par ailleurs, l'infiltration cornéenne par les PNN contribuait à une augmentation de la réplication virale intracornéenne et augmentait la dissémination du virus au système nerveux (TG), en raison d'une réplication d'HSV-1 au sein des PNN. Les auteurs concluaient que dans ce modèle, les PNN potentialisaient l'infection et sa dissémination [157].

Enfin, une étude *in vitro* suggérait que la synthèse de GM-CSF par certains types cellulaires de la cornée, tels que les fibroblastes et les cellules épithéliales augmentaient la survie des PNN et modulaient leurs fonctions effectrices [28].

3.1.4 Rôle des éosinophiles dans l'immunité innée anti-HSV-1

3.1.4.1 Rappels sur les polynucléaires éosinophiles (PNE)

Ces cellules n'ont jusqu'à présent pas été associées à l'immunité anti-HSV-1. Nos résultats expérimentaux nous ont incité à étudier les données déjà connues sur leurs rôles habituels dans le système immunitaire.

Généralités

Les PNE sont des cellules myéloïdes caractérisés par l'existence de volumineuses granulations intracytoplasmiques basiques/ cationiques, colorées par l'éosine. Les PNE sont très peu nombreux dans le sang, ils sont présents en revanche dans les tissus périphériques, en particulier la peau et les muqueuses. Chez l'homme, les PNE peuvent être définis par l'absence de CD66b et la présence de CD15, et éventuellement de CD125 (récepteur à l'IL5) et de CRTH2. Chez la souris, les PNE peuvent être définis en cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) par les marquages $CD45^+/Ly6G^-/CD11c^+/CD64^+/CD11b^+$ [139] (**cf. tableaux 1 et 2**).

Les PNE jouent des rôles dans les réponses innées et adaptatives. Leurs granulations spécifiques contiennent : la protéine basique majeure (MBP), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile et l'éosinopéroxydase (EPO). Sous l'action conjuguée de chimiokines et de facteurs chimio-attractants (notamment l'éotaxine-1 / CCL11, mais également l'IL5, les leucotriènes, l'histamine) et de molécules d'adhésion (notamment endothéliales) les PNE vont se domicilier dans les tissus.

Les PNE peuvent libérer le contenu de leurs granulations cytotoxiques pour détruire des cellules tumorales ou des parasites. A l'instar des PNN, les PNE ont la capacité de produire des ROS. Les polynucléaires éosinophiles sont essentiellement des cellules pro-inflammatoires. Les polynucléaires éosinophiles stockent ou synthétisent des cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, TNFα...), des chimiokines (éotaxine), des médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines, PAF...), des protéines cationiques (MBP, ECP, EPO...) qui entretiennent et amplifient les réactions inflammatoires. Les PNE ont également des capacités de phagocytose. Ces effets pro-inflammatoires peuvent être protecteurs lorsqu'ils ont une action anti-infectieuse ou anti- tumorale ou participent au remodelage tissulaire. Ils peuvent être délétères s'ils sont mal contrôlés.

Pathologies associées aux PNE

On observe une éosinophilie dans de nombreuses situations. Toutefois, les effets et la toxicité tissulaire des PNE sont liés aux composants des granules qui sont relargués dans les tissus périphériques. C'est donc l'hyperéosinophilie tissulaire et non sanguine, qui explique le retentissement viscéral des éosinophilies.

Les PNE sont impliqués dans la **maladie allergique**. Cette dernière est le plus souvent initiée par la génération de LTCD4 spécifiques d'allergènes, qui produisent des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, et IL-13) permettant la maturation, la prolifération, la survie et l'activation des basophiles et des mastocytes, mais aussi des PNE. Les PNE sont également impliqués dans l'immunité contre **les helminthes** [158].

3.1.4.2 Rôle des PNE dans l'infection par HSV-1

A notre connaissance, aucun rôle direct des PNE n'a pour l'instant été rapporté dans le contrôle de l'infection par HSV-1. Il est toutefois intéressant de rapporter 2 observations cliniques notables : i) les infections herpétiques oculaires sont plus fréquentes et souvent plus sévères chez les patients allergiques [159 160], ii) la surinfection par HSV-1 des lésions d'eczéma est particulièrement grave (syndrome de Kaposi-Juliusberg ou *eczema herpeticum*) [161]. Toutefois, la physiopathologie de ces associations n'est pas élucidée et le rôle des éosinophiles n'est que spéculatif.

Enfin, une étude sur 44 patients souffrants d'herpes labiaux (HSV-1) et génitaux (HSV-2) comparés à des contrôles, l'activité phagocytaires des éosinophiles était augmentée dans le groupe des patients [162].

3.1.5 Mécanismes d'échappement d'HSV-1 à la réponse immune innée

Ces mécanismes sont très nombreux, témoignant de la co-évolution de ce virus avec son hôte, et les recherches dans le domaine en révèlent régulièrement de nouveaux. En voici une liste d'exemples non exhaustive.

3.1.5.1 Protéines virale diminuant la réponse interféron

ICP0

ICP0 joue un rôle majeur pour diminuer la réponse IFN. Elle agit en inhibant la translocation d'IRF3, ce qui conduit à sa dégradation, bloque la production d'IFN et inhibe l'induction des ISGs [163]. ICP0 est également impliquée dans la déstabilisation des PML-NB et dans la dégradation de deux de leurs composants principaux : les protéines PML et Sp100 via le protéasome [164 165]. Le génome viral libéré des PML-NB peut plus facilement engager un cycle lytique. A l'inverse, sur les souches virales délétées ou mutées sur ICP0, les PML-NB persistent et la réplication virale est diminuée, notamment à faible MOI [166].

ICP27

Les macrophages infectés par un virus délété d'ICP27 présentent une plus forte activation d'IRF3 et de NF-κB et produisent une plus grande quantité de cytokines en comparaison de ceux infectés par le virus sauvage [167]. De plus, ICP27 inhibe la phosphorylation et l'accumulation nucléaire de STAT1 lors de l'infection à HSV-1 [168]. De ce fait, cette protéine virale bloque la voie de signalisation induite par l'IFN et inhibe la réponse antivirale.

ICP 34.5

ICP 34.5 joue également un rôle important pour diminuer la réponse INF. Son extrémité N-terminal forme un complexe avec la protéine TBK-1, inhibant ainsi l'activation d'IRF3 et la synthèse des ISGs. Les souches d'HSV-1 délétées pour cette protéine sont d'ailleurs **dépourvues de neurovirulence** [169].

Autres protéines virales

La protéine de tégument **VP22** et la protéine **VHS** inhibent la production d'IFN-β en interférant avec la voie cGAS/STING [170 171]. La protéine codée par **Us11** inhibe la production de 2′–5′ oligoadénylates (OAS) sur des cellules humaines préalablement traitées par IFN-α. Le mécanisme

implique une interaction d'Us11 et des OAS via des complexes contenant des ARN double brin. La séquestration de ces ARN double brin, reconnus par certains senseurs (**cf. Réponse interféron 3.1.1**), en font un mécanisme d'évasion probable [169]. Enfin, la protéine codée par **Us3** pourrait également jouer un rôle protecteur contre les IFN. Us3 diminuerait la synthèse de TLR3 et d'IRF3, diminuant ainsi la réponse INF I. En outre, Us3 bloquerait également la synthèse des ISGs induit par l'IFN-γ [169].

3.1.5.2 Mécanismes d'échappement aux NK

Chez l'homme, les récepteurs (activateurs) NKG2D peuvent se lier à des molécules apparentées au CMH-I tels que MICA, MICB (*MHC class I polypeptide-related sequence A and B*) ou encore ULBP (*UL16-binding proteins*). Les cellules infectées par HSV-1 diminuent leur expression de MICA et ULBP, ce qui aide potentiellement les cellules infectées à échapper aux NK [125].

Les complexes gE-gI présents à la surface des cellules infectées participent à la formation de « pontage » d'anticorps, dans lequel un anticorps spécifique d'HSV-1 se lie par son fragment Fab à un antigène et par sa région Fc à la gE. Ce pontage pourrait bloquer l'accès du récepteur FcγRIIIA/CD16a des NK à la région Fc et induire l'endocytose d'antigènes viraux. Cette inhibition de l'ADCC peut être considéré comme un mécanisme d'évasion à l'immunité innée [125].

3.2 Présentation de l'antigène : la transition vers la réponse adaptative

3.2.1 Monocytes / Macrophages

3.2.1.1 Généralités

Les connaissances sur les monocytes et les macrophages ont beaucoup évolué au cours de dernières années. Dans la conception établie dans les années 70's, les macrophages tissulaires dérivent des monocytes circulants, dont le précurseur est myéloïde. On distingue désormais 2 grandes catégories de macrophages. Les macrophages issus des monocytes circulants, et les macrophages résidant dans les tissus (MRT), dont l'origine embryologique est totalement différente. En effet, les MRT dérivent du sac vitellin ou du foie fœtal, colonisent certains tissus pendant le

développement embryonnaire [172], et y persistent et s'y renouvellent durant toute la vie. A l'opposé, les macrophages dérivés de monocytes ont une durée de vie limitée dans les tissus, et ne s'y renouvellent pas.

A l'état d'homéostasie, certains organes dits « fermés » ne sont colonisés que par des MRT. C'est le cas de l'épiderme (cellules de Langherans), du système nerveux central (microglie), des poumons (macrophages alvéolaires) et du foie (cellules de Kupffer). Les organes « ouverts » sont, à l'âge adulte, quasi-uniquement colonisés par des macrophages dérivés des monocytes (**Figure 16**).

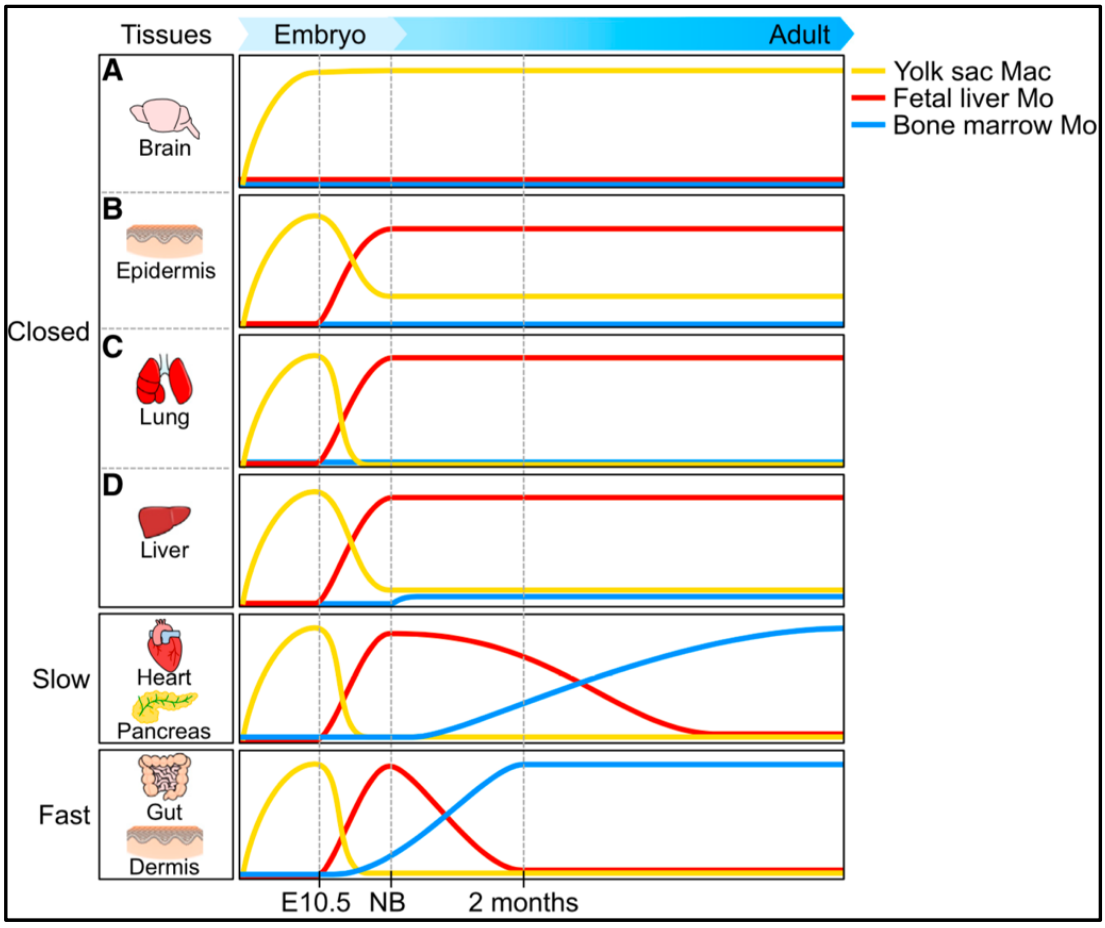


Figure 16, d'après [172] : Ontogénèse des macrophages tissulaires en état d'homéostasie (en l'absence de processus inflammatoire). Dans les tissus dits « fermés », les macrophages résidant dans les tissus peuvent être issus du sac vitellin (A : c'est le cas de la microglie du système nerveux central), du foie fœtal (C : macrophages alvéolaires) ou bien des 2 (B : macrophages de l'épiderme, et D : cellules de Kupffer). Dans les tissus « ouverts » les macrophages sont issus des monocytes circulants qui se différencient en macrophages avec des cinétiques de remplacement qui peuvent être lentes (cœur, pancréas) ou rapides (intestin, derme), spécifiques à chaque tissu.

Les monocytes et les 2 grandes catégories de macrophages vues ci-dessus font partie, avec les cellules dendritiques, du système phagocytaire mononucléé.

Les macrophages éliminent les PNN apoptotiques, les cellules mortes et les débris cellulaires, favorisant ainsi la résolution des processus inflammatoires. Les monocytes/macrophages sécrètent des quantités très importantes de cytokines (10 à 100 fois plus que les PNN) et régulent ainsi la réponse immunitaire. Au cours d'une réponse inflammatoire, les monocytes gagnent les tissus quelques heures après les PNN, dont ils partagent les mécanismes de migration par diapédèse. Les monocytes/macrophages reconnaissent les pathogènes via les PRRs, et les récepteurs pour les dérivés du complément et pour les fragments Fc des Immunoglobulines. En fonction de leur environnement, les macrophages peuvent schématiquement se polariser de 2 façons : M1) sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires sous l'influence de l'IFN-γ, ou M2) sécrétion de cytokines anti-inflammatoires sous l'influence de l'IL-4 et l'IL-13.

Les monocytes et les macrophages sont, tout comme les cellules dendritiques et les LB des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), capables de charger un antigène sur le CMH de classe I mais également de classe II et de stimuler ainsi les LTCD4$^+$ et CD8$^+$ [173].

Ils sont définis en immuno-marquage chez l'homme par la présence à leur surface de CD14 et CD33. Chez la souris, les marqueurs les plus utilisés sont CD11b, Mac-1 et F4/80 ; en CMF, ils peuvent être définis par les marquages CD45$^+$/Ly6G$^-$/CD11c$^+$/CD64$^+$/CD11b$^+$ [139].

3.2.1.2 Rôle dans l'immunité anti-HSV-1

Le rôle des macrophages dans l'infection par HSV-1 a été mis en évidence sur des modèles murins d'infection. Les macrophages constituent en effet le type cellulaire prédominant dans les cornées des souris inoculées avec HSV-1 par scarification cornéenne.

La déplétion des macrophages induisait chez les souris infectées par scarification cornéenne (et préalablement immunisées avec des glycoprotéines d'enveloppe) une augmentation de la réplication d'HSV-1 au niveau oculaire aux temps précoces de l'infection. En revanche, cette déplétion n'avait aucun effet sur la latence virale dans le TG des animaux infectés [174]. Cathcart et al. observaient sur des souris BALB/c infectées par injection intracamérulaire (dans la chambre

antérieure de l'œil) qu'une infiltration majeure par des macrophages des tissus intraoculaires, co-localisant avec l' l'IFN-γ, était présente aux premiers jours de l'infection [175].

Plus récemment, Lee *et al.* étudiaient les rôles respectifs des macrophages M1 et M2 dans l'infection [176]. Dans un premier temps, ils montraient à l'aide d'un modèle *in vitro* que la réplication de HSV-1 était nettement moindre dans les macrophages M1. L'infections des macrophages par HSV-1 s'accompagnait d'une augmentation significative de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoires dans les macrophages M1. Ensuite, pour analyser les effets in vivo d'une polarisation M1 ou M2, des souris étaient injectées par voie intramusculaire avec des plasmides codant pour l'IFN-γ (connu pour induire une polarisation M1) ou CSF-1 (*Colony stimulating factor 1*) connu pour indure une polarisation M2), avant inoculation cornéenne. Les auteurs montraient que la polarisation M1 augmentait la réplication virale dans l'œil, la latence les transcrits de CD4, CD8 IFN-γ et PD-1 dans le TG des souris infectées. A l'inverse, la polarisation M2 était associée à une réduction de tous ces paramètres. Bien que cet article ait fait l'objet de critiques méthodologiques fondées (voir [177]), ces données suggéraient le rôle potentiel des macrophages, et notamment de leur polarisation dans l'immunité anti-HSV-1 [176].

En utilisant le même modèle animal, Jeon et al. étudiaient le rôle de l'interaction PD-1/PD-L1, connu pour son rôle dans le maintien du privilège immunitaire cornéen, sur la clairance cornéenne d'HSV-1. Après inoculation des souris, l'expression de PD-L1 augmentait pour atteindre un pic à J4 p.i., concomitant d'une infiltration cornéenne par des NK, des DC et des macrophages. Le blocage de PDL-1 par des anticorps monoclonaux injectés localement (par voie sous-conjonctivale) permettait une diminution plus rapide de la charge virale cornéenne, associée à une augmentation de l'infiltrat macrophagique [178]. Ces résultats suggèrent que l'expression de PD-L1 à la surface oculaire impacte négativement la réponse immune et notamment macrophagique, à l'infection par HSV-1.

3.2.2 Cellules dendritiques

3.2.2.1 Généralités

Il existe 4 types de cellules dendritiques (ou DC pour *dendritic cells*) : 3 types de DC dites myéloïdes, et un type dérivé des monocytes. Les DC font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [179].

DC myéloïdes (mDC)

Elles comportent les DC conventionnelles ou classiques (cDC) de type 1 et de type 2, et les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les cDC, ($CD45^+$/$HLADR^+$/$CD11c^+$ chez l'homme) sont considérées comme les CPA professionnelles : elles peuvent présenter les antigènes, secréter de grandes quantités d'IL-12, expriment des molécules de co-stimulation et disposent donc de toutes les caractéristiques nécessaires pour activer des LT.

Les cDC de type 1 ($CD141^+$, $XCR1^+$, $CLEC9A^+$) ont la capacité de capturer les cellules nécrotiques ou apoptotiques et de cross-présenter des antigènes aux $LTCD8^+$ lors des réponses antivirales ou anticancéreuses [180]. Leurs équivalents chez la souris sont les DC $CD8\alpha^+$ (qui sont $CD11b^-$).

Les cDC de type 2 ($CD1c^+$) présenteraient préférentiellement les antigènes aux $LTCD4^+$, et seraient l'équivalent des cellules dendritiques $CD11b^+$ chez la souris [180].

Les pDC, ($CD11c^-CD123^{high}$, chez l'homme et la souris) qui doivent leur nom à leur ressemblance morphologique avec des plasmocytes, ont la capacité de produire de grandes quantités d'IFN-α après activation.

DC dérivées des monocytes

Les DC dérivées des monocytes ont un phénotype proche des cDC de type 2, elles ont un précurseur commun avec les macrophages. Elles se différencient *in situ* à partir de monocytes recrutés sur le site de l'inflammation [179].

Recrutement des DC

Les DC sont très nombreuses dans tous les tissus en contact avec le milieu extérieur, notamment au sein des épithéliums cutanéo-muqueux. Leur recrutement est dépendant des chémokines qui sont produites sur le site de l'inflammation par les cellules de l'immunité innée ou les cellules épithéliales. Les DC immatures expriment un répertoire de récepteurs aux chémokines inflammatoires, telles que le GM-CSF et le CCL20 / MIP-3α (*Macrophage Inflammatory Protein-3α*). Ces deux facteurs sont produits par les tissus inflammatoires (surtout les épithéliums). Les DC reconnaissent les microorganismes grâce à des PRR (dont les TLR).

Capture de l'antigène

Après un contact avec l'agent infectieux ou stimulation par des cytokines inflammatoires, les DC immatures capturent les antigènes reconnus par différents mécanismes (endocytose, macropinocytose ou phagocytose). L'internalisation de l'antigène est un processus propre aux DC immatures qui diminue au cours de leur maturation.

Maturation des DC et présentation de l'antigène

Pendant leur activation, les DC interagissent avec d'autres effecteurs de l'immunité présents sur le site (PNN, NK…). En fonction de ces interactions et de l'environnement cytokinique, les DC entrent dans un programme spécifique de maturation induisant au final différents types de réponses T. Les DC orchestrent donc les différents acteurs de l'immunité et font ainsi le relai entre la réponse innée et la réponse adaptative. Les DC matures expriment à leur surface de grandes quantités de molécules du CMH et des molécules de co-stimulation dédiées à la présentation de l'antigène.

Migration des cellules dendritiques

Grâce à leur propriété de migration au cours de la maturation, les DC font le lien entre la périphérie (site de l'inflammation) et les organes lymphoïdes secondaires. Après activation, les DC quittent ainsi les tissus inflammatoires et entrent dans la circulation lymphatique vers les ganglions lymphatiques de drainage.

Activation des lymphocytes par les cellules dendritiques

Les DC matures délivrent alors aux LT les signaux d'activation, de prolifération et de différenciation qui leur sont nécessaires. L'interaction DC-LT implique la reconnaissance du peptide

par le récepteur T (TCR) associé au complexe CD3, les molécules du CMH, les molécules de co-stimulation et les molécules d'adhésion. Les DC activent et régulent ainsi la réponse immunitaire en polarisant les LT vers la voie de différenciation la plus adaptée à l'agression. Une interaction avec des DC matures est nécessaire pour une survie à long terme des LT et leur différenciation en cellules mémoire.

3.2.2.2 Rôles dans l'immunité anti-HSV-1

Il existe désormais de nombreux arguments en faveur d'un rôle important joué par les DC dans le contrôle de l'infection par HSV-1, et notamment dans la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [181].

Les pDC produisent de grandes quantités d'IFN-α en réponse à l'infection par HSV-1, chez l'homme et sur des modèles murins. Cette sécrétion dépend en partie d'une stimulation des TLR9, mais aussi d'autres mécanismes [182]. Pollara et al. ont en effet montré que la fixation de la glycoprotéine D sur les cDC provoque la sécrétion d'IFN de type I par ces cellules et leur maturation [183].

Par ailleurs, les DC immatures peuvent être infectées par HSV-1. Selon Bosjnak et al., elles deviennent alors apoptotiques et peuvent être phagocytées par d'autres DC qui peuvent présenter les antigènes viraux aux LT cytotoxiques [184]. Les cellules infectées peuvent correspondre à des DC « périphériques », qui effectueraient ce « transfert » après migration dans les organes lymphoïdes [185].

L'activation des pDC par HSV-1, concomitamment à la production d'IFN de type 1, stimule la production d'IFN γ et d'IL10 par des LTCD4$^+$ naïfs. Mais également la migration de LT et NK activés par la production de CCL4 et CXCL10 [181].

Réciproquement, sur des souris C57BL/6, habituellement résistantes à l'infection par HSV-1, la déplétion en DC entraine des infections sévères du système nerveux central, une activation déficiente des NK, des LTCD4$^+$ et des LTCD8$^+$ [186]. De même, un faible nombre de pDC a été associé à des infections récurrentes à HSV-1 chez l'homme [187]

Dans les tissus périphériques, les LTCD8$^+$ mémoires spécifiques d'HSV-1 sont stimulés par une interaction avec les LTCD4$^+$ et les DC recrutés dans la circulation sanguine [181]. Selon

le mode d'infection, la présentation antigénique aux LTCD4$^+$ et LTCD8$^+$ pourrait se faire soit par les DC périphériques, soit par les DC des organes lymphoïdes [188].

3.3 Réponse immunitaire adaptative

3.3.1 Réponse humorale

Dans le contexte de l'infection par HSV-1, l'immunité humorale est définie par la sécrétion par les LB d'anticorps neutralisants dont les principales cibles sont les glycoprotéines d'enveloppe de HSV-1 (gD et gB). Ces anticorps ne sont toutefois pas capables d'éradiquer le virus, même s'ils pourraient jouer un rôle pour diminuer/ raccourcir les symptômes des récurrences.

Les premières données expérimentales avaient notamment montré que le transfert passif de sérum d'une souris immunisée n'avait pas d'effet sur la réplication virale locale ou dans le système nerveux, mais semblait avoir une incidence sur la sévérité des atteintes neurologiques [189]. A ce propos, sachant qu'HSV-1 est considéré comme un potentiel agent causal de la maladie d'Alzheimer, Mancuso et al., en comparant des patients atteints d'Alzheimer et des contrôles ont montré que le taux d'anticorps anti-HSV-1 était protecteur, notamment en termes de volume de la matière grise du SNC [190].

De même, il a été observé que lors d'infection oculaire de souris déficientes en cellules B, les symptômes et la susceptibilité à l'encéphalite herpétique sont accrus, de même que les atteintes oculaires[191]. Par conséquent, la contribution spécifique de l'immunité humorale n'est pas négligeable, mais c'est probablement son interaction avec d'autres effecteurs de l'immunité tels que les cellules T qui permet de contrôler de manière efficace l'infection à HSV-1, notamment la fréquence et la sévérité des récurrences.

Le rôle de la réponse humorale a récemment été remis à l'honneur dans un travail publié par Royer et al. [192]. Les auteurs vaccinaient des souris avec un vaccin vivant atténué, délété pour la séquence de signalisation nucléaire d'ICP0 (souche ICP0ΔNLS), ou un vaccin sous unitaire (gD + adjuvant). Après inoculation par scarification cornéenne, la souche ICP0ΔNLS conféraient une meilleure protection contre la réplication virale, les atteintes oculaires (néovascularisation cornéenne notamment) et la mortalité que le vaccin sous-unitaire. En outre, l'efficacité vaccinale était corrélée

aux taux d'anticorps neutralisants. Enfin, l'immunisation passive de souris avec les sérums des souris vaccinées permettait une protection contre la néovascularisation cornéenne, la sécrétion virale et la latence (définie par le nombre de copie de LAT par TG) [193].

3.3.2 Réponse cellulaire

La réponse cellulaire T, médiée par les LTCD4$^+$ et aux LTCD8$^+$, joue un rôle prédominant dans le contrôle de l'infection à HSV-1. Le rôle des LTCD8$^+$ dans le contrôle de l'infection aiguë et dans le maintien de la latence a été largement décrit. Dans les modèles d'infection cutanée par HSV-1, ils permettent notamment de contrôler la réplication virale au site d'inoculation, mais n'empêchent pas la dissémination du virus aux ganglions nerveux sensitifs [194 195].

Les LTCD8$^+$ infiltrent précocement le TG et persistent durant toute la vie de l'hôte [196]. Les LTCD8$^+$ activés viennent au contact des neurones infectés, formant ainsi une « synapse immunologique » [93] (**Figure 18**). Ils jouent un rôle dans le blocage de la réactivation virale.

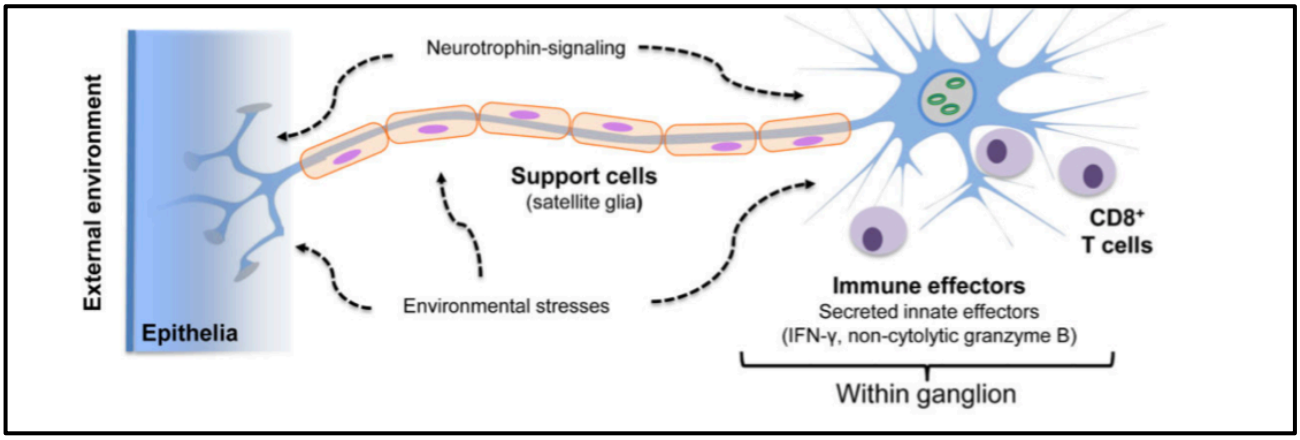


Figure 17, d'après [100] Les LTCD8$^+$ spécifiques de HSV-1 sont au contact des neurones infectés et bloquent la réactivation virale en sécrétant de l'IFN-γ et d'autres facteurs non cytolytiques comme le granzyme B.

Ces phénomènes ont pu être observés chez l'homme, où après une première phase d'expansion clonale, les LTCD8$^+$ s'organisent autour des neurones du TG hébergeant HSV-1 en latence [197]. Ces cellules expriment des chémokines et des récepteurs au chémokines, ainsi que des molécules cytotoxiques (IFNγ, granzyme A et B)[197], essentiels pour le contrôle de l'activité de l'infection [198]. Toutefois, les neurones hébergeant le transcrit LAT résistent à la mort

cellulaire immunogène [199]. Ceci aboutit à une activité inflammatoire des LT exacerbée, qui se caractérise par un relargage continu de chémokines et de granzyme [200] et peut conduire à un épuisement des LTCD8$^+$. Une étude a d'ailleurs récemment montré que les LT des patients atteints de récurrences herpétiques présentaient des déficiences fonctionnelles et des marqueurs d'épuisement (expression de PD-1 et TIGIT), alors que la réponse T globale contre HSV-1 était similaire chez les patients infectés, qu'ils présentent ou non des récurrences cliniques [201]. L'expression par les neurones des récepteurs qui induisent l'épuisement des LT semble déclenchée par les cytokines cytotoxiques (IFNγ, granzyme)[202]. L'environnement immunitaire du TG est donc un processus dynamique, et l'activité de HSV-1 semble donc contrôlée par un processus impliquant des LT et leur épuisement.

3.3.3 Mécanismes d'échappement d'HSV-1 à la réponse immune adaptative

Le mécanisme d'échappement le mieux décrit dans ce contexte est l'inhibition de la présentation antigénique et de l'activation des LTCD8$^+$ par HSV-1. En effet, en bloquant la protéine de transport TAP, ICP47 inhibe le transport des peptides antigéniques vers le réticulum endoplasmique qui constitue le site d'assemblage au CMH I [203].

HSV-1 semble également capable d'inhiber l'activation des LTCD4$^+$ et leur sécrétion de cytokine. Barcy & Corey montraient en effet sur un modèle in vitro que la protéine ICP22 diminuaient la capacité de cellules humaines lymphoblastoïdes (ayant des propriétés de CPA) infectées par HSV-1 à activer des LTCD4$^+$ [204]. En revanche, cette inhibition n'est pas associée à une diminution de l'expression de CMH II ou de molécules co-stimulatrices à la surface cellulaire [204].

Plus récemment, à l'aide d'un modèle murin, Koyanagi et *al.* montraient qu'une kinase virale (codée par UL13) inhibait la sécrétion de la chémokine CXCL9, et par ce mécanisme, l'accumulation aux sites d'infection de LTCD8$^+$ spécifiques d'HSV-1 [205].

4 Stratégies vaccinales anti-HSV-1

Malgré de nombreuses tentatives (précliniques et cliniques), aucune stratégie vaccinale anti-HSV-1 (ni même anti-HSV-2) n'a fait preuve d'une efficacité suffisante pour être appliquée en clinique. En revanche, plusieurs vaccins efficaces contre le virus de varicelle et du zona (VZV), un *Alphaherpesvirus* très proche de HSV, sont désormais disponibles.

4.1 Le modèle des vaccins anti-VZV

Le VZV est responsable de 2 pathologies : la varicelle, lors de la primo-infection, et le zona, lors des réactivations. Deux catégories de vaccins anti-VZV sont désormais disponibles.

4.1.1 Vaccins vivants atténués

Les vaccins anti-VZV basés sur la souche Oka ont constitué les premiers vaccins efficaces contre un *Herpesviridae*. Cette souche, isolée au Japon chez un enfant atteint de varicelle, a été atténuée de façon empirique par passages successifs sur des fibroblastes humains, puis d'embryons de cochon d'inde et enfin à nouveau sur fibroblastes humains [206].

4.1.1.1 Vaccins anti-varicelle

Aujourd'hui, **deux vaccins monovalents contre la varicelle** sont disponibles, et ont reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les enfants immunocompétents âgés de plus de 12 mois : le Varivax®, (souche Oka-Merck, laboratoire Sanofi Pasteur MSD) et le Varilix® (souche Oka-RIT, laboratoire Glaxo-Smith-Kline). Les deux souches (Oka-Merck et Oka-RIT) ont été obtenues par des procédés d'atténuation très proches, et ne diffèrent que par 36 nucléotides, dont seuls 14 sont impliqués dans des substitutions d'acides aminés [207]. Ces vaccins d'administrent par voie intra-musculaire ou sous-cutanée.

Par ailleurs, deux vaccins tétravalents (rougeole-oreillons-rubéole-varicelle) ont été développés par ces laboratoires pour simplifier le calendrier vaccinal.

L'efficacité du vaccin anti-varicelle dépend en partie de l'âge à la vaccination (le vaccin semble plus efficace après 15 mois [208]), mais surtout du nombre de doses (une ou deux). Elle diminue progressivement après la vaccination. La protection globale est de l'ordre de 80%, après une dose, et 92% après 2 doses. Par contre, une dose suffit à protéger 98% des patients vaccinés

contre les formes modérées à sévères et 100% contre les formes sévères [209]. L'efficacité de protection est bien corrélée au titre des anticorps dirigés contre les glycoprotéines virales de surface [210] , même si cette corrélation semble plus statistique que mécanistique [211].

4.1.1.2 Vaccin anti-zona

Le zona, qui correspond une réactivation de VZV, est la conséquence d'une perte liée à l'âge de l'immunité cellulaire spécifique du VZV. Qi et al. ont d'ailleurs démontré une forte corrélation entre l'augmentation de l'incidence du zona et la diminution des LT spécifiques de VZV productrices d'IFN-γ [212]. Le taux d'anticorps spécifiques anti-VZV ne diminue quant à lui pas avec l'âge, mais semble toutefois insuffisant pour prévenir à lui seul les réactivations [212]. La vaccination a donc pour but d'augmenter la réponse T spécifique contre VZV [213].

Le vaccin anti-zona Zostavax® (laboratoire Sanofi Pasteur MSD) contient la souche Oka-Merck à une concentration 14 fois supérieure à celle du vaccin anti-varicelle. Cette concentration est nécessaire pour contrebalancer les effets de l'immunosénescence chez la population cible.

Le Zostavax® a reçu en France une AMM en prévention du zona et des algies post-zostériennes chez les adultes immunocompétents de plus de 50 ans (il n'est remboursé qu'après 65 ans). Il permet de réduire de moitié l'incidence du zona et de 66% les algies post-zostériennes [214], mais la protection contre le zona diminue avec l'âge de la vaccination, passant de 70% entre 50 et 60 ans, à 37% après 70 ans. Après plus de 10 ans d'utilisation aux États-Unis, l'étude des données de tolérance est rassurante. Les cas de zona post-vaccination sont dans la plupart des cas liés au virus sauvage. Les exceptionnels cas de zona liés à la souche vaccinale sont apparus chez des patients immunodéprimés [215]. En revanche, l'effet du vaccin diminue avec le temps, et n'est plus significative après 8 ans, suggérant que des ré-injections seraient probablement nécessaires pour assurer une protection pérenne [216].

4.1.2 Vaccin sous-unitaire

Un vaccin anti-zona sous-unitaire est disponible aux Etats-Unis depuis octobre 2017. Il a été autorisé en Europe en mars 2018, mais n'est pas encore accessible en France. Le Shingrix® (laboratoire Glaxo-Smith-Kline) est composé de la glycoprotéine E (glycoprotéine d'enveloppe essentielle pour la réplication virale) associée à l'adjuvant AS01B (un adjuvant liposomal contenant

de la saponine) [217]. Son efficacité contre le zona semble supérieure au vaccin vivant atténué, dépassant 90%, aussi bien pour prévenir le zona que les algies post-zostériennes. En outre, cette efficacité se maintient chez les patients vaccinés entre 70 et 80 ans.

Ce vaccin induit une immunité humorale et cellulaire ($LTCD4^+$) [217]. Il a en outre l'avantage de pouvoir être utilisé chez les patients immunodéprimés, chez qui le zona est souvent beaucoup plus sévère.

Les autorités sanitaires américaines, et en particulier l'ACIP (*Advisory Comittee on Immunization practice*) recommandent désormais ce vaccin en première intention [218].

4.2 Les tentatives de vaccins anti-HSV-1

La grande majorité des recherches dédiées à l'élaboration d'un vaccin contre HSV ont ciblé HSV-2. La similarité de ces 2 virus, (tant génomique que dans leurs interactions avec l'hôte) permettent de transposer une partie des concepts à la protection vaccinale contre HSV-1. Nous verrons les différentes stratégies (jusque-là incomplètement efficaces), mises en œuvre dans le développement de vaccins anti-HSV.

4.2.1 Vaccins inactivés

Les vaccins inactivés contiennent des particules virales complètes mais sont incapables de réplication, ce qui constitue un avantage essentiel en termes de sécurité. L'inactivation peut être obtenue par divers procédés (rayonnement ultraviolets, chaleur, irradiation). Cependant, les virus inactivés induisent habituellement une réponse immunitaire assez faible et une protection moins durable que les vaccins vivants atténués. Les vaccins inactivés ont été les premiers utilisés dans le contexte d'HSV. L'efficacité de protection contre HSV s'est révélée peu concluante lors des essais cliniques conduits dans les années 30 à 60, et ce malgré l'utilisation d'adjuvants [219].

4.2.2 Vaccins sous-unitaires

Ces échecs, et les progrès technologiques, ont redirigé les études vers sur les vaccins sous-unitaires, également avantageux en termes de sécurité. Ces vaccins ont pour la plupart été élaborés à base de glycoprotéines virales d'enveloppe, et plus particulièrement gD et gB, connues pour être les principales cibles des anticorps neutralisants. Ces protéines sont essentielles dans l'entrée du

virus dans les cellules de l'hôte, et sont très immunogènes chez l'animal [219]. Plusieurs vaccins sous-unitaires recombinants, basées sur ces glycoprotéines, avec ou sans adjuvant, ont été évalués en clinique contre l'herpès génital, mais leur efficacité s'est révélée très modeste [220-222]. Ils permettaient au mieux de réduire la fréquence des récurrences chez les patients séronégatifs au moment de la vaccination, mais pas chez les patients séropositifs pour HSV-1 et/ou HSV-2. En outre, il est apparu que le taux d'anticorps neutralisants spécifiques des glycoprotéines virales présent dans le sérum des patients ne constituait pas un corrélat de protection [219].

4.2.3 Vaccins vivants atténués

Ils sont le plus souvent obtenus par invalidation de gènes codant pour des protéines majeures du cycle viral conférant une atténuation de la virulence tout en stimulant une réponse immune humorale et cellulaire robuste. Dans cette catégorie, on distingue les vaccins à réplication limitée ou non réplicatifs et les vaccins réplicatifs.

4.2.3.1 Vaccins non réplicatifs

Les vaccins non réplicatifs ont l'avantage théorique d'un meilleur profil en terme de sécurité. Cette approche implique en effet l'invalidation de gène(s) indispensable(s) pour la réplication virale. Les virus sont obtenus sur des lignées cellulaires spécifiques qui compensent la protéine virale déficitaire. Lors de la vaccination, ils sont capables d'infecter une cellule normale, mais ils ne sont pas capables de synthétiser le gène délété, et donc de produire de nouveaux virions. L'infection est donc limitée à un cycle sans dissémination à d'autres cellules.

De nombreux candidats de cette catégorie ont été employés dans des modèles expérimentaux. N'Guyen et al. testaient des virus HSV-1 issus de la souche KOS, délétés pour les gènes d'ICP4 , ICP27 ou encore ICP8 (indispensable pour la réplication de l'ADN viral). Ces virus, inoculés par voie intrapéritonéale, n'induisaient aucune pathologie, et protégeaient contre la mortalité et les signes d'infection les animaux challengés 3 semaines plus tard avec la souche virulente [223]. En outre, ils induisaient une réponse humorale et cellulaire spécifique.

Hoshino et al. utilisaient une souche d'HSV-2 invalidés pour plusieurs gènes indispensables à la réplication, en l'occurrence UL5 (codant pour un composant du complexe hélicase primase) et

UL29 (codant pour ICP8) dans la souche HSV2 dl5-29, auxquels ils ajoutaient UL41 (codant pour VHS) dans la souche HSV-2 dl5-29-41. Ils montraient à l'aide de 2 modèles animaux (souris et cochon d'Inde) que ces deux souches étaient efficaces pour protéger contre un challenge létal par une souche virulente d'HSV-2, et n'étaient pas pathogènes chez des animaux sévèrement immunodéprimés [224].

Toutefois, le problème des virus non réplicatifs est qu'ils peuvent théoriquement regagner leur capacité réplicative en présence d'une souche sauvage, par un phénomène appelé transcomplémentation. Pour limiter ce risque potentiel, Yao et Eriksson ont développé une souche d'HSV-1 exprimant une protéine (UL9-C535C) se fixant sur le gène UL9 (codant pour ICP8, qui rappelons-le, est indispensable à la réplication de l'ADN d'HSV-1 et 2) et inhibant sa transcription (effet trans-dominant négatif). Cette souche (CJ83193) a donc la capacité d'infecter des cellules, mais ne se réplique pas, et surtout, bloque la réplication d'autres souches potentiellement présentes dans les cellules infectées [225]. La souche CJ83193 a été étudiée chez la souris par Augustinova et al. Elle ne générait pas de réplication virale intra-cornéenne après inoculation par scarification, et ne se réactivait pas à partir de TG infectés en phase latente. Utilisée comme souche vaccinale, elle diminuait la charge virale d'une souche virulente dans la cornée et les TG, mais ne bloquait pas totalement la réplication de cette dernière, ni la réactivation à partir de la latence [226].

Afin d'améliorer l'efficacité de la souche CJ83193, Brans et al. augmentaient son immunogénicité en remplaçant le gène UL9 de cette souche par une copie supplémentaire de la glycoprotéine D [227 228], tout en conservant sa capacité à exprimer la protéine UL9-C535C. La souche obtenue (dénommée CJ9-gD) était plus efficace en terme de protection que CJ83193 sur un modèle murin de kératite à HSV-1 [229], mais également sur un modèle d'infection cutanée à HSV-1 et d'infection génitale par HSV-2 chez le cochon d'Inde [227 230]. Cette nouvelle souche induisait dans ces différents modèles une forte réponse humorale et une réponse cellulaire spécifique contre HSV-1 et HSV-2, mais n'était pas vraiment plus efficace pour bloquer la réactivation. C'est peut-être la raison pour laquelle ce modèle vaccinal n'a jamais donné lieu à des essais cliniques.

4.2.3.2 Vaccins réplicatifs

Cette stratégie présente de nombreux avantages : la réplication virale permet l'expression de l'ensemble du répertoire antigénique, ce qui peut éventuellement améliorer l'immunogénicité du candidat vaccinal.

Par contre, ces vaccins conservent une capacité de réplication, ce qui peut poser des problèmes chez les patients dont le système immunitaire est immature (enfants) ou compromis. De nombreuses protéines ont fait l'objet d'une invalidation dans la perspective de vaccination par des vaccins vivants atténués, le plus souvent sur des modèles d'herpès génital impliquant HSV-2 (gE, gH, gK, ICP34.5, UL55-56, UL43.5, US10-12, UL5, UL29, UL42, ICP27, et ICP0 [231]) Nous nous intéresserons ci-dessous aux candidats qui nous ont paru les plus prometteurs.

Glycoprotéine H

Le virus délété pour la glycoprotéine H (nécessaire pour l'entrée du virus dans la cellule), construit sur la base de la souche SC16 a été considéré par ses auteurs comme un virus non réplicatif. Toutefois, les conséquences de cette délétion ne sont pas très claires. Les cellules normales peuvent être infectées par ce virus (en raison probablement de l'importance de l'inoculum), produisent des virions, mais ces derniers ne sont pas infectants. Quoiqu'il en soit, les résultats sur un modèle murin d'inoculation cutanée auriculaire, où la souche induisait une protection clinique et des anticorps neutralisants, étaient concluants [232]. Si bien qu'une variante de cette souche, sur la base d'HSV-2 était utilisée dans un essai clinique randomisé multicentrique contrôlé contre placebo incluant des patients souffrant d'au moins 6 récurrences d'herpès génital par an. Les injections du virus vaccinal étaient réalisées par voie sous-cutanée dans le bras. Plusieurs protocoles, comprenant 1 à 4 injections espacées de 2 semaines, à la dose de 10^6PFU par injection, étaient comparés. Il n'y avait malheureusement aucune différence entre les groupes concernant le nombre de récurrences, le temps de guérison, ainsi que la sécrétion asymptomatique de virus [233].

ICP0

Comme nous l'avons vu, la protéine ICP0, est une une protéine transactivatrice IE jouant un rôle crucial dans l'initiation du cycle lytique. Plusieurs auteurs ont tenté de protéger des animaux à l'aide de virus dont la fonction d'ICP0 était altérée. Haford et al. utilisaient une souche d'HSV-2

délétée pour la séquence de signalisation nucléaire d'ICP0 (HSV2-ICP0ΔNLS). Les souris étaient immunisées par injection dans le coussinet plantaire, puis challengées au même site, mais également par voie vaginale, nasale ou oculaire avec 125.10^3 PFU d'une souche virulente. Ils comparaient cette stratégie à vaccin sous unitaire (gD + adjuvant) [234]. Les souris vaccinées par le virus vivant atténué survivaient toutes à l'inoculation (114/115 versus 3/ 45 dans le groupe vacciné par gD), et avaient une excrétion virale très nettement diminuée aux différents sites.

Plus récemment, Royer et al. reproduisaient à peu de chose près ces expérimentations, mais cette fois-ci avec une souche ICP0ΔNLS dérivée d'HSV-1, dans un modèle murin d'infection oculaire. De manière identique, ils comparaient ce candidat à un vaccin sous-unitaire (gD + adjuvant). Après inoculation par scarification cornéenne, la souche ICP0ΔNLS conféraient une meilleure protection contre la réplication virale, les atteintes oculaires (néovascularisation cornéenne notamment) et la mortalité que le vaccin sous-unitaire. En outre, l'efficacité vaccinale était corrélée aux taux d'anticorps neutralisants. Enfin, l'immunisation passive de souris avec les sérums des souris vaccinées permettait une protection contre la néovascularisation cornéenne, la sécrétion virale et la latence [192].

Glycoprotéine E

La glycoprotéine E est nécessaire pour la propagation de l'infection dans les tissus épithéliaux polarisés, le transport antérograde des capsides virales, du tégument et des glycoprotéines du corps cellulaire neuronal vers les terminaisons axonales. Brittle et al. ont testé l'efficacité d'une souche d'HSV-1 délétée pour la gE sur un modèle murin. Le vaccin était inoculé par scarification cutanée sur le flanc de l'animal, de même que la souche virulente (HSV-1 ou HSV-2), 4 semaines plus tard. Les souches virulentes se répliquaient (à des titres faibles) au site d'inoculation. Toutefois, les animaux vaccinés étaient protégés contre la mort, et présentaient des signes cliniques moins sévères au site d'inoculation. La souche virulente était retrouvée dans les ganglions sensitifs de la racine dorsale (zone de latence après une inoculation sur le flanc) chez moins de 10% des animaux vaccinés, contre 100% dans le groupe contrôle [235].

Glycoprotéine K

Iyer et al. ont récemment étudié l'efficacité protectrice d'une souche d'HSV-1 délétée pour la gK [231]. Du fait de la délétion, ce virus ne peut pas infecter les neurones [51]. En revanche, il se multiplie de manière efficace dans tous les autres types cellulaires et semble induire une réponse cellulaire T durable. Des souris BalB/C de 6 semaines étaient vaccinées avec 10^6 PFU de la souche vaccinale par voie intramusculaire, puis challengées 14 jours après par voie intra vaginale avec des souches virulentes d'HSV-1 (McKrae) ou d'HSV-2 (HSV2-G). Les animaux vaccinés avaient une morbi/mortalité significativement diminuée, (survie de 90% vs 10 dans le groupe HSV-1 et 70% versus 0 avec HSV-2). Les auteurs retrouvaient des LT mémoires spécifiques des gB et gD jusqu'à 7 mois après la vaccination [231].

Ces résultats, très encourageants pour certains, et très décevants pour d'autres, posent plusieurs problèmes conceptuels dans la stratégie à mettre en place pour mettre au point un candidat vaccinal contre HSV.

D'une part, on peut s'interroger sur la validité et l'hétérogénéité des modèles animaux d'inoculation et de challenge, dans l'étude des phénomènes cliniques et immunologiques, mais également sur la quasi-absence d'étude expérimentale sur les capacités de ces candidats à protéger contre les réactivations. En outre, la persistance à vie du candidat vaccinal dans les neurones sensitifs des sujets vaccinés (sauf a priori pour la souche gK^-), pose question en ce qui concerne la sécurité. Enfin, on voit bien que la question de la population cible (déjà immunisée contre HSV-1 et/ou HSV-2, ou au contraire non infectée), n'est pas tranchée.

Chapitre II : Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus Herpès simplex type 1 après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal

1 Résultats obtenus récemment par l'équipe

Comme vu précédemment, les atteintes oculaires herpétiques sont quasiment toujours unilatérales chez l'homme, et récidivent du même côté. Il en va de même pour l'atteinte oculaire dans le modèle murin oro-oculaire développé dans notre équipe [116 120].

Dans ce dernier, alors même que les quantités de LAT en RT-PCR sont équivalentes entre les deux TG, certains neurones du TG gauche (ipsilatéraux à l'inoculation) en expriment en quantités suffisantes pour être détectées par hybridation *in situ,* ce qui n'est pas le cas du côté droit [120]. Or, la relation entre expression des LAT par les neurones et capacité de réactivation de HSV-1 a été précédemment décrite (sans pour autant être élucidée) [79], et dans notre modèle, les TG gauches (ipsilatéraux à l'inoculation labiale) ont une plus grande capacité de réactivation. Notre hypothèse de travail est que les premiers temps de la dissémination du virus dans les divers éléments du système nerveux sensitif conditionnent ces derniers pour leur susceptibilité ultérieure au phénomène de réactivation.

En d'autres termes, nous avons émis l'hypothèse que les premiers tissus neuronaux sensitifs atteints par le virus (gauches dans notre modèle) peuvent héberger une infection latente capable de réactivation ultérieure, alors que ceux atteints quelques jours plus tard (côté droit) peuvent contraindre le virus à une infection latente définitive, probablement grâce à l'intermédiaire de mécanismes de défense immunitaire (mis en place respectivement après l'arrivée du virus du côté gauche, mais avant l'arrivée du virus du côté droit). La capacité de ces tissus neuronaux à permettre la réactivation (mais non pas à héberger la latence), serait ainsi modifiée de façon définitive.

Pour faire la preuve de ce concept, nous avons cherché à contraindre une souche virale sauvage virulente (SC16) à développer une infection latente sans capacité de réactivation, c'est à dire comme observé du côté non-inoculé (droit) de notre modèle, et dans l'un des deux TG chez l'homme (Thèse de Nolwenn Poccardi & article correspondant en **Annexe 1**).

Nous avons ainsi démontré qu'une primo-infection par une souche herpétique non-neurovirulente et non-réactivable (invalidée pour le gène de la thymidine kinase ou TK_{del})[236], donc uniquement capable de réplication locale au site d'inoculation, suivie d'une inoculation dans la lèvre controlatérale au moins 4 jours plus tard par une autre souche de HSV-1 pleinement virulente (SC16), induit une protection contre les signes d'infection aiguë et contre la réactivation virale (publication en cours de soumission). Ces observations suggèrent fortement qu'une pression du système immunitaire (déclenchée très rapidement par l'inoculation de la souche non-neurovirulente, qui ne peut se répliquer que dans la lèvre) est en cause dans la protection induite contre la ré-infection. Nous avons donc cherché à caractériser ces phénomènes, afin de mieux comprendre la pathogénie de l'histoire naturelle des kératites herpétiques chez l'homme, et dans un second temps de poser les bases du développement d'une stratégie préventive contre HSV-1.

2 Objectifs de la thèse

La compréhension des mécanismes en cause dans l'unilatéralité de l'infection récurrente, et par extension ceux induisant la protection induite par la souche TK_{del}, serait non seulement un progrès important dans la compréhension de la balance entre infection latente et réactivation de HSV-1, mais serait surtout une ouverture majeure vers de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment vaccinales.

Nos objectifs sont donc de i) étudier les mécanismes immunologiques innés et adaptatifs impliqués en jeu afin de mettre en évidence, *in fine* des corrélats de protection ; pour ii) poser les bases du développement à plus long terme de stratégies préventives efficaces contre HSV-1, notamment vaccinales.

3 Matériel et méthodes

3.1 Virus et cellules

3.1.1 Virus

Pour ces travaux, nous avons utilisé :

- La souche SC16 d'HSV1, dérivée d'une souche clinique pleinement virulente connue pour sa capacité à répliquer dans les cellules Vero [115]. Il s'agit par ailleurs de la souche utilisée dans le modèle murin d'infection herpétique développé par notre équipe [60]

- La souche recombinante HSV1-TK_{del} (souche TKDM21), dérivée de SC16, contenant une délétion de 831 pb entre les nucléotides 46695 et 47526 au sein du gène codant pour la thymidine kinase (TK, codée par le gène UL23)[237].

La souche HSV1-TK_{del} peut être considérée comme à réplication « limitée ». En effet, cette souche peut se répliquer dans des types cellulaires ayant des capacités de division (comme les cellules épithéliales), en utilisant les kinases cellulaires, mais pas dans les types cellulaires ne se divisant pas (tels que les neurones). Par conséquent, cette souche peut entrer en latence, mais ne peut pas se réactiver dans les neurones [236 237]. On peut donc considérer qu'il s'agit d'une souche réplicative, mais non **neuro-virulente**.

3.1.2 Cellules

Les cellules Vero (cellules épithéliales de rein du singe vert *Chlorocebus sp.* – anciennement *Cercopithecus Aethiops*) étaient utilisées pour la titration des stocks viraux par la méthode des plages de lyse. Cette lignée était choisie en raison de sa permissivité à l'infection herpétique (ces cellules présentent en effet les récepteurs membranaires nécessaires à l'entrée du virus et sont déficientes en interféron), sa capacité à entrainer des plages de lyse de grande taille (facilement comptables), et sa relative facilité de culture [238-240]. La culture cellulaire était réalisée dans un milieu de Eagle modifié de Dulbecco (*Dulbecco modified Eagle medium* ou DMEM, Gibco®, Life Technologies™, Paisley, Grande Bretagne) additionné de sérum de veau fœtal (SVF, à 10%), de pénicilline (100 UI/mL), de streptomycine (100g/mL), de GlutaMAX™, de D-Glucose (4,5g/L) et de pyruvate, dans une atmosphère contrôlée à 37°C avec 5% de CO_2.

3.2 Préparation des concentrés viraux

3.2.1 Infection des cellules

Des flacons de culture cellulaires T175 de cellules Vero confluentes à 90% étaient rincées avec du DMEM (6ml) puis infectées avec le virus dilué (SC16 ou TK_{del}) à raison de 2.10^5PFU dilué dans 5ml par T175 (MOI : 0,01). Après adsorption 1 heure, en incubateur à 37°C (flacons agités toutes les 15 minutes), l'infection était bloquée par un rinçage à l'aide de 30ml de DMEM + SVF à 5% + pénicilline et streptomycine, puis les cellules infectées étaient cultivées pendant 48 heures.

3.2.2 Récolte des cellules infectées

Les cellules et les surnageants primaires (SN1) étaient récoltés dans des tubes de 50ml (Falcon), puis centrifugés 10minutes/800G/4°C. Chaque culot primaire (C1) était re-suspendu dans 125µl de DMEM, transféré dans un Eppendorf de 1,5ml et soniqué 3 fois pendant 30 secondes avec des intervalles de 2 minutes entre chaque sonication. Les tubes étaient ensuite centrifugés 10minutes/800G/4°C. Le surnageant secondaire obtenu (SN2) contenant le concentré viral était transféré dans des tubes. Le culot secondaire (C2) était techniqué selon le protocole utilisé pour C1. Le surnageant tertiaire (S3) était poolé avec S2.

Purification sur coussin de sucrose :

Les surnageants S1, S2 et S3 étaient poolés. On versait le sucrose dilué à 25% dans du PBS dans les tubes stériles de l'ultracentrifugeuse (2ml par tube), puis un volume de 9ml de surnageant était délicatement déposé à la surface du sucrose. Les tubes étaient disposés dans le rotor SW41 (Beckman-Coulter) et centrifugés 3heures/70 000G/4°C dans une ultracentrifugeuse (Beckman-Coulter). Après aspiration du surnageant, les culots viraux (blanchâtres) étaient re-suspendus dans 200µl de DMEM sans rouge phénol, puis soniqués 3 fois 5 secondes. Le virus concentré purifié était aliquoté par volume de 20µl.

3.2.3 Détermination du titre des concentrés viraux

Une aliquote de chaque concentré viral était titrée selon la méthode de plage de lyse. Des dilutions successives de suspension virale étaient réalisées dans du milieu DMEM (non supplémenté en sérum ni antibiotique) puis déposées sur des cellules VERO confluentes en culture monocouche dans des plaques 6 puits (Falcon®), à raison de 200µl de suspension diluée par puits.

Après adsorption 1h à 37°C, l'inoculum viral était retiré puis les cellules recouvertes dans chaque puits d'1,5ml de milieu (composé de 2% de carboxyméthylcellulose (CMC), 10% de tryptose et enrichi avec 8% de SVF, 1% de pénicilline et streptomycine). Les boîtes étaient ensuite incubées à l'étuve pendant 3 jours à 37°C. Après cette période d'incubation, le milieu contenant de la carboxyméthylcellulose était retiré et le tapis cellulaire était coloré au cristal violet à 0,05% (dilué dans une solution aqueuse de formaldéhyde à 2% et d'éthanol à 50%), avec un temps d'incubation de 30 minutes. Le colorant était ensuite aspiré, les tapis cellulaires étaient rincés puis séchés à l'air libre avant lecture. Les plages de lyse étaient comptées à l'œil nu (elles apparaissaient comme une zone claire sur le fond coloré, **Figure 18**). Les titres viraux obtenus étaient de l'ordre de 2-3.10^9 PFU/ml.

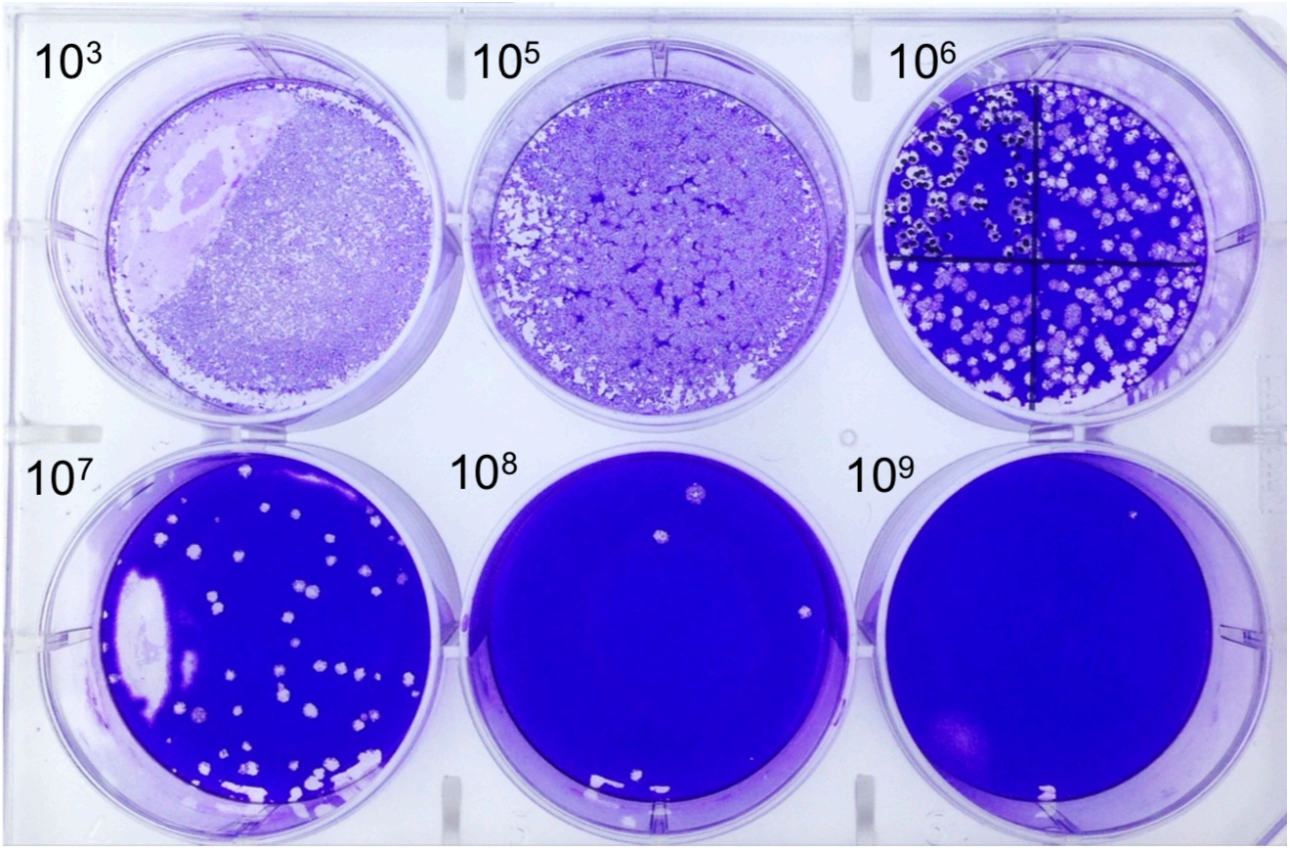


Figure 18 : exemple titration de la souche SC16 d'HSV-1. Les dilutions successives de suspension virales sont réalisées sur des plaques 6 puits. Les plages de lyse correspondent aux tâches claires (absence de tapis cellulaire) sur le fond bleu (tapis cellulaire intact coloré par le crystal violet). Sur les premières dilutions (10^3 et 10^5) les plages confluentes ne peuvent être comptées. En revanche, leur décompte est possible à partir de 10^6. Dans cet exemple, le titre correspond à 2,5.10^9 PFU/mL.

3.3 Techniques d'expérimentation animale

3.3.1 Animaux utilisés

Des souris BALB/c femelles de six semaines (Elevage Janvier, Le Genest Saint Ile, France) étaient utilisées pour toutes les expérimentations. Ces souris recevaient un accès illimité en nourriture et en eau. Toutes les manipulations et inoculations étaient réalisées sous anesthésie générale. Ces procédures étaient en conformité avec les règles éthiques de l'expérimentation animale, notamment celles définies par l'association pour la recherche en sciences visuelles et ophtamlologie (ARVO) ainsi que celles du comité d'éthique local. Elles respectaient les recommandations des démarches éthiques appliquées à l'expérimentation animale (règle des 3R pour *Reduce-Refine-Replace*), et ont été déclarées et validées par le CEEA 59 sous le numéro 0774602.

3.3.2 Inoculation des animaux, surveillance clinique et biologique

L'injection sous cutanéomuqueuse labiale supérieure était réalisée à l'aide d'une micropipette en verre faite sur mesure (par nos soins, à l'aide de capillaires en verre de 1mm de diamètre externe, Hilgenberg GmBH, Malsfled, Allemagne) reliée à un système d'injection mécanisé (Infusion Pump, Harvard Apparatus, Les Ulis), comme décrit précédemment [20].

Le volume injecté (1µL) contenait soit une suspension d'HSV1 contenant 10^6 PFU, soit, dans le groupe contrôle, une solution de tampon PBS. Pendant la période de l'infection aigüe (entre le 1er jour de la première inoculation et le 10ème jour suivant la seconde inoculation), les animaux étaient traités par antalgiques à titre préventif (meloxicam 0,4 mg/kg/j dans leur eau de boisson).

Les souris étaient observées quotidiennement avec surveillance de l'apparition des signes cliniques **(Tableau 3).**

Signes systémiques	Signes oculaires
- Modification de l'aspect du pelage avec hérissement des poils, - perte de poids, - réduction de la mobilité,	- Kératite se manifestant par une opacification, une néovascularisation et/ou, une ulcération cornéenne. - Blépharite, avec vésicules et croûtes périoculaires.

Tableau 3 : signes cliniques surveillés lors de l'inoculation des animaux avec SC16 ou TK_{del} ou les deux souches séquentiellement.

3.3.3 Groupes d'étude

Quatre groupes d'animaux étaient définis dans notre étude.

- **Le groupe SC16** était injecté avec 1µL du virus SC16 à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dns la lèvre supérieure gauche à **J0**.
- **Le groupe TK_{del}** était injecté avec 1µL du virus TK_{del} à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure droite à **J0**.
- **Le groupe contrôle**, était injecté avec du PBS (1µL) dans la lèvre supérieure gauche à **J0**.
- **Le groupe « réinfection »** était injecté avec 1µL du virus TK_{del} à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure droite à **J-4** puis 1µL du virus SC16 à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure gauche à **J0**.

Les échantillons tissulaires étaient prélevés à J0 sur les souris naïves, puis à des temps clefs du cycle infectieux d'HSV1 dans notre modèle : phase aigüe précoce (**J2, J4, J6**), phase aiguë tardive (**J10**) et latence (**J28**) [60 120]. Le protocole expérimental est schématisé sur la **figure 19**.

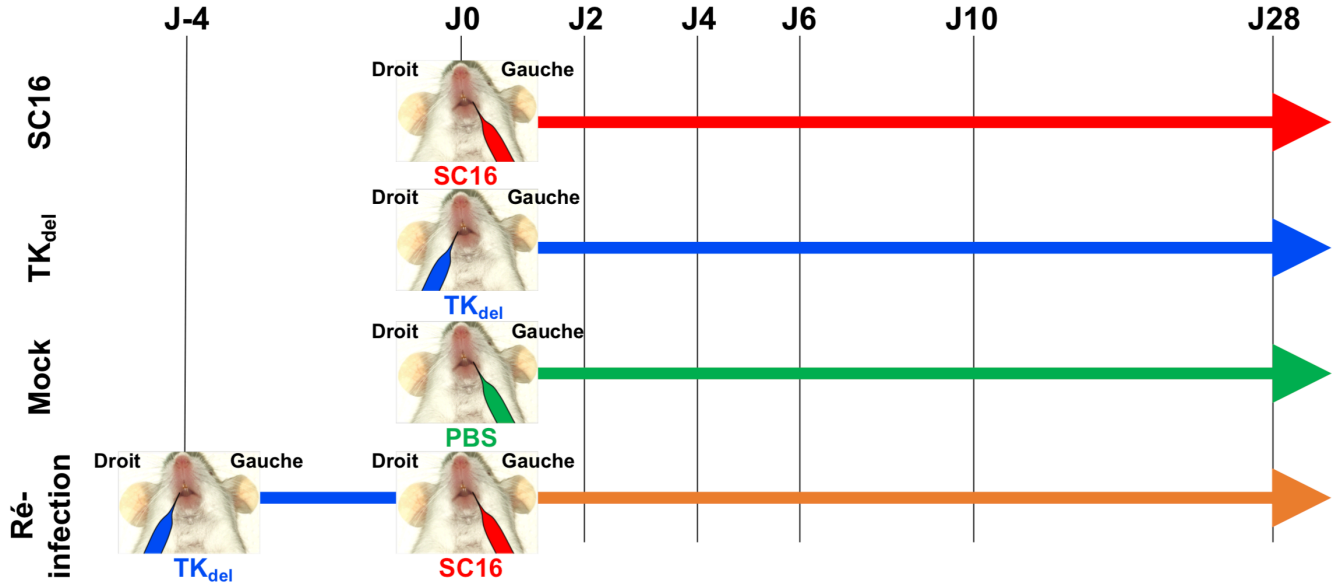


Figure 19 : Représentation schématique des groupes expérimentaux. En haut en bas : **groupe SC16**, injecté avec 1µL du virus SC16 à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure gauche à J0 ; **groupe TK_{del}**, injecté avec 1µL du virus TK_{del} à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure droite à J0 **groupe contrôle (Mock)**, injecté avec du PBS (1µL) dans la lèvre supérieure gauche à J0 ; **groupe « ré-infection »**, injecté avec 1µL du virus TK_{del} à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure droite à J-4 puis 1µL du virus SC16 à 10^9PFU/ml soit 10^6PFU dans la lèvre supérieure gauche à J0.

3.3.4 Sacrifice des animaux / points limites

Les animaux étaient sacrifiés par dislocation cervicale. Le protocole d'observation après inoculation était interrompu (euthanasie) si le comportement générait un doute franc sur l'existence d'une douleur importante ou d'une gêne fonctionnelle importante, c'est à dire devant l'observation d'au moins un des points limites suivants : i) agitation permanente et/ou attitude agressive vis à vis des autres animaux, ou à l'inverse ii) prostration et/ou troubles évidents de la mobilité gênant la marche de l'animal, notamment toute atteinte de la mobilité gênant l'accès à la nourriture et à la boisson disponible dans la cage ; iii) perte de poids cliniquement évidente (pesée en cas de doute, atteinte du point limite si perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids moyen des individus en début d'expérimentation), iv) vocalisation spontanée ou déclenchée par le toucher. En cas d'apparition d'un point limite, les animaux étaient euthanasiés dans les plus brefs délais par dislocation cervicale.

3.4 Analyse de la réponse immunitaire

Elle consistait en une analyse des tissus au site d'inoculation (lèvre) et d'infection (ganglion trigéminé) portant d'une part sur l'infiltrat par des cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes et d'autre part sur la présence de cytokines inflammatoires. Les prélèvements des échantillons étaient réalisés de la même façon dans les 2 cas.

3.4.1 Prélèvements des échantillons

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, les tissus étaient prélevés sous hotte microbiologique à l'aide de matériel chirurgical et microchirurgical.

Les prélèvements labiaux intéressaient un fragment de 2X2X2mm comportant la muqueuse, le tissu cutané et le tissu sous-muqueux au niveau de la commissure labiale. Les portions de nerf trigéminé prélevées s'étendaient de la racine, au ras du bulbe rachidien, jusqu'à 2mm après le ganglion trigéminé, soit après la division en 3 branches. Au total, le prélèvement mesurait 4 à 5 mm. Pour la compensation du cytomètre, la rate d'une souris du groupe SC16 était également prélevée.

3.4.2 Etude des infiltrats immuns par cytométrie en flux multiparamétrique

3.4.2.1 Préparation des tissus

Les tissus prélevés étaient transférés dans des tubes Eppendorf étiquetés contenant 1mL de milieu CM10 (DMEM contenant du GlutamaxTM, 10% de SVF, 50µg/ml de pénicilline et streptomycine, 100 µg/ml de néomycine et 5mM de tampon HEPES) conservés sur de la glace.

Dissociation des échantillons (lèvres et TG)

Nous avons adapté des protocoles publiés, combinant digestion mécanique et enzymatique afin de produire une suspension de cellules à partir des échantillons [241 242]. Les tissus étaient disposés sur des boites de Pétri stériles sous hotte microbiologique et coupés en fragments à l'aide de ciseaux de Vannas (Beaver Visitec International, Eybens, France), puis transférés avec une pipette dans des tubes Falcon de 15L avec 5ml de milieu CIM10. Des solutions concentrées d'enzymes étaient ajoutées dans chaque tube (50µl par tube de collagénase de type IV dosée à 1mg/ml - Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France- et de DNase de pancréas bovin à 100µg/ml - Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France-). Ces derniers étaient incubés à 37°C pendant 25 minutes avec une agitation mécanique à 60 rotations par minute.

Le lysat obtenu était passé au travers d'une membrane microporeuse disposée sur un tube Falcon de 50ml (Cell strainer 40 µm, Corning, Samois sur-Seine, France), à l'aide du piston d'une seringue d'1ml. La membrane était rincée avec 3ml de tampon pour cytométrie en flux (PBS additionné de 2% de FCS). Après centrifugation (7 minutes/400G/4°C), et aspiration du surnageant, le culot était resuspendu dans 1ml d'une solution de particules colloïdales de silice (Percoll Plus dilué à 37%, GE Healthcare, Chicago, USA).

Les tubes étaient centrifugés (10 minutes/400G/4°C, sans frein), afin de réaliser un gradient de densité pour séparer les cellules dissociées des résidus protéiques (notamment de myéline). Les surnageants étaient aspirés et les culots cellulaires re-suspendus dans 1ml de tampon pour cytomérie en flux (tampon PBS avec 2% de SVF), puis centrifugés.

3.4.2.2 Immunomarquages de surface

Les culots étaient re-suspendus dans 50µl d'une solution contenant le mélange d'anticorps suivant (**tableau 4**), puis conservés 20 minutes à 4°C.

Marqueur	Type cellulaire cible	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Référence	Vol. par échantillon (µl)
Live Dead	Cellules mortes	-	Aqua	Fischer Scientific	L34957	0,25
Ly6C	PNN	HK1.4	PerCPcy5.5	Fischer Scientific	45-5932-80	0,25
CD8a	LTCD8	53-6.7	PECF594	BD Biosciences	562283	0,5
CD3	LT	145-2C11	PEcy7	Fischer Scientific	25-0031-81	0,25
Ly6G	NK	1A8	AF700	BD Biosciences	561236	0,25
CD11b	Macrophages / monocytes/granulocytes / NK	M1/70	APCcy7	BD Biosciences	557657	0,125
CD64	Monocytes, macrophages / DC	X54-5/7.1	BV421	Biolegend	BLE139309	0,066
CD45	Cellules hématopoïétiques	30-F11	BV605	Biolegend	BLE103139	0,063
IA/IE	CMH II (LB)	M5/114	BV650	BD Biosciences	563415	0,033
CD24	PNN / LB / LT / monocytes / DC	M1/69	BV711	BD Biosciences	563450	0,05
CD11c	DC/ macrophages	HL3	BV786	BD Biosciences	563735	0,5
CD4	LTCD4	GK1.5	BUV395	BD Biosciences	563790	0,5
		Tampon PBS				Pour vol. total 50µl

Tableau 4 : mélange d'anticorps pour l'immunomarquage de surface (Vol. : volume).

Les cellules étaient ensuite lavées 2 fois par ajout d'1mL de tampon pour cytométrie en flux à chaque tube, centrifugation (500G, 3 minutes, 4°C) et aspiration. Le culot final était re-suspendu dans 150µl de tampon de fixation dilué à 10% dans de l'eau (BD cellfix 10X, BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) et stocké à 4°C.

3.4.2.3 Protocole de cytométrie en flux multiparamétrique (CMF)

Les échantillons étaient analysés le même jour ou le lendemain matin de la dissociation. Avant l'acquisition de la cytométrie, on ajoutait 50µl par tube d'une solution de billes de comptage (1 tube de *trucount beads*, BD Bioscience, dilué dans 2ml de PBS). L'acquisition était réalisée sur

un cytomètre FORTESSA X20 flow (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), en configuration 5 lasers/20 filtres.

3.4.2.4 Analyse des données

La calibration du cytomètre, notamment pour les voltages et les compensations, était réalisée avec des splénocytes de souris BALB/c infectées par SC16 selon le protocole habituel d'inoculation dans la lèvre. La préparation des cellules était réalisée par dissociation mécanique, puis passage à travers un filtre (*cell strainer* 40µm), et lavées avec du tampon pour CMF (PBS + 2% SVF). Après comptage cellulaire, on disposait un million de splénocytes par tube de CMF, lesquels étaient centrifugés (500G / 3 minutes / 4°C). Le culot était re-suspendu dans 50µl de PBS, avec un marqueur par tube, mis dans la même quantité que dans le mélange précédemment décrit. Après fixation et lavage, les échantillons étaient passés au cytomètre.

La compensation était réalisée manuellement, couleur par couleur, pour réduire au maximum les overlap des spectres d'émission des fluorophores utilisés dans notre panel d'anticorps. Nous réalisions ensuite l'acquisition d'un contrôle avec un mélange des splénocytes marqués par les différentes couleurs, puis l'acquisition des échantillons.

La stratégie de définition des populations (*gating strategy*) analysées par CMF était basée sur celle décrite par Yu *et al.* [139]. Elle est détaillée dans la première section des résultats.

3.4.3 Détection et quantification des chémokines inflammatoires

3.4.3.1 Préparation des homogénats tissulaires

Après prélèvement, les échantillons étaient transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5ml contenant 500µl d'un tampon de lyse cellulaire (800µl de 10X *cell lysis buffer* - Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA- dilué dans 8ml d'eau distillée et 80µl de fluoride de phénylméthylsulfonyl dilué au 1/100 - Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France-) et conservés dans la glace pendant 1 heure. Les échantillons étaient ensuite transférés dans des tubes contenant des billes de céramiques pour homogénéisation (CKmix 2ml, BertinPharma, Montigny le Bretonneux, France) et eux-mêmes traités par un homogénéisateur de tissus (Precellys24, BertinPharma, Montigny le Bretonneux, France) à 6500RPM pendant 45 secondes.

L'homogénat de tissu était centrifugé (5 minutes/10 000G/4°C), le surnageant était prélevé et conservé à -20°C.

3.4.3.2 Principe du kit LEGENDplex

Le kit LEGENDplex (Biolegend, Paris, France) est spécifiquement dédié à la détection et à la quantification des chémokines inflammatoires de souris. La technique repose sur les principes de base d'un test immunologique en « sandwich ». De manière schématique, des billes fluorescentes couvertes d'anticorps spécifiques des chémokines, de tailles différentes et d'intensité de fluorescence (allophycocyanine, APC) différentes pour chaque chémokine (au nombre de 13), permettant d'être bien différenciées les unes des autres, sont mises en présence d'un lysat tissulaire. Après fixation des chémokines aux billes, on ajoute les anticorps spécifiques biotinylés et de la streptavidine couplée à un fluorochrome (phycoérythrine, PE). Ces anticorps secondaires se fixent aux antigènes attachés au bille. Après lavage, la préparation est analysée en cytométrie en flux qui permet de séparer chaque chémokine (en fonction de la taille et de la fluorescence APC) et de les quantifier (grâce à l'intensité de la fluorescence PE) (**Figure 20**).

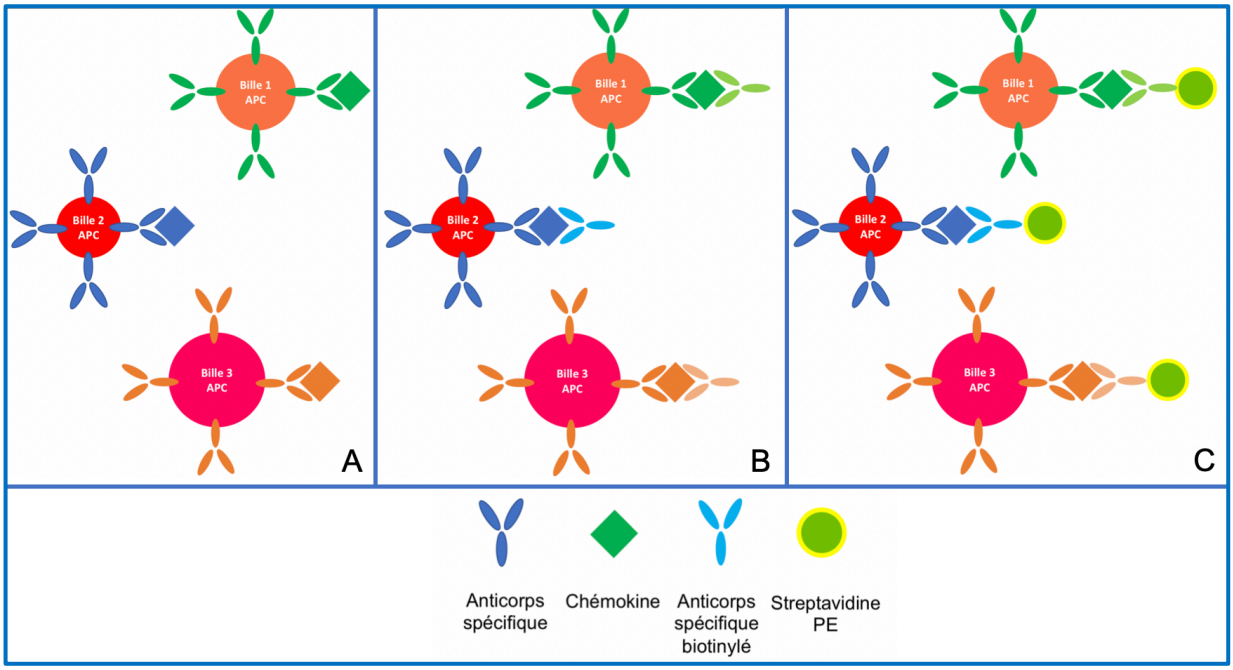


Figure 20 : Principe du kit LEGENDplex. **A)** Des billes fluorescentes couvertes d'anticorps spécifiques des chémokines, de tailles différentes et d'intensité de fluorescence (allophycocyanine, APC) différentes pour chaque chémokine (au nombre de 13), sont mises en présence d'un lysat tissulaire. Les chémokines se fixent aux billes. **B)** des anticorps spécifiques biotinylés sont ajoutés et se fixent aux antigènes attachés aux billes. **C)** La streptavidine couplée à un fluorochrome (phycoérythrine, PE) est ajoutée au mélange.

3.4.3.3 Réalisation du test

Le test était réalisé conformément aux instructions du fournisseur. L'ensemble des réactifs et les surnageants des lysats tissulaires étaient décongelés et portés à température ambiante. Les échantillons étaient dilués deux fois et une courbe étalon était établie en diluant des échantillons pour obtenir des concentrations finales (en pg/ml) de : 10 000 / 2 500 / 625 / 156,3 / 39,1 / 9,8 / 2,4 et un tampon était utilisé comme contrôle négatif. Les échantillons, les dilutions de la courbe étalon et les contrôles étaient incubés durant 2 heures sur un agitateur mécanique (cadencé à 500RPM) à température ambiante avec les billes du kit. Ces dernières comportent 13 types de billes, ayant chacune des paramètres spécifiques de taille et de fluorescence APC, et couvertes d'un anticorps spécifique d'une chémokine : CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10), CCL11 (éotaxine-1), CCL17 (TARC), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CXCL9 (MIG), CCL20 (MIP-3α), CXCL5 (LIX), CXCL1 (KC), CXCL13 (BLC) et CCL22 (MDC). Les principaux sources et rôles biologiques de ces chémokines sont résumées dans le tableau 5.

Chémokine	Principaux rôles biologiques	Principales source cellulaires
CCL2 (MCP-1)	- Chimiotactique pour les monocytes, LT mémoire, DC	Monocytes, macrophages, DC
CCL5 (RANTES)	- Chimiotactique pour les LT, PNE, PNB - Recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires - Prolifération et activation des NK	LT
CXCL10 (IP-10)	- Chimiotactique pour Monocytes, lymphocytes, PNB	Multiples types cellulaires, dont monocytes, cellules endothéliales, fibroblastes
CCL11 (Eotaxine)	- Chimiotactique pour les PNE	Multiples types cellulaires
CCL17 (TARC)	- Chimiotactique pour les LT	Macrophages, DC, PNE
CCL3 (MIP-1α)	- Chimiotactique pour les PNN	Multiples types cellulaires
CCL4 (MIP-1β)	- Chimiotactique pour les monocytes, macrophages et NK	Monocytes, LB, LT, fibroblastes cellules endothéliales et épithéliales
CXLC9 (MIG)	- Chimiotactique pour les lymphocytes	Non spécifiées
CCL20 (MIP-3α)	- Chimiotactique pour les lymphocytes	PNN, LB, DC
CXCL5 (LIX)	- Chimiotactique pour les PNN - Régulation des PNN - Remodelage tissus conjonctifs	Cellules épithéliales, PNE
CXCL1 (KC)	- Chimiotactique pour les PNN	Macrophages, PNN, cellules épithéliales
CXCL13 (BLC)	- Chimiotactique pour les LB	LT
CCL22 (MDC)	- Chimiotactique pour les monocytes, DCs, NK et LT activés	DC, macrophages

Tableau 5 : principales sources et rôles biologiques des chémokines testées dans notre étude.

Après lavage, les échantillons avec les billes, étaient incubés avec les anticorps de détection biotinylés et de la streptavidine couplée au PE pendant 30 minutes. Après 2 lavages avec un tampon spécifique, la quantité d'anticorps de détection liée aux billes était quantifiée à l'aide du cytomètre FORTESSA X20 (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) réglé pour acquérir 4000 billes par échantillon.

3.4.3.4 Analyse des données

Le logiciel LEGENDplex v.8.0 était utilisé pour déterminer la concentration des chémokines dans les lysats tissulaires par comparaison avec la courbe étalon. Ces données étaient exportées sur un fichier Excel (Microsoft)

3.4.4 Etude cytologique des infiltrats

3.4.4.1 Isolement des cellules immunitaires de la lèvre et du TG par CMF

Les cellules de 3 lèvres et 3 TG de chaque côté, prélevés à J6 p.i. après inoculation labiale par SC16 étaient poolées. Pour l'isolement, les cellules étaient marquées 20 minutes avec les anticorps suivant : Live/Dead Aqua (Life Technologies, Invitrogen), PE anti-CD11b, et APC-efluor700 anti-CD45. L'isolement était réalisé avec le cytomètre FACSAria I (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) avec le logiciel FACS Diva v6.

3.4.4.2 Centrifugation et étude morphologique

Les populations isolées étaient centrifugées (Cytospin 4, Thermo Scientific, France). La cytocentrifugeuse était équipée en lames Superfrost Plus (Thermo Scientific, France), chambre et buvard pour chaque échantillon analysé. Un volume de 50µl de chaque suspension était disposée (5×10^5 cellules / ml) dans une chambre, puis centrifugé à 800 RPM pour 1 minute. Les lames étaient séchées puis fixées et colorée par May-Grünwald Giemsa, puis photographiées (Nikon Eclipse 80i avec l'objectif Dxm 1200C) au grossissement X60 et identifiées sur des critères morphologiques par un cytologiste expérimenté.

3.4.5 Analyses statistiques :

Les analyses statistiques étaient réalisées avec le logiciel R, version 3.2.0.[243]. Les nombres de cellules étaient comparées à l'aide d'un test de permutation, les concentrations des chémokines étaient comparés à l'aide du t-test, les proportions des infiltrats immunitaires à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$ (bilatéral).

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

4 Résultats

Il existe chez l'homme, et dans notre modèle OO une protection naturelle des neurones d'un des 2 TG contre le phénomène de réactivation. Nous avons récemment identifié la possibilité d'induire un état de "protection" bilatéral dans notre modèle oro-oculaire. En effet, une primo-infection par inoculation labiale d'une souche non-neurovirulente et non réactivable d'HSV-1 (TK_{del}) permet de bloquer les signes d'infection aiguë et de réactivation causés par une souche pleinement virulente inoculée dans la lèvre controlatérale, si celle-ci est inoculé après un délai minimum de 4 jours [244] (**Annexe 1**).

Dans cette étude, nous avons étudié comment l'infection initiale par TK_{del} peut modifier la dynamique de l'infiltrat immunitaire et par conséquent des chémokines inflammatoires aux principaux sites de réplication virale, à savoir la lèvre du côté infecté puis les TG [60 116], lors d'une ré-infection par SC16. Dans ces conditions, nous avons précédemment observé que les souris ne présentent aucun des signes habituels de l'infection aiguë (hérissement du pelage, perte de poids, atteinte oculaire du côté de l'inoculation, mortalité) [244], alors qu'on observe une morbidité générale de 100% (dont 60% d'atteinte oculaire) et une mortalité de 35% dans les 10 jours suivant une inoculation simple de la souche SC16 [20 120 244].

4.1 Définition des populations en cytométrie en flux (CMF)

La stratégie de définition des populations en CMF utilisé dans notre étude est basée sur le protocole décrit par Yu et al. , conçu et validé pour analyser les infiltrats de cellules immunitaires dans les tissus non-lymphoïdes à l'état inflammatoire [139]. Nous avons cependant modifié quelques aspects du protocole comme suit. Tout d'abord, nous avons éliminé les doublets de cellules. En outre, nous avons utilisé des billes de comptage pour être en mesure de quantifier le nombre absolu de cellules acquises. En outre, les lymphocytes T, définis par $CD45^+/Ly6G^-/CD11c^-/CD11b^-/CD24^-/MHC2-$ ont été subdivisés en $LTCD8^+$ et $LTCD4^+$ (**Figure 22**). Cette stratégie permettait de définir une majorité des sous-types de cellules hématopoïétiques : PNN, PNE, cellules dendritiques $CD11b^+$ et $CD11b^-$, monocytes totaux, inflammatoires et résidents, LB, $LTCD8^+$, $LTCD4^+$, LT double négatifs, cellules NK, ainsi qu'une population non déterminée nommée X. Nous

avons donc utilisé cette stratégie de définition pour caractériser l'infiltrat immunitaire dans la lèvre et le TG aux différents temps (tissus non infectés à J0, phase aiguë précoce : J2, J4, J6 ; phase aiguë tardive J10 et phase latente), dans les différents groupes d'études (**Figure 19**).

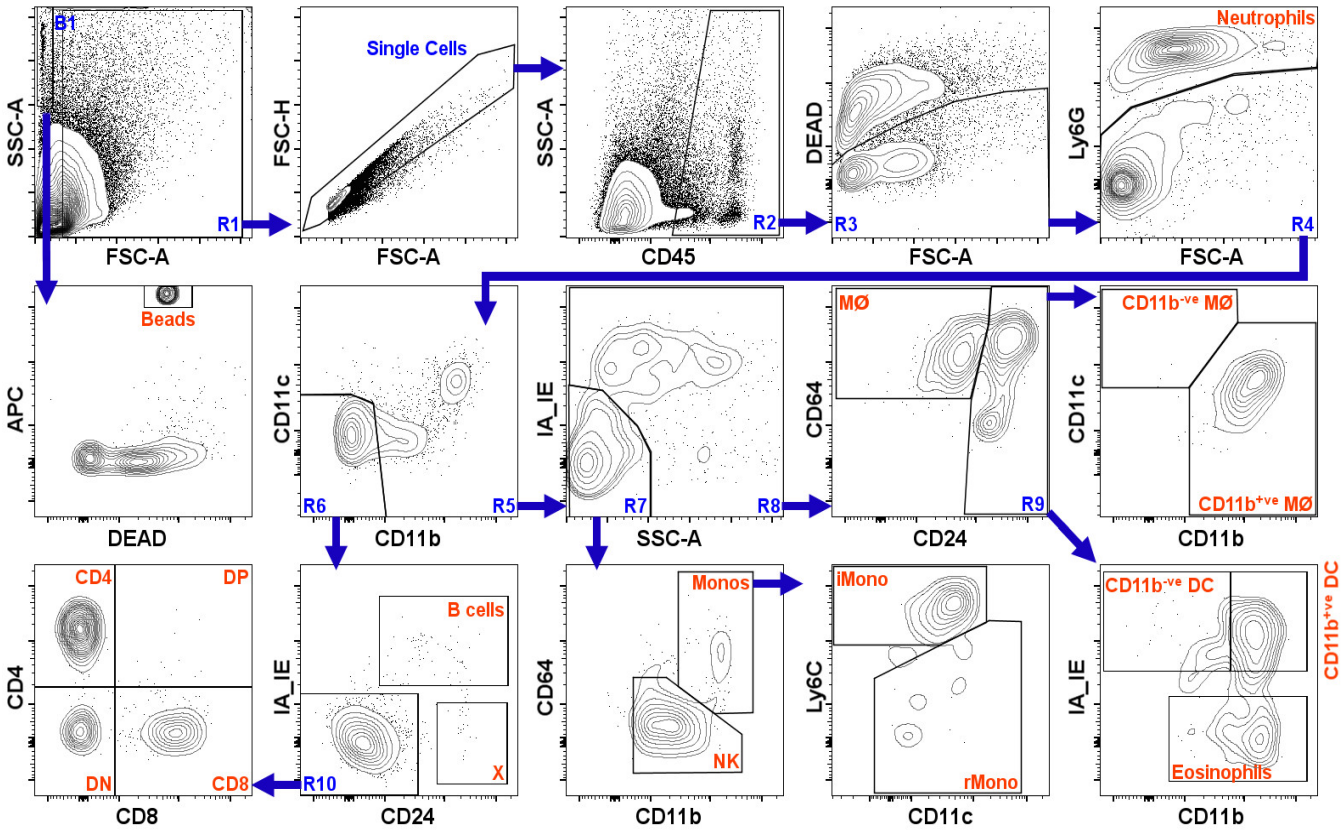


Figure 21 : tracés de contour et stratégie de définition des populations immunes dans les lèvres et TG, adapté d'après Yu et al. [139]. Cette permet de définir une majorité des sous-types de cellules hématopoïétiques : PNN, PNE, cellules dendritiques CD11b$^+$ et CD11b$^-$, monocytes totaux, inflammatoires et résidents, LB, LTCD8$^+$, LTCD4$^+$, LT double négatifs, cellules NK, ainsi qu'une population non déterminée (X).

4.2 Phénomènes immunologiques au site d'inoculation

4.2.1 L'infiltrat immunitaire global (cellules CD45$^+$) apparait plus précocement et disparait plus vite dans les lèvres infectées par SC16 du groupe réinfection

Nous avons tout d'abord quantifié l'infiltrat immunitaire global (cellules hématopoïétiques CD45$^+$) aux sites d'injection aux différents temps de l'infection (**lèvres gauches** des groupes contrôles, SC16, réinfection ; et **lèvres droites** du groupe TK_{del}) (**Figure 22**).

Le nombre de cellules CD45$^+$ augmentait de manière significative dans tous les groupes à J2 p.i., y compris dans le groupe contrôle. Dans ce dernier, cette augmentation était de faible

intensité et très transitoire, puisqu'elle n'était plus détectée à J4 p.i. Dans les groupes SC16 et TK_{del}, le nombre de cellules culminait à J4 p.i., puis diminuait tout en restant à un niveau significatif jusqu'à J28 p.i., surtout dans le groupe SC16, dans lequel le nombre de cellules à J28 était 40 fois plus important qu'à J0.

La cinétique de l'infiltrat immunitaire labial du groupe réinfection était sensiblement différente. Le nombre de cellules $CD45^+$ à J2 p.i. était significativement supérieur à celui des groupes contrôle, restait à un niveau élevé dans la phase aiguë précoce et s'effondrait à J10 p.i. (temps auquel l'expression des gènes viraux n'est plus détectable en immunohistochimie dans la lèvre [116]).

Ces résultats étaient en faveur d'un recrutement plus rapide dans le site d'infection par SC16 dans le groupe « réinfection » (préalablement inoculé dans la lèvre controlatérale avec TK_{del}). En outre, la résolution de l'infiltrat immunitaire semblait plus rapide dans le groupe réinfection que dans les groupes SC16 et TK_{del}.

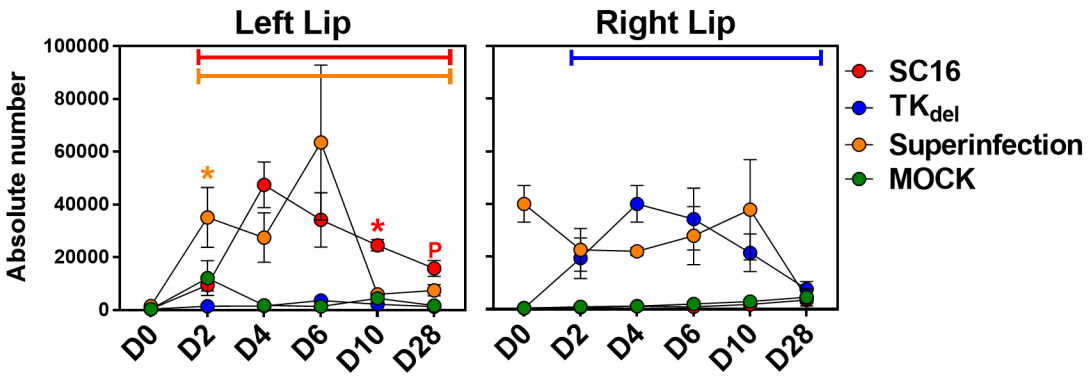


Figure 22 : évolution de l'infiltrat immunitaire (nombre absolu de cellules $CD45^+$) dans la lèvre au cours du temps dans les différents groupes expérimentaux. Les *barres colorées* indiquent la période durant laquelle le nombre de cellules de l'infiltrat est significativement plus élevée qu'à j0, elles ne concernent que les groupes TK_{del}, SC16 et réinfection. Les *astérisques colorés* indiquent que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de l'astérisque est significativement plus important que ceux des autres groupes. La *lettre P colorée* indique que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de la lettre est significativement plus important que ceux du groupe contrôle (PBS). (Superinfection = réinfection)

4.2.2 L'infection préalable par TK_{del} induit des modifications qualitatives, quantitatives et dynamiques des sous-types immunitaires au site de la réinfection par SC16

A l'aide de la stratégie de définition des populations définies précédemment (**Figure 21)**, nous avons analysé plus spécifiquement les différentes sous-populations de cellules immunitaires de l'infiltrat dans les lèvres de animaux inoculés, afin de déterminer si la dynamique de ces infiltrats dans le tissu labial réinfecté par SC16 était modifiée par l'inoculation préalable du virus TK_{del} dans la lèvre controlatérale (**Figure 23**).

L'ensemble des populations étudiées infiltrait les tissus labiaux infectés de manière significative dès J2, à l'exception des LB et des DC $CD11b^+$ (**Figure 23 I & K**).

Dans les lèvres inoculées avec du PBS (groupe contrôle), on constatait également des infiltrats significatifs, qui ne concernaient toutefois que les monocytes inflammatoires, les macrophages, les PNN, les PNE, les DC $CD11b^+$ et $CD11b^-$, et disparaissaient à J4 (**Figure 23 E-J, courbe verte**). Au contraire, les infiltrats de ces populations persistaient à jusqu'à J28 dans les lèvres infectées des groupes SC16 and TK_{del}.

Dans les lèvres infectées du groupe SC16 la plupart des sous-types culminaient à J4 (NK, LT DN, monocytes inflammatoires, macrophages, PNN et PNE (**Figure 23 A, B, E-H**). Ces infiltrats déclinaient à partir de J6 mais persistaient à des niveaux significatifs jusqu'à J28, à l'exception des LT DN. Les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ et les LB culminaient à J6 et persistaient également jusqu'à J28 (**Figure 23 C, D & K**). Le nombre de DC $CD11b^+$ et $CD11b^-$ semblaient augmenter au cours du temps, atteignant un maximum à J28 (**Figure 23 I & J)**

L'infiltrat des **lèvres infectées par SC16 du groupe réinfection** était très différent de celui du groupe SC16, tant sur sa composition que sur sa dynamique. Les NK, LT $CD4^+$ et $CD8^+$, y augmentaient de manière plus importante J2. Par contre, ils diminuaient drastiquement après J6. Les macrophages et les neutrophiles diminuaient également après J6 (**Figure 23 F & G**). En outre, il ne semblait pas y avoir d'infiltration par des monocytes inflammatoires (**Figure 23 E**). Enfin, les DC $CD11b^+$ atteignaient des nombres plus importants, bien qu'ils n'étaient supérieurs à ceux des groupes contrôles et SC16 seulement à J4, et ils restaient à un niveau équivalent jusqu'à J28.

Pour résumer, suite à une infection par HSV-1, la plupart des populations immunes infiltraient la lèvre inoculée à J2, culminaient à J4-J6 et persistaient à J28. Une primo-infection par TK_{del} entraine donc des modifications majeures de la composition et de la dynamique de l'infiltrat immunitaire lors d'une réinfection par SC16 4 jours plus tard dans la lèvre controlatérale : infiltration plus précoce et plus abondante par les NK, les $LTCD4^+$ et les $LTCD8^+$, absence de monocytes inflammatoires pendant la phase aigüe, augmentation des DC et réduction des infiltrats immunitaires à la phase aiguë tardive (J10) et à la phase de latence (J28).

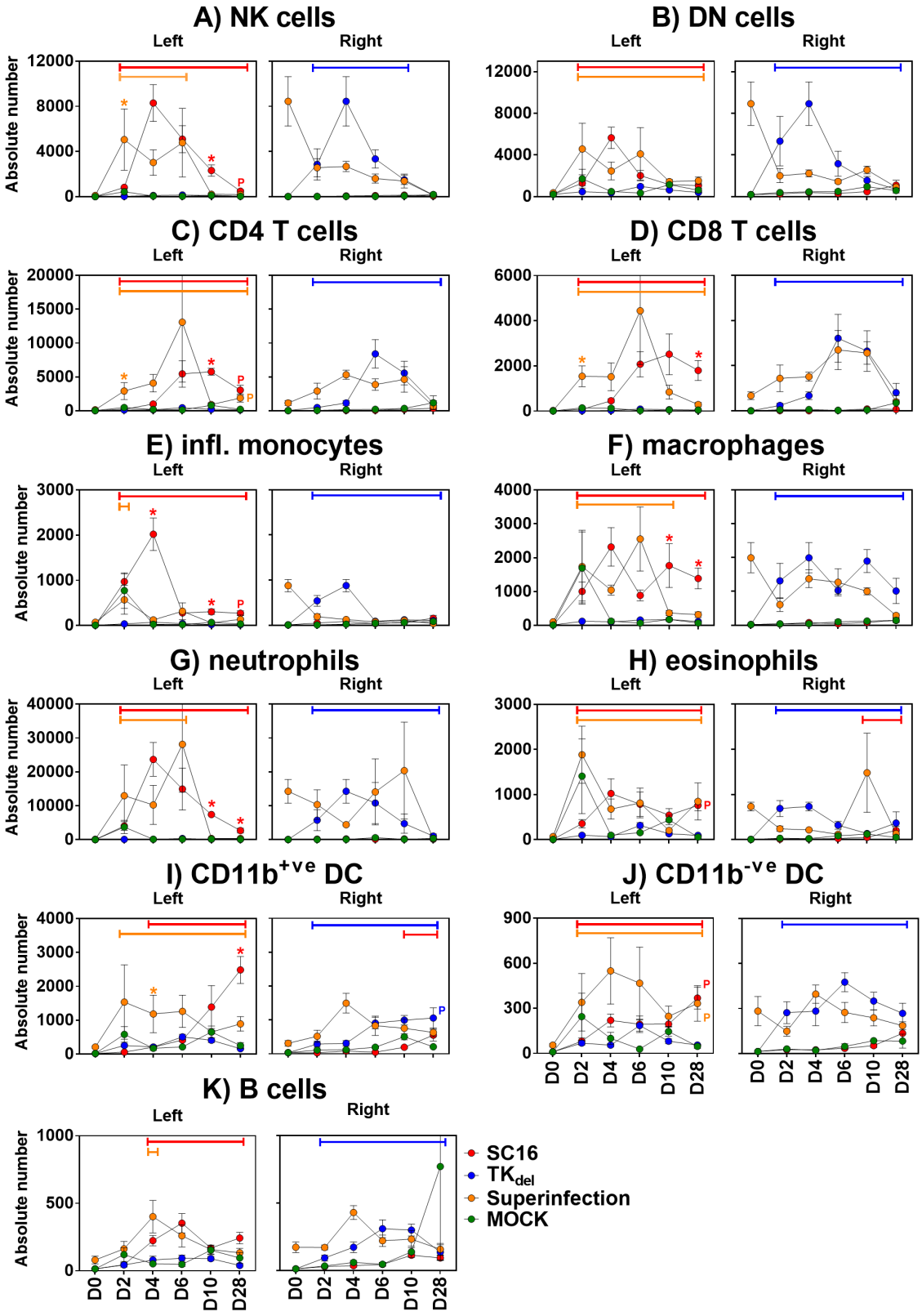


Figure 23 A-K : évolution au cours du temps de l'infiltrat pour chacune des sous-populations de cellules immunitaires dans la lèvre pendant l'infection. Les *barres colorées* indiquent la période durant laquelle le nombre de cellules de l'infiltrat est significativement plus élevée qu'à J0, elles ne concernent que les groupes TK_{del}, SC16 et réinfection (*Superinfection*). Les *astérisques colorés* indiquent que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de l'astérisque est significativement plus important que ceux des autres groupes. La *lettre P colorée* indique que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de la lettre est significativement plus important que ceux du groupe contrôle (*Mock*).

4.2.3 L'infiltrat immunitaire dans les lèvres réinfectées est orienté vers une réponse adaptative

Afin d'affiner l'analyse des modifications des dynamiques de l'infiltrat immunitaire du site de surinfection par SC16 induite par primo-infection préalable par TK_{del}, nous avons comparé les proportions des différents infiltrats spécifiques (% du nombre total de cellules $CD45^+$), présentes au site d'inoculation de SC16 dans les groupes **SC16** et **réinfection**. Dans un souci de clarté, les populations de LTCD4+ et LTCD8+ étaient fusionnées, de même que les populations de DC $CD11^+$ et $CD11^-$(**Figure 24**).

Les PNN constituaient la sous-population majoritaire dans les lèvres inoculées des groupes SC16 et réinfection entre J2 et J6 (**Figure 24, orange**). Toutefois, la proportion des PNN diminuait à J10 et J28 dans le groupe réinfection, tandis qu'elle restait prédominante dans le groupe SC16 (8% vs 32% à J10 ; 5% vs 18% à J28, respectivement, $p < 0,03$).

Dans les lèvres réinfectées par SC16, les monocytes étaient nettement moins fréquents à J2 et J4 (2% vs 12% à J2 ; 1% vs 5% à J4 ; respectivement, $p < 0,03$ pour les 2 comparaisons), mais cette différence n'était plus significative à J6 et J10. En outre, la proportion de NK était moindre de J4 à J10 (11% vs 18% à J4, 6% vs 17% à J6, 4% vs 10% at D10, respectivement, $p < 0,03$ pour les 3 comparaisons).

A l'opposé, la proportion de LT était plus importante dans les lèvres du groupe réinfection à J4 et J10 (33% vs 16% à J4 ; 57% vs 40% à J10 ; respectivement, $p < 0,03$ pour les 2 comparaisons). De même, les LB et les DC étaient plus fréquents à J4 et J10 dans le groupe réinfection (LB : 2% vs 0,5% à J4 ; 3% vs 0,8% à J10 respectivement ; $p < 0,03$ pour les 2 comparaisons ; DC : 11% vs 1% à J4; 15% vs 6% à J10, $p < 0,03$ pour les 2 comparaisons).

A la phase de latence (J28), les proportions de DC étaient comparables dans les 2 groupes, tandis que la proportion des LT était plus importante dans le groupe réinfection (53% vs 39% ; $p < 0,03$).

L'ensemble de ces résultats était en faveur d'une transition d'une réponse innée lors de la primo-infection par SC16 vers une réponse adaptative lors d'une réinfection par SC16 effectuée 4 jours après une primo-infection par TK_{del}.

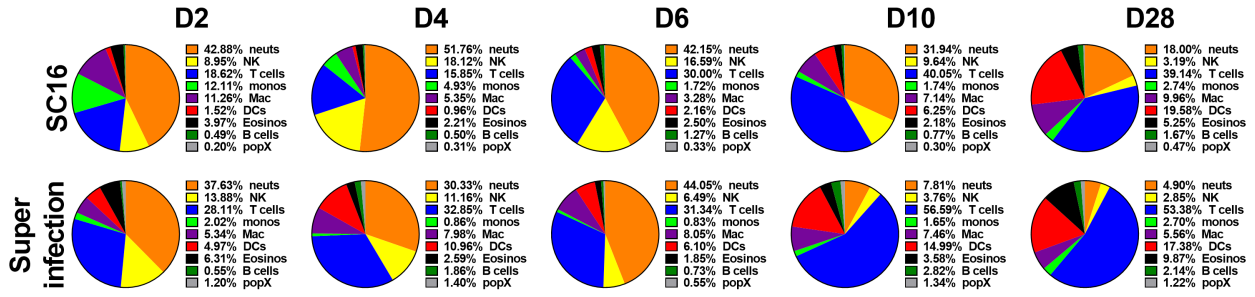


Figure 24 : représentation en diagramme des proportions des différentes populations de l'infiltrat immunitaire total (CD45$^+$) pendant la phase aiguë et latente de l'infection dans les lèvres infectées ou surinfectées par SC16 (lèvres gauches des groupes SC16 et réinfection). Les proportions de chaque type cellulaire ont fait l'objet d'une comparaison statistique (test de Kruskal-Wallis) entre les groupes SC16 et réinfection.

4.2.4 Les concentrations de chémokines inflammatoires sont diminuées lors d'une réinfection par SC16

Afin de mieux caractériser la réponse inflammatoire induite au site de l'inoculation d'HSV1, nous avons mesuré les concentrations en chémokines inflammatoires dans les lèvres inoculées des groupes TKdel, SC16 et réinfection (**Figure 25**).

Les dynamiques des concentrations en chémokines inflammatoires aux sites d'inoculation étaient globalement similaires dans **les groupes TK_{del} et SC16** (**Figure 25 A et B,** respectivement), avec un pic de concentration à J4 p.i. suivi d'une diminution à J6 p.i. (à l'exception de CCL11 dont le pic était à J6 p.i. dans le groupe SC16).

Dans les lèvres inoculées du groupe TK_{del} les concentrations de CCL11, CCL2, CCL3 et CCL4 augmentaient uniquement à J4 p.i. (**Figure 25 A**). En revanche, l'augmentation des concentrations de CCL5, CXCL9 et CXCL10 était significative pendant toute la phase aiguë (J2 à J10 p.i.).

Dans les lèvres inoculées du groupe SC16, les concentrations en CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CXCL1, CXCL9, et CXCL10 étaient significativement augmentées pendant toute la phase aiguë (J2 à J10 p.i., **Figure 25B**). CCL2 persistait en latence (J28 p.i.) à des niveaux bas, mais significatifs, par rapport aux concentrations observées dans les tissus naïfs (J0). Les concentrations de CXCL13 augmentaient de J4 à J28 p.i., mais, en raison d'une variabilité importante des mesures, seules les concentrations à J6 et J10 p.i. étaient significativement supérieures à celles de J0. Les

concentrations en CCL5 étaient augmentées durant toute l'étude, mais pour la même raison, cette augmentation n'était significative qu'à J2 et J4 p.i.

Dans les lèvres inoculées par SC16 du groupe réinfection, il semblait y avoir une augmentation des concentrations de CCL5, CCL11, CCL3, CCL4, et CXCL13, toutefois non significative en comparaison avec J0 (**Figure 25C**)

Comme attendu, on retrouvait dans **les lèvres inoculées par TK_{del} du groupe ré-infection** (lèvres droites) un profil d'augmentation des concentrations de chémokines comparable à celui observé dans les tissus labiaux infectés du groupe TK_{del}. On notait en effet une augmentation significative de CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CXCL13 et CXCL5 (**Figure 25D**), mais de façon sporadique entre J2 et J10 après la réinfection par SC16, ce qui correspond à J6-J14 après l'infection par TK_{del}.

Nous observions donc une augmentation majeure et une persistance des chémokines inflammatoires dans les lèvres inoculées du groupe SC16, contrairement à celles du groupe TK_{del}. Par ailleurs, on observait une nette diminution des chémokines inflammatoires dans le site d'inoculation de SC16, lorsque les animaux avaient été préalablement inoculés avec TK_{del} (groupe réinfection).

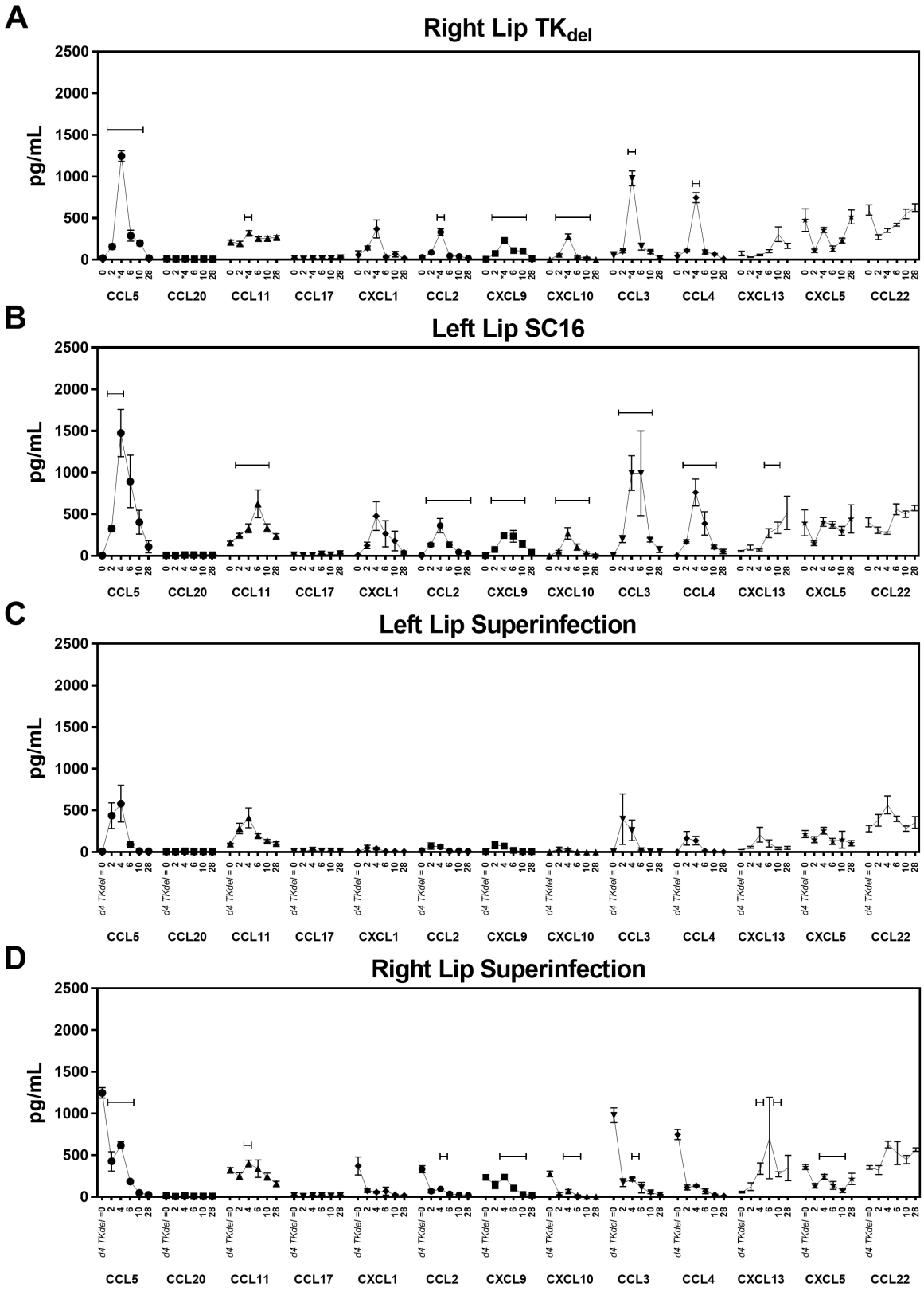


Figure 25 : Dynamique des concentrations des chémokines inflammatoires dans la lèvre (pg/mL) au cours de l'étude (J0, J2, J4, J6, J10, J28). **A)** Lèvre inoculée (droite) du groupe TK_{del} ; **B)** Lèvre inoculée (gauche) du groupe SC16 ; **C)** lèvre inoculée par SC16 (gauche) du groupe réinfection; **D)** Lèvre inoculée par TK_{del} (droite) du groupe réinfection.

4.3 Phénomènes immunologiques dans le TG

4.3.1 L'infiltrat immunitaire est diminué du côté de la réinfection par SC16

A l'aide de la même méthodologie que celle utilisée pour les lèvres infectées, nous avons ensuite évalué la dynamique de l'infiltrat immunitaire global (nombre de cellules $CD45^+$) dans les TG des souris des différents groupes (**Figure 26**).

Dans le groupe **contrôle (Figure 26, TG gauches, courbe verte)**, nous n'observions pas d'infiltrat significatif aux différents temps de l'infection.

Dans le TG ipsilatéral à l'inoculation (iTG) du **groupe SC16,** il existait une augmentation minime, mais significative, de l'infiltrat dès J2. Le nombre de cellules $CD45^+$ était multiplié par 8,7 à J4 et atteignait son pic à J6, où le nombre de cellules était multiplié par 32 par rapport à J0 (**Figure 26, TG gauches, courbe rouge)**. L'infiltrat diminuait à J10, tout en restant plus important que dans les iTG des autres groupes ($p < 0,03$ pour les 2 comparaisons). A J28, l'infiltrat restait supérieur à celui du groupe contrôle. Dans le TG controlatéral à l'inoculation, on notait un infiltrat significatif, mais de moindre abondance, de J4 à J28 (**Figure 26, TG droits, courbe rouge)**.

La cinétique de l'infiltrat des iTG du **groupe TK_{del}**, était globalement comparable, mais avec 2 différences notables : un début retardé de 2 jours (J4 à la place de J2) et un nombre de cellules nettement moindre.

Concernant le **groupe réinfection**, il y avait une augmentation de l'infiltrat $CD45^+$ dans certains TG ipsilatéraux à la réinfection par SC16 (gauches), mais en moyenne, cette variation n'était pas significative, en comparaison avec l'infiltrat à J0 (**Figure 26, TG gauches, courbe orange)**. Par contre, l'infiltrat était significativement plus important que dans le groupe contrôle ($p < 0,03$) à J6, puis revenait à un niveau équivalent à ce dernier à J10 et J28. De manière attendue, l'infiltrat dans le TG droit du groupe réinfection (du côté de l'inoculation de TK_{del}) était similaire à celui du iTG du groupe TK_{del}, sachant que J2 dans ce groupe correspond à J6 après l'inoculation de TK_{del} (**Figure 26, TG droits, courbe orange**).

Ces données démontraient une infiltration significative des iTG du groupe SC16 à J2, qui persistait en abondance jusqu'à J28 (phase de latence). L'infiltrat était nettement moindre dans le TG ipsilatéral à l'inoculation de SC16 du groupe réinfection, où il était résolu à J10.

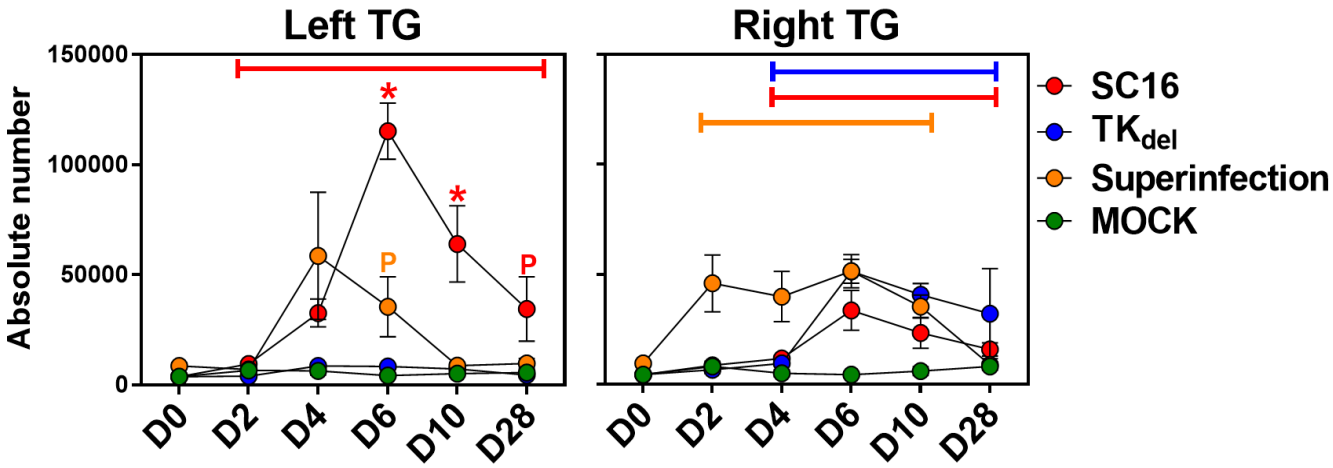


Figure 26 : évolution de l'infiltrat immunitaire (nombre absolu de cellules CD45$^+$) dans les TG au cours du temps dans les différents groupes expérimentaux. Les *barres colorées* indiquent la période durant laquelle le nombre de cellules de l'infiltrat est significativement plus élevée qu'à j0, elles ne concernent que les groupes TK_{del}, SC16 et réinfection. Les *astérisques colorés* indiquent que l'infiltrat CD45$^+$ du groupe correspondant à la couleur de l'astérisque est significativement plus important que ceux des autres groupes. La *lettre P colorée* indique que l'infiltrat CD45$^+$ du groupe correspondant à la couleur de la lettre est significativement plus important que ceux du groupe contrôle (PBS). (Superinfection = ré-infection, Mock = contrôle).

4.3.2 Certaines types cellulaires sont absents des TG ipsilatéraux à la ré-infection par SC16

L'analyse spécifique des différentes populations de cellules immunitaires permettait de mieux cerner l'effet d'une primo-infection par TK_{del} lors de la réinfection par SC16 (**Figure 27**).

Dans **les iTG du groupe SC16**, on constatait une augmentation significative de l'ensemble des sous-populations pendant la phase aiguë de l'infection (J2-J10). Le nombre de cellules culminait à J4 pour les monocytes inflammatoires et les PNN (**Figure 27 E & G**), et à J6 pour les autres populations (cellules NK, cellules DN, LTCD4+, LTCD8+, macrophages, PNE, DC CD11b$^+$ et CD11b$^-$ et LB, **Figure 27 A-D, F, H-K**). Les monocytes inflammatoires et les PNE persistaient jusqu'à la fin de la phase aiguë (J10) (**Figure 27 E & H**), alors que les PNN diminuaient à J6 (**Figure 27 G**). Les autres populations persistaient jusqu'à J28 (**Figure 27 A-D, F, I-K**), à des niveaux le plus souvent supérieurs à ceux du groupe contrôle (**Figure 27 C, D, F, I and J**).

On observait dans **les iTG du groupe TK_{del},** une dynamique assez similaire, mais avec une amplitude moindre, à l'exception des infiltrats des LTCD4+, LTCD8+ et DC CD11b$^-$ dont l'amplitude était comparable à celle des iTG du groupe SC16.

Dans les **TG controlatéraux à l'inoculation du groupe SC16** (**Figure 27, TG droits, courbe rouge**) on détectait une augmentation significative, mais limitée à la phase aiguë, des monocytes inflammatoires, macrophages, PNN, PNE et DC CD11b$^+$ (**Figure 27 E-I**). En revanche, les NK, cellules DN, LTCD4$^+$, LTCD8$^+$, DC CD11b$^-$ et les LB augmentaient à la fois pendant la phase aiguë et en latence (**Figure 27 A-D, J, K**).

Dans le groupe **réinfection**, il y avait une réduction globale des infiltrats spécifiques dans les TG ipsilatéraux à la réinfection par SC16. Les nombres de NK, DN, LTCD4$^+$, monocytes inflammatoires et LB (**Figure 27 A-C, K**) n'augmentaient de manière significative qu'à un seul temps de l'infection (*J4 pour les* monocytes inflammatoires, *J6 pour les autres*). Les LTCD8$^+$ persistaient jusqu'à J28 (**Figure 27 D**), mais à un niveau moindre que dans les iTG du groupe SC16. Il semblait y avoir une augmentation des DC CD11b$^-$ dès J4, mais cette dernière ne devenait significative qu'entre J6 et J28 (**Figure 27 J**), et à niveau équivalent à celui constaté dans le groupe SC16. En revanche, il n'y avait pas d'augmentation significative des macrophages, PNN, PNE, DC CD11b$^+$ (**Figure 27 F-I**).

On constatait donc une infiltration très nette par l'ensemble des populations dans les iTG du groupe SC16, avec certains populations présentes dès J2 (NK, cellules DN, monocytes inflammatoires), mais surtout, une augmentation nette à J4 ou J6. Dans le TG controlatéral, il y avait un infiltrat très discret des populations de l'immunité innée et un infiltrat réduit, mais plus sensible des populations de l'immunité adaptative. Ce même type de profil était retrouvé dans les TG ipsilatéraux à l'inoculation de SC16 du groupe **ré-infection**, avec une réduction majeure, voire une disparition, de certaines populations de l'immunité innée (macrophages, PNE, PNN, DC CD11b$^+$) et une réduction des populations de l'immunité adaptative.

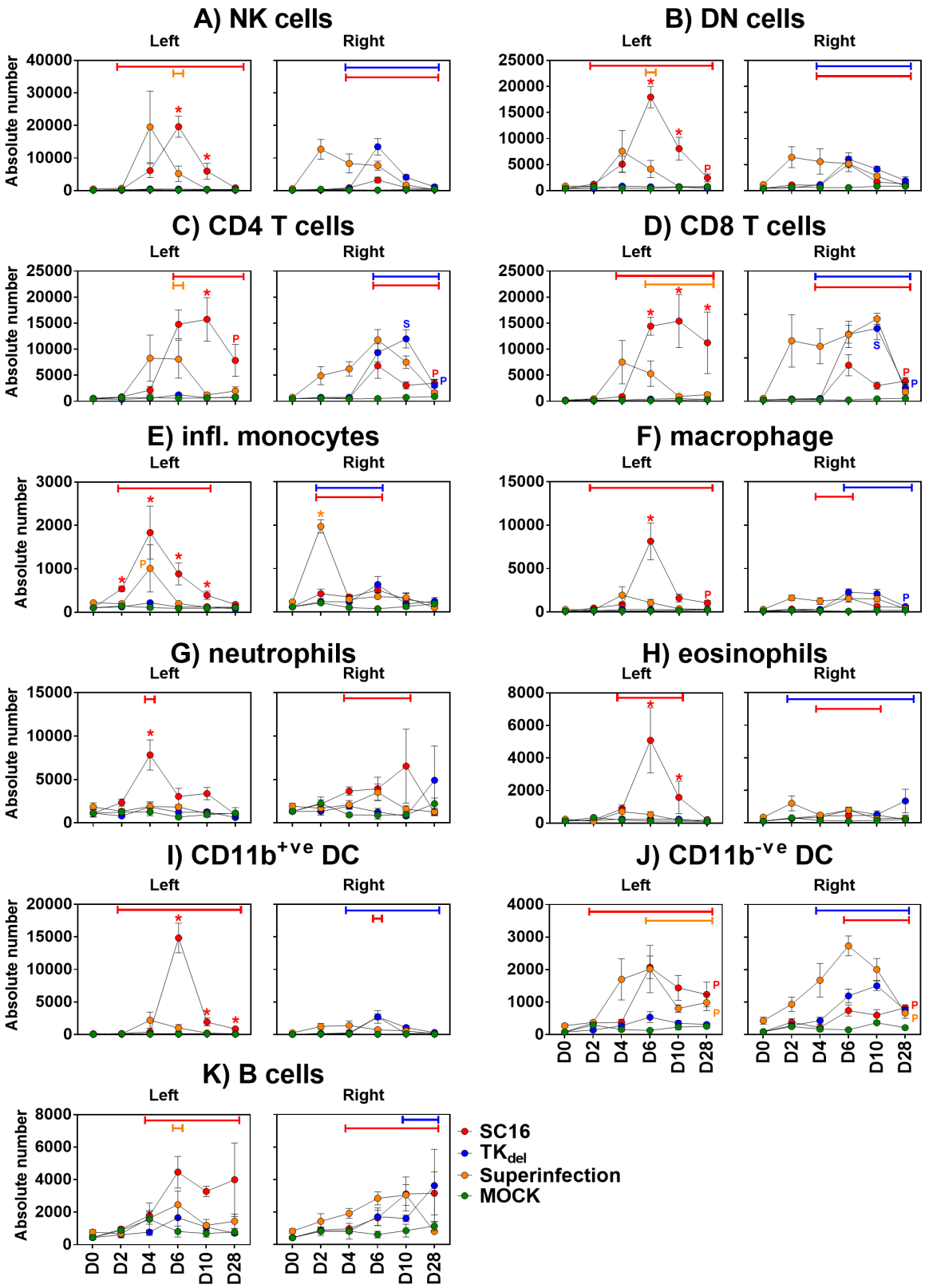


Figure 27 A-K: évolution au cours du temps de l'infiltrat pour chacune des sous-populations de cellules immunitaires dans les TG pendant l'infection. Les *barres colorées* indiquent la période durant laquelle le nombre de cellules de l'infiltrat est significativement plus élevée qu'à J0, elles ne concernent que les groupes TK_{del}, SC16 et réinfection (*Superinfection*). Les *astérisques colorés* indiquent que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de l'astérisque est significativement plus important que ceux des autres groupes. La *lettre P colorée* indique que l'infiltrat $CD45^+$ du groupe correspondant à la couleur de la lettre est significativement plus important que ceux du groupe contrôle (*Mock*).

4.3.3 Les lymphocytes T prédominent dans les TG, avec une cinétique différente lors de la réinfection par SC16

Afin de mieux comprendre comment la primo-infection préalable par TK_{del} modifiait les dynamiques de l'infiltrat immunitaire des TG ipsilatéraux à l'inoculation de SC16, nous avons comparé les proportions des différents infiltrats spécifiques (% du nombre total de cellules $CD45^+$), présentes au site d'inoculation de SC16 dans les groupes **SC16** et **réinfection (Figure 28)**.

Les LT constituaient l'infiltrat prédominant dans les 2 groupes. Dans les iTG du groupe SC16, la proportion de ces derniers augmentait au cours de la phase aiguë, de 28% à J4, à 63% à J10, puis se stabilisait à J28 (65%). Leur fréquence évoluait moins dans le groupe réinfection, passant de 34% à J2, à 36% à J10 puis 42% à J28. Toutefois, la différence de proportion des LT entre les 2 groupes n'était significative qu'à J10 ($p < 0,03$).

Au premier temps de mesure (J2), les proportions des populations étaient assez similaires entre les 2 groupes, à l'exception des monocytes, plus fréquents dans les iTG du groupe SC16 (12% vs 7% ; $p < 0,03$). La proportion de ces derniers restait plus importante dans le groupe SC16 à J4 (8% vs 3% ; $p < 0,03$), tandis que la tendance s'inversait à J10 et J28 où ils étaient plus fréquents dans le groupe réinfection (5% vs 1% à J10 ; 4% vs 1% à J28 ; $p < 0,03$ pour les 2 comparaisons).

Dans les TG du groupe SC16, la proportion des DC culminait à J6, où elle était supérieure à celle du groupe réinfection (16% vs 9% $p < 0,03$), puis diminuait à J10, où à l'inverse, elle était inférieure à celle du groupe réinfection (6% vs 15% ; $p < 0,03$).

Dans les iTG du groupe SC16, la proportion des NK, monocytes, macrophages et PNE déclinait au cours du suivi, au profit de l'augmentation des LT et des PNN. Dans les TG du groupe réinfection, les LT étaient plutôt stables et les NK diminuaient alors que les autres populations augmentaient.

Ces résultats illustraient les cinétiques différentielles des proportions des monocytes, des DC, des NK et des LT au cours de la phase aiguë (J2 à J10). Les LT qui prédominaient largement dans les 2 groupes, voyaient leur proportion augmenter au fil du temps dans le groupe SC16, tandis qu'elle était plutôt sable dans le groupe réinfection. Aux premiers jours de la phase aiguë, les monocytes étaient plus fréquents dans les iTG du groupe SC16 que dans le groupe réinfection,

tandis que c'était le contraire à J10 et J28. Quant aux DC, leur proportion atteignait un pic à J6 suivi d'une diminution dans le groupe SC16, alors qu'elle augmentait plus tardivement (J10) et se stabilisait dans la phase de latence dans le groupe réinfection.

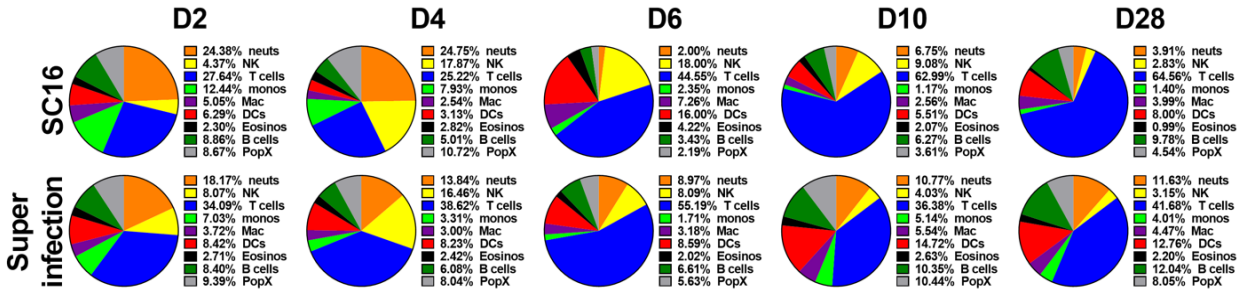


Figure 28 : représentation en diagramme des proportions des différentes populations de l'infiltrat immunitaire total ($CD45^+$) pendant la phase aiguë et latente de l'infection dans les TG ipsilatéraux à l'inoculation de SC16 (gauches) dans les groupes SC16 et réinfection. Les proportions de chaque type cellulaire ont fait l'objet d'une comparaison statistique (test de Kruskal-Wallis) entre les groupes SC16 et réinfection.

4.3.4 Les chémokines inflammatoires induites par l'infection des TG par SC16 sont nettement diminuées lors de la réinfection

Afin de mieux définir la réaction inflammatoire induite par l'infection par HSV-1 dans les TG, nous mesurions et comparions les concentrations des chémokines inflammatoires dans les iTG des groupes SC16 et TK_{del}, et dans les TG ipsilatéraux à l'inoculation de SC16 du groupe réinfection (**Figure 29**).

Dans les **iTG du groupe TK_{del}**, les concentrations de CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CXCL13, et CCL22, atteignaient leur pic à J6 (**Figure 29 A**).

Dans les **iTG du groupe SC16** ces mêmes chémokines étaient détectées, ainsi que CXCL1 et CXCL5, mais à des concentrations supérieures (**Figure 29 B**). Fait notable, les concentrations de CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 et CXCL10 atteignaient leur pic à J4 dans les iTG du groupe SC16, soit 2 jours plus tôt que dans ceux du groupe TK_{del} (J6).

Dans les **TG ipsilatéraux de la réinfection par SC16** seules les concentrations de CCL5, CCL11 et CXCL13 augmentaient de manière significative (**Figure 29 C**). Dans ce groupe, on retrouvait par contre une augmentation significative de nombreuses chémokines (CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CXCL13, CXCL5) dans les TG droits, ipsilatéraux à l'infection par TK_{del} (**Figure 30D**). Ces chémokines étaient détectées à partir de J2 de l'infection par SC16, qui

correspond en réalité à J6 après l'infection par TK_{del}, reproduisant une cinétique comparable à celle constatée dans les iTG du groupe TK_{del}.

Ces données nous permettent de mieux cerner les réponses inflammatoires secondaires aux différents protocoles d'infection par HSV-1 dans les TG : nous constations d'une part un délai pour atteindre le pic de concentration de chémokines inflammatoires dans les iTG du groupe TK_{del}, et d'autre part, des niveaux plus élevés de chémokines dans les iTG du groupe SC16. De façon marquante, les chémokines inflammatoires étaient quasiment absentes des TG ipsilatéraux à la réinfection par SC16.

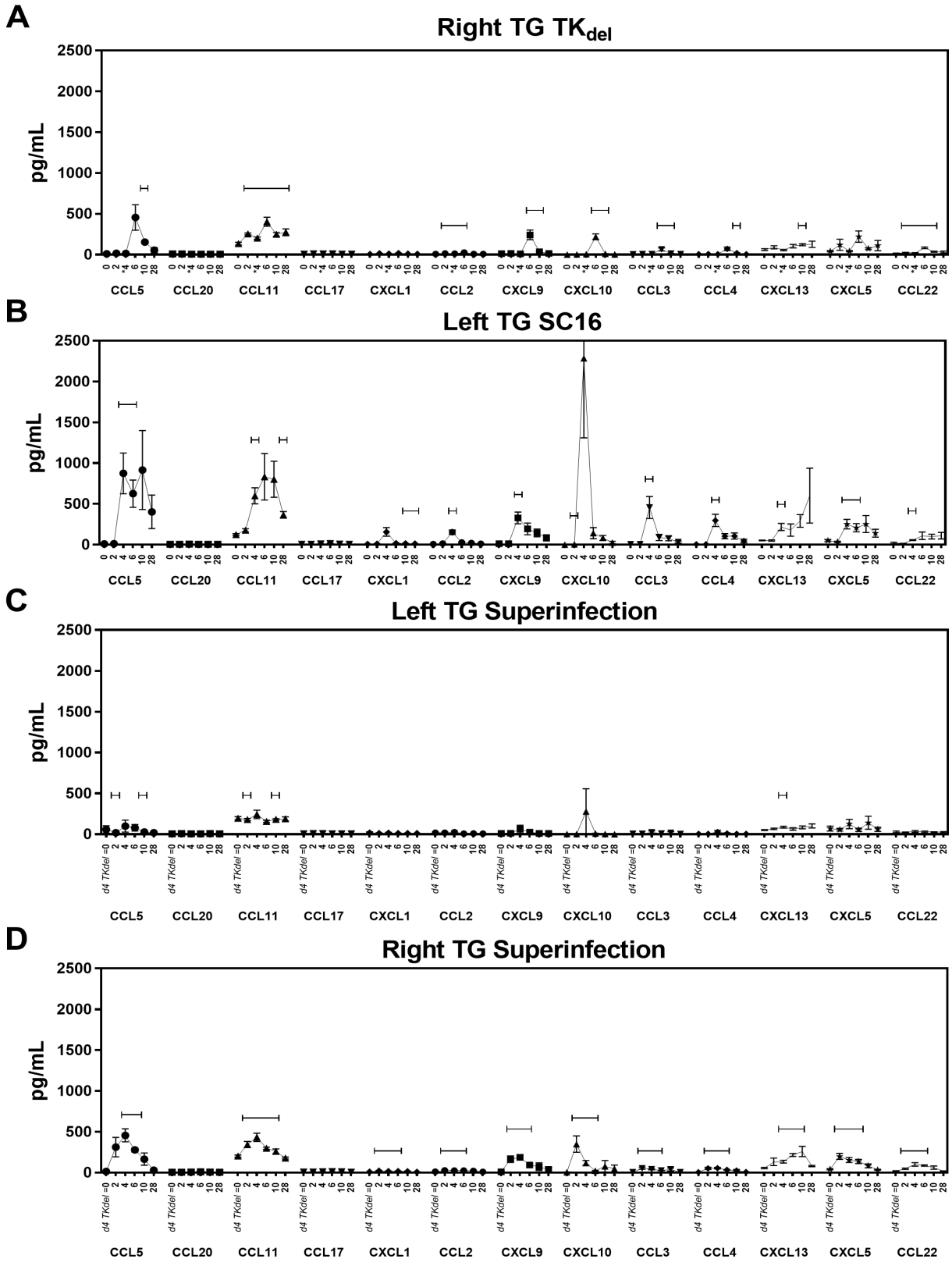


Figure 29 : Dynamique des concentrations des chémokines inflammatoires dans les TG (pg/mL) au cours de l'étude (J0, J2, J4, J6, J10, J28). **A)** TG ipsilatéral à l'inoculation (droit) du groupe TK_{del} ; **B)** TG ipsilatéral à l'inoculation (gauche) du groupe SC16 ; **C)** TG ipsilatéral à la réinfection (gauche) du groupe SC16 **D)** TG ipsilatéral à l'inoculation par TK_{del} (droit) du groupe réinfection.

4.4 Comparaison en cytologie des infiltrats dans la lèvre et le TG

Afin de confirmer les résultats d'analyse des sous-types cellulaires obtenus en CMF, nous avons isolé, coloré, compté et analysé les cellules hématopoïétiques $CD11b^+$ ou $CD11b^-$ (PNN, PNE, phagocytes mononuclées, lymphocytes, plasmocytes) dans la lèvre et le TG, à J6 après une infection par SC16.

Avec cette méthodologie, permettant de concentrer les populations les plus rares sur les lames, les cellules $CD11b^+$ de la lèvre étaient pour la grande majorité des PNN (69%) (**Figure 30 K**), suivis par les cellules phagocytaires mononuclées (17%), les lymphocytes (11%) et les PNE (3%). Dans le TG, les phagocytes mononuclées et les lymphocytes (56% et 40%, respectivement) constituaient la grande majorité des cellules hématopoïétiques $CD11b^+$ (**Figure 30 L**). Les cellules hématopoïétiques $CD11b^-$ étaient majoritairement composées de cellules lymphocytaires, aussi bien dans la lèvre que dans le TG (91% et 93%, respectivement).

Ces données retrouvaient les mêmes tendances que celles mesurées en CMF, et confirmaient les différences majeures de composition entre les infiltrats immunitaires des lèvres et des TG.

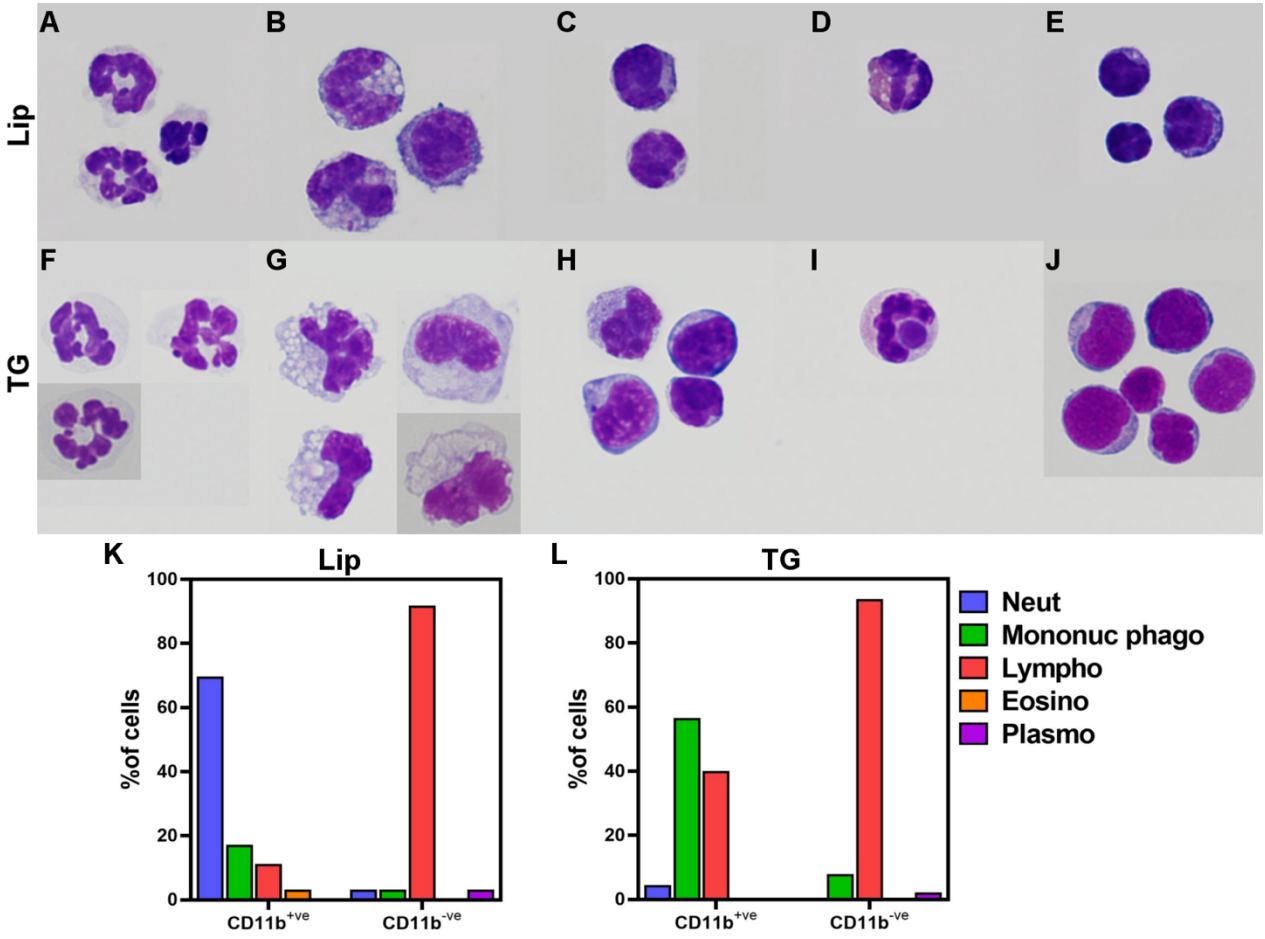


Figure 30 : Partie supérieure : exemples de cellules CD11b$^+$ et CD11b$^-$ observées dans des suspensions de lèvre et de ganglion trigéminé (TG) à J6 d'une inoculation labiale par la souche SC16 d'HSV-1. **A)** Polynucléaires neutrophiles (PNN) CD11b$^+$ de la lèvre, **B)** Cellules phagocytaires mononuclées CD11b$^+$ de la lèvre, **C)** Lymphocytes CD11b^{+ve} de la lèvre, **D)** Polynucléaires éosinophiles CD11b$^+$ de la lèvre, **E)** Lymphocytes CD11b$^-$ de la lèvre, **F)** PNN CD11b$^+$ du TG, **G)** Monocytes / phagocytes CD11b$^+$ du TG, **H)** Lymphocytes CD11b$^+$ du TG, **I)** PNE CD11b$^+$ du TG, **J)** Lymphocytes CD11b$^-$ du TG.
Partie inférieure : Proportions relatives de neutrophiles, cellules phagocytaires mononuclées, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles et plasmocytes dans les suspensions de cellules de la lèvre **(K)** et du le TG **(L)**.

5 Discussion

5.1 Pourquoi un délai de 4 jours pour obtenir une protection par TK_{del} ?

Nous avons précédemment montré dans le modèle murin OO que dans le cadre d'une infection par une souche virulente d'HSV1 (SC16), l'atteinte oculaire et la réactivation à partir de la latence dans le TG étaient restreintes au côté homolatéral à l'inoculation dans la lèvre [244], alors même que l'ADN viral est présent dans les 2 TG, témoignant de la mise en place d'un phénomène de protection dans le TG controlatéral à l'inoculation (**Annexe 1**).

De façon complémentaire, une première inoculation avec une souche non neurovirulente (TK_{del}) confère cette protection bilatérale, de telle sorte qu'une réinfection avec SC16 (dans la lèvre controlatérale) n'entraine aucun signe clinique d'infection systémique ou oculaire, et bloque même le potentiel de réactivations à partir des TG infectés de façon latente (testées *ex vivo*). Toutefois, cette protection est efficace à la condition qu'un délai minimum de 4 jours entre l'inoculation de la souche primo-infectante et celle de la souche ré-infectante soit respecté [244].

Nos résultats montrent clairement que ce délai de 4 jours correspond au délai nécessaire pour que l'infiltrat immunitaire au site d'inoculation initial de SC16 ou TK_{del} soit maximal (**Figure 22**). Il correspond aussi au délai nécessaire pour constater une infiltration significative en $LTCD4^+$ et $LTCD8^+$ dans les lèvres inoculées de groupes SC16 et TK_{del} **(Figure 23 C & D**).

Ce délai était aussi retrouvé par le groupe de Francis Carbone, sur des modèles murins d'infection cutanée d'HSV-1. Dans l'étude de Coles et al. où l'inoculation d'HSV-1 avait lieu dans le coussinet plantaire, il fallait également 4 jours pour observer une migration dans le corps entier des LT effecteurs spécifiques d'HSV-1 après activation dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'inoculation [194]. Van Lint et al. montraient sur un autre modèle d'inoculation cutanée, dans le flanc cette fois, que ces LT spécifiques, présents encore une fois à J4 au site d'inoculation, permettaient de limiter la réplication virale, mais arrivaient trop tard pour empêcher la dissémination et la réplication dans les ganglions nerveux sensitif [195]. C'est d'ailleurs également le cas dans notre modèle, puisqu'après une inoculation labiale, le virus se réplique déjà dans le TG ipsilatéral à J4 [120]. En revanche, la réplication dans le TG controlatéral n'est observée qu'à J6, c'est-à-dire un délai suffisant pour qu'interviennent d'éventuels LT spécifiques afin de bloquer la réplication virale.

Ainsi, nous pensons que l'activation de LT effecteurs spécifiques par une inoculation labiale pourrait être un élément clef dans la protection du TG controlatéral et restreindre la maladie herpétique à l'unilatéralité.

Lors de la réinfection, l'inoculation préalable par TK_{del} pourrait induire une immunosurveillance par des LT effecteurs mémoires [245], qui permettrait à ces derniers de répondre plus précocement dans la lèvre réinfectée, (**Figure 23 C & D**), sans pour autant empêcher la dissémination de la souche ré-infectante aux 2 TG [244].

5.2 Effet de la primo-infection par TK_{del} la sur la cinétique de l'infiltrat

Quand l'inoculation par TK_{del} dans la lèvre droite était suivie 4 jours plus tard d'une réinfection par SC16 dans la lèvre gauche, nous constations un recrutement plus précoce des cellules immunitaires $CD45^+$ dans la lèvre gauche (à J2). Cet infiltrat, à la fois précoce et d'une amplitude équivalente à celui induit par l'inoculation de SC16 à J4, constituait une particularité immunologique au site de réinfection. Cette rapidité d'installation de la réponse immunitaire pourrait être un élément clef dans la protection. Canivet *et al.*, ont en effet démontré dans un modèle murin d'encéphalite herpétique, (par inoculation intranasale), que le recrutement précoce de cellules immunitaires dans les tissus du SNC jouait un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection. Dans ce modèle, les souris de lignée C57BL/6, dont la réponse immune s'installe très rapidement, ont une susceptibilité diminuée à l'infection, tandis que les souris BALB/c, dont l'infiltration par les cellules immunitaire du SNC est retardée, ont des atteintes cliniques beaucoup plus marquées [246].

Ces résultats suggèrent que dans notre modèle, le recrutement rapide des cellules immunitaires dans la lèvre réinfectée, (induit par l'infection préalable par TK_{del}) pourrait conférer un contrôle plus efficace de la réplication d'HSV-1, et réduire ainsi la charge virale parvenant aux TG.

5.3 Différents profils d'inflammation au site d'inoculation

HSV-1 est détecté par le système immunitaire via les PRR dans les heures qui suivent l'infection [128]. La détection des PAMP d'HSV-1 déclenche localement un processus pro-inflammatoire dans lequel la sécrétion de chémokines inflammatoires permet le recrutement de différents types de cellules immunitaires au site de l'inflammation [128 247 248]. Certaines chémokines dépendent de la présence de types cellulaires spécifiques, qui dépendent de l'expression des différents profils de PRR. Ainsi, différents profils de signalisation qui induisent des modifications de la réponse immunitaire, peuvent être déclenchés par la présence du virus et des PAMP viraux [249-251]. En outre, la production d'IFN de type I et III, de TNF-α, d'IL-6 et de CXCL10 est une conséquence directe de la détection (*sensing*) d'HSV-1 [128], alors que l'IFN de type II et l'IL10 peuvent rétro-contrôler l'expression des chémokines inflammatoires, et modifier la réponse immune dans les tissus infectés [251 252].

Notre technique d'inoculation utilise une aiguille en verre ultra-fine [253], de façon à réduire le niveau d'inflammation induit par le processus d'inoculation lui-même. Toutefois, le traumatisme de la barrière cutanéo-muqueuse lié à l'injection s'accompagne d'une réaction inflammatoire, aussi minime soit-elle [254]. Nous avons d'ailleurs détecté une augmentation minime, mais sensible, des cellules de l'immunité innée dans les lèvres injectées avec du PBS (groupe contrôle) à J2, qui s'estompait dès J4 (**Figure 23 E-J**). Cette réaction précoce était également présente dans les autres groupes, mais augmentait à J4, en réponse à la réplication virale.

Des niveaux comparables des chémokines CCL5, CCL11, CXCL1, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 étaient retrouvés dans les lèvres infectées par SC16 et TK_{del} au cours de la phase aiguë de l'infection (**Figure 25 A et B, respectivement**),

De façon notable, l'infiltration par les monocytes inflammatoires du site d'inoculation n'avait pas lieu dans les lèvres réinfectées par SC16, de même que le pic de CCL2 (**Figure 25 C**). Ces données suggèrent que les processus de signalisation induits par la réplication virale, qui recrutent des monocytes à J4 sont réduits, voire absents dans les lèvres réinfectées par SC16.

5.4 Différents profils d'inflammation dans les TG

Dans les TG, les concentrations en chémokines inflammatoires étaient nettement moindres dans les iTG du groupe TK_{del} (**Figure 29 A et B**, respectivement) que dans les iTG du groupe SC16.

Cette différence est vraisemblablement liée au caractère non virulent de TK_{del}. Ce virus ne peut en effet pas se répliquer dans les neurones [237]. L'absence de réplication, et l'expression très limitée des gènes lytiques par les neurones infectés par TK_{del} [255] diminue très probablement les dommages cellulaires et l'exposition des PAMP viraux.

Dans notre étude, les pics de concentration de chémokines survenaient à J6 dans les iTG du groupe TK_{del} versus J4 dans ceux du groupe SC16 (**Figure 29 A et B**). Ces délais coïncident avec les pics de monocytes inflammatoires dans les iTG respectifs, et suggèrent d'une part que le *sensing* de TK_{del} est retardée, et d'autre part que les monocytes inflammatoires produisent, ou au moins sont impliqués, dans la production des chémokines inflammatoires. En outre, l'infiltrat réduit et retardé en monocytes inflammatoires dans les TG des groupes réinfection et TK_{del} (**Figure 27 E**) allait de paire avec l'absence des autres populations inflammatoires, telles que les macrophages, les PNN et les PNE (**Figure 27 E-I**). L'ensemble de ces données est en faveur d'un contrôle de la réplication virale dans les TG ipsilatéraux à l'inoculation de SC16 du groupe réinfection, où nos travaux précédents avaient montré un niveau très diminué de réplication virale [244]. A l'opposé, l'expression plus élevée et prolongée des chémokines inflammatoires dans les iTG du groupe SC16 montre bien que la réplication virale est à l'origine du recrutement de cellules inflammatoires.

5.5 Le modèle expérimental influence les résultats des études immunologiques portant sur l'infection par HSV-1, et notamment le rôle des PNN

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, de nombreux types de cellules immunitaires sont impliqués dans le contrôle de l'infection par HSV-1 [256]. Les monocytes inflammatoires, notamment, sont en première ligne, pour initier la réaction inflammatoire, recruter les NK au site de l'infection puis se différencier en macrophages et en DC [257-260]. Les NK,

activées par les autres types cellulaires, ou par la reconnaissance directe d'HSV-1, lysent les cellules infectées [125], tandis que les cellules $CD11b^+$ induisent les lésions histologiques dans la cornée et réduisent la réplication virale dans ce tissu [261].

Toutefois, il est difficile d'être certain des rôles respectifs de ces cellules dans la mesure où leur action a été étudiée dans des modèles différents des conditions rencontrées chez l'homme, notamment celui reposant sur une inoculation par scarification cornéenne. En effet, ce modèle modifie complètement le cours de l'infection [60], car la cornée bénéficie d'un privilège immunitaire alors que les tissus cutanéo-muqueux, où la primo-infection a lieu chez l'homme (et dans notre modèle) sont spécialisés dans la réponse immunitaire aux agents infectieux [262 263].

Dans notre modèle, les PNN constituent la principale population infiltrant les lèvres (**Figure 24**), et un contingent important de l'infiltrat du TG dans les premiers jours de l'infection (**Figure 28**). Dans d'autres modèles d'infection cutanéo-muqueuse, ces cellules ne semblent pas essentielles pour contrôler la maladie [264]. Par ailleurs, ces cellules ne transportent pas les antigènes aux ganglions lymphatiques [265]. A l'inverse, plusieurs études menées sur des modèles d'infection par scarification cornéenne ont montré un rôle bénéfique des PNN sur l'infection, participant activement à la clairance virale, et au recrutement de lymphocytes T [154 266 267]. Mais, pour compliquer les choses, une étude récente montrait que l'infiltration cornéenne par les PNN contribuait à une augmentation de la réplication virale intracornéenne et augmentait la dissémination du virus au système nerveux (TG), en raison d'une réplication d'HSV-1 au sein des PNN… Les auteurs concluaient que dans ce modèle, les PNN potentialisaient l'infection et sa dissémination [157]. Enfin, les PNN jouent un rôle très délétère sur le contrôle viral et la survie des souris dans de modèles d'encéphalite herpétique ou l'inoculation est réalisée par scarification cornéenne [156].

Dans notre étude, l'infiltrat de PNN dans la lèvre était prépondérant aux premiers temps de la phase aiguë (J2 à J6) dans les groupes SC16 et réinfection (**Figure 24**), mais sa diminution aux temps ultérieurs était plus drastique dans le groupe réinfection. Au niveau du TG, la proportion de PNN dans ces deux groupes était moindre, et diminuait dès J6. Il s'agissait dans tous le cas de PNN mâtures (**Figure 30**). Compte tenu de l'ensemble de ces données, la place des PNN reste donc

encore mal cernée, et des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre leurs rôles exacts dans le contrôle de l'infection herpétique.

5.6 Les polynucléaires éosinophiles pourraient être impliqués dans le contrôle de l'infection par HSV-1

Nous avons mis en évidence la présence d'un contingent significatif de PNE dans les lèvres infectées par HSV-1 de tous les groupes, (**Figure 23 H**), mais seulement les iTG du groupe SC16 (**Figure 27 H**), qui sont les seuls TG associés à une réplication virale lytique, une atteinte oculaire, et une réactivation possible à partir de la latence [120 244]. La présence de ces cellules, détectée en CMF, a été confirmée par l'étude cytologique (**Figure 30**). Cet infiltrat de PNE était concomitant d'une augmentation de CCL11 (**Figures 25 et 29**), une chémokine également connue sous le nom d'éotaxine-1, et dont le rôle biologique est spécifiquement de recruter les PNE.

Des associations épidémiologiques et nosologiques entre PNE et HSV-1 :

Le rôle des PNE dans l'infection par HSV-1 n'a jusqu'à présent pas été décrit. Il semble toutefois exister des liens entre ce type cellulaire et l'infection herpétique, en particulier dans le contexte des maladies allergiques.

Concernant les kératites herpétiques, des études épidémiologiques d'envergure ont montré que les infections herpétiques oculaires sont plus fréquentes et souvent plus sévères chez les patients allergiques [159]. Par ailleurs, chez les atopiques, le traitement antiviral préventif semble moins efficace pour réduire le nombre d'épisode de kératite herpétique sévère (kératites stromales et endothéliales) [160].

En dermatologie, il est bien connu que la surinfection par HSV-1 des lésions d'eczéma est particulièrement sévère (syndrome de Kaposi-Juliusberg ou *eczema herpeticum*) [161]. Enfin, Doutlik et al. ont montré que l'activité phagocytaires des éosinophiles était augmentée chez les patients souffrants d'herpes labiaux (HSV-1) et génitaux (HSV-2) [162].

Un rôle dans la dissémination virale ?

Une hypothèse possible est le rôle potentiellement facilitateur des PNE dans la transmission inter-cellulaire du virus, via l'augmentation des connections et de la densité du réseau

neuronal, qui est décrite dans peau des patients atteints de dermatite atopique. Foster et al. ont ainsi démontré que les PNE induisait une augmentation des branchements neuronaux sur la peau des souris dans un modèle d'atopie [268]. Les PNE pourraient, par ce mécanisme, faciliter le passage intercellulaire d'HSV-1 dans les lèvres ou les TG infectés [269].

5.7 La primo-infection par TK_{del} renforce l'immunosurveillance dans la lèvre

La transmission des antigènes d'HSV-1 des tissus cutanéo-muqueux vers les ganglions lymphatiques a lieu par l'intermédiaire des cellules de Langherans et des cellules dendritiques du derme [270], vers les DC conventionnelles qui vont les présenter aux lymphocytes T [271]

Dans notre étude, le nombre de DC dans les lèvres infectées par SC16 augmentait plutôt tardivement, à la fin de la phase aiguë et à la phase de latence (**Figure 23**). En revanche, leur nombre était augmenté dès J2 dans les lèvres ré-infectées. Ces infiltrats pourraient d'ailleurs comporter des DC activant les réponses T spécifiques [272]. Ces données suggèrent donc que dans les souris primo-infectées par TK_{del}, un niveau d'immunosurveillance plus élevé est établi à J4, permettant un meilleur contact avec les cellules présentatrices d'antigène professionnelles, et par conséquent potentiellement une meilleure activation des lymphocytes T spécifiques.

En outre, on notait que les DC $CD11b^+$ et $CD11b^-$ étaient présentes à J28 (phase de latence) dans les lèvres et les TG de tous les groupes, (**Figures 23 et 27 I & J)**, ce qui suggérait que l'immunosurveillance mise en place pendant la phase aiguë persistait en latence, après la phase de réplication virale lytique.

Notre panel de définition ne nous permettait pas de discriminer les sous-populations de $CD11b^+$, qui pourraient inclure des DC dérivés des monocytes, des DC conventionnelles, des macrophages ou des cellules gliales [257 272-275]. Pour cette raison, des expérimentations complémentaires doivent être réalisées pour mieux définir les sous-populations de $CD11b^+$ et leurs rôles spécifiques dans notre modèle.

5.8 La souche non neurovirulente TK_{del} : avantages et inconvénients

Propriétés spécifiques de la souches TK_{del}

La TK cellulaire intervient dans la réplication de l'ADN, avant la division cellulaire. Elle n'est donc pas produite par les cellules qui ne se divisent pas (dites post-mitotiques), comme les neurones et les polynucléaires mâtures. En l'absence de TK exogène (cellulaire), la souche TK_{del} n'est donc pas capable de se répliquer. Pour cette raison, TK_{del} ne peut pas répliquer son génome dans les neurones [237]. Néanmoins, TK_{del} a la capacité d'infecter et de se répliquer dans les tissus cutanéomuqueux de la lèvre (où de nombreux types cellulaires, se renouvellent), d'infecter les terminaisons neuronales locales, puis de migrer vers les noyaux des neuronaux situés dans le TG où il peut entrer en latence [237 276]. Par contre, pour les raisons vues ci-dessus, cette souche n'est pas capable de se réactiver dans ces neurones, faute de TK indispensable à la production d'ADN viral.

Avantages :

Dans notre étude, les lèvres inoculées avec TK_{del} étaient le siège d'un infiltrat immunitaire relativement comparable à celui retrouvé dans les lèvres inoculées par SC16 (**Figure 23 E-I**). En revanche, on constatait une réduction majeure de la réponse inflammatoire dans les TG ipsilatéraux à une inoculation par TK_{del} par rapport aux TG ipsilatéraux à une inoculation par SC16 (**Figure 27 E-I**),

Il est également possible que TK_{del} ne puisse pas se répliquer dans certaines cellules immunitaires (comme les PNN) à l'inverse des souches virulentes [277]. Le mécanisme de réplication dans les PNN, incriminé dans leur rôle délétère pour l'infection, est d'ailleurs lié à cette capacité d'HSV1 de les utiliser comme usine de réplication [157], notamment dans la cornée, ce qui ne peut donc pas être le cas avec une souche TK_{del}. Au contraire, une infection de ces cellules, sans réplication, pourrait moduler la réponse contre HSV-1, en permettant au PNN de contribuer à la présentation de l'antigène [278].

Inconvénients :

Le principal problème de la souche TK_{del}, provient de sa capacité à être trans-complémentée dans le TG par un autre virus, c'est-à-dire, utiliser la TK d'une autre souche co-infectante, intacte

pour la TK [237 279 280]. Ce phénomène, documenté dans des modèles murins [237 279], explique tout à fait la constatation faite en pratique clinique de porteurs d'infection à HSV-1 résistantes aux traitements.

Dans les infections systémiques, près de 95% des résistances d'HSV-1 sont liée à une mutation dans le gène de la thymidine kinase [281-283]. Dans le contexte des infections oculaires, cette proportion est moins documentée mais elle semble du même ordre [28] [31]. Ces mutations rendent inefficaces la plupart des traitements antiviraux disponibles. En effet, les inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase virale doivent être phosphorylés par la TK virale pour être incorporés et bloquer la synthèse de l'ADN viral. Les alternatives efficaces (trifluridine par voie topique, et foscavir) sont beaucoup moins bien tolérées, et n'existent pas par voie orale, ne permettant donc pas d'instaurer un traitement prophylactique des récidives. Par conséquent, les kératites liées à des virus TK_{del} sont de mauvais pronostic [33]. Pour toutes ces raisons, l'utilisation d'une souche uniquement modifiée pour TK n'est pas concevable à des fins thérapeutiques.

Conclusion et perspectives :

Notre étude apporte donc des éléments importants pour comprendre la relation entre la cinétique de l'infection par HSV-1 et celle de la réponse immunitaire, en fonction du type de souche utilisée et de la séquence d'inoculation.

Basée sur le modèle oro-oculaire, qui reproduit les points clefs de l'infection par HSV-1 chez l'homme, ces données aident à comprendre le caractère unilatéral des kératites herpétiques, et donnent de nouveaux arguments en faveur de la faisabilité d'une stratégie thérapeutique préventive de la maladie herpétique oculaire, basée sur l'utilisation vaccinale de souches modifiées d'HSV-1.

En effet, nous avons démontré des modifications dans la réaction immunitaire locale (i.e. recrutement de lymphocytes dans le site de l'inoculation, et réduction/absence de cellules inflammatoires et de chémokines pendant la phase aiguë de l'infection de réplication virale), associées au développement d'une protection contre les signes cliniques de la maladie, et contre les réactivations. Cette protection, qui se produit naturellement après une inoculation virale dans la lèvre pourrait être utilisée comme base pour le développement d'une stratégie vaccinale. Toutefois, cet objectif nécessite d'une part de caractériser mieux encore les phénomènes immunitaires impliqués dans cette protection, et d'autre part d'améliorer la sécurité de la souche vaccinale potentielle qu'est TK_{del}.

Perspectives sur la caractérisation de la réaction immunitaire

Comme nous l'avons vu, les LT jouent un rôle direct dans le contrôle de l'infection par HSV-1, au niveau du site d'inoculation, en éliminant les cellules infectées [195], et dans le TG, en contrôlant les réactivations par des mécanismes des mécanismes de protection non cytolytiques [198]. Une étude a récemment démontré que les lymphocytes T des patients atteints de récurrences herpétiques avaient des déficiences fonctionnelles et des marqueurs d'épuisement, alors que la réponse T globale contre HSV-1 était similaire chez les patients infectés, qu'ils présentent ou non des récurrences cliniques [201]. L'étude de la différenciation fonctionnelle des LT semble être une piste majeure à poursuivre pour mieux caractériser la réaction immunitaire dans notre modèle. Nous

sommes actuellement en train de mettre au point un panel de CMF pour évaluer la différenciation fonctionnelle et l'épuisement des lymphocytes T dans notre modèle.

L'étude de spécificité des lymphocytes T engagés aux sites d'inoculation et dans le TG est un autre aspect essentiel pour mieux définir les phénomènes immunitaires liés au phénomènes de protection. Notre équipe collabore déjà avec le laboratoire de David Price (*University of Cardiff, Department of Medical Biochemistry and Immunology*), pour tester des monomères de complexes CMH-épitopes d'HSV-1. Ces molécules devraient nous permettre de détecter des sous-populations de LTCD8$^+$ spécifiques d'HSV-1 et propres aux souris de souche BALB/c [284]. Nous étudierons la fonctionnalité, le phénotype d'activation et/ou d'épuisement de cette sous-population spécifique au site d'inoculation et dans les TG au cours de l'infection aiguë, de l'infection latente et sur des explants de TG en organoculture (afin d'étudier les phénomènes immunologiques associés à la réactivation). Les données de ces expérimentations détermineront si la souche TK_{del} entraine effectivement une différenciation fonctionnelle et un phénotype des LT différents de ceux induits par la souche SC16. Nous espérons pouvoir démontrer un déséquilibre des phénotypes des LT CD8 résidents dans les TG ipsilatéraux et controlatéraux à l'inoculation.

Notre étude devra par ailleurs être complétée par une définition plus précise des mécanismes de présentations de l'antigène impliqués dans notre modèle. Le sort et la fonctionnalité des LT sont en effet dictés par le contact initial avec l'antigène présenté par les CPA [285]. Or les modalités d'activation des sous-populations de CPA sont diverses et influent la réponse immunitaire adaptative [286]. Il s'agira de mieux caractériser les sous-populations de cellules dendritiques impliquées dans le modèle OO. Nous pourrons également définir les sous-populations de CPA qui interagissent avec les LTCD8$^+$ dans les TG et au site d'inoculation. Des avancées technologiques récentes ont permis de pousser ce type d'étude au niveau d'une cellule unique [287].

Optimisation de la souche TK_{del} et du protocole de vaccination

Comme nous l'avons vu, la souche TK_{del} n'est en l'état pas utilisable comme souche vaccinale. Le risque d'une transcomplémentation, qui lui permettrait de réactiver et de causer des

pathologies oculaires difficiles à traiter, impose des modifications supplémentaires pour améliorer sa sécurité.

Pour mener à bien cette amélioration, il faudrait diminuer cette possibilité de transcomplémentation.

Par ailleurs, nous avons d'ores et déjà commencé à tester l'efficacité d'autres voies d'inoculation de la souche TK_{del} (sous-cutanée notamment) afin d'évaluer le caractère indispensable de l'injection par voie intra-labiale.

Enfin, il faudra plus tard réfléchir au meilleur agenda vaccinal, bien que le mode de fonctionnement que nous avons mis à jour laisse suggérer qu'une vaccination prophylactique, survenant avant toute primo-infection par une souche sauvage, soit la seule option possible pour espérer une pleine efficacité.

Tous ces éléments sont autant d'axes de recherche que notre équipe entend poursuivre avec détermination dans la quête d'une prévention efficace des atteintes oculaires liée au virus HSV-1.

Références

1. Liesegang TJ. Epidemiology of ocular herpes simplex. Natural history in Rochester, Minn, 1950 through 1982. Arch Ophthalmol **1989**;107(8):1160-5.
2. McElwee M, Beilstein F, Labetoulle M, Rixon FJ, Pasdeloup D. Dystonin/BPAG1 promotes plus-end-directed transport of herpes simplex virus 1 capsids on microtubules during entry. J Virol **2013**;87(20):11008-18.
3. Miranda-Saksena M, Denes CE, Diefenbach RJ, Cunningham AL. Infection and Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Neurons: Role of the Cytoskeleton. Viruses **2018**;10(2).
4. Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. Surv Ophthalmol **2012**;57(5):448-62.
5. McQuillan G, Kruszon-Moran D, Flagg EW, Paulose-Ram R. Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Persons Aged 14-49: United States, 2015-2016. NCHS data brief **2018**(304):1-8.
6. Wang K, Lau TY, Morales M, Mont EK, Straus SE. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus DNA in human trigeminal Ganglia at the single-cell level. J Virol **2005**;79(22):14079-87.
7. Pica F, Volpi A. Public awareness and knowledge of herpes labialis. Journal of medical virology **2012**;84(1):132-7.
8. Rozenberg F, Deback C, Agut H. Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy. Infectious disorders drug targets **2011**;11(3):235-50.
9. Schmutzhard E. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. Journal of neurology **2001**;248(6):469-77.
10. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. Science **2006**;314(5797):308-12.
11. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. Science **2007**;317(5844):1522-7.
12. Sancho-Shimizu V, Zhang SY, Abel L, et al. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. Current opinion in allergy and clinical immunology **2007**;7(6):495-505.
13. Audry M, Ciancanelli M, Yang K, et al. NEMO is a key component of NF-kappaB- and IRF-3-dependent TLR3-mediated immunity to herpes simplex virus. The Journal of allergy and clinical immunology **2011**;128(3):610-7.e1-4.
14. Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, et al. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. Nature genetics **2003**;33(3):388-91.
15. Looker KJ, Magaret AS, May MT, et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. The Lancet. Global health **2017**;5(3):e300-e09.
16. Harris JB, Holmes AP. Neonatal Herpes Simplex Viral Infections and Acyclovir: An Update. The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG **2017**;22(2):88-93.
17. Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, et al. Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. Ophthalmology **2005**;112(5):888-95.
18. Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976-2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. Arch Ophthalmol **2010**;128(9):1178-83.
19. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. Cornea **2001**;20(1):1-13.
20. Labetoulle M, Kucera P, Ugolini G, et al. Neuronal pathways for the propagation of herpes simplex virus type 1 from one retina to the other in a murine model. The Journal of general virology **2000**;81(Pt 5):1201-10.
21. Legeais JM, Parc C, d'Hermies F, Pouliquen Y, Renard G. Nineteen years of penetrating keratoplasty in the Hotel-Dieu Hospital in Paris. Cornea **2001**;20(6):603-6.
22. Reynaud C, Rousseau A, Kaswin G, M'Garrech M, Barreau E, Labetoulle M. Persistent Impairment of Quality of Life in Patients with Herpes Simplex Keratitis. Ophthalmology **2017**;124(2):160-69.

23. James SH, Prichard MN. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. Current opinion in virology **2014**;8c:54-61.
24. MacDougall C, Guglielmo BJ. Pharmacokinetics of valaciclovir. The Journal of antimicrobial chemotherapy **2004**;53(6):899-901.
25. Wilhelmus KR. Therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. The Cochrane database of systematic reviews **2008**(1):CD002898.
26. Wilhelmus KR, Beck RW, Moke PS, et al. Acyclovir for the prevention of recurrent herpes simplex virus eye disease. Herpetic Eye Disease Study Group. N Engl J Med **1998**;339(5):300-6.
27. Wald A, Corey L, Timmler B, et al. Helicase-primase inhibitor pritelivir for HSV-2 infection. N Engl J Med **2014**;370(3):201-10.
28. Duan R, de Vries RD, Osterhaus AD, Remeijer L, Verjans GM. Acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from patients with herpetic keratitis. J Infect Dis **2008**;198(5):659-63.
29. van Velzen M, van de Vijver DA, van Loenen FB, Osterhaus AD, Remeijer L, Verjans GM. Acyclovir prophylaxis predisposes to antiviral-resistant recurrent herpetic keratitis. J Infect Dis **2013**;208(9):1359-65.
30. van Velzen M, Missotten T, van Loenen FB, et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in intra-ocular fluid samples of herpetic uveitis patients. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **2013**;57(3):215-21.
31. Rousseau A, Boutolleau D, Titier K, et al. Recurrent herpetic keratitis despite antiviral prophylaxis: A virological and pharmacological study. Antiviral research **2017**;146:205-12.
32. Burrel S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. Antimicrobial agents and chemotherapy **2010**;54(11):4833-42.
33. Rousseau A, Burrel S, Gueudry J, et al. Aciclovir-resistant HSV1 keratitis: a
clinical and virological study. Acta ophthalmologica **2018**;96(S261):110-11.
34. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: An update from a ten-year survey in France. Antiviral research **2014**.
35. Kumar M, Hill JM, Clement C, Varnell ED, Thompson HW, Kaufman HE. A double-blind placebo-controlled study to evaluate valacyclovir alone and with aspirin for asymptomatic HSV-1 DNA shedding in human tears and saliva. Invest Ophthalmol Vis Sci **2009**;50(12):5601-8.
36. Sengler U, Reinhard T, Adams O, Krempe C, Sundmacher R. Herpes simplex virus infection in the media of donor corneas during organ culture: frequency and consequences. Eye **2001**;15(Pt 5):644-7.
37. Biswas S, Suresh P, Bonshek RE, Corbitt G, Tullo AB, Ridgway AE. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. The British journal of ophthalmology **2000**;84(7):701-5.
38. Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. Lancet **2001**;357(9254):442.
39. Thuret G, Acquart S, Gain P, et al. Ultrastructural demonstration of replicative herpes simplex virus type 1 transmission through corneal graft. Transplantation **2004**;77(2):325-6.
40. Zheng X. Reactivation and donor-host transmission of herpes simplex virus after corneal transplantation. Cornea **2002**;21(7 Suppl):S90-3.
41. Mietz H, Cassinotti P, Siegl G, Kirchhof B, Krieglstein GK. Detection of herpes simplex virus after penetrating keratoplasty by polymerase chain reaction: correlation of clinical and laboratory findings. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **1995**;233(11):714-6.
42. Cockerham GC, Bijwaard K, Sheng ZM, Hidayat AA, Font RL, McLean IW. Primary graft failure : a clinicopathologic and molecular analysis. Ophthalmology **2000**;107(11):2083-90;discussion 90-1.
43. Lomholt JA, Baggesen K, Ehlers N. Recurrence and rejection rates following corneal transplantation for herpes simplex keratitis. Acta ophthalmologica Scandinavica **1995**;73(1):29-32.
44. The Australian Corneal Graft Registry. 1990 to 1992 report. Australian and New Zealand journal of ophthalmology **1993**;21(2 Suppl):1-48.
45. Roizman B, Pelett PE. The Familly Herpesviridae: A brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, eds. Fields Virology 4th Edition.

Philadelphia: Lippincott Raven, 2001:2381-97.
46. Crépin S, Labetoulle M. Alphaherpesvirinae (1): Généralités sur les herpèvirus et virus de l'herpès simplex. In: Labetoulle M, ed. Herpès et Zona oculaire: de la clinique au traitement. Paris: Med'Com, 2009:13-26.
47. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. Current opinion in virology **2011**;1(2):142-9.
48. Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. Nucleic acids research **2011**;39(Database issue):D576-82.
49. Roizman B, Ward PL. Simplexvirus. In: Tidona C, Darai G, eds. The Springer Index of Viruses: Springer, 2011:663-70.
50. Liesegang TJ. Biology and molecular aspects of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. Ophthalmology **1992**;99(5):781-99.
51. David AT, Saied A, Charles A, Subramanian R, Chouljenko VN, Kousoulas KG. 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 **2012**;3(4):e00144-12.
52. Devadas D, Koithan T, Diestel R, Prank U, Sodeik B, Dohner K. Herpes simplex virus internalization into epithelial cells requires Na+/H+ exchangers and p21-activated kinases but neither clathrin- nor caveolin-mediated endocytosis. J Virol **2014**;88(22):13378-95.
53. Roberts AP, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon FJ, Pasdeloup D. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. J Virol **2009**;83(1):105-16.
54. Xu P, Mallon S, Roizman B. PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2016**;113(21):E3022-8.
55. Gu H, Zheng Y, Roizman B. Interaction of herpes simplex virus ICP0 with ND10 bodies: a sequential process of adhesion, fusion, and retention. J Virol **2013**;87(18):10244-54.
56. Everett RD. HSV-1 biology and life cycle. Methods in molecular biology **2014**;1144:1-17.
57. Roizman B, Knipe DM. Herpesvirus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, eds. Fields Virolgy, 4th Edition: Lippincott Raven 2001:2399-459.
58. Weller SK, Coen DM. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2012**;4(9):a013011.
59. Melancon JM, Luna RE, Foster TP, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and UL20p function redundantly in virion de-envelopment. J Virol **2005**;79(1):299-313.
60. Cavallero S, Huot N, Francelle L, Lomonte P, Naas T, Labetoulle M. Biological features of herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. Invest Ophthalmol Vis Sci **2014**;55(12):7761-74.
61. Maillet S, Naas T, Crepin S, et al. Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. J Virol **2006**;80(18):9310-21.
62. Phelan D, Barrozo ER, Bloom DC. HSV1 latent transcription and non-coding RNA: A critical retrospective. J Neuroimmunol **2017**;308:65-101.
63. Sawtell NM. 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 **1998**;72(8):6888-92.
64. Hagmann M, Georgiev O, Schaffner W, Douville P. Transcription factors interacting with herpes simplex virus alpha gene promoters in sensory neurons. Nucleic acids research **1995**;23(24):4978-85.
65. Valyi-Nagy T, Deshmane S, Dillner A, Fraser NW. 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 **1991**;65(8):4142-52.
66. Lillycrop KA, Dent CL, Wheatley SC, et al. The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons. Neuron **1991**;7(3):381-90.
67. Kristie TM, Vogel JL, Sears AE. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1999**;96(4):1229-33.

68. La Boissiere S, Hughes T, O'Hare P. HCF-dependent nuclear import of VP16. The EMBO journal **1999**;18(2):480-9.
69. Kubat NJ, Tran RK, McAnany P, Bloom DC. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. J Virol **2004**;78(3):1139-49.
70. Dressler GR, Rock DL, Fraser NW. Latent herpes simplex virus type 1 DNA is not extensively methylated in vivo. The Journal of general virology **1987**;68 (Pt 6):1761-5.
71. Kubat NJ, Amelio AL, Giordani NV, Bloom DC. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. J Virol **2004**;78(22):12508-18.
72. Kwiatkowski DL, Thompson HW, Bloom DC. The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency. J Virol **2009**;83(16):8173-81.
73. Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM, Knipe DM. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2005**;102(44):16055-9.
74. Kristie TM. Dynamic modulation of HSV chromatin drives initiation of infection and provides targets for epigenetic therapies. Virology **2015**;479-480:555-61.
75. Cliffe AR, Garber DA, Knipe DM. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. J Virol **2009**;83(16):8182-90.
76. Krummenacher C, Zabolotny JM, Fraser NW. Selection of a nonconsensus branch point is influenced by an RNA stem-loop structure and is important to confer stability to the herpes simplex virus 2-kilobase latency-associated transcript. J Virol **1997**;71(8):5849-60.
77. Nicoll MP, Proenca JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. FEMS microbiology reviews **2012**;36(3):684-705.
78. Javier RT, Stevens JG, Dissette VB, Wagner EK. A herpes simplex virus transcript abundant in latently infected neurons is dispensable for establishment of the latent state. Virology **1988**;166(1):254-7.
79. Perng GC, Slanina SM, Yukht A, et al. A herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript mutant with increased virulence and reduced spontaneous reactivation. J Virol **1999**;73(2):920-9.
80. Henderson G, Peng W, Jin L, et al. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. Journal of neurovirology **2002**;8 Suppl 2:103-11.
81. Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. Science **2000**;287(5457):1500-3.
82. Ahmed M, Lock M, Miller CG, Fraser NW. Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. J Virol **2002**;76(2):717-29.
83. Tormanen K, Allen S, Mott KR, Ghiasi H. The Latency-Associated Transcript Inhibits Apoptosis via Downregulation of Components of the Type I Interferon Pathway during Latent Herpes Simplex Virus 1 Ocular Infection. J Virol **2019**;93(10).
84. Srivastava R, Dervillez X, Khan AA, et al. The Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Gene Is Associated with a Broader Repertoire of Virus-Specific Exhausted CD8+ T Cells Retained within the Trigeminal Ganglia of Latently Infected HLA Transgenic Rabbits. J Virol **2016**;90(8):3913-28.
85. Chentoufi AA, Kritzer E, Tran MV, et al. The herpes simplex virus 1 latency-associated transcript promotes functional exhaustion of virus-specific CD8+ T cells in latently infected trigeminal ganglia: a novel immune evasion mechanism. J Virol **2011**;85(17):9127-38.
86. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. Nature **2008**;454(7205):780-3.
87. Umbach JL, Nagel MA, Cohrs RJ, Gilden DH, Cullen BR. Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia. J Virol

2009;83(20):10677-83.
88. Kramer MF, Jurak I, Pesola JM, Boissel S, Knipe DM, Coen DM. Herpes simplex virus 1 microRNAs expressed abundantly during latent infection are not essential for latency in mouse trigeminal ganglia. Virology **2011**;417(2):239-47.
89. Nicoll MP, Hann W, Shivkumar M, et al. The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. PLoS Pathog **2016**;12(4):e1005539.
90. Giordani NV, Neumann DM, Kwiatkowski DL, et al. During herpes simplex virus type 1 infection of rabbits, the ability to express the latency-associated transcript increases latent-phase transcription of lytic genes. J Virol **2008**;82(12):6056-60.
91. Kramer MF, Coen DM. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. J Virol **1995**;69(3):1389-99.
92. Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR, Tscharke DC. Lytic gene expression is frequent in HSV-1 latent infection and correlates with the engagement of a cell-intrinsic transcriptional response. PLoS Pathog **2014**;10(7):e1004237.
93. Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR, Hendricks RL. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. Immunity **2003**;18(5):593-603.
94. Margolis TP, Elfman FL, Leib D, et al. Spontaneous reactivation of herpes simplex virus type 1 in latently infected murine sensory ganglia. J Virol **2007**;81(20):11069-74.
95. Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2002**;99(2):978-83.
96. Sawtell NM. Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. J Virol **1997**;71(7):5423-31.
97. Abitbol O, Hoang-Xuan T. Herpès et zona oculaire : de la clinique au traitement. In: Labetoulle M, ed. Herpes et zona oculaire : De la clinique au traitement. Paris: Med'Com, 2009:193-212.
98. Cliffe AR, Arbuckle JH, Vogel JL, et al. Neuronal Stress Pathway Mediating a Histone Methyl/Phospho Switch Is Required for Herpes Simplex Virus Reactivation. Cell host & microbe **2015**;18(6):649-58.
99. Deshmane SL, Fraser NW. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. J Virol **1989**;63(2):943-7.
100. Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. Trends in microbiology **2012**;20(12):604-11.
101. Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM. De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. PLoS Pathog **2009**;5(3):e1000352.
102. Herrera FJ, Triezenberg SJ. VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. J Virol **2004**;78(18):9689-96.
103. Cliffe AR, Knipe DM. Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. J Virol **2008**;82(24):12030-8.
104. Lomonte P, Thomas J, Texier P, Caron C, Khochbin S, Epstein AL. Functional interaction between class II histone deacetylases and ICP0 of herpes simplex virus type 1. J Virol **2004**;78(13):6744-57.
105. Gu H, Liang Y, Mandel G, Roizman B. Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2005**;102(21):7571-6.
106. Wilcox CL, Johnson EM, Jr. Characterization of nerve growth factor-dependent herpes simplex virus latency in neurons in vitro. J Virol **1988**;62(2):393-9.
107. Kim JY, Mandarino A, Chao MV, Mohr I, Wilson AC. Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons. PLoS Pathog **2012**;8(2):e1002540.
108. Bertke AS, Swanson SM, Chen J, Imai Y, Kinchington PR, Margolis TP. A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro. J Virol **2011**;85(13):6669-77.

109. Davison AJ. Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. Annals of the New York Academy of Sciences **2011**;1230:E37-49.
110. Sawtell NM, Thompson RL. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. Journal of virology **1992**;66(4):2150-56.
111. Neumann DM, Bhattacharjee PS, Hill JM. Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. J Virol **2007**;81(11):6106-10.
112. Sawtell NM, Thompson RL. Comparison of herpes simplex virus reactivation in ganglia in vivo and in explants demonstrates quantitative and qualitative differences. Journal of virology **2004**;78(14):7784-94.
113. Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. Trends in microbiology **2012**;20(12):604-11.
114. Cavallero S, Huot N, Francelle L, Lomonte P, Naas T, Labetoulle M. Biological features of herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. Investigative ophthalmology & visual science **2014**;55(12):7761-74.
115. Hill TJ, Field HJ, Blyth WA. Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. The Journal of general virology **1975**;28(3):341-53.
116. Labetoulle M, Kucera P, Ugolini G, et al. Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye. Invest Ophthalmol Vis Sci **2000**;41(9):2600-6.
117. Hill TJ, Yirrell DL, Blyth WA. Infection of the adrenal gland as a route to the central nervous system after viraemia with herpes simplex virus in the mouse. The Journal of general virology **1986**;67 (Pt 2):309-20.
118. Renis HE, Eidson EE, Mathews J, Gray JE. Pathogenesis of herpes simplex virus types 1 and 2 in mice after various routes of inoculation. Infection and immunity **1976**;14(2):571-8.
119. Wildy P. The progression of herpes simplex virus to the central nervous system of the mouse. The Journal of hygiene **1967**;65(2):173-92.
120. Labetoulle M, Maillet S, Efstathiou S, Dezelee S, Frau E, Lafay F. HSV1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. Invest Ophthalmol Vis Sci **2003**;44(1):217-25.
121. Drane P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. Genes & development **2010**;24(12):1253-65.
122. Catez F, Picard C, Held K, et al. HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons. PLoS Pathog **2012**;8(8):e1002852.
123. Cohen C, Corpet A, Roubille S, et al. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. PLoS Pathog **2018**;14(9):e1007313.
124. Maroui MA, Calle A, Cohen C, et al. Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment. PLoS Pathog **2016**;12(9):e1005834.
125. Dai HS, Caligiuri MA. Molecular Basis for the Recognition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Human Natural Killer Cells. Frontiers in immunology **2018**;9:183.
126. Zhang SY, Casanova JL. Inborn errors underlying herpes simplex encephalitis: From TLR3 to IRF3. The Journal of experimental medicine **2015**;212(9):1342-3.
127. Ma Y, He B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. Journal of molecular biology **2014**;426(6):1133-47.
128. Melchjorsen J. Sensing herpes: more than toll. Reviews in medical virology **2012**;22(2):106-21.
129. Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. Am J Pathol **2010**;177(5):2433-45.
130. Reinert LS, Lopusna K, Winther H, et al. Sensing of HSV-1 by the cGAS-STING pathway in microglia orchestrates antiviral defence in the CNS. Nature communications **2016**;7:13348.
131. Alandijany T, Roberts APE, Conn KL, et al. Distinct temporal roles for the promyelocytic

leukaemia (PML) protein in the sequential regulation of intracellular host immunity to HSV-1 infection. PLoS Pathog **2018**;14(1):e1006769.
132. Li J, Hu S, Zhou L, et al. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons. Glia **2011**;59(1):58-67.
133. Cantin E, Tanamachi B, Openshaw H. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. J Virol **1999**;73(4):3418-23.
134. Sainz B, Jr., Halford WP. Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. J Virol **2002**;76(22):11541-50.
135. Kajita AI, Morizane S, Takiguchi T, Yamamoto T, Yamada M, Iwatsuki K. Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. The Journal of investigative dermatology **2015**;135(8):2005-11.
136. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, et al. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. Leukemia **1995**;9(12):2027-33.
137. Merkl PE, Orzalli MH, Knipe DM. Mechanisms of Host IFI16, PML, and Daxx Protein Restriction of Herpes Simplex Virus 1 Replication. J Virol **2018**;92(10).
138. Maucourant C, Petitdemange C, Yssel H, Vieillard V. Control of Acute Arboviral Infection by Natural Killer Cells. Viruses **2019**;11(2).
139. Yu YR, O'Koren EG, Hotten DF, et al. A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. PloS one **2016**;11(3):e0150606.
140. Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. Cell **2010**;142(6):847-56.
141. Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. Current topics in microbiology and immunology **2010**;341:37-58.
142. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. N Engl J Med **1989**;320(26):1731-5.
143. Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). Clinical and experimental immunology **1996**;103(3):408-13.
144. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Katz DR, Chain BM. Glycoprotein-dependent and TLR2-independent innate immune recognition of herpes simplex virus-1 by dendritic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2008**;180(11):7525-36.
145. Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. J Virol **2012**;86(12):6555-62.
146. Ahn K, Meyer TH, Uebel S, et al. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. The EMBO journal **1996**;15(13):3247-55.
147. Dai HS, Griffin N, Bolyard C, et al. The Fc Domain of Immunoglobulin Is Sufficient to Bridge NK Cells with Virally Infected Cells. Immunity **2017**;47(1):159-70.e10.
148. Deback C, Rousseau A, Breckler M, et al. Antiviral effects of Cacicol((R)), a heparan sulfate biomimetic for corneal regeneration therapy, for herpes simplex virus type-1 and varicella zoster virus infection. Antiviral therapy **2018**;23(8):665-75.
149. Kim M, Osborne NR, Zeng W, et al. Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2012**;188(9):4158-70.
150. Chakravarti A, Allaeys I, Poubelle PE. [Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]. Medecine sciences : M/S **2007**;23(10):862-7.
151. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. Journal of immunology research **2016**;2016:2349817.
152. Zheng M, Fields MA, Liu Y, Cathcart H, Richter E, Atherton SS. Neutrophils protect the retina of the injected eye from infection after anterior chamber inoculation of HSV-1 in BALB/c mice. Invest Ophthalmol Vis Sci **2008**;49(9):4018-25.
153. Hayashi K, Hooper LC, Okuno T, Takada Y, Hooks JJ. Inhibition of HSV-1 by chemoattracted neutrophils: supernatants of corneal epithelial cells (HCE) and macrophages (THP-1) treated with virus components chemoattract neutrophils (PMN), and supernatants of PMN treated with these conditioned media inhibit viral growth. Archives of virology

2012;157(7):1377-81.
154. Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, Rouse BT. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **1997**;158(3):1383-91.
155. Armien AG, Hu S, Little MR, et al. Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis. Brain pathology (Zurich, Switzerland) **2010**;20(4):738-50.
156. Ramakrishna C, Cantin EM. IFNgamma inhibits G-CSF induced neutrophil expansion and invasion of the CNS to prevent viral encephalitis. PLoS Pathog **2018**;14(1):e1006822.
157. Royer DJ, Zheng M, Conrady CD, Carr DJ. Granulocytes in Ocular HSV-1 Infection: Opposing Roles of Mast Cells and Neutrophils. Invest Ophthalmol Vis Sci **2015**;56(6):3763-75.
158. Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, et al. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2009**;182(3):1577-83.
159. Borkar DS, Gonzales JA, Tham VM, et al. Association between atopy and herpetic eye disease: results from the pacific ocular inflammation study. JAMA ophthalmology **2014**;132(3):326-31.
160. Rezende RA, Bisol T, Hammersmith K, et al. Efficacy of oral antiviral prophylaxis in preventing ocular herpes simplex virus recurrences in patients with and without self-reported atopy. American journal of ophthalmology **2006**;142(4):563-7.
161. Ong PY, Leung DY. Bacterial and Viral Infections in Atopic Dermatitis: a Comprehensive Review. Clinical reviews in allergy & immunology **2016**;51(3):329-37.
162. Doutlik S, Kutinova L, Benda R, et al. Some immunological characteristics of subjects suffering from frequent herpes simplex virus recrudescences. Acta virologica **1989**;33(5):435-46.
163. Melroe GT, Silva L, Schaffer PA, Knipe DM. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. Virology **2007**;360(2):305-21.
164. Everett RD, Freemont P, Saitoh H, et al. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. J Virol **1998**;72(8):6581-91.
165. Boutell C, Sadis S, Everett RD. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and is isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. J Virol **2002**;76(2):841-50.
166. Lium EK, Silverstein S. Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 ICP0 C3HC4 zinc ring finger reveals a requirement for ICP0 in the expression of the essential alpha27 gene. J Virol **1997**;71(11):8602-14.
167. Melchjorsen J, Siren J, Julkunen I, Paludan SR, Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. The Journal of general virology **2006**;87(Pt 5):1099-108.
168. Johnson KE, Song B, Knipe DM. Role for herpes simplex virus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling. Virology **2008**;374(2):487-94.
169. Paladino P, Mossman KL. Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **2009**;29(9):599-607.
170. Huang J, You H, Su C, Li Y, Chen S, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein VP22 Abrogates cGAS/STING-Mediated Antiviral Innate Immunity. J Virol **2018**;92(15).
171. Su C, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff Protein, UL41. J Virol **2017**;91(6).
172. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. Immunity **2016**;44(3):439-49.
173. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. Nature reviews. Immunology **2017**;17(6):349-62.
174. Mott K, Brick DJ, van Rooijen N, Ghiasi H. Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. Invest Ophthalmol Vis Sci **2007**;48(12):5605-15.
175. Cathcart HM, Fields MA, Zheng M, Marshall B, Atherton SS. Infiltrating cells and IFNgamma production in the injected eye after uniocular anterior chamber inoculation of HSV-1. Invest Ophthalmol Vis Sci **2009**;50(5):2269-75.

176. Lee DH, Ghiasi H. Roles of M1 and M2 Macrophages in Herpes Simplex Virus 1 Infectivity. J Virol **2017**;91(15).
177. Carr DJJ. Herpes Simplex Virus 1, Macrophages, and the Cornea. J Virol **2017**;91(21).
178. Jeon S, Rowe AM, Carroll KL, Harvey SAK, Hendricks RL. PD-L1/B7-H1 Inhibits Viral Clearance by Macrophages in HSV-1-Infected Corneas. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2018**;200(11):3711-19.
179. Segura E, Amigorena S. [Inflammatory dendritic cells]. Medecine sciences : M/S **2014**;30(1):64-8.
180. Breton G. [Origin and development of human dendritic cells]. Medecine sciences : M/S **2015**;31(8-9):725-7.
181. Schuster P, Boscheinen JB, Tennert K, Schmidt B. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Innate and Adaptive Immune Responses against Alpha Herpes Virus Infections. Advances in virology **2011**;2011:679271.
182. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2004**;101(31):11416-21.
183. Pollara G, Jones M, Handley ME, et al. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2004**;173(6):4108-19.
184. Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Koelle DM, Boadle RA, Jones CA, Cunningham AL. Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2005**;174(4):2220-7.
185. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. Immunity **2006**;25(1):153-62.
186. Kassim SH, Rajasagi NK, Zhao X, Chervenak R, Jennings SR. In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. J Virol **2006**;80(8):3985-93.
187. Kittan NA, Bergua A, Haupt S, et al. Impaired plasmacytoid dendritic cell innate immune responses in patients with herpes virus-associated acute retinal necrosis. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2007**;179(6):4219-30.
188. Lee HK, Zamora M, Linehan MM, et al. Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. The Journal of experimental medicine **2009**;206(2):359-70.
189. Eis-Hubinger AM, Schmidt DS, Schneweis KE. Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes. The Journal of general virology **1993**;74 (Pt 3):379-85.
190. Mancuso R, Baglio F, Cabinio M, et al. Titers of herpes simplex virus type 1 antibodies positively correlate with grey matter volumes in Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD **2014**;38(4):741-5.
191. Deshpande SP, Zheng M, Daheshia M, Rouse BT. Pathogenesis of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions in B-cell-deficient mice. J Virol **2000**;74(8):3517-24.
192. Royer DJ, Carr MM, Gurung HR, Halford WP, Carr DJJ. The Neonatal Fc Receptor and Complement Fixation Facilitate Prophylactic Vaccine-Mediated Humoral Protection against Viral Infection in the Ocular Mucosa. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2017**;199(5):1898-911.
193. Royer DJ, Gurung HR, Jinkins JK, et al. A Highly Efficacious Herpes Simplex Virus 1 Vaccine Blocks Viral Pathogenesis and Prevents Corneal Immunopathology via Humoral Immunity. J Virol **2016**;90(11):5514-29.
194. Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2002**;168(2):834-8.
195. van Lint A, Ayers M, Brooks AG, Coles RM, Heath WR, Carbone FR. Herpes simplex

virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2004**;172(1):392-7.
196. Shimeld C, Whiteland JL, Nicholls SM, et al. Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. J Neuroimmunol **1995**;61(1):7-16.
197. Derfuss T, Segerer S, Herberger S, et al. Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia. Brain pathology (Zurich, Switzerland) **2007**;17(4):389-98.
198. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. Science **2008**;322(5899):268-71.
199. Himmelein S, Lindemann A, Sinicina I, Strupp M, Brandt T, Hufner K. Latent herpes simplex virus 1 infection does not induce apoptosis in human trigeminal Ganglia. J Virol **2015**;89(10):5747-50.
200. Jenkins MR, Rudd-Schmidt JA, Lopez JA, et al. Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time. The Journal of experimental medicine **2015**;212(3):307-17.
201. Khan AA, Srivastava R, Spencer D, et al. Phenotypic and functional characterization of herpes simplex virus glycoprotein B epitope-specific effector and memory CD8+ T cells from symptomatic and asymptomatic individuals with ocular herpes. J Virol **2015**;89(7):3776-92.
202. Jeon S, St Leger AJ, Cherpes TL, Sheridan BS, Hendricks RL. PD-L1/B7-H1 regulates the survival but not the function of CD8+ T cells in herpes simplex virus type 1 latently infected trigeminal ganglia. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2013**;190(12):6277-86.
203. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. Nature **1995**;375(6530):411-5.
204. Barcy S, Corey L. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2001**;166(10):6242-9.
205. Koyanagi N, Imai T, Shindo K, et al. Herpes simplex virus-1 evasion of CD8+ T cell accumulation contributes to viral encephalitis. The Journal of clinical investigation **2017**;127(10):3784-95.
206. Arvin AM. Varicella vaccine: genesis, efficacy, and attenuation. Virology **2001**;284(2):153-8.
207. Tillieux SL, Halsey WS, Thomas ES, Voycik JJ, Sathe GM, Vassilev V. Complete DNA sequences of two oka strain varicella-zoster virus genomes. J Virol **2008**;82(22):11023-44.
208. Vazquez M, LaRussa PS, Gershon AA, et al. Effectiveness over time of varicella vaccine. Jama **2004**;291(7):851-5.
209. Marin M, Marti M, Kambhampati A, Jeram SM, Seward JF. Global Varicella Vaccine Effectiveness: A Meta-analysis. Pediatrics **2016**;137(3):e20153741.
210. Gilbert PB, Gabriel EE, Miao X, et al. Fold rise in antibody titers by measured by glycoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay is an excellent correlate of protection for a herpes zoster vaccine, demonstrated via the vaccine efficacy curve. J Infect Dis **2014**;210(10):1573-81.
211. Gilbert PB, Luedtke AR. Statistical Learning Methods to Determine Immune Correlates of Herpes Zoster in Vaccine Efficacy Trials. J Infect Dis **2018**;218(suppl_2):S99-s101.
212. Qi Q, Cavanagh MM, Le Saux S, et al. Defective T Memory Cell Differentiation after Varicella Zoster Vaccination in Older Individuals. PLoS Pathog **2016**;12(10):e1005892.
213. Weinberg A, Pang L, Johnson MJ, et al. The Effect of Age on the Immunogenicity of the Live Attenuated Zoster Vaccine Is Predicted by Baseline Regulatory T Cells and VZV-Specific T Cell Immunity. J Virol **2019**.
214. Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. N Engl J Med **2005**;352(22):2271-84.
215. Willis ED, Woodward M, Brown E, et al. Herpes zoster vaccine live: A 10year review of post-marketing safety experience. Vaccine **2017**;35(52):7231-39.
216. Morrison VA, Johnson GR, Schmader KE, et al. Long-term persistence of zoster vaccine efficacy. Clin Infect Dis **2015**;60(6):900-9.
217. Heineman TC, Cunningham A, Levin M. Understanding the immunology of Shingrix, a

recombinant glycoprotein E adjuvanted herpes zoster vaccine. Current opinion in immunology **2019**;59:42-48.
218. CDC Shingles vaccination. Secondary CDC Shingles vaccination 2018. https://www.cdc.gov/shingles/vaccination.html.
219. Stanberry LR, Cunningham AL, Mindel A, et al. Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. Clin Infect Dis **2000**;30(3):549-66.
220. Corey L, Langenberg AG, Ashley R, et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. Jama **1999**;282(4):331-40.
221. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, et al. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. N Engl J Med **2002**;347(21):1652-61.
222. Straus SE, Wald A, Kost RG, et al. 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 **1997**;176(5):1129-34.
223. Nguyen LH, Knipe DM, Finberg RW. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. J Virol **1992**;66(12):7067-72.
224. Hoshino Y, Pesnicak L, Dowdell KC, et al. 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 **2008**;26(32):4034-40.
225. Yao F, Eriksson E. A novel anti-herpes simplex virus type 1-specific herpes simplex virus type 1 recombinant. Human gene therapy **1999**;10(11):1811-8.
226. Augustinova H, Hoeller D, Yao F. The dominant-negative herpes simplex virus type 1 (HSV-1) recombinant CJ83193 can serve as an effective vaccine against wild-type HSV-1 infection in mice. J Virol **2004**;78(11):5756-65.
227. Brans R, Akhrameyeva NV, Yao F. Prevention of genital herpes simplex virus type 1 and 2 disease in mice immunized with a gD-expressing dominant-negative recombinant HSV-1. The Journal of investigative dermatology **2009**;129(10):2470-9.
228. Brans R, Yao F. Immunization with a dominant-negative recombinant Herpes Simplex Virus (HSV) type 1 protects against HSV-2 genital disease in guinea pigs. BMC microbiology **2010**;10:163.
229. Lu Z, Brans R, Akhrameyeva NV, Murakami N, Xu X, Yao F. High-level expression of glycoprotein D by a dominant-negative HSV-1 virus augments its efficacy as a vaccine against HSV-1 infection. The Journal of investigative dermatology **2009**;129(5):1174-84.
230. Brans R, Eriksson E, Yao F. Immunization with a dominant-negative recombinant HSV type 1 protects against HSV-1 skin disease in guinea pigs. The Journal of investigative dermatology **2008**;128(12):2825-32.
231. Iyer AV, Pahar B, Chouljenko VN, Walker JD, Stanfield B, Kousoulas KG. Single dose of glycoprotein K (gK)-deleted HSV-1 live-attenuated virus protects mice against lethal vaginal challenge with HSV-1 and HSV-2 and induces lasting T cell memory immune responses. Virol J **2013**;10:317.
232. Farrell HE, McLean CS, Harley C, Efstathiou S, Inglis S, Minson AC. Vaccine potential of a herpes simplex virus type 1 mutant with an essential glycoprotein deleted. J Virol **1994**;68(2):927-32.
233. de Bruyn G, Vargas-Cortez M, Warren T, et al. A randomized controlled trial of a replication defective (gH deletion) herpes simplex virus vaccine for the treatment of recurrent genital herpes among immunocompetent subjects. Vaccine **2006**;24(7):914-20.
234. Halford WP, Puschel R, Gershburg E, Wilber A, Gershburg S, Rakowski B. A live-attenuated HSV-2 ICP0 virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. PloS one **2011**;6(3):e17748.
235. Brittle EE, Wang F, Lubinski JM, Bunte RM, Friedman HM. A replication-competent, neuronal spread-defective, live attenuated herpes simplex virus type 1 vaccine. J Virol **2008**;82(17):8431-41.
236. Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG, et al. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

1989;86(12):4736-40.
237. Efstathiou S, Kemp S, Darby G, Minson AC. The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. The Journal of general virology **1989**;70 (Pt 4):869-79.
238. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell **1996**;87(3):427-36.
239. Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. Molecular immunology **2009**;46(3):393-9.
240. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. Current protocols in microbiology **2008**;Appendix 4:Appendix 4E.
241. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. Stroke **2009**;40(5):1849-57.
242. Legroux L, Pittet CL, Beauseigle D, Deblois G, Prat A, Arbour N. An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. J Neurosci Methods **2015**;247:23-31.
243. R: A Language and Environment for Statistical Computing [program]: Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011.
244. Poccardi N, Rousseau A, Haigh O, et al. The kinetics of primary herpetic infection in ipsilateral and contralateral TGs determine the nature of HSV-1 acute infection and reactivation. submitted **2019**.
245. Gebhardt T, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR. Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells. Trends in immunology **2013**;34(1):27-32.
246. Canivet C, Uyar O, Rheaume C, Piret J, Boivin G. The recruitment of peripheral blood leukocytes to the brain is delayed in susceptible BALB/c compared to resistant C57BL/6 mice during herpes simplex virus encephalitis. Journal of neurovirology **2019**;25(3):372-83.
247. Gianni T, Leoni V, Campadelli-Fiume G. Type I interferon and NF-kappaB activation elicited by herpes simplex virus gH/gL via alphavbeta3 integrin in epithelial and neuronal cell lines. J Virol **2013**;87(24):13911-6.
248. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2015**;7(5).
249. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. Journal of leukocyte biology **2004**;75(3):504-14.
250. Soby S, Laursen RR, Ostergaard L, Melchjorsen J. HSV-1-induced chemokine expression via IFI16-dependent and IFI16-independent pathways in human monocyte-derived macrophages. Herpesviridae **2012**;3(1):6.
251. Molesworth-Kenyon SJ, Milam A, Rockette A, Troupe A, Oakes JE, Lausch RN. Expression, Inducers and Cellular Sources of the Chemokine MIG (CXCL 9), During Primary Herpes Simplex Virus Type-1 Infection of the Cornea. Curr Eye Res **2015**;40(8):800-8.
252. Tumpey TM, Cheng H, Yan XT, Oakes JE, Lausch RN. Chemokine synthesis in the HSV-1-infected cornea and its suppression by interleukin-10. Journal of leukocyte biology **1998**;63(4):486-92.
253. Ugolini G. Transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV 1) from mixed limb nerves to the CNS. I. Sequence of transfer from sensory, motor, and sympathetic nerve fibres to the spinal cord. J Comp Neurol **1992**;326(4):527-48.
254. Brazil JC, Quiros M, Nusrat A, Parkos CA. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. The Journal of clinical investigation **2019**;130.
255. Kosz-Vnenchak M, Coen DM, Knipe DM. Restricted expression of herpes simplex virus lytic genes during establishment of latent infection by thymidine kinase-negative mutant viruses. J Virol **1990**;64(11):5396-402.
256. Lucinda N, Figueiredo MM, Pessoa NL, et al. Dendritic cells, macrophages, NK and CD8(+) T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. Virol J **2017**;14(1):37.
257. Conrady CD, Zheng M, Mandal NA, van Rooijen N, Carr DJ. IFN-alpha-driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. Mucosal Immunol **2013**;6(1):45-55.
258. Katsumoto A, Lu H, Miranda AS, Ransohoff RM. Ontogeny and functions of central

nervous system macrophages. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2014**;193(6):2615-21.
259. Menasria R, Canivet C, Piret J, Boivin G. Infiltration Pattern of Blood Monocytes into the Central Nervous System during Experimental Herpes Simplex Virus Encephalitis. PloS one **2015**;10(12):e0145773.
260. Vogel K, Thomann S, Vogel B, Schuster P, Schmidt B. Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. Immunology **2014**;143(4):588-600.
261. Chucair-Elliott AJ, Gurung HR, Carr MM, Carr DJJ. Colony Stimulating Factor-1 Receptor Expressing Cells Infiltrating the Cornea Control Corneal Nerve Degeneration in Response to HSV-1 Infection. Invest Ophthalmol Vis Sci **2017**;58(11):4670-82.
262. Handfield C, Kwock J, MacLeod AS. Innate Antiviral Immunity in the Skin. Trends in immunology **2018**;39(4):328-40.
263. Levin C, Perrin H, Combadiere B. Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. Human vaccines & immunotherapeutics **2015**;11(1):27-36.
264. Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, et al. Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. The Journal of general virology **2010**;91(Pt 9):2158-66.
265. Hor JL, Heath WR, Mueller SN. Neutrophils are dispensable in the modulation of T cell immunity against cutaneous HSV-1 infection. Sci Rep **2017**;7:41091.
266. Molesworth-Kenyon SJ, Popham N, Milam A, Oakes JE, Lausch RN. Resident Corneal Cells Communicate with Neutrophils Leading to the Production of IP-10 during the Primary Inflammatory Response to HSV-1 Infection. Int J Inflam **2012**;2012:810359.
267. Shen FH, Wang SW, Yeh TM, Tung YY, Hsu SM, Chen SH. Absence of CXCL10 aggravates herpes stromal keratitis with reduced primary neutrophil influx in mice. J Virol **2013**;87(15):8502-10.
268. Foster EL, Simpson EL, Fredrikson LJ, et al. Eosinophils increase neuron branching in human and murine skin and in vitro. PloS one **2011**;6(7):e22029.
269. Carmichael JC, Yokota H, Craven RC, Schmitt A, Wills JW. The HSV-1 mechanisms of cell-to-cell spread and fusion are critically dependent on host PTP1B. PLoS Pathog **2018**;14(5):e1007054.
270. Kim M, Truong NR, James V, et al. Relay of herpes simplex virus between Langerhans cells and dermal dendritic cells in human skin. PLoS Pathog **2015**;11(4):e1004812.
271. Whitney PG, Makhlouf C, MacLeod B, et al. Effective Priming of Herpes Simplex Virus-Specific CD8(+) T Cells In Vivo Does Not Require Infected Dendritic Cells. J Virol **2018**;92(3).
272. Hain T, Melchior F, Kamenjarin N, et al. Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. The Journal of investigative dermatology **2019**;139(2):422-29.
273. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. Trends in immunology **2013**;34(9):440-5.
274. van Velzen M, Laman JD, Kleinjan A, Poot A, Osterhaus AD, Verjans GM. Neuron-interacting satellite glial cells in human trigeminal ganglia have an APC phenotype. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2009**;183(4):2456-61.
275. Xu H, Manivannan A, Dawson R, et al. Differentiation to the CCR2+ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **2005**;175(10):6915-23.
276. Rosato PC, Leib DA. Neurons versus herpes simplex virus: the innate immune interactions that contribute to a host-pathogen standoff. Future virology **2015**;10(6):699-714.
277. Gill MB, Wright DE, Smith CM, May JS, Stevenson PG. Murid herpesvirus-4 lacking thymidine kinase reveals route-dependent requirements for host colonization. The Journal of general virology **2009**;90(Pt 6):1461-70.
278. Takashima A, Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. Journal of leukocyte biology **2015**;98(4):489-96.
279. Chen SH, Lin YW, Griffiths A, Huang WY, Chen SH. Competition and complementation between thymidine kinase-negative and wild-type herpes simplex virus during co-

infection of mouse trigeminal ganglia. The Journal of general virology **2006**;87(Pt 12):3495-502.
280. Xie Y, Wu L, Wang M, et al. Alpha-Herpesvirus Thymidine Kinase Genes Mediate Viral Virulence and Are Potential Therapeutic Targets. Frontiers in microbiology **2019**;10:941.
281. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. Clinical microbiology reviews **2003**;16(1):114-28.
282. Burrel S, Aime C, Hermet L, Ait-Arkoub Z, Agut H, Boutolleau D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. Antiviral research **2013**;100(2):365-72.
283. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **2003**;26(1):29-37.
284. Melenhorst JJ, Scheinberg P, Chattopadhyay PK, et al. Detection of low avidity CD8(+) T cell populations with coreceptor-enhanced peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. Journal of immunological methods **2008**;338(1-2):31-9.
285. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. Immunity **2014**;40(5):642-56.
286. Minoda Y, Virshup I, Leal Rojas I, et al. Human CD141(+) Dendritic Cell and CD1c(+) Dendritic Cell Undergo Concordant Early Genetic Programming after Activation in Humanized Mice In Vivo. Frontiers in immunology **2017**;8:1419.
287. Pasqual G, Chudnovskiy A, Tas JMJ, et al. Monitoring T cell-dendritic cell interactions in vivo by intercellular enzymatic labelling. Nature **2018**;553(7689):496-500.

Annexes

Article 1 : HSV-1 replication, ocular disease and reactivations from latency are restricted unilaterally after inoculation of virus into the lip.

(accepté dans Journal of Virology le 11/09/2019)

HSV-1 replication, ocular disease and reactivations from latency are restricted unilaterally after inoculation of virus into the lip

Nolwenn Poccardi,[a] Antoine Rousseau,[a,b,c] Oscar Haigh,[b] Julie Takissian,[a,d] Thierry Naas,[d] Claire Deback,[e] Louise Trouillaud,[b] Mohammad Issa,[b] Simon Roubille,[g] Franceline Juillard,[g] Stacey Efstathiou,[f] Patrick Lomonte,[g] Marc Labetoulle[a,b,c]#

a) Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Département de Virologie, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

b) CEA - Université Paris Sud, INSERM U1184, Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, IDMIT departement, IBFJ, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.

c) Université Paris Sud, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, Service d'Ophtalmologie, APHP, DHU Vision & Handicaps, Centre de référence maladies rares en ophtalmologie OPHTARA, Le Kremlin-Bicêtre, France.

d) Université Paris Sud, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, Service de Bactériologie, APHP, Le Kremlin-Bicêtre, France.

e) Université Paris Sud, Hôpital Paul Brousse, Service de Virologie, APHP, Villejuif, France.

f) Division of Virology, Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QP, UK

g) Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U 1217, LabEx DEVweCAN, Institut NeuroMyoGène (INMG), team Chromatin Assembly, Nuclear Domains, Virus. F-69100, Lyon, France

Running Title: Altered kinetics of HSV-1 infection eliminates disease

Total word count: 5797

Abstract word count: 257

#Corresponding author:

Marc Labetoulle, Service d'ophtalmologie, Hôpital de Bicêtre

78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre

marc.labetoulle@aphp.fr

phone: +33 1 45 21 36 90, fax: +33 1 45 21 22 46

Keywords: HSV-1; latency; reactivation; trigeminal ganglion; neurons; superinfection; keratitis

ABSTRACT

Ocular herpes simplex keratitis (HSK) is a consequence of viral reactivations from trigeminal ganglia (TG) and occurs almost exclusively in the same eye in humans. In our murine oro-ocular (OO) model, HSV-1 inoculation in one side of the lip propagates virus to infect the ipsilateral TG. Replication here allows infection of the brainstem, and infection of the contralateral TG. Interestingly, HSK is observed in our OO model only from the eye ipsilateral to site of lip infection. Thus, unilateral restriction of HSV-1 may be due to differential kinetics of virus arrival in the ipsilateral versus contralateral TG. We inoculated mice with HSV-1 reporter viruses, and then superinfected them to monitor changes in acute and latent phase gene expression in TG after superinfection, compared to control (single inoculation). Delaying superinfection by 4 days after initial right lip inoculation elicited failed superinfecting-virus gene expression, and eliminated clinical signs of disease. Initial inoculation with a thymidine kinase-deficient HSV-1 (TK_{del}) completely abolished reactivation of WT superinfecting virus from TG during latent stage. In light of these seemingly failed infections, viral genome was detected in both TGs. Our data demonstrate that inoculation of HSV-1 in the lip propagates virus to both TG, but with delay in reaching the TG contralateral to the side of lip infection. This delay is responsible for restricting viral replication to the ipsilateral TG, which abrogates ocular disease and viral reactivations from the contralateral side. These observations may help to understand why HSK is observed unilaterally in humans, and provides insight into vaccine strategies to protect against HSK.

IMPORTANCE

Herpetic keratitis (HK) is the leading cause of blindness by an infectious agent in the developed world. This disease can occur after reactivation of Herpes simplex virus 1 in the trigeminal ganglia leading to dissemination of virus to, and infection of, the cornea. A clinical paradox is evidenced by the bilateral presence of latent viral genomes in both trigeminal ganglia, while for any given patient the disease is unilateral with recurrences in a single eye. Our study links the kinetics of early infection to unilateral disease phenomenon, and demonstrates protection against viral reactivation when kinetics are exploited. Our results have direct implications in the understanding of human disease pathogenesis, and immunotherapeutic strategies for the treatment of HK and viral reactivations.

INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) belongs to the *Herpesviridae* family, which are widespread in nature and have the characteristic feature of establishing lifelong latency in the infected host **(1)**. The unique natural host of HSV-1 is humans, in which primary infection occurs almost always via the oral mucosae **(2, 3)**. Subsequently, the nucleocapsid travels by retrograde axonal transport to neuronal cell bodies **(4)** located in the trigeminal ganglia (TG), where the virus establishes a latent infection. The main sites of HSV-1 latency are the TG, which drive sensitive innervation of the face **(5, 6)**, and where the viral genome is retained for the entirety of the hosts life **(7)**. Reactivations of these latent reservoirs can propagate infection of various ocular tissues, leading to ocular herpetic disease (OHD). The prevalence of OHD has been estimated at 150/100 000 inhabitants in the US **(8)**, and the annual incidence ranges between 12 and 30 per

100 000 inhabitants **(8-10)**. Corneal recurrence of herpetic keratitis (HK) is the most common clinical presentation of OHD **(11)**. While some HK can resolve without further complications, the cumulative risk of one or more recurrences is greater than 60% in persons over 20 years old **(11)**. The risk of corneal opacities increases with the number of relapses. Hence, HK is a sight-threatening disease and 10-year follow-up has shown that visual acuity is below 20/200 in more than 10% of affected eyes **(10)**.

One of the most striking properties of HK is the unilateral nature of the recurrences in almost all patients **(6, 11)**, despite similar latent HSV-1 DNA loads in both the left and right TG **(5, 12, 13)**. This clinical-biological discordance suggests that the presence of viral genome in the TG is not a sufficient event for precipitating a reactivation event. Furthermore, different animal infection models and *in vitro* studies have confirmed that under conditions of sequential infection, immune (innate and adaptive) and HSV-1-mediated (superinfection exclusion) mechanisms influence the severity of acute phase clinical signs, and the establishment of latency by the superinfecting strains **(14-18)**. However, these mechanisms are unable to control the spread of superinfecting HSV-1 to neuronal ganglia, nor to prevent reactivations completely. These studies support the idea that reactivations of HSV-1 to cause recurrent disease are heavily influenced by the sequence of infection; where the primary virus infecting the host attenuates the infectivity of superinfections and their ability to reactivate from latency, while the primary virus retains its own ability to reactivate.

The profound unilateral reactivation phenomena of HK, in light of bilateral latent HSV-1 infection, begs the question of how a primary infection can influence outcomes of

viral superinfection of the neuronal network. To explore these concepts, and to investigate how acute phase and virus latent state (linked to HK) were affected by infection kinetics, we took advantage of a well-defined mouse model of oral-ocular (OO) HSV-1 infection **(19-22)**, which mimics several of the key aspects of OHD in humans. After precise primary inoculation into the oral tissue segregated to the left side of the upper lip, the ipsilateral TG (left) supports active virus replication from 4 days after primary infection and acute keratitis occurs in the ipsilateral eye from 6 days post infection (DPI). During this time the virus also reaches the contralateral TG (right side), although there is no infection of the right eye. Once acute phase of the infection has resolved, HSV-1 latency is detectable in both TG from 28 DPI. While the latent HSV-1 DNA load is similar in both TG **(22)**, as described in humans **(5, 12, 13)**, neurons expressing high levels of LAT are almost exclusively detected in the TG ipsilateral to the lip inoculation site **(21, 22)**. We have observed that reactivation from latency occurred almost exclusively from one TG, the TG ipsilateral to inoculation, mimicking the unilateral nature of HK in humans **(6)**.

We hypothesized that unilateral viral reactivation in animals and the ocular disease patterns in humans could be related to the triggering of early events, induced during or just after the inoculation process, that eventually dictate the long-term establishment of latency and unilateral reactivation. We explored this idea using a dual inoculation procedure, where HSV-1 reporter viruses were inoculated into the right upper lip of mice to initiate viral infection, while virulent wild type virus was inoculated into the contralateral lip with delay. This study allowed us to determine how altered

HSV-1 infection kinetics would influence superinfecting virus acute phase, viral dissemination, and latency establishment.

RESULTS

Unilateral lip inoculation of wild-type HSV-1 SC16 results in unilateral reactivation in mice. HSV-1 inoculation in the oral ocular (OO) model occurs in the upper lip, and is localized to the center of one side, at the muco-cutaneous border. After acute phase replication in the lip, the virus disseminates to both left and right TG, as previously demonstrated by an abundance of viral DNA and bilateral transcription of ICP0 and LAT mRNA **(21, 22)**. To demonstrate unilateral HSV-1 reactivation phenomenon, mice (*n =14*) were inoculated in the left lip with wild-type SC16 virus. Most animals (*12/14*) survived the acute phase of infection and were sacrificed at 28 DPI. TGs were harvested and HSV-1 reactivation from individual TGs was induced by *ex vivo* culture. Infectious virus particles were generated from 50% of ipsilateral (left) TG cultures, while no contralateral (right) TG cultures generated infectious virus (**Figure 1A**) A second group of mice (*n = 5*) infected via the same process were also harvested at 28 DPI, and HSV-1 genomes were detected by qPCR targeting gG coding sequence (**Figure 1B**). HSV-1 DNA was detected in abundance in all TG, with no significant difference between HSV-1 DNA detected in left or right TG. This data demonstrates that after lip infection restricted to one side, HSV-1 is propagated to both left and right TG. However, HSV-1 reactivations from latency occur unilaterally from the TG ipsilateral to HSV-1 inoculation.

Delayed kinetics of infection block the transcriptional activity of superinfecting virus in the ipsilateral TG. To further characterize the phenomenon of unilateral HSV-

1 reactivation from the ipsilateral TG, we questioned whether the naturally delayed kinetics of viral arrival to the TGs after lip infection (i.e. 4 DPI in TG ipsilateral and 6 DPI in TG contralateral to infection **(19)**) was involved in restricting virus reactivation to the ipsilateral TG. To explore this concept, we performed an initial virus inoculation in the right lip with followed by superinfection in the left lip. The superinfecting left lip inoculations were performed in different groups of mice on different days, so that superinfecting virus would disseminate to the ipsilateral (left) TG at delayed time points in relation to the initial infection on day 0 (**Figure 2A**). The right side infection aimed to produce day 4 right TG and day 6 left TG infection kinetics, while the delays in superinfection of the left lip would achieve infection of the left TG before, during, or after this 4 - 6 day window. To distinguish the initial infecting virus from superinfecting virus, we utilized reporter viruses all derived from the SC16 parent strain: gJ-GFP for the initial right-side inoculation, and gJ-LacZ for superinfection in the left-side. We previously observed that mice infected with gJ-GFP lack signs of clinical morbidity (no death or ocular signs) during the first 10 days after inoculation, despite the presence of replicating particles in the TG at day 4 after inoculation albeit to a much lesser extent than with wild-type SC16 (*unpublished observations*).

A group of mice (*n = 24*) were inoculated with gJ-GFP in the right lip. Between zero to 6 days later, subgroups of mice (*n = 3*) were superinfected with gJ-LacZ in the left lip. Left and right TG were harvested from these animals that were sacrificed 6 DPSI, and fixed sections were analyzed for superinfecting virus gJ-LacZ reporter gene activity by enumeration of β-galactosidase^{+ve} neurons in both TGs (**Figure 2B**). In the absence of an initial inoculation, or when superinfection was performed up to 3 days after initial

inoculation, β-galactosidase^{+ve} neurons were frequently observed in left (ipsilateral to superinfection) TGs (*11/12*). Under all conditions, and in the vast majority of mice (*22/24*), no β-galactosidase^{+ve} neurons could be detected in the TG contralateral to superinfection (right TG). Strikingly, no β-galactosidase^{+ve} neurons could be detected in either the left or right TG from all mice that were superinfected at 4 DPI (*9/9*), and beyond (highlighted by bracket). These data demonstrated that any delay between initial infection and contralateral superinfection in the lips leads to a reduction in the numbers of cells harboring viral replication in the TG ipsilateral to superinfection during acute phase. Furthermore, a 4-day delay or more abolished superinfecting viral gene expression in the TG ipsilateral to superinfection.

To further explore this phenomenon, we reproduced this sequence of inoculation for all following experiments (i.e. an interval of 4 days between the initial infection in the right lip and superinfection in the left lip). To determine if the elimination of β-galactosidase activity of superinfecting gJ-LacZ virus was a consequence of restricted virus migration to TG, 2 additional groups of mice (*n = 10*) were initially inoculated in the right lip with either gJ-GFP or a mock inoculum. Superinfection with gJ-LacZ was performed at 4 DPI in the left lip in all mice. Enumeration of β-galactosidase^{+ve} neurons at 6 DPSI identified gJ-LacZ virus transcriptional activity in mice receiving an initial mock inoculation with PBS (**Figure 3A**). The vast majority of β-galactosidase^{+ve} neurons were found in the TGs ipsilateral (left) to inoculation with gJ-LacZ (*62 ± 33.5, range 21-138*) in initially mock infected mice, compared to extremely low numbers of β-galactosidase^{+ve} neurons in some (*4/10*) contralateral (right) TGs (*2 ± 3.9, range 0 - 9*). In contrast, both left and right TGs from the 10 mice that received an initial gJ-GFP

inoculation in the right lip before superinfection with gJ-LacZ in the left lip, lacked β-galactosidase^{+ve} neurons. This reduction in the number of cells harboring lytic viral replication, between initial mock- or gJ-GFP-infected groups, was significant ($p < 0.01$). Using an additional group of mice, which underwent the same inoculation procedure, qPCR for LacZ sequence was performed to detect superinfecting gJ-LacZ genomic DNA load from TGs harvested at 6 DPSI ($n = 6$ mice per group). Superinfecting virus DNA, relative to host GAPDH, was abundant in both left and right TG whether mice received an initial right-lip gJ-GFP inoculation (*Left TGs: 8.45E-03 ± 1.32E-02 vs Right TGs: 4.23E-03 ± 4.06E-03*) or a mock inoculation (*Left TGs: 1.73E-02 ± 1.34E-02 vs Right TGs: 9.21E-03 ± 1.68E-02*) (**Figure 3B**). Combined, these data demonstrated that superinfecting virus reporter gene activity was restricted to the TG ipsilateral to lip infection (left). Thus, an initial infection in the opposite side (right) 4 days prior, lead to almost complete attenuation of superinfecting virus transcriptional activity in the TG without blocking the dissemination of virus to the TG.

HSV-1 infection in the lip leads to inhibition of mortality and disease, and a major impact on the establishment of latency by a superinfecting virus. In the following series of experiments, we used the LβA reporter virus for left-side superinfection to explore whether a primary infection with the attenuated gJ-GFP virus would translate into protection against LβA-associated diseases and mortality. While the LβA reporter virus has an insertion of the *LacZ* gene within the LAT locus, this reporter virus produces a virulent phenotype causing ocular disease and mortality in lip-infected mice, comparable to that of parental SC16 wild-type **(20).**

Two groups of mice (*n = 30 per group*) were initially mock infected, or initially infected with gJ-GFP, in the right lip. All mice were then superinfected with LβA in the left lip 4 days later. During acute phase, mice that received the initial mock inoculation exhibited signs of ocular diseases (67%), which included corneal clouding, corneal neovascularization and/or iris atrophy with pupil mydriasis (**Figure 4A**). Furthermore, 40 % experienced death during the first 10 days, similar to previous observations of acute phase LβA infection (**Figure 4B**) **(20)**. In contrast, when mice received the initial gJ-GFP inoculation before LβA, there were no signs of ocular morbidity, or mortality (**Figures 4A** and **4B**; *end-point Chi^2 2-tailed test = p < 0.001 for both A and B*).

At 28 DPSI, corresponding to superinfecting virus latency phase, mice (*n = 6*) from each group were sacrificed and fixed TG sections were analyzed by microscopy for β-galactosidase^{+ve} neurons, as LacZ expression is a surrogate marker of LAT promoter activity in the LβA strain **(23)**. In initially mock infected mice, significant numbers of β-galactosidase^{+ve} neurons were counted in the left TG (*199 ± 170.7, range 48-498*), the TG ipsilateral to LβA superinfection (**Figure 4C**). In stark contrast to the mock infected mice, only few β-galactosidase^{+ve} neurons were found in the TG ipsilateral to LβA superinfection when mice were initially infected with gJ-GFP (*3.5 ± 4.4, range 0-9*, *mock vs gJ-GFP initial infection: p < 0.01*). These reduced numbers of positive neurons were similar to those elicited in the contralateral TGs to superinfection of initially mock infected mice (*mock right TG: 3.0 ± 3.8, range 0-9)*, and also the contralateral TG to superinfection in initially gJ-GFP infected mice *(gJ-GFP right TG: 0*). The load of superinfecting LβA DNA was quantified in left and right TGs to rule out restricted viral dissemination as a cause for the reduction in numbers of β-galactosidase^{+ve} neurons.

LβA superinfected animals (*n = 6*), which were initially mock or gJ-GFP infected, were sacrificed and DNA extracted from TGs. Quantification of LβA by qPCR, relative to host GAPDH, demonstrated no significant difference in superinfecting LβA genome loads between left and right TGs, or between TGs of mice initially mock or gJ-GFP infected (*gJ-GFP or mock: p > 0.05 for all comparisons)* (**Figure 4D**). These data demonstrated that while LβA virus disseminated to both TG during acute phase, an initial infection 4 days prior in the lip opposite to superinfection prevented superinfecting LβA-mediated ocular disease and mortality without blocking viral dissemination, and included the attenuation of LAT promoter activity during latent phase.

HSV-1 TK_{del} mutant infection in the lip attenuates acute and latent superinfecting virus activity and eliminates reactivation from latency. Our original objective was to determine how altering kinetics of infection would influence superinfections, specifically. Thus, to avoid bias towards reactivation that might be elicited by initial reporter virus reactivations in the TG explant method **(24)**, we sought a virus mutant that would be unable to reactivate from TGs for use as the initial inoculating virus. Previous studies have shown that HSV-1 mutants deficient for thymidine kinase (TK) expression were unable to replicate in neurons (non-neurovirulent), but could still enter latency and persist in neuronal cells of immunocompetent animals **(24)**. Ideally, these mutants could not reactivate from a latent state without rescue by non-defective virus **(24-28)**. We utilized a TK_{del} mutant derived from the SC16 parent strain for initial infections in reactivation studies **(26)**. Non-reactivatable TK_{del} allowed us to observe how reactivation from latency of the superinfecting virus alone would be influenced by the altered kinetics introduced by the earlier initial infection.

Mice were initially mock infected, or infected with TK_{del} in the right lip. Four DPI, mice were superinfected with LβA (*n = 17*), or with SC16 wild-type virus (*n = 20*) in the left lip. During the acute phase of LβA or SC16 superinfection (and up to 15 DPSI), mice that received an initial TK_{del} inoculation lacked signs of ocular morbidity, mortality, and weight loss (LβA: **Figure 5A, 5B** and **5C**; *end-point Chi^2 2-tailed test = p < 0.001 for both A and B*). In contrast, mice which were initially mock infected, exhibited the expected rates of morbidity described earlier with LβA alone **(20)**.

Mice (*n = 5*) from both groups were randomly sampled at day 6 DPSI to observe LβA-associated LAT promoter activity during acute phase (**Figure 5D**). As expected, all of the left TGs from mice that were initially mock infected, before superinfection in the left lip with LβA, contained β-galactosidase^{+ve} neurons (*272 ± 155.5, range 99 - 483*). Furthermore, TGs contralateral to the LβA superinfection (4/5), contained extremely low numbers of β-galactosidase^{+ve} neurons (*6 ± 7.0, range 0 - 18*). In striking contrast, both the left and right TGs from mice initially infected with TK_{del} before left lip superinfection with LβA were almost completely devoid of β-galactosidase^{+ve} neurons (*superinfected left TG: 14 ± 12.8, range 3 – 21, and superinfected right TG: 0*). This reduction in β-galactosidase^{+ve} neurons was statistically significant (*p = 0.009*). These data demonstrated that an initial infection with a virus unable to replicate in neurons could trigger protection against acute phase disease, which corresponded with the attenuation of virulent superinfection viral gene expression.

297 To understand further the consequences of non-neurovirulent initial infection on the
298 transcriptional activity of superinfecting virus during latency, the LAT promoter activity
299 was monitored during the latent phase (28 DPSI) of LβA virus infection (**Figure 6A**).
300 While β-galactosidase^{+ve} neurons were frequently detected in all TGs ipsilateral to LβA
301 superinfection in initially mock infected animals (*132 ± 75.3, range 72 - 219*), there was
302 a significant reduction in β-galactosidase^{+ve} neurons of TGs ipsilateral to LβA
303 superinfection in initially TK_{del}-infected animals (*5 ± 8.2, range 0 - 21, p<0.01, from 3/6*
304 *animals*). β-galactosidase^{+ve} neurons in right TGs, contralateral to LβA superinfection,
305 were only just detected from mock infected animals (*1 ± 1.1, range 1 - 3*) and were not
306 detected in right TGs from superinfected mice that received the initial TK_{del} inoculation.
307 Meanwhile, abundant loads of superinfecting LβA viral genome were detected from the
308 left and right TG of mock infected animals, and between mice that received an initial
309 mock or TK_{del} inoculation in left TGs (**Figure 6B**). Additional groups of mice were either
310 mock infected, or infected with TK_{del} in the right lip and then left for 1 month before
311 superinfection in the left lip with LβA. Mice were randomly sampled at day 28 DPSI (D
312 56) to observe LβA-associated LAT promoter activity during latency (**Figure 6C**).
313 Similar to a 4 day delay, frequent β-galactosidase^{+ve} neurons were detected in the TG
314 ipsilateral to infection with LβA in mice that were initially mock infected. Whereas, in
315 mice receiving an initial TK_{del} inoculation, β-galactosidase^{+ve} neurons were almost
316 undetectable from both TG. Meanwhile, LβA DNA was found in both left and right TG in
317 groups of mice that were initially inoculated with TK_{del}, or not (**Figure 6D**). These data
318 demonstrate that in the TG, LAT promoter activity of superinfecting virus was abrogated
319 by initial infection with TK_{del} in the lip from 4 days before superinfection in the
320 contralateral lip, and were long-lived up to 28 DPSI.

Superinfecting virus reactivations from latency after the TK_{del} initial infection were quantified from explanted TGs in 4 additional groups of mice sacrificed 28 DPSI. Groups were initially mock infected, infected with TK_{del} in the right lip or in the right footpad, and then superinfected with LβA or wild type SC16 virus in the left lip 4 DPI. The supernatants from the TG cultures generated viral plaques only from cultures of TG ipsilateral to superinfection with LβA or SC16 virus (left) when initially mock infected (40% and 64% of TG respectively) (**Figure 7A** and **7B**, respectively). Interestingly, no plaques were detected from any TG cultures from mice that were initially infected in the lip with TK_{del}, and superinfected with LβA or the SC16 wild type. However, 53% of TG cultures from mice that were initially infected in the footpad with TK_{del} generated viral plaques. These data demonstrated that a fully virulent superinfecting HSV-1, which is normally capable of reactivating, and was present in abundance bilaterally (at a viral load compatible with reactivation), was unable to reactivate if mice were initially infected in the lip, but not the footpad with non-neurovirulent virus 4 days prior to the contralateral superinfection. We can infer that TK_{del} was not rescued by the superinfection 4 days later, or during TG explant culture. These results indicate that an initial TK_{del} infection did not prevent superinfecting LβA from entering the TGs to establishing latency, as assessed by measurement of latent DNA loads. However, an initial TK_{del} infection in the lip lead to control of transcriptional activity of the HSV-1 genomes, and blocked reactivation. In contrast, an initial TK_{del} infection in the footpad did not abrogate reactivations from latency.

Attenuation of acute disease mediated by initial HSV-1 TK_{del} inoculation occurs systemically. To further probe the ability of initial TK_{del} inoculation to dictate acute phase and latent phase superinfection outcomes, mice were initially mock infected, or infected with TK_{del} in the right lip or right footpad. After 4 days, mice were challenged with virulent SC16 in the left lip and mice were monitored for signs of disease. Mice that were initially mock infected displayed rates of mortality (~30%), ocular disease (~60%) and weight loss, as expected after a challenge with virulent SC16 in the lip (**Figures 8A**, **8B** and **8C**). In contrast, mice that received an initial inoculation of TK_{del} in the lip or footpad were completely protected from signs of disease. These data demonstrate that acute phase disease, as a consequence of virulent superinfection in the lip, was attenuated systemically by an initial inoculation with TK_{del} 4 days prior to superinfection.

Discussion

In humans, almost all HK recurrences are unilateral **(6, 11)**, while the viral load is not statistically different between left and right TG for a given patient **(5, 12, 13)**. These data suggest that HSV-1 infection yields a different state of latency between left and right TGs of the same infected individual. Using a mouse model of HSV-1 labial primary infection, where infection is performed unilaterally at the orofacial cavity, we have previously demonstrated that both ipsilateral and contralateral TGs are infected with a 2-day delay between the former and the latter in any given animal **(21, 22)**.

Using this model in the present study, we have shown that HSV-1 reactivation occurs solely from the TG ipsilateral to infection (**Figure 1A**), while virus genomic DNA is present bilaterally (**Figure 1B**). As symmetrical nerve networks innervating the left

368 and right sides of the face are directly linked to a corresponding left or right TG **(20)**,
369 virus propagation from a primary lip infection, localized to one side of the face, is directly
370 associated with axons of the TG aligned to that side of the face, thus explaining how
371 this ipsilateral TG is infected before the contralateral TG. We therefore hypothesized
372 that asymmetry of HSV-1 acute phase activity and recurrences in humans are
373 associated with differential kinetics of virus arrival in ipsilateral and contralateral TGs
374 during orofacial infection. Upon lip infection, the virus must disseminate through second
375 and third order midbrain neurons of the trigeminal pathways to reach the contralateral
376 TG, but with a delay in comparison to infection of the TG that is ipsilateral and directly
377 connected to the infected lip site (as described in **(19, 20)**). We confirmed this notion by
378 utilizing a dual inoculation process, where an initial HSV-1 infection in the lip aligned to
379 one side, was followed by a contralateral lip superinfection with different reporter viruses
380 derived from the same HSV-1 strain. Delaying by 4 days or more the inoculation of
381 superinfecting virus resulted in a complete inhibition of the acute phase of
382 superinfection in the ipsilateral TG (**Figure 2** and **3A**), with concomitant elimination of
383 morbidity and mortality (**Figure 4A** and **B**). Virus was still propagated to the ipsilateral
384 and contralateral TG, as detected by viral genomic qPCR (**Figures 3B**, **4D**, **6B**, and **6D**).
385 Interestingly, this 4-day window of time correlated with the time to develop adaptive
386 immune surveillance, critical in the control of acute phase HSV-1 infection in other
387 mouse models **(29-31)**. HSV-1-specific cytotoxic T cell function has been recorded in
388 draining lymph nodes as early as 2 DPI, and proliferating HSV-1-specific T cells were
389 found in the spleen 4 DPI **(32)**, and these cells provide a long-lived protection by
390 mounting rapid responses to a viral challenge. On the other hand, innate anti-HSV-1
391 mechanisms triggered by neurons, and driven by type I and type II interferons, have

been reported to shut down viral transmission and repress acute phase HSV-1 lytic activity **(33, 34)**. The outcome of HSV-1 infection of the TG is further dictated by the neuronal subtypes infected that are infected, with $NefH^{+ve}$ neurons more efficient for harboring virus in latent state versus $NefH^{-ve}$ which are more efficient in harboring lytic viral replication **(35, 36)**. Even so, our observations from dual infection, where altered kinetics of TG infection incurred attenuation of viral replication in the contralateral TG, may illustrate why acute phase HSV-1 activity is restricted to the ipsilateral TG after orofacial infection. Indeed, a plausible explanation raised from our experiments is that while the TG ipsilateral to the site of orofacial inoculation becomes infected rapidly, the delay in travel time for virions to arrive in the contralateral TG enables the development of appropriate antiviral mechanisms in the host, which elicit protection against viral replication and associated disease of the contralateral side.

The use of thymidine kinase-deficient mutant, TK_{del}, for the initial infection allowed us to question further the implications of delayed superinfection of the contralateral TG on viral reactivations. The TK_{del} mutant HSV-1 can cause a fulminant infection in epithelial tissue during acute infection, is known for its capacity to establish latency and persist, but is unable to reactivate or replicate in neurons **(24, 26, 37)**. Infectious particles can only be found at the site of lip infection during acute phase, and not from either TG (*data available upon request*). Hence, this mutant virus is unable to spread from one neuron to another in the TG, and by extension cannot proceed to the TG contralateral to lip infection. Here, we describe a major protective state elicited by TK_{del} infection. LAT promoter activity of the LßA superinfecting virus, as well as ocular signs of disease, and mortality of the superinfected mice were eliminated by initial

416 infection with the TK_{del} mutant virus (**Figures 5, 6,** and **8**). While efficient protection
417 elicited by priming with attenuated virus is in line with previous experimental reports **(37-**
418 **42)**, of great interest was the complete absence of virulent wild type superinfecting virus
419 reactivations from ipsilateral and contralateral TGs in initially TK_{del}-infected animals
420 (**Figure 7**). To establish protection against reactivation, footpad initial infection (not
421 affecting the trigeminal neural network) was ineffective at blocking reactivations while
422 contralateral lip infection was. In contrast, initial inoculation with TK_{del} in the footpad was
423 able to elicit attenuation of acute phase disease (**Figure 8**). These findings suggest that
424 different immune- or virus-mediated mechanisms are required to protect against acute
425 phase lytic gene expression and associated disease versus blocking reactivations.
426 Therefore, yet unappreciated mechanisms exists for controlling viral reactivation that
427 may involve properties unique to non-neurovirulent HSV-1 mutants. Further studies are
428 required to determine whether the prophylaxis against reactivation elicited by TK_{del} is
429 mediated by eliciting local adaptive cellular immunity **(37)**, and/or by HSV-1-mediated
430 cellular level functions **(14, 18)**. Defining these conditions may enable exploitation for
431 the control of viral reactivation from the TG.
432
433 Our study was motivated by observations of unilateral HSV-1 infection and
434 reactivation in the OO model, and by clinical observations of recurrent unilateral human
435 ocular disease. Altered lateral kinetics of infection, elicited by performing an initial
436 inoculation in the lip contralateral to a delayed secondary infection, attenuated
437 superinfection viral gene expression. A key time point of 4 days delay between
438 infections was discovered, after which protective mechanisms had extended to include
439 the lip and/or TG contralateral to the side of initial infection. These results are promising,

as the natural origin of HSV-1-mediated ocular disease is from viral replication in the TG. However, superinfecting viral DNA was abundant in the opposing TGs, illustrating uncontained viral dissemination through the neural network. Initial infection with TK_{del} lead to a profound absence of viral reactivations from latency in mice superinfected with virulent HSV-1. These results indicate that reactivation, and more particularly unilateral recurrence, are a manifestation of latency establishment early during acute phase infection where: the ipsilateral TG is directly-linked to the orofacial site of inoculation, and is infected before a critical state of immunity has occurs, in contrast to the contralateral TG that is infected after this event. Further characterization of the mechanism restricting virus activity unilaterally will help to elucidate effective strategies for eliminating virus reactivation from the TG. These results are promising for understanding how the kinetics of HSV-1 infection influence the unilateral nature of virus activity and disease, and for future studies aiming to develop preventive or therapeutic strategies. Future directions should include elucidation of local immune phenomena and inflammatory processes that are altered by the delayed orofacial infection kinetics, to discover how non-neurovirulent virus initial infection inhibits HSV-1 reactivation from the TG; these are the subjects of our ongoing studies.

MATERIALS AND METHODS

Virus strains and cells

The wild type SC16 strain of HSV-1 **(43)** was used as background for the following genetically modified viruses;

Reporter viruses SC16-BE8 **(44)** and SC16-C12 **(45)**, termed gJ-LacZ and gJ-GFP in this manuscript, respectively contain an IE1CMV (immediate early promoter 1 of

464 cytomegalovirus) promoter-driven *LacZ* or *eGFP* gene inserted in the U_S5 locus
465 (encoding the gJ protein). β-galactosidase activity or eGFP fluorescence were used as
466 virus-specific markers of active viral replication.

467 The recombinant LβA strain contains an encephalomyocarditis virus internal
468 ribosomal entry site (IRES) inserted just before the *LacZ* gene of *Escherichia coli*
469 (insertion into a 168-bp HpaI deletion, nucleotides 120301 to 120469) within the major
470 LAT locus **(23)**. β-galactosidase activity was used as a strain-specific marker for active
471 viral replication, and to assess LAT promoter activity.

472 The recombinant HSV-1 SC16 mutant TKDM21, termed TK_{del} in this manuscript,
473 harbors an 816-bp deletion within the Thymidine Kinase (TK) coding region **(26)**.
474 Viruses were propagated and titrated using the VERO cell line (ATCC) as previously
475 described **(19)**.

476 The expression of *eGFP* and *LacZ* cassettes from these strains faithfully reflect
477 the transcription or expression of viral genes driven by the same promoters **(20, 46)**.
478 These strain-specific reporter genes were targeted for detection of specific viral
479 genomes by qPCR, and strain-specific reporter gene expression were quantified as
480 surrogate markers for strain-specific viral activity.

481

482 **Inoculation procedures**

483 Six-week-old inbred female BALB/c mice (Janvier Breeding, Le Genest-Saint-Isle,
484 France), receiving unrestricted access to food and water, were used for the experiments.
485 Procedures were performed under general anaesthesia induced by intraperitoneal
486 injection of 0.1ml of a solution containing ketamine (25mg/ml) and xylazine (20mg/ml).
487 Analgesic was added to drinking water during the first 10 DPSI. Using a custom-made

488 glass microneedle and Harvard microinjector, viral suspensions in saline solution of 1 ×
489 10^6 plaque-forming-units (PFU) of virus in 1 µl volumes were injected below the
490 epithelium of the right upper lip for initial infections. One microliter of saline was
491 administered for mock inoculation. Superinfecting virus of identical virus load and
492 volume was inoculated at defined later time points below the epithelium of the left upper
493 lip, as previously described **(19)**. Mice were observed daily for clinical signs of ocular
494 infection from 0 to 28 days post-superinfection (DPSI), as previously described **(20)**.
495 Mice were randomly sacrificed at either 6 DPSI for acute infection, or 28 DPSI for latent
496 infection and reactivation studies. The experimental procedures involving animals were
497 performed under general anesthesia. All procedures involving experimental animals
498 conformed to ethical standards of the Association for Research in Vision and
499 Ophthalmology (ARVO) Statement for the use of animals in research and were
500 approved by the local ethics committee (CEEA 59).
501
502 **Quantification of HSV-1-infected cells and viral genome copy number in TGs**
503 After sacrifice, TG were removed and processed according to the procedures for X-Gal
504 assays on histological cryosections, or for qPCR on DNA extracts from whole tissues,
505 as previously described **(22)**. Primers used for quantification of reporter regions of HSV-
506 1 strain genomic DNA gJ-LacZ and gJ-GFP are listed in **Table 1**, or as defined for gG in
507 Cavallero *et al* **(22)**. qPCR conditions for viral DNA amplification involved: activation for
508 15 min at 95°C, amplification for 15 s at 94°C and 1 min at 58°C (repeated 40 times),
509 hold 5 min at 25°C; for GAPDH PCR: activation for 15 min at 95°C, amplification for 15
510 s at 94°C, 1 min at 58°C and 130 s at 72°C (repeated 30 times), melting curve for 1 min

511 from 50°C to 90°C. Viral genome copy number was determined, relative to murine
512 GAPDH.
513
514 ***Ex vivo* explant reactivation assay**
515 In the OO model, a state of HSV-1 latency is achieved at 28 DPI **(20)**. Latency is
516 disrupted by culture of TG *ex vivo*, which results in the release of infectious virus into
517 the culture supernatant, corresponding to *ex vivo* reactivation **(47)**. Mice were sacrificed
518 28 DPSI, and both TG were removed then cultured in culture medium (CM): Dulbeco's
519 modified eagle medium (DMEM) supplemented with 8% fetal calf serum and 1%
520 streptomycin + penicillin. An aliquot of medium (200 µl) was sampled from each culture
521 well every 2 days for up to 14 days, and an equivalent 200 µl of medium was added to
522 the TG culture to compensate for the loss. TG culture medium from days 0, 4, 6, 8, 10
523 and 14 were plated on VERO cell monolayers to perform plaque-assays using serial
524 dilutions (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}). Reactivation was recorded for a single TG if plaques were
525 observed for any of the time points measured. Generally, between 2 to 10,000 plaques
526 were enumerated, and the peak yield of infectious virus usually occurred at day 8 of
527 culture.
528
529 **Plaque assay for the identification and quantification of virus**
530 To identify the virus that reactivated following PI with gJ-GFP, and superinfection with
531 gJ-LacZ or LßA, all GFP^{+ve} and GFP^{-ve} plaques were enumerated by fluorescent
532 microscopy. β-galactosidase^{+ve} GFP^{-ve} plaques were identified by staining cell
533 monolayers with neutral red (0.02%) after fixation with paraformaldehyde 4% for 15 min
534 at room temperature, and counterstaining with X-Gal reactant (0.33 mg/ml X-Gal (5-

bromo-4chloro-3-indolyl--D-galactopyranoside), 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 0.01% sodium deoxycholate, and 0.1% Triton X-100) for 1h at 37°C. Plaques that expressed β-galactosidase stained blue, whereas the GFP-expressing virus, TK_{del}- and SC16- wild-type-associated plaques remained transparent. When TK_{del}, SC16, or a mock inoculation was performed initially, the identification of SC16 or LβA strain reactivation plaques was performed after staining the cell monolayer with crystal violet.

Infectious HSV-1 particle titration of homogenized TG

As described previously **(34)**, the TG harvested from sacrificed mice were homogenized in microtubes containing 250µL of DMEM medium. Three cycles of freezing/thawing were performed with liquid nitrogen, and the samples were centrifuged and supernatants stored at -80°C until use. Serial dilutions were used to titrate the virus on VERO cells using plaque-assays (as described above).

Statistical analyses

The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to analyze histological data and viral DNA loads (qPCR). Means and 95% confidence intervals (CI) were calculated with STATA 13.1 (StataCorp, USA). End-point Chi^2 2-tailed test was performed for survival curves.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are warmly thankful to Vincent Marechal and Flore Rozenberg for constructive discussions about results, and to Rich Bains for careful proofreading of the manuscript.

This study was supported by research grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR) (grant # ANR-18-CE15-0014-01 (EPIPRO project)), the Ministere de l'Education Nationale de la Recherche et de Technologie (MENRT), the *Société Française d'Ophtalmologie* (SFO), the *Fondation pour les Aveugles de Guerre* (FAG), the *Fondation de France* (FAF).

REFERENCES

1. Roizman B, Knipe DM. 2001. Herpes simplex viruses and their replication, p 2399-2459. *In* Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), Fields Virology, vol 4. Raven Publishers, Philadelphia.
2. Liesegang TJ. 1989. Epidemiology of ocular herpes simplex. Natural history in Rochester, Minn, 1950 through 1982. ArchOphthalmol 107:1160-1165.
3. Farooq AV, Shukla D. 2012. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. Surv Ophthalmol 57:448-62.
4. Smith GA, Gross SP, Enquist LW. 2001. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. ProcNatlAcadSciUSA 98:3466-3470.
5. Richter ER, Dias JK, Gilbert JE, Atherton SS. 2009. Distribution of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus in ganglia of the human head and neck. JInfectDis 200:1901-1906.
6. Kaye S, Choudhary A. 2006. Herpes simplex keratitis. ProgRetinEye Res 25:355-380.
7. Lewis ME, Leung WC, Jeffrey VM, Warren KG. 1984. Detection of multiple strains of latent herpes simplex virus type 1 within individual human hosts. J Virol 52:300-5.
8. Liesegang TJ, Melton LJd, Daly PJ, Ilstrup DM. 1989. Epidemiology of ocular herpes simplex. Incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. ArchOphthalmol 107:1155-1159.
9. Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, Crochard A, Daniloski M, Bouee S, El Hasnaou iA, Colin J. 2005. Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. Ophthalmology 112:888-895.
10. Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. 2010. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976-2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. ArchOphthalmol 128:1178-1183.
11. Liesegang TJ. 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. Cornea 20:1-13.
12. Motani H, Sakurada K, Ikegaya H, Akutsu T, Hayakawa M, Sato Y, Yajima D, Sato K, Kobayashi K, Iwase H. 2006. Detection of herpes simplex virus type 1 DNA in bilateral human trigeminal ganglia and optic nerves by polymerase chain reaction. JMedVirol 78:1584-1587.
13. Cohrs RJ, Randall J, Smith J, Gilden DH, Dabrowski C, van Der KH, Tal-Singer R. 2000. Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. JVirol 74:11464-11471.

14. Criddle A, Thornburg T, Kochetkova I, DePartee M, Taylor MP. 2016. gD-Independent Superinfection Exclusion of Alphaherpesviruses. J Virol 90:4049-58.
15. Meignier B, Norrild B, Roizman B. 1983. Colonization of murine ganglia by a superinfecting strain of herpes simplex virus. Infect Immun 41:702-8.
16. Centifanto-Fitzgerald YM, Varnell ED, Kaufman HE. 1982. Initial herpes simplex virus type 1 infection prevents ganglionic superinfection by other strains. Infect Immun 35:1125-32.
17. Price RW, Walz MA, Wohlenberg C, Notkins AL. 1975. Latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: efficacy of immunization. Science 188:938-40.
18. Mador N, Panet A, Steiner I. 2002. The latency-associated gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) interferes with superinfection by HSV-1. JNeurovirol 8 Suppl 2:97-102.
19. Labetoulle M, Kucera P, Ugolini G, Lafay F, Frau E, Offret H, Flamand A. 2000. Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye. InvestOphthalmolVisSci 41:2600-2606.
20. Labetoulle M, Maillet S, Efstathiou S, Dezelee S, Frau E, Lafay F. 2003. HSV1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. InvestOphthalmolVisSci 44:217-225.
21. Maillet S, Crepin S, Naas T, Roque-Afonso AM, Lafay F, Efstathiou S, Labetoulle M. 2006. Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express the latency associated and ICP0 transcripts. JVirol 80:9310-9321.
22. Cavallero S, Huot N, Francelle L, Lomonte P, Naas T, Labetoulle M. 2014. Biological features of Herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. Invest Ophthalmol Vis Sci 55:7761.
23. 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. JVirol 71:3197-3207.
24. 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 86:4736-40.
25. Wilcox CL, Crnic LS, Pizer LI. 1992. Replication, latent infection, and reactivation in neuronal culture with a herpes simplex virus thymidine kinase-negative mutant. Virology 187:348-52.
26. Efstathiou S, Kemp S, Darby G, Minson AC. 1989. The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. J Gen Virol 70 (Pt 4):869-79.
27. 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. JVirol 74:965-974.
28. Chen SH, Pearson A, Coen DM, Chen SH. 2004. Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. J Virol 78:520-3.
29. Gurung HR, Carr MM, Carr DJ. 2017. Cornea lymphatics drive the CD8(+) T-cell response to herpes simplex virus-1. Immunol Cell Biol 95:87-98.
30. Vahed H, Agrawal A, Srivastava R, Prakash S, Coulon PA, Roy S, BenMohamed L. 2018. Unique Type I Interferon, Expansion/Survival Cytokines and JAK/STAT Gene Signatures of Multi-Functional HSV-Specific Effector Memory CD8(+) TEM Cells Are Associated with Asymptomatic Ocular Herpes in Humans. J Virol doi:10.1128/jvi.01882-18.
31. Greyer M, Whitney PG, Stock AT, Davey GM, Tebartz C, Bachem A, Mintern JD, Strugnell RA, Turner SJ, Gebhardt T, O'Keeffe M, Heath WR, Bedoui S. 2016. T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8(+) DCs for Optimal CD8(+) T Cell Priming. Cell Rep 14:586-597.
32. Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. 2002. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. JImmunol 168:834-838.
33. Song R, Koyuncu OO, Greco TM, Diner BA, Cristea IM, Enquist LW. 2016. Two Modes of the Axonal Interferon Response Limit Alphaherpesvirus Neuroinvasion. MBio 7:e02145-15.

34. Maroui MA, Calle A, Cohen C, Streichenberger N, Texier P, Takissian J, Rousseau A, Poccardi N, Welsch J, Corpet A, Schaeffer L, Labetoulle M, Lomonte P. 2016. Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment. PLoS Pathog 12:e1005834.
35. Cabrera JR, Charron AJ, Leib DA. 2018. Neuronal Subtype Determines Herpes Simplex Virus 1 Latency-Associated-Transcript Promoter Activity during Latency. J Virol 92.
36. 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 85:6669-77.
37. Sato A, Suwanto A, Okabe M, Sato S, Nochi T, Imai T, Koyanagi N, Kunisawa J, Kawaguchi Y, Kiyono H. 2014. Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. J Virol 88:13699-708.
38. Mitchell BM, Stevens JG. 1996. Neuroinvasive properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein variants are controlled by the immune response. JImmunol 156:246-255.
39. Schrimpf JE, Tu EM, Wang H, Wong YM, Morrison LA. 2011. B7 costimulation molecules encoded by replication-defective, vhs-deficient HSV-1 improve vaccine-induced protection against corneal disease. PLoS One 6:e22772.
40. Davido DJ, Tu EM, Wang H, Korom M, Gazquez Casals A, Reddy PJ, Mostafa HH, Combs B, Haenchen SD, Morrison LA. 2018. Attenuated Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Expressing a Mutant Form of ICP6 Stimulates a Strong Immune Response That Protects Mice against HSV-1-Induced Corneal Disease. J Virol 92.
41. Khan AA, Srivastava R, Chentoufi AA, Kritzer E, Chilukuri S, Garg S, Yu DC, Vahed H, Huang L, Syed SA, Furness JN, Tran TT, Anthony NB, McLaren CE, Sidney J, Sette A, Noelle RJ, BenMohamed L. 2017. Bolstering the Number and Function of HSV-1-Specific CD8(+) Effector Memory T Cells and Tissue-Resident Memory T Cells in Latently Infected Trigeminal Ganglia Reduces Recurrent Ocular Herpes Infection and Disease. J Immunol 199:186-203.
42. Royer DJ, Carr MM, Gurung HR, Halford WP, Carr DJJ. 2017. The Neonatal Fc Receptor and Complement Fixation Facilitate Prophylactic Vaccine-Mediated Humoral Protection against Viral Infection in the Ocular Mucosa. J Immunol 199:1898-1911.
43. Hill TJ, Field HJ, Blyth WA. 1975. Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. JGenVirol 28:341-353.
44. Proenca JT, Coleman HM, Connor V, Winton DJ, Efstathiou S. 2008. A historical analysis of herpes simplex virus promoter activation in vivo reveals distinct populations of latently infected neurones. J Gen Virol 89:2965-74.
45. Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM, Efstathiou S. 2001. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. JVirol 75:3885-3895.
46. De Regge N, Van ON, Nauwynck HJ, Efstathiou S, Favoreel HW. 2010. Interferon alpha induces establishment of alphaherpesvirus latency in sensory neurons in vitro. PLoSOne 5.
47. Sawtell NM, Thompson RL. 2004. Comparison of herpes simplex virus reactivation in ganglia in vivo and in explants demonstrates quantitative and qualitative differences. JVirol 78:7784-7794.

689 **FIGURE LEGENDS AND TABLES**

690 **Figure 1: HSV-1 SC16 reactivation and viral DNA from TG harvested during**
691 **latency period.** BALB/c mice were inoculated in the left upper lip with wild-type HSV-1
692 SC16 strain. At 28 DPI (i.e. a time known to correspond with latent phase of TG
693 infection in the OO model), mice were sacrificed. (**A**) TG from mice (*n = 12*) were
694 harvested and incubated individually in culture medium (CM) for 14 days. Aliquots of
695 medium were removed every two days, and compensated with fresh CM. Infectious
696 particle release (reactivation) from aliquots was measured by plaque assay. Bars
697 represent the percentage of TG cultures from individual mice in which plaques
698 developed at any given time (*** = p < 0.01 (Kruskal-Wallis test)*). (**B**) DNA was extracted
699 and qPCR performed targeting the gG coding sequence or mouse GAPDH gene,
700 according to Cavallero *et al* **(22)**. Results were determined as the average number of
701 gG genome copies relative to GAPDH DNA, and bars represent the 95% confidence
702 interval.

703

704 **Figure 2: Quantification of HSV-1 superinfecting replication in the TG after initial**
705 **infection and delayed superinfection.** In each group, BALB/c mice (*n = 3*) were
706 inoculated initially in the right upper lip with gJ-GFP (1 µl of PBS was delivered for mock
707 infection), and superinfected in the left upper lip with gJ-LacZ. Superinfection was
708 performed at different time intervals per group after the primary infection on days 0 to 6,
709 or received only gJ-LacZ in the left lip for group "**C**". All mice were sacrificed during
710 acute phase of infection at 6 DPSI with gJ-LacZ. TG frontal cryosections (10 µm) were
711 prepared and stained with X-Gal reactant, and counterstained with neutral red.
712 β-galactosidase^{+ve} neurons were enumerated. *Note: bar indicates groups

corresponding to the period of time where β-galactosidase^{+ve} neurons were not detected (when superinfection occurred between 4 to 6 days post initial infection), data points indicate average number of cells ± SEM.

Figure 3: Transcriptional activity of superinfecting gJ-LacZ in TG of mice inoculated 4 days prior with gJ-GFP. Mice initially infected in the right upper lip with gJ-GFP (or PBS for mock infection). Four days later mice were superinfected with gJ-LacZ in the left upper lip and sacrificed 6 DPSI with gJ-LacZ. (**A**) TG frontal cryosections (10 μm) were prepared and stained with X-Gal reactant, and counterstained with neutral red. β-galactosidase^{+ve} neurons were enumerated. Symbols represent the number of β-galactosidase^{+ve} neurons from individual TG, and floating bar represents the average. (**** = p < 0.001 (Kruskal-Wallis test)*). (**B**) DNA was extracted from whole TG samples (*n = 6 per group*) and used as template DNA for qPCR with primers targeting the *LacZ* gene, or mouse GAPDH gene. The number of gJ-LacZ genome copies per TG was determined relative to GAPDH. Bars indicate the average number of gJ-LacZ genome copies relative to GAPDH DNA, and bars represent the 95% confidence interval.

Figure 4: Mortality, ocular disease, and latency phase activity of LßA superinfection is extinguished in mice receiving an inoculation of gJ-GFP 4 days prior. BALB/c mice infected in the right upper lip with gJ-GFP (or PBS for mock infection). At 4 DPI, mice were superinfected in the left upper lip with LßA. Ocular disease (corneal clouding, corneal neovascularization, iris atrophy with pupil mydriasis) (**A**), and deaths (**B**) were recorded. At 28 DPSI with LßA, mice were sacrificed. End-

point Chi^2 2-tailed test was performed for groups in A and B * = $p < 0.001$. (**C**) TG frontal cryosections (10µm) were prepared and stained with X-Gal reactant, and counterstained with neutral red and β-galactosidase^{+ve} neurons were enumerated). Symbols represent the number of β-galactosidase^{+ve} neurons from individual TG, and floating bar represents the average (*** = p < 0.01 (Kruskal-Wallis test)*) (**D**) DNA was extracted from whole TG samples (*n = 6 per group*) and used as template DNA for qPCR with primers targeting the *LacZ* gene, or GAPDH gene. The number of gJ-LacZ genome copies per TG was determined relative to GAPDH. Bars indicate the average number of gJ-LacZ genome copies relative to GAPDH DNA, and bars represent the 95% confidence interval.

Figure 5: Mortality, ocular disease, weight loss and acute phase activity of LßA superinfection is extinguished in mice when initially infected with TK_{del} 4 days prior. Mice initially infected in the right lip with TK_{del} (or PBS for mock infection) and again 4 DPI in the left lip with LßA were monitored for 15 days. (**A**) Ocular disease signs: corneal clouding, corneal neovascularization, iris atrophy with pupil mydriasis, and deaths (**B**) were recorded. End-point Chi^2 2-tailed test was performed for groups in A and B * = $p < 0.05$. Weights of individual mice were recorded from before the first infection and daily for the duration of the experiment. Data in (**C**) represents the mean of the lowest measure for each animal during acute phase. At 6 DPSI with LßA mice were sacrificed. (**D**) TG frontal cryosections (10µm) were prepared and stained with X-Gal reactant, counterstained with neutral red and β-galactosidase^{+ve} neurons were enumerated. Symbols represent the number of β-galactosidase^{+ve} neurons from

individual TG, and floating bar represents the average. (Statistics: *Kruskal-Wallis test ** = $p < 0.01$*).

Figure 6: **Reduced LAT promoter activity of LßA superinfection, with maintained viral DNA load, in mice initially infected with TK_{del} 4 or 28 days prior.** Mice initially infected in the right lip with TK_{del} (or PBS for mock infection) and superinfected at 4 DPI or 28 DPI in the left lip with LßA. Mice were sacrificed 28 DPSI. TG frontal cryosections (10µm) from mice, superinfected at 4 DPI (**A**) or at 28 DPSI (**C**), were prepared and stained with X-Gal reactant, and counterstained with neutral red, and β-galactosidase^{+ve} neurons were enumerated. Symbols represent the number of β-galactosidase^{+ve} neurons from individual TG, and floating bar represents the average. (*** = $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis test)*). DNA was extracted from whole TG samples (*n = 5 per group*) harvested from mice that were superinfected, at 4 DPI (**B**) or 28 DPSI (**D**), and used as template DNA for qPCR with primers targeting the *LacZ* gene, or murine GAPDH gene. The number of LβA genome copies per TG was determined relative to GAPDH. Bars indicate the average number of LβA genome copies relative to GAPDH DNA, and bars represent the 95% confidence interval.

Figure 7: **Rates of HSV-1 reactivation from explanted TGs from mice initially infected with TK_{del} and superinfected with HSV-1 SC16 wild type, or LßA reporter virus, 4 days later.** Groups of BALB/c mice were initially infected in the upper right lip with TK_{del} (or PBS for mock), or in the right footpad (TK_{del} FOOTPAD). At 4 DPI, mice were superinfected in the left lip with the LßA reporter virus (*n = 10 mice*) or the wild type SC16 parent strain (*TK_{del} lip initial n = 14 mice, TK_{del} footpad initial n = 13*). All mice

were sacrificed at 28 DPSI, corresponding to latent phase of TG infection in the OO model. TG were harvested and incubated individually in CM during 14 days. Aliquots of medium were removed every two days, and compensated with fresh CM. Infectious particles released (reactivation) from aliquots were quantified by plaque assay. Bars represent the percentage of cultured TGs that developed plaques at any given time. (**** = p < 0.001 (Kruskal-Wallis test)*).

Figure 8: Initial infection with TK_{del} attenuates mortality, ocular disease and weight loss associated with virulent wild type superinfection occurring 4 days later. Mice were initially mock infected with PBS or infected with TK_{del} in the right lip (*n = 20 per group*), or in the right footpad with TK_{del} (TK_{del}FOOT) (*n = 12 per group*). At 4 DPI mice were superinfected with SC16 wild type HSV-1 in the left lip, and monitored for 15 days. Deaths (**A**), and ocular disease signs: corneal clouding, corneal neovascularization, iris atrophy with pupil mydriasis (**B**) were recorded. End-point Chi^2 2-tailed test was performed for groups in A and B * = p < 0.001. Weights of individual mice were recorded from before the first infection and daily for the duration of the experiment. Data in (**C**) represents the mean of the lowest measure for each animal during acute phase.

Table 1: **Sequences of primers and TaqMan probes used for quantitative PCR**

Target	Oligo	Sequence 5` to 3`
TK	Forward primer	GAAAGCTGTCCCCAATCCTC
	Reverse primer	GGCTTGACCTGGCTATGTTG
	Taqman probe	FAM-TATTGGCAAGCAGCTCGTAA-TAMRA
LacZ	Forward primer	TACTGTCGTCGTCCCCTCAAA
	Reverse primer	TAACAACCCGTCGGATTCTCC
	Taqman probe	FAM-TATCCCATTACGGTCAATCCGCCG-TAMRA
GFP	Forward primer	CAACAGCCACAACGTCTATATCATG
	Reverse primer	ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG
	Taqman probe	FAM-CAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA-TAMRA
GAPDH	Forward primer	CAAGGTCATCCATGACAACTTTG
	Reverse primer	GGCCATCCACAGTCTTCTGG

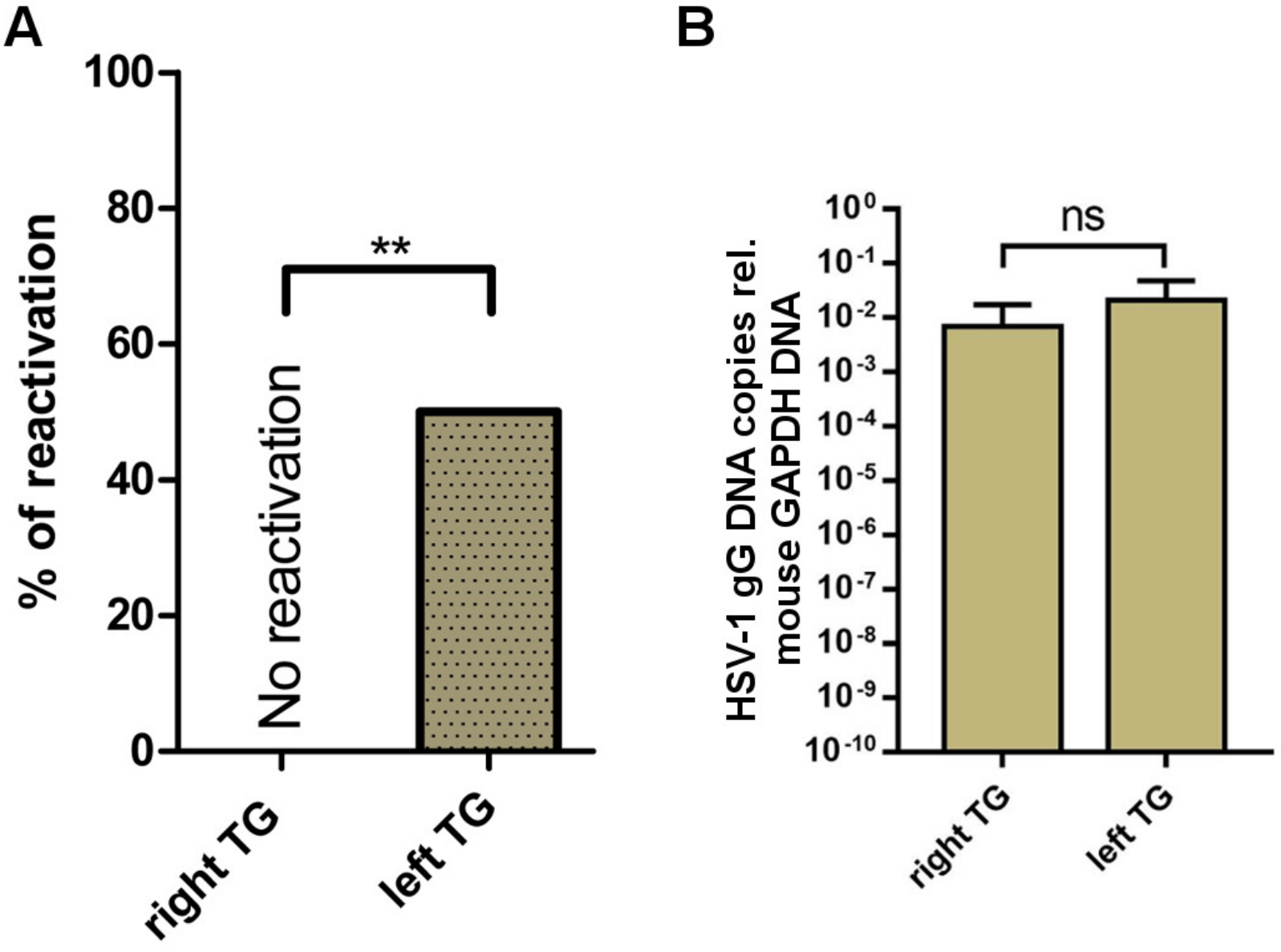
804

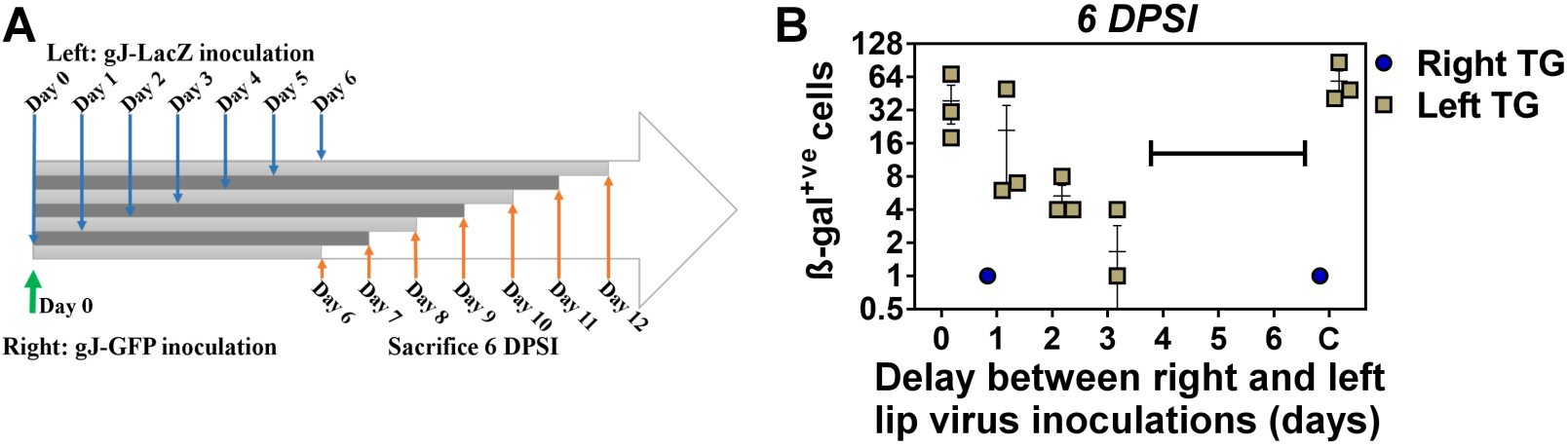
805 **Abbreviations**: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), trigeminal ganglia (TG),
806 Thymidine Kinase (TK), herpetic keratitis (HK), Latency-associated transcripts (LAT),
807 HSV-1 murine oral-ocular model (OO), primary infection (PI), days post infection (DPI),
808 days post superinfection (DPSI), plaque-forming-units (PFU), culture medium (CM),
809 reporter *LacZ* gene of *Escherichia coli* (LacZ), reporter gene encoding the enhanced
810 Green Fluorescent Protein (GFP); murine Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
811 (GAPDH).

812

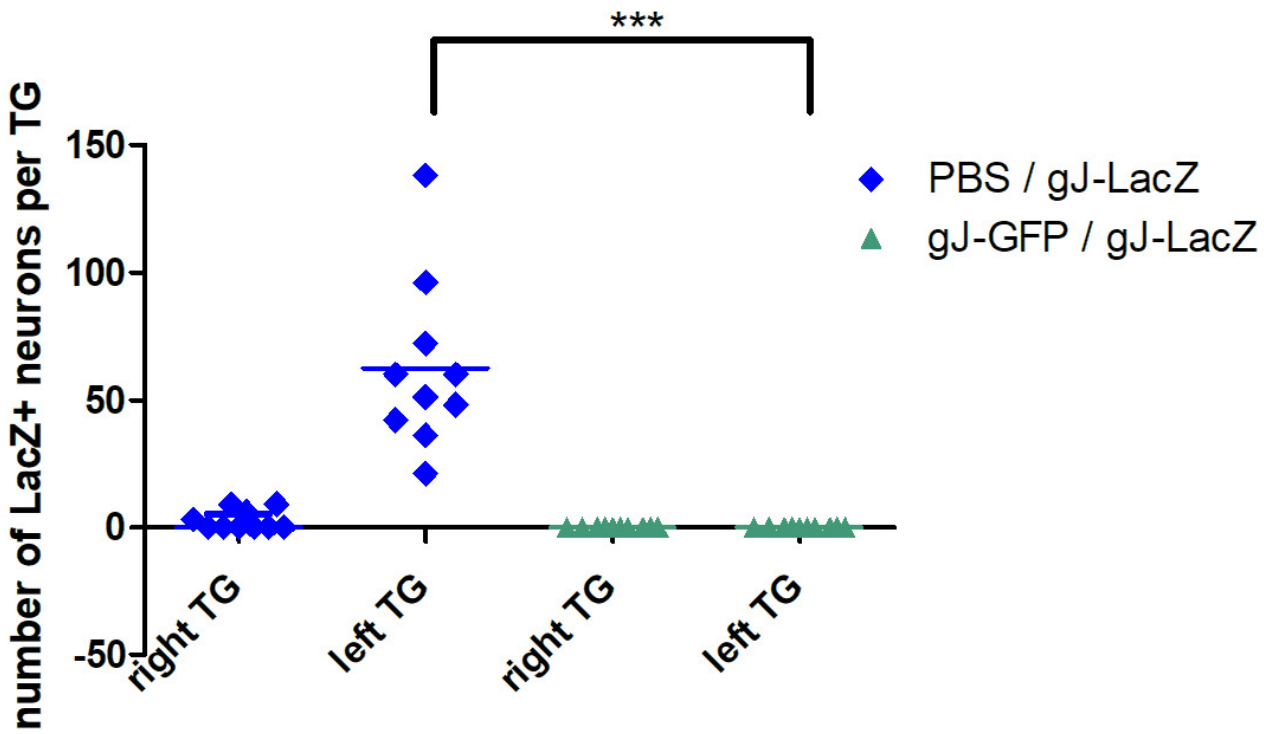
813

Target	Oligo	Sequence 5` to 3`
TK	Forward primer	GAAAGCTGTCCCCAATCCTC
	Reverse primer	GGCTTGACCTGGCTATGTTG
	Taqman probe	FAM-TATTGGCAAGCAGCTCGTAA-TAMRA
LacZ	Forward primer	TACTGTCGTCGTCCCCTCAAA
	Reverse primer	TAACAACCCGTCGGATTCTCC
	Taqman probe	FAM-TATCCCATTACGGTCAATCCGCCG-TAMRA
GFP	Forward primer	CAACAGCCACAACGTCTATATCATG
	Reverse primer	ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG
	Taqman probe	FAM-CAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA-TAMRA
GAPDH	Forward primer	CAAGGTCATCCATGACAACTTTG
	Reverse primer	GGCCATCCACAGTCTTCTGG

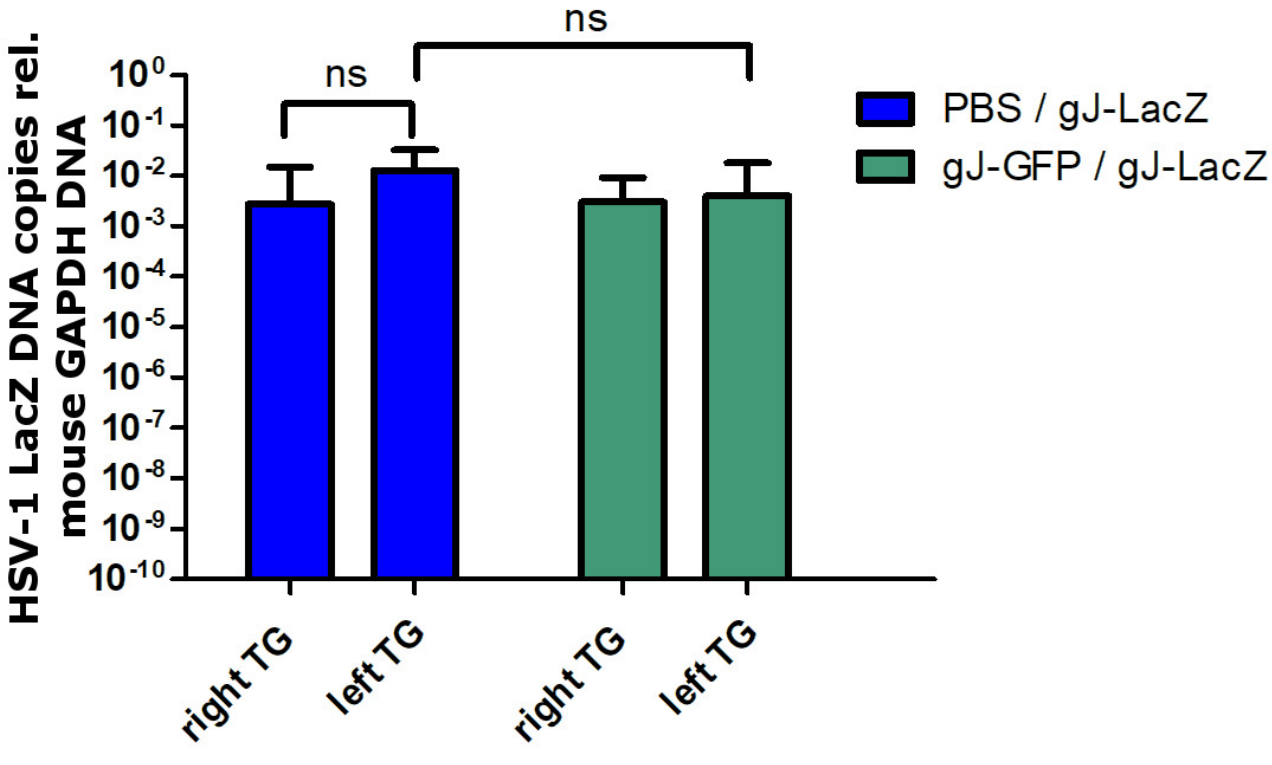

A
100
80
60
40
20
0
% of reactivation
**
No reactivation
right TG
left TG
B
HSV-1 gG DNA copies rel.
mouse GAPDH DNA
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
10^-5
10^-6
10^-7
10^-8
10^-9
10^-10
ns
right TG
left TG


A
Left: gJ-LacZ inoculation
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 0
Right: gJ-GFP inoculation
Day 6
Day 7
Day 8
Day 9
Day 10
Day 11
Day 12
Sacrifice 6 DPSI
B
6 DPSI
ß-gal+ve cells
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0
1
2
3
4
5
6
C
Delay between right and left lip virus inoculations (days)
Right TG
Left TG

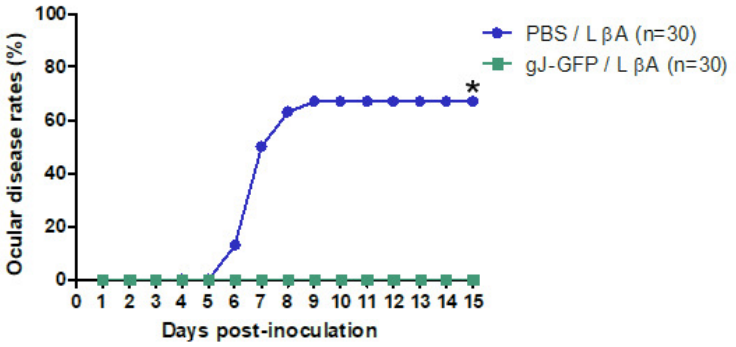
A.


***
number of LacZ+ neurons per TG
150
100
50
0
-50
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / gJ-LacZ
gJ-GFP / gJ-LacZ

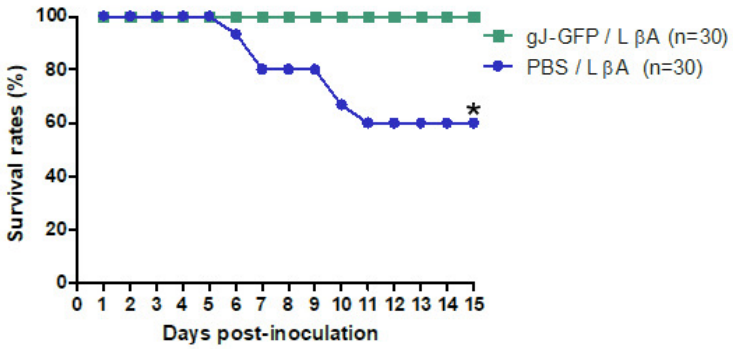
B.


ns
ns
HSV-1 LacZ DNA copies rel. mouse GAPDH DNA
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
10^-5
10^-6
10^-7
10^-8
10^-9
10^-10
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / gJ-LacZ
gJ-GFP / gJ-LacZ

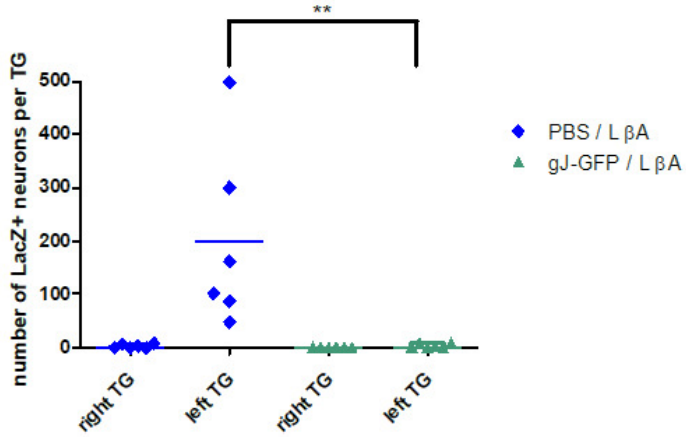
A.


Ocular disease rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
PBS / L βA (n=30)
gJ-GFP / L βA (n=30)
*

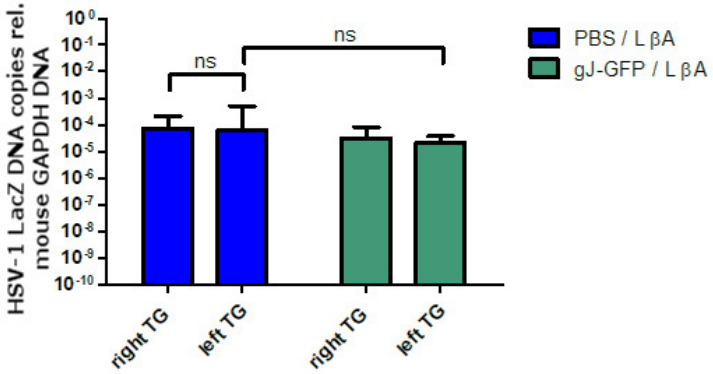
B.


Survival rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
gJ-GFP / L βA (n=30)
PBS / L βA (n=30)
*

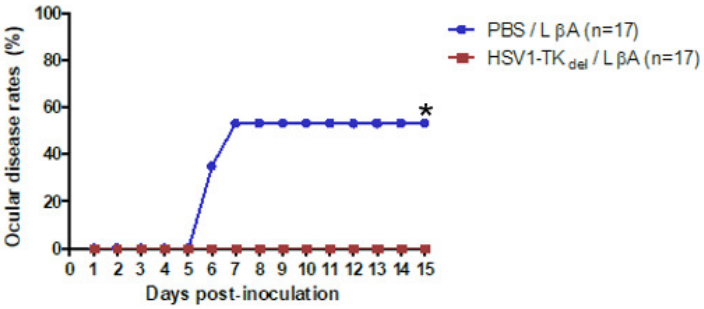
C.


number of LacZ+ neurons per TG
500
400
300
200
100
0
**
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / L βA
gJ-GFP / L βA

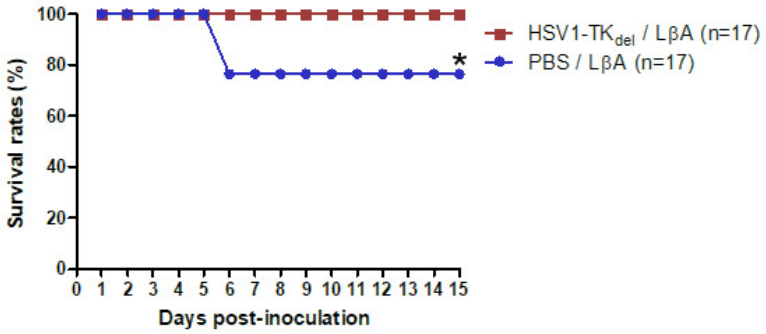
D.


HSV-1 LacZ DNA copies rel. mouse GAPDH DNA
10 0
10 -1
10 -2
10 -3
10 -4
10 -5
10 -6
10 -7
10 -8
10 -9
10 -10
ns
ns
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / L βA
gJ-GFP / L βA

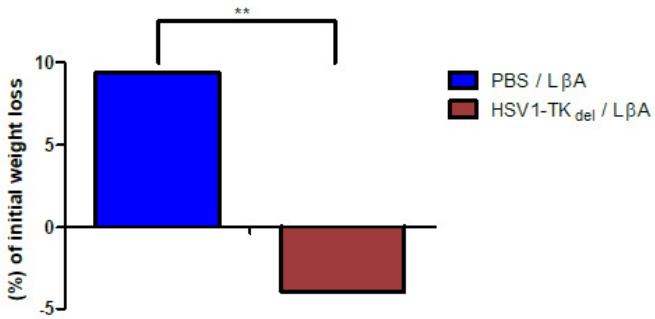
A.


Ocular disease rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
*
PBS / LβA (n=17)
HSV1-TK del / LβA (n=17)

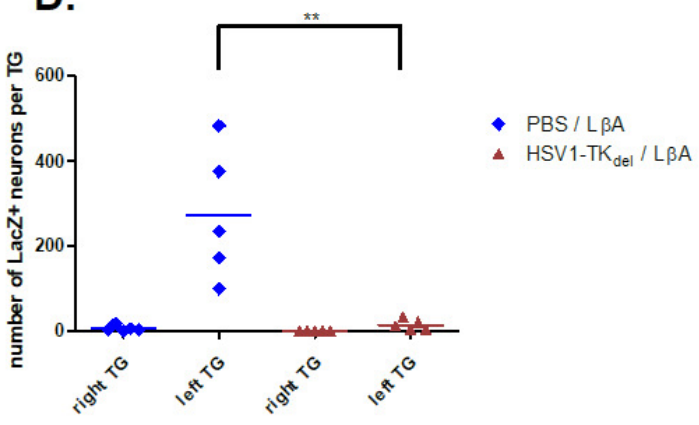
B.

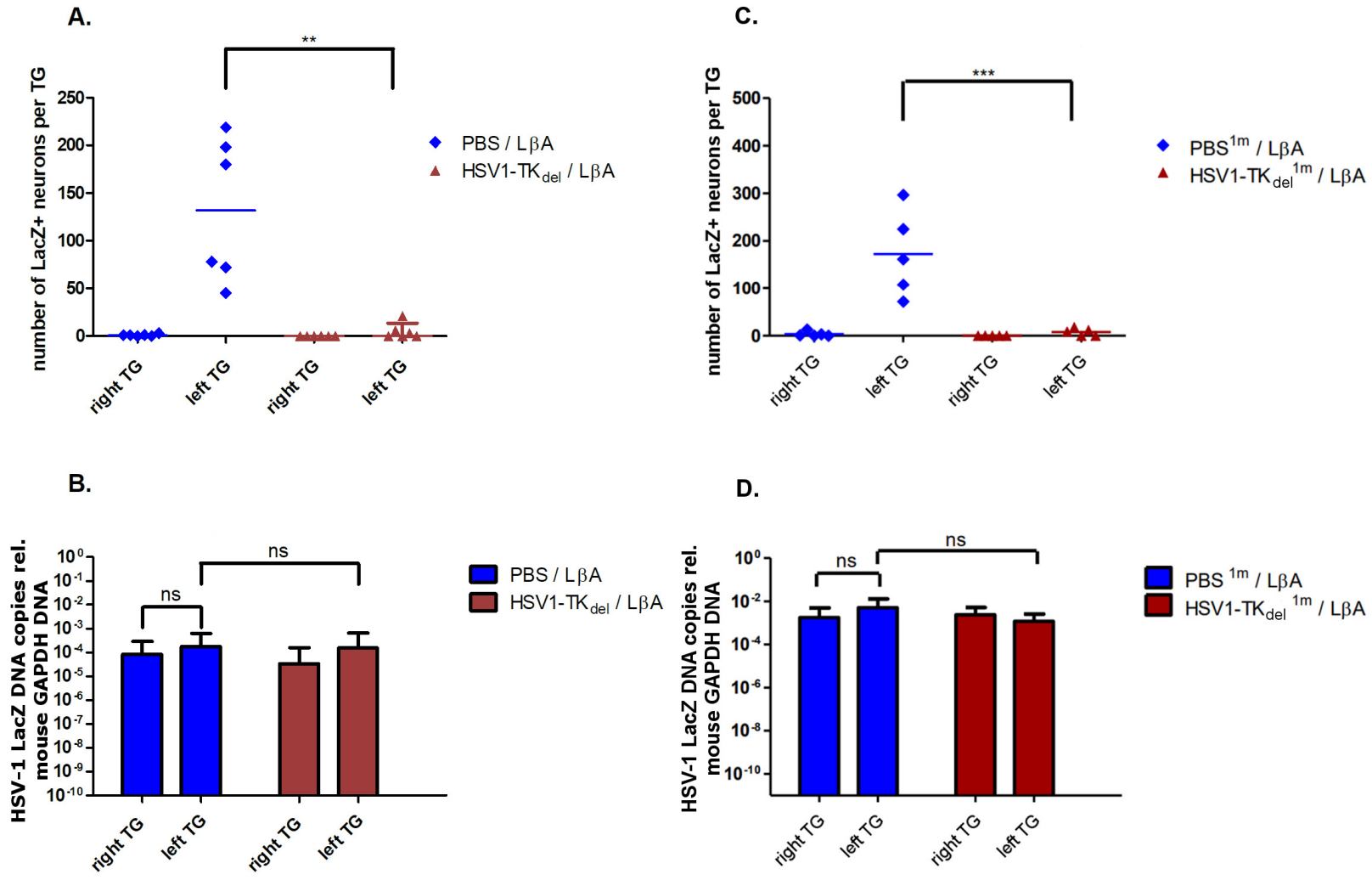

Survival rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
*
HSV1-TK del / LβA (n=17)
PBS / LβA (n=17)

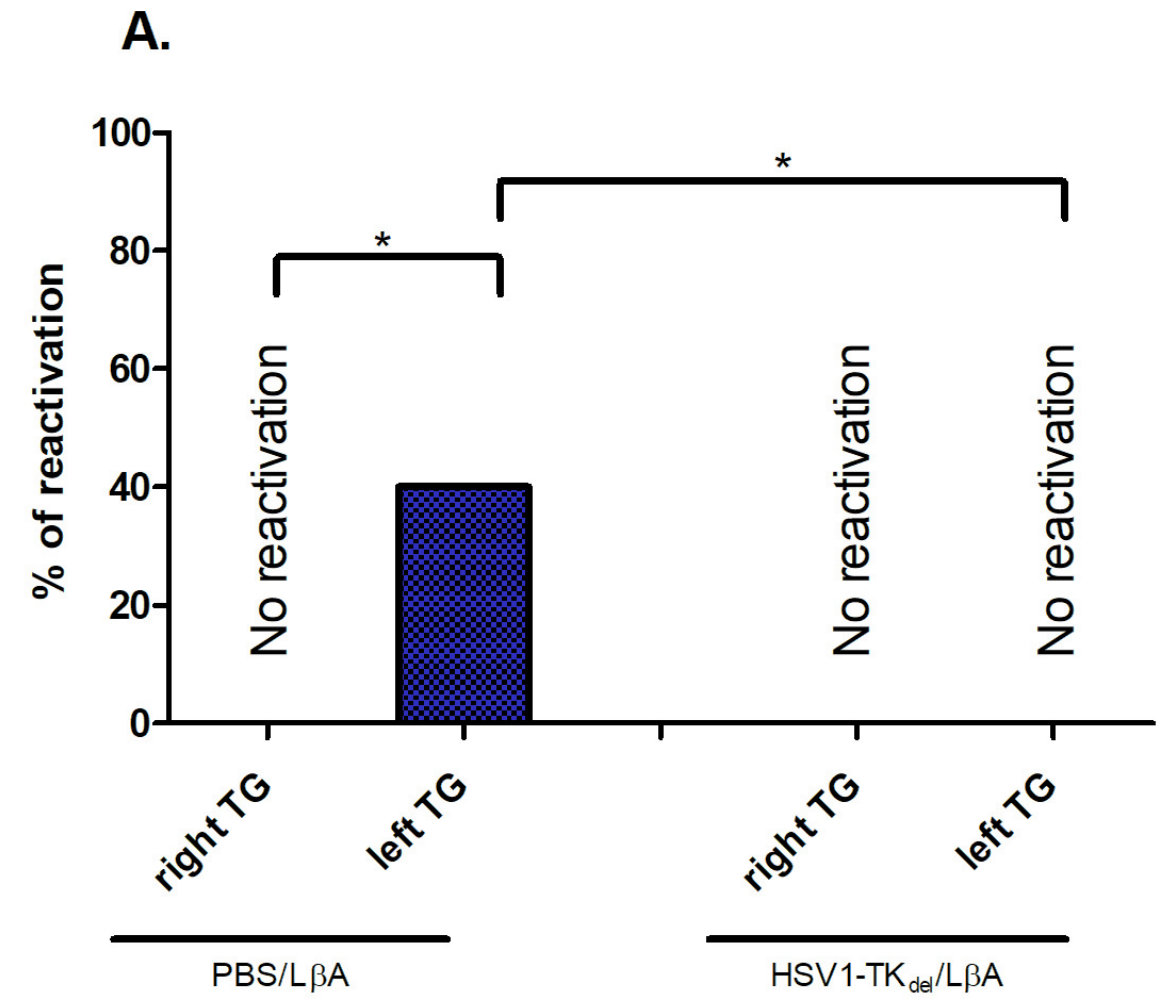
C.

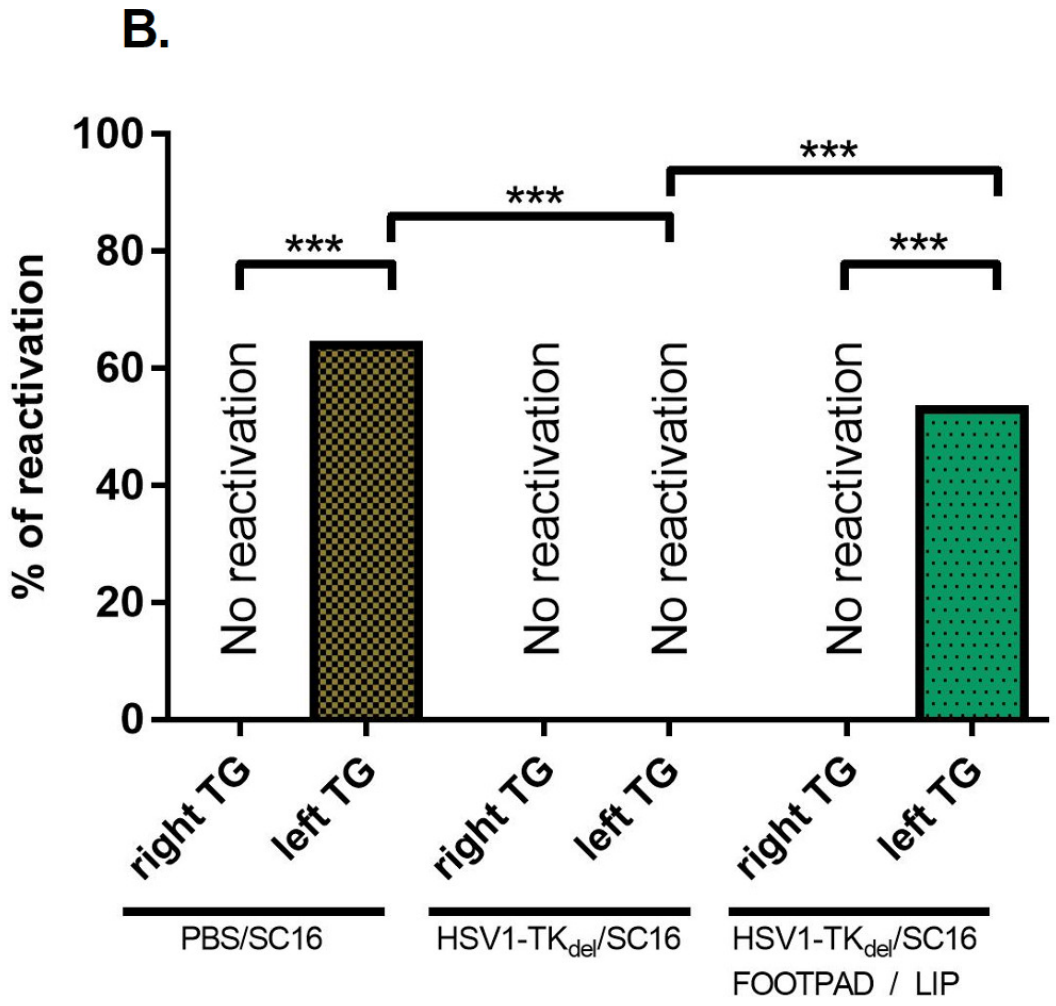

**
(%) of initial weight loss
10
5
0
-5
PBS / LβA
HSV1-TK del / LβA

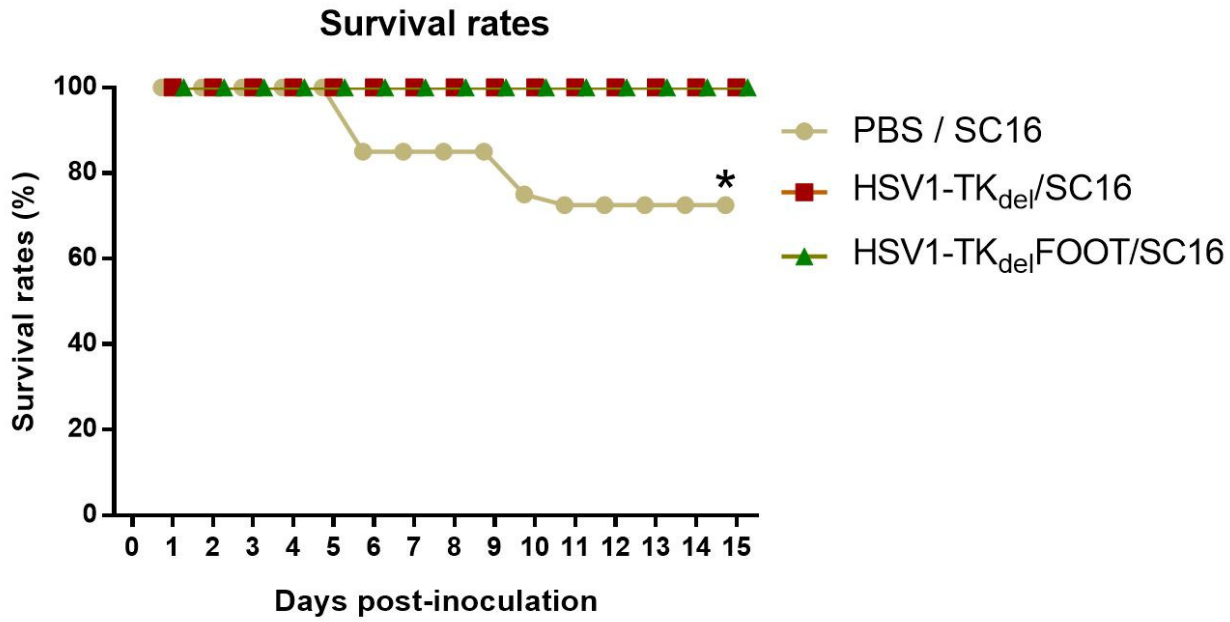
D.

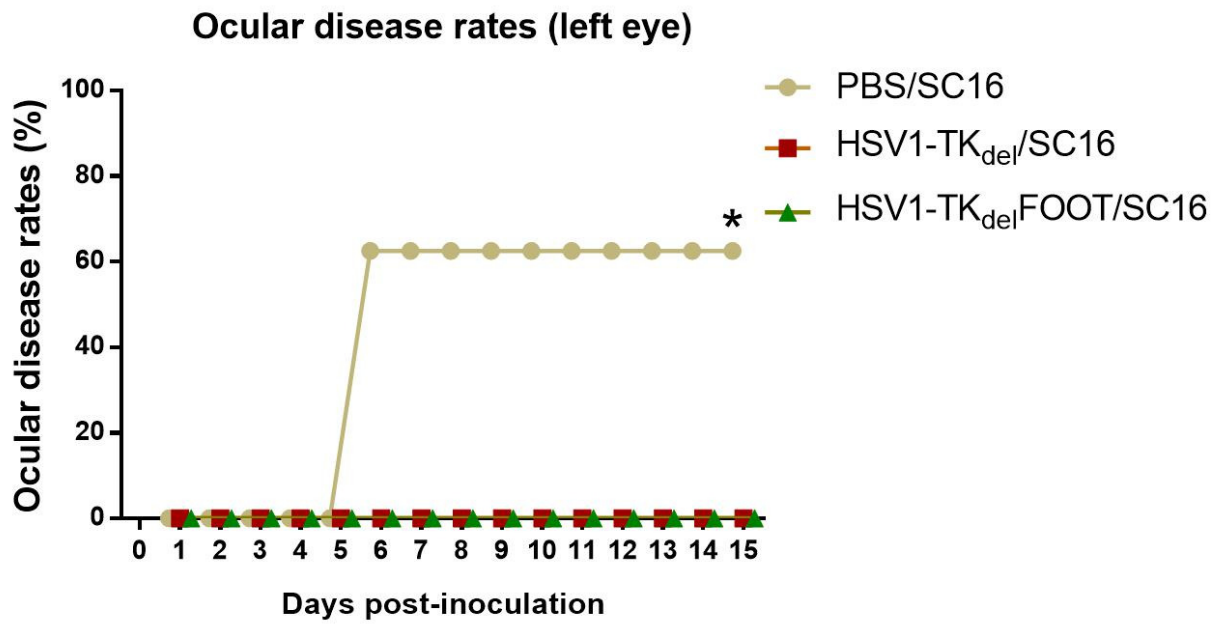

**
number of LacZ+ neurons per TG
600
400
200
0
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / LβA
HSV1-TK del / LβA

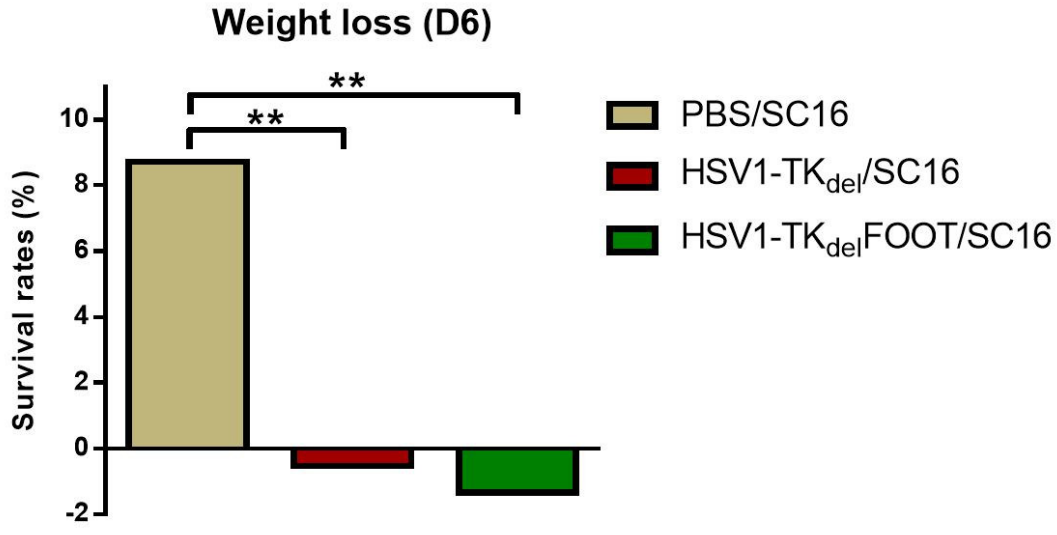

A.
number of LacZ+ neurons per TG
250
200
150
100
50
0
**
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / LβA
HSV1-TKdel / LβA
C.
number of LacZ+ neurons per TG
500
400
300
200
100
0
***
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS1m / LβA
HSV1-TKdel 1m / LβA
B.
HSV-1 LacZ DNA copies rel. mouse GAPDH DNA
ns
ns
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS / LβA
HSV1-TKdel / LβA
D.
HSV-1 LacZ DNA copies rel. mouse GAPDH DNA
ns
ns
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS 1m / LβA
HSV1-TKdel 1m / LβA


A.
100
80
60
40
20
0
% of reactivation
*
*
No reactivation
No reactivation
No reactivation
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS/LβA
HSV1-TKdel/LβA


B.
100
80
60
40
20
0
% of reactivation
***
***
***
***
No reactivation
No reactivation
No reactivation
No reactivation
right TG
left TG
right TG
left TG
right TG
left TG
PBS/SC16
HSV1-TKdel/SC16
HSV1-TKdel/SC16
FOOTPAD / LIP


Survival rates
Survival rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
*
PBS / SC16
HSV1-TKdel/SC16
HSV1-TKdelFOOT/SC16


Ocular disease rates (left eye)
Ocular disease rates (%)
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days post-inoculation
*
PBS/SC16
HSV1-TKdel/SC16
HSV1-TKdelFOOT/SC16


Weight loss (D6)
Survival rates (%)
10
8
6
4
2
0
-2
**
**
PBS/SC16
HSV1-TKdel/SC16
HSV1-TKdelFOOT/SC16

Article 2 : Local immune alterations associated with a non-neurovirulent modified strain of HSV-1-mediated protection in a oro-ocular model of HSV-1 disease.

Local immune alterations associated with a non-neurovirulent modified strain of HSV-1-mediated protection in a oro-ocular model of HSV-1 disease.

ROUSSEAU A[1,2], LEGRAND R[1], PALGEN JL[1], LEMAITRE J[1], DEBACK C[3], LOMONTE P[4], LABETOULLE M[1,2], HAIGH O[2]

1) CEA - Université Paris Sud, INSERM U1184, Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, IDMIT department, IBFJ, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.
2) Université Paris Sud, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, Service d'Ophtalmologie, APHP, DHU Vision & Handicaps, Centre de référence maladies rares en ophtalmologie OPHTARA, Le Kremlin-Bicêtre, France.
3) Université Paris Sud, Hôpital Paul Brousse, Service de Virologie, APHP, Villejuif, France.
4) Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U 1217, LabEx DEVweCAN, Institut NeuroMyoGène (INMG), team Chromatin Assembly, Nuclear Domains, Virus, Lyon, France.

Total word count: 10290

Abstract word count: 299

Corresponding author's address

Marc Labetoulle

Service d'ophtalmologie, Hôpital de Bicêtre

78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre

phone: +33 1 45 21 36 90

fax: +33 1 45 21 22 46

Keywords: HSV-1; latency; reactivation; trigeminal ganglion; neurons; superinfection; keratitis

ABSTRACT

In humans, Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), primary infection occurs in the oral mucocutaneous tissues. Virions replicated here penetrate sensitive neuronal axons, migrate to both trigeminal ganglion (TG) where it established a lifelong latency. Reactivations of HSV-1 in the TG neurons induce clinical recurrences in the connected peripheral tissues. This process is involved in herpes simplex keratitis (HSK), a condition that, strikingly, occurs almost exclusively in the same eye for a given patient. Based on an experimental oro-ocular (OO) model of HSV-1 infection, we previously demonstrated that a virus inoculation on one side of the mouth, leads to viral replication in the lip, followed by HSK. Virus concomitantly disseminates to both TG, but reactivation only occurs in the TG ipsilateral to the inoculation site. We also observed that after a primary inoculation with a non-neurovirulent strain of HSV-1 in one lip, mice are protected against both acute phase disease and reactivation after a superinfection with a fully virulent wild-type strain of HSV-1 in the contralateral lip. However, the immune mechanisms involved in this protective state remains to be elucidated.

Here, we combined high resolution flow cytometry and bead-based immunoassays, we quantified hematopoietic subsets and inflammatory chemokines in the lips (site of inoculation) and the TG (site of HSV-1 latency/reactivation). We demonstrated that after a single inoculation with the wild-type strain, a delayed immune infiltrate, boasting more proinflammatory subsets, occurred in the lip and persisted in the TG. In contrast, the immune infiltrate occurred earlier in the superinfected lip and ipsilateral TG, with less inflammatory chemokines but more adaptive immune subsets. Moreover, cellular infiltrate resolved faster, correlating with nullification of inflammatory chemokines locally. These data show that the immune response kinetics influence the development of natural immunity to HSV-1, and can be harnessed to protect against disease and reactivations.

INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a human neurotropic virus that is characterized by its capacity to alternate between phases of latent infection and reactivations (Kaye and Choudhary, 2006). A 40-year population survey has shown that HSV-1 primary infection almost always occurs in the oral mucocutaneous tissues (Liesegang, 1989), where the first contact of HSV-1 with the host immune system occurs. HSV-1 pathogen associated molecular patterns (PAMP) are detected by pattern recognition receptors (PRR) (Melchjorsen, 2012), trigger inflammatory responses and recruit immune cells (Conrady et al., 2013; Vogel et al., 2014; Dai and Caligiuri, 2018; Handfield et al., 2018). The latter are directed to work in concert to inhibit viral replication by eliminating infected cells, inactivating viral particles, and further shaping the immune response (Eyerich et al., 2018; Handfield et al., 2018). Meanwhile, HSV-1 antigens are transported to lymph nodes by dendritic cell (DC) relay (Lee et al., 2009; Kim et al., 2015), where T cell responses are primed (Whitney et al., 2018). After infection, “armed” effector T cells are actively involved in immunosurveillance, where they can respond to kill infected cells and clear infection (Coles et al., 2002; van Lint et al., 2004).

Concomitantly, viral particles produced in the site of the primary infection can penetrate sensitive neuronal axon termini situated in the oral mucocutaneous tissue, and are transported to the trigeminal ganglia (TG), which is responsible for the sensory innervation of the face (Smith et al., 2001). There, the virus can either replicate in the neurons somata and continue its propagation to the second order neurons (located in the brainstem) and third order neurons (including those of the contralateral TG), or can enter a latent stage of infection, which can persist for the life of the host. Immune control mechanisms, involving complex innate and adaptive mechanisms, are implicated in the maintenance of this latent state (Decman et al., 2005; Catez et al., 2012; van Velzen et al., 2013a; Maroui et al., 2016).

However, HSV-1 latency can be interrupted by one or several episodes of viral reactivation. In this case, viral particles can migrate in the axons of the neuron harboring the reactivation process, and reach the corresponding peripheral tissues where they can replicate more widely, leading to the clinical signs of herpetic recurrences (Kaye and Choudhary, 2006). This latency-reactivation cycle explains herpetic recurrences in the cornea (HSV-1 keratitis,

HSK), a sight-threatening condition that, strikingly, occurs almost exclusively in the same eye for a given patient despite latent HSV-1 DNA loads found in both left and right TG (Cohrs et al., 2000; Motani et al., 2006; Richter et al., 2009). HSK affects 12-30/100 000 patients (Labetoulle et al., 2005; Kaye and Choudhary, 2006), with a risk of visual impairment increasing with the number of HSK episodes (Liesegang, 1989; Young et al., 2010). Even during the quiescent phases of disease, HSK significantly impairs the quality of life of patients (Reynaud et al., 2017) due to persistent visual abnormalities (Kaswin et al., 2013) and/or ocular surface dysregulation (M'Garrech et al., 2013). HSK episodes can be treated by with HSV-1 DNA polymerase inhibitors, which effectively block viral replication during acute episodes (Kaye and Choudhary, 2006). However, prevention of HSK recurrences in the affected patients remains an unmet need with the current available therapeutic options: antiviral drugs can be used as a long-term treatment but they reduced the rate of recurrences by only 50% with regimen approved by health authorities (Wilhelmus et al., 1998), and their chronicle use may trigger the emergence of antiviral-resistant strains (van Velzen et al., 2013b; Rousseau et al., 2017). Therefore, developing new preventive strategies to combat HSV-1 recurrences is necessary. Vaccine strategies exploiting recombinant subunits or live attenuated viruses have been shown to protect against acute phase disease in animal models by eliciting immune responses that control viral replication (Iyer et al., 2013; Royer et al., 2016), but they failed to achieve significant efficacy in clinical trials (Johnston et al., 2016). For these reasons, new therapeutic tools, likely based on a immune control of the virus, remain to be developed, and for that purpose, the choice of the experimental conditions may make the difference.

Most commonly, immunological studies of HSK are performed in corneal scarification models (Knickelbein et al., 2007; Royer et al., 2016; Lee and Ghiasi, 2017), while the eye is considered an immune privileged site (Knickelbein et al., 2007; Taylor and Ng, 2018; Lee et al., 2019), and does not provide the same kinetics of viral spread to the eye as inoculation at the oral mucocutaneous tissue, a professional tissue for eliciting antiviral responses (Levin et al., 2015; Handfield et al., 2018). Thus, it is possible that immune conditions in HSK could differ

substantially from those elicited experimentally by corneal scarification, and this may influence disease outcomes (Cavallero et al., 2014).

We previously described an oro-ocular (OO) murine model of HSV-1 infection which may circumvent most of these pitfalls. After inoculation of HSV-1 at the mucocutaneous tissue of the mouth, virus replication occurs at the site of inoculation for up to 4 days, while at day 4 (D4), viral replication is observed in the TG ipsilateral to lip infection and by D6 in the contralateral TG (Labetoulle et al., 2000a; Labetoulle et al., 2003). Concomitantly, from D6, 60% of mice develop HSK (which spontaneously resolves at D10), but only in the eye ipsilateral to the inoculation site, and all these animals are eventually latently infected in the both TGs (Labetoulle et al., 2003; Maillet et al., 2006). Using the explant method, a very sensitive technique to induce HSV-1 reactivation, we observed that reactivations occur from ~50% of the TGs from TG ipsilateral to lip inoculation, but not in the other (contralateral) TG, a feature that is similar to the clinical observations made in HSK patients.

This unilateral restriction of virus activity and potential reactivation is related to the kinetics of viral spread from the lip to the ipsilateral TG (Labetoulle 2003), and likely the immune reaction elicited by the primary infection. Indeed, when mice are pre-challenged with a non-neurovirulent strain of HSV-1 (TK_{del}) in the right lip 4 days (or more) before virulent wild type superinfection in the left lip, acute ocular disease signs, viral replication in both TG and even reactivations are completely inhibited (Poccardi et al., 2019).

In the present study, we questioned how kinetics of HSV-1 infection in the lip would influence immune responses, to uncover immune features that could be responsible for the protection observed in our model. We used high definition flow cytometric analysis (Yu et al., 2016) and bead-based immunoassays, to define changes in immune infiltrate and inflammatory chemokines that occurred at key sites (lip and TG), after viral inoculation in the lip. We compared tissues from mice that received a single inoculation in the left lip with a virulent wild-type of HSV-1, which induces ocular disease and potential reactivation, versus a superinfection regimen (initial inoculation with TK_{del} in the right lip, followed by superinfection with a the wild-type HSV1 strain in the the left lip, separated by a 4 days interval), which confers the protection described above. We identified changes in kinetics and magnitude of immune

cell infiltrate and chemokines at the lip and TG, which may explain the unilateral-restricting disease by initial lip infection and also bilateral protection that occurred after lip infection with TK_{del}.

METHODS

Virus strains and cells

Viruses used include the wild-type SC16 strain of HSV-1 (Hill et al., 1975), and the HSV-1 SC16 mutant TKDM21 (termed TK_{del}), encoding a deletion of 816-bp within the Thymidine Kinase (TK) coding region (Efstathiou et al., 1989). Using the VERO cell line, viruses were propagated and titrated as previously described (Labetoulle et al., 2000a).

Inoculation procedures

Female BALB/c mice (Janvier Breeding, Le Genest-Saint-Isle, France), housed with unrestricted access to food and water, were used for experiments at 6 weeks of age. Infections were performed below the epithelium of the upper lip of mice as previously described (Labetoulle et al., 2000b), to administer 1 µL volumes of 1 x 10^6 plaque-forming-units (PFU) of virus diluted in PBS. One microliter of PBS was administered for mock inoculations. Initial infections with TK_{del} occurred in the right lip, while all other virus inoculations and mock, were administered in the left lip. Uninfected mice (*n = 4 per group*) were randomly sacrificed at D0, and infected mice (*n = 4, per time point, per group*) on D2, D4, D6, D10 (acute phase) and D28, which corresponds to early stage of latent infection in our model (Cavallero et al., 2014). For superinfected group, D0 corresponded to the day of superinfection. All procedures involving experimental animals conformed to ethical standards of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the use of animals in research and were approved by the local ethics committee (CEEA 59).

Sample collection

Specimens of the upper left and right lip, approximately 2 × 2 × 2 mm and encompassing the site of infection, were harvested just internal to the labial commissures, after which left and right TG were harvested from the same animals.

Detection of immune infiltrate by multiparameter flow cytometry

Cell suspensions were prepared by initially mincing with Vannas scissors (Beaver Visitec International, Eybens, France) and digestion with collagenase type IV (Scima/Worthington Chemicals) and DNase I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (Gelderblom et al., 2009; Legroux et al., 2015). To separate myelin from cells, 37% Percoll Plus (GE Healthcare, Chicago, USA) was used (Legroux et al., 2015), after which cells were resuspended in flow cytometry staining buffer (PBS + 2% fetal calf serum). Cells were labelled with a previously defined antibody panel, previously described to study immune infiltrate into non-lymphoid tissues (Yu et al., 2016), and modified to include anti-mouse CD3 PE-Cy7 (Fischer Scientific), anti-mouse CD4-BUV395 (BD Biosciences) and anti-mouse CD8α-PE-CF594 (BD Biosciences). Equal numbers of true count beads were added to each tube to enable absolute cell counting. Samples acquisition was performed using a FORTESSA X20 flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), with a 5-laser and 20-filter configuration. Immune populations were defined using a modified strategy to that previously published by Yu *et al.*, (Yu et al., 2016), with the addition of a single cell gate, bead gating and including CD3, CD4 and CD8 analysis of the T cell population using Flowjo v10.0. Raw data was extracted for analysis using Microsoft Excel 2016. Figures were generated using Prism v7.00 (Graphpad) and GIMP v2.

Quantification of inflammatory chemokines in lip and TG samples by bead-based immunoassay

Lip and TG samples were collected from mice (*n = 4* per group, per time point) in non-denaturing 4.7 × cell lysis buffer (Cell Signaling Technologies, USA) with 1 mM PSMF (Sigma-Aldrich, France) freshly added immediately prior to harvesting. Tissues were homogenised in CKmix tubes (BertinPharma, Montigny-le-Bretonneux, France) at 6,500 × RPM for 45 seconds using the Precellys24 (BertinPharma, France). Tissue homogenates were clarified at 10,000 × g for 5 mins at 4°C and frozen at -80°C. Mouse proinflammatory chemokines LEGENDplex assay (Biolegend, France) was performed according to manufacturers' instructions with 2-fold diluted samples. Data acquisition was performed using a FORTESSA X20 flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) to acquire 4000 beads/sample, and LEGENDplex v.8.0 software was used to calculate the chemokine concentrations from tissue

samples by comparison with standard curves. Standard curves achieved *r* values of no lower than *0.995*, and all samples with chemokines detected fell within the standard curve. Microsoft Excel 2016 was used to collate the data for statistical analysis, while Graphpad Prism and GIMP v2 were used to generate figures.

Cytology comparison of immune infiltrate of lip and TG tissues

Cell suspensions of left lip (*n = 3*) or left TG (*n = 3*), harvested 6 days after inoculation with SC16 were labelled with: Live/Dead Aqua (Life Technologies, Invitrogen), PE anti-mouse CD11b, and APC-efluor700 anti-mouse CD45. $CD11b^{+ve}$ and $CD11b^{-ve}$ populations were sorted into FCS using a FACSAria I (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) with FACS Diva v6. Sorted population were attached to Superfrost Plus microscope slides (Thermo Scientific, France) and stained by May-Grünwald Giemsa procedure. Images were captured randomly using Nikon Eclipse 80i with Dxm 1200C digital camera at 60× magnification. Cells were identified and enumerated by morphological criteria by a trained cytologist.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed with R version 3.2.0. (RDC, 2011). Cell numbers were compared using the *exactRankTests* permutation test, chemokines' concentrations using the *Student's t-test*, and infiltrate frequencies using the non-parametric *Kruskal-Walis test*. Statistical significance was indicated by $p < 0.03$ (2-tailed).

RESULTS

Identifying immune subset infiltrate into sites of acute HSV-1 replication

To help understand the role of immune mechanisms that develop in our model to protect against disease, groups of mice (*n = 26 mice per group*) were infected in the lip with: virulent HSV-1 SC16 wild-type strain (**SC16**; *in left lip*), sterile PBS (**Mock**; *in left lip*), or TK_{del} (**TK_{del}**; *in right lip*) at D0 (**Figure 1**). A 4^{th} group was initially infected with TK_{del} in the right lip at D-4, and 4 days later (D0) superinfected in the left lip with SC16 (**Superinfection**).

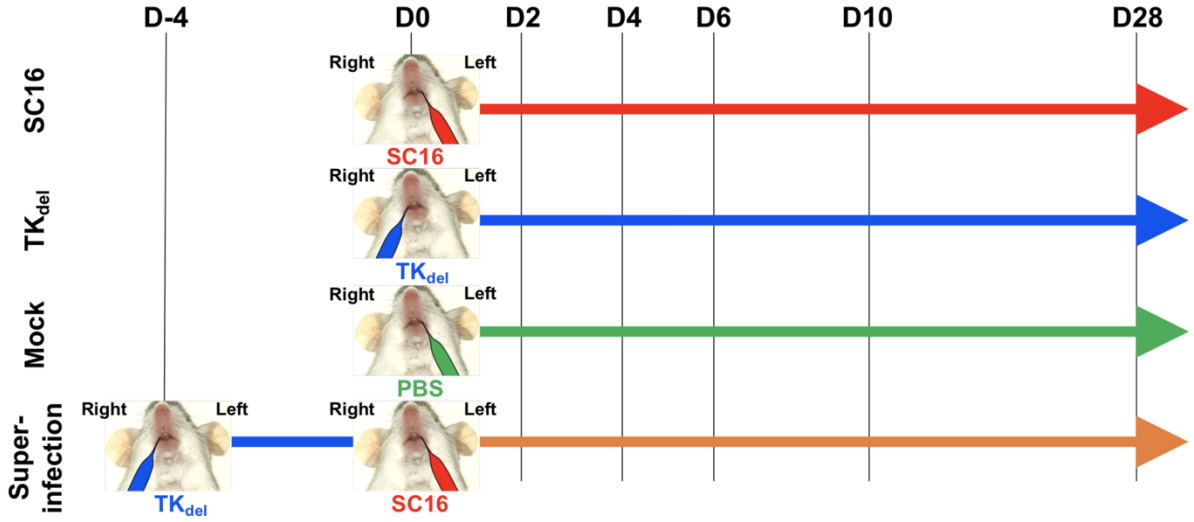


Figure 1: Schematic representation of the experimental procedure and time course. Single viral inoculation consisted in HSV-1 wild strain SC16 (upper left lip) or non-neurovirulent TK_{del} (upper right lip) injection in the left lip at D0. Mock inoculation consisted of PBS injection in the upper left lip. In the "Superinfection" group, TK_{del} was injected in the upper right lip 4 days prior (D-4) to SC16 injection (D0). Four mice per group were randomly sacrificed at days 0, 2, 4, 6, 10 and 28 and sampled for left and right lips and TGs. D = day.

Immune infiltrates were categorised in the lip and TG using a flow cytometry technique designed to study haematopoietic cells in non-lymphoid tissues under inflammatory conditions (Yu et al., 2016). By customising the protocol to include CD4- and CD8-specific antibodies, and including cytometry counting beads for quantifying cell numbers, we were able to identify and quantify haematopoietic subsets with precision (**Figure 2**).

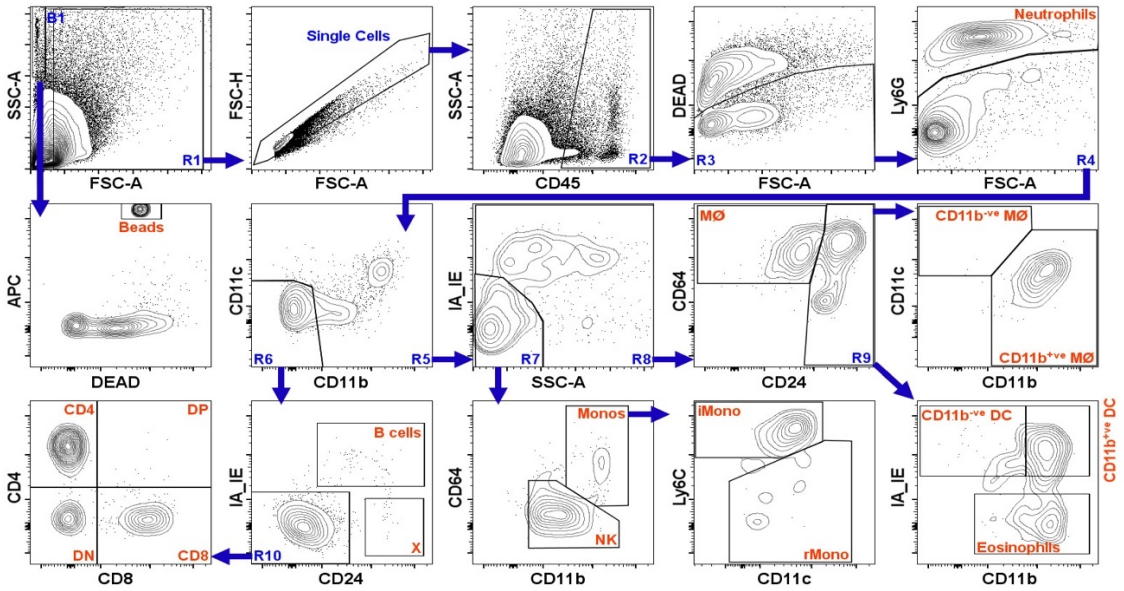


Figure 2: Contour plots and gating strategy used for the identification of immune cell population in lip and TG tissues, modified from Yu et al. (Yu et al., 2016). The immune subsets include neutrophils, monocytes including inflammatory (iMono) and resident monocytes (rMono), $CD4^{+ve}$, $CD8^{+ve}$ and double negative (DN) T cell T cells, B cells, NK cells, $CD11b^{+ve}$ and $CD11b^{-ve}$ dendritic cells, macrophages, eosinophils and an undetermined population (X).

Immune infiltrate appears earlier and is cleared faster in SC16-superinfected lip

To determine if immune responses were altered at the site of inoculation, we first quantified the global immune cell infiltrate into infected lip tissues by enumerating the number of $CD45^{+ve}$ cells present in samples over time. $CD45^{+ve}$ cells increased in lip tissue significantly, by comparison with uninfected D0 lip, by D2 in all groups (**Figure 3**). However, while $CD45^{+ve}$ cell numbers in SC16-infected lips were comparable to those in mock-infected lips at D2, the numbers in SC16-superinfected lips increased to a much greater extent, reaching peak levels at this time. In contrast, TK_{del}-infected and SC16-infected lip infiltrating $CD45^{+ve}$ cells kept increasing to peak at D4. $CD45^{+ve}$ cells in SC16-superinfected lip decreased to numbers similar to those of mock-infected lips by D10 and remained at D28 (a point when latent state of infection is established (Labetoulle et al., 2003; Cavallero et al., 2014)). On the contrary, TK_{del}-infected and SC16-infected lip $CD45^{+ve}$ cells persisted until D10 (a point when cells positive for lytic viral gene expression had become undetectable (Labetoulle et al., 2000c)). Furthermore, at D28, $CD45^{+ve}$ cell numbers continued to persist in SC16-infected lip tissues and were detected at levels 40 times higher than those of the naïve lip at D0. These results demonstrated that a more rapid recruitment of immune cells occurs into the site of SC16 superinfection, i.e. when preceded 4 days earlier by a contralateral lip infection with TK_{del}. This immune infiltrate subsided by D10 in the superinfected lip, whereas infiltrate into SC16-infected lip peaked at D4 and persisted at the site of SC16 infection into latency.

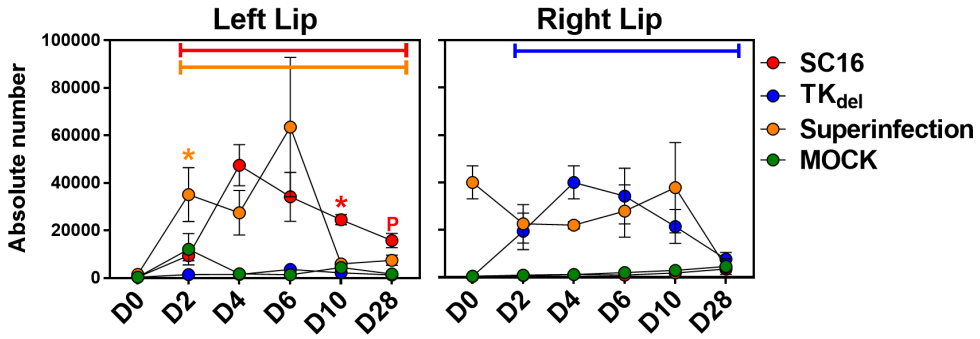


Figure 3: $CD45^{+ve}$ immune infiltrates (absolute number of cells) in the lip over time in the different experimental protocols. Single SC16 or TK_{del} inoculations induce an immune infiltrate that peaks at D4 and persists until D10. Upper coloured bars indicate significant difference from uninfected D0. Orange a*sterisk* indicates a significant difference for Superinfection group compared to Mock and SC16 groups, and red asterisk indicates a significant difference for SC16 compared to Mock and Superinfection groups ($p < 0.03$). *Coloured P* indicates a significant difference between the color-corresponding group and the Mock group.

Prior infection with TK_{del} induces differences in the types of immune subset at the site of SC16 superinfection

To develop further understanding of how immune dynamics were altered in SC16-superinfected lip, because of the initial contralateral TK_{del} inoculation 4 days prior, we compared the quantities of specific immune cell subsets in lip tissues of the different groups after infection (**Figure 4**). Across infected lip tissues, with the exception of B cells and $CD11b^{+ve}$ DC (**Figure 4 I and K**), cell subsets had increased significantly by D2 (**Figure A to H, and J**; *bar = $p < 0.03$ vs D0*). However, in mock-infected lips at D2, there were increased numbers of inflammatory monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, $CD11b^{+ve}$ and $^{-ve}$ DC, which subsided by D4 (**Figure 4 E to J**). In contrast, these populations increased further on D4 in SC16- and TK_{del}-infected lips, but then declined to remain at levels greater than in mock beyond the late acute phase (D10), and persisted into the latent phase of infection (D28).

The greatest changes in immune subset infiltration of SC16-infected left lip occurred on D4, with most subset numbers peaking at this time, including: NK cells, DN cells, inflammatory monocytes, macrophages, neutrophils and eosinophils (**Figure 4 A and B, and E to H**). These subsets all commenced a decline by D6 and, excluding DN cells (**Figure 4B**), persisted from D10 up to D28 at lower, yet significant levels. $CD4^{+ve}$ and $CD8^{+ve}$ T cells, and B cells, peaked at D6 and these numbers persisted up to D28 as well (**Figure 4 C, D and K**). The numbers of $CD11b^{+ve}$ and $^{-ve}$ DC seemed to increase over the course of the infection, to reach peak numbers by D28 (**Figures 4 I and J**).

There were obvious differences between the immune subset infiltrates into the SC16-superinfected lip compared to SC16-infected lip. NK cells, $CD4^{+ve}$ T and $CD8^{+ve}$ T cells had increased in the SC16-superinfected tissue by D2 (**Figures 4 A, C and D**; *$p < 0.03$ for all conditions*). In contrast to the infiltrate of SC16-infected lips, these 3 subsets persisted only until D6 in SC16-superinfected lips, after which they drastically subsided and remained low from D10 to D28. Macrophage and neutrophil numbers also subsided on D10 and remained low up to D28 (**Figure 4 F and G**). Furthermore, there was an apparent absence of inflammatory monocyte infiltrate in SC16-superinfected lip mediated by HSV-1 infection (D4 peak, **Figure 4 E**). $CD11b^{+ve}$ DC reached higher numbers in SC16-superinfected lip. However,

only at D4 were numbers significantly higher than in SC16- and mock-infected lips (**Figure 4 I**; $p < 0.03$ *for both*), and they did not increase further but remained consistent until D28. To summarize, infiltrate enters the site of lip inoculation with HSV-1 by D2, and increases to peak during acute phase (D4 to D6) with most subsets persisting up to D28. Meanwhile, in SC16-superinfected lip earlier and greater numbers of NK cells, $CD4^{+ve}$ and $CD8^{+ve}$ T cells infiltrated with an absence of inflammatory monocytes during acute phase. Furthermore, infiltration by most innate immune subsets had resolved by D10, while DC persisted into latency.

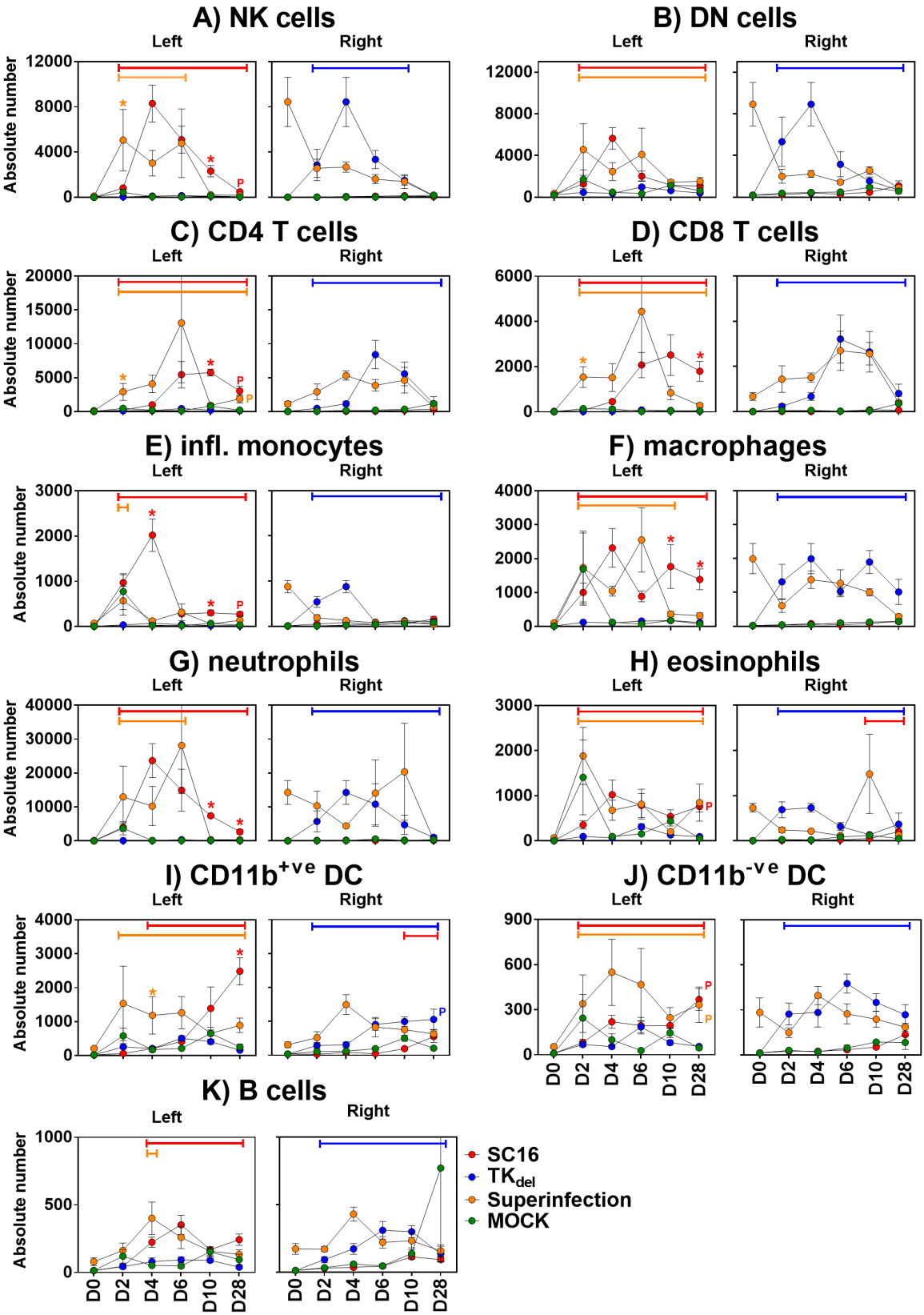


Figure 4 A-K: Immune subsets infiltrates (absolute number of cells) in the lip over time in the different experimental protocols. Upper coloured bars indicate significant difference from uninfected D0. Orange *asterisk* indicates a significant difference for Superinfection group compared to Mock and SC16 groups, and red asterisk indicates a significant difference for SC16 compared to Mock and Superinfection groups ($p < 0.03$). *Coloured P* indicates a significant difference between the colour-corresponding group and the Mock group.

Immune infiltrates of SC16-superinfected lip are skewed towards an adaptive response

To confirm that immune infiltrates were altered at the site of SC16-superinfection, we compared the relative frequency of immune cell subsets as a proportion of total $CD45^{+ve}$ cells with those found in SC16-infected lips (**Figure 5**). While neutrophils remained a common major infiltrating population in both SC16-superinfected and SC16-infected lips between D2 to D6, their frequency reduced on D10 and D28 in SC16-superinfected lips, but remained more frequent in SC16-infected lips (8% vs 32% at D10; 5% vs 18% at D28, $p < 0.03$, *respectively*). Monocytes were much less frequent between D2 to D4 in SC16-superinfected lips compared to SC16-infected lips (2% vs 12% at D2; 1% vs 5% at D4; both $p < 0.03$), but were no longer significantly different from D6 to D10. The proportion of NK cells was significantly lower from D4 to D10 in SC16-superinfected lips compared to SC16-infected lips (11% vs 18% at D4, 6% vs 17% at D6, 4% vs 10% at D10, $p < 0.03$ *for both*). In contrast, the proportion of T cells was higher in SC16-superinfected lips on D4 and D10 (33% vs 16% at D4; 57% vs 40% at D10; $p < 0.03$ *for both*). Similarly, a higher proportion of B cells and DC was also observed on D4 and D10 in SC16-superinfected lips (B cells: 2% vs 0.5% at D4; 3% vs 0.8% at D10 respectively; both $p < 0.03$; DC: 11% vs 1% at D4; 15% vs 6% at D10, $p < 0.03$). During latency (D28), frequencies of DC were comparable between groups, while T cells were more frequent in SC16-superinfected lips compared to lips infected with SC16 (53% vs 39%; $p < 0.03$). These results demonstrated that immune infiltrate into SC16-superinfected lips was altered compared to the infiltrate of SC16-infected lips, with a higher proportion of adaptive immune cell subsets into the superinfected lip.

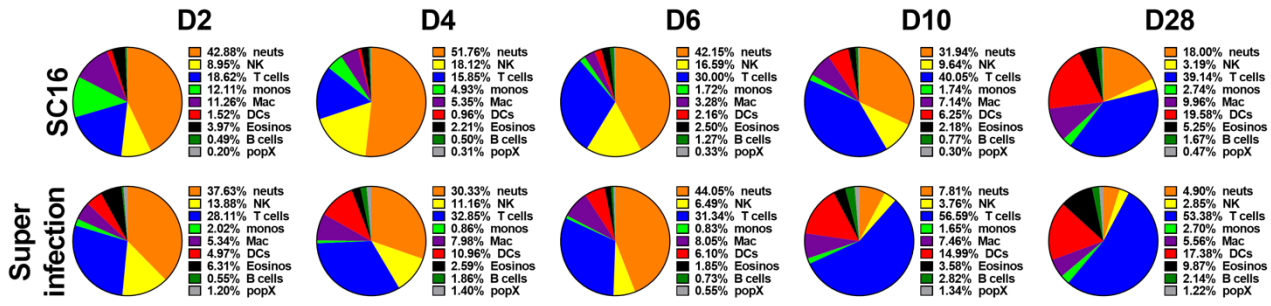


Figure 5: Diagram representation of relative frequencies of immune cell subsets as a proportion of total $CD45^{+ve}$ in SC16-infected and SC16-superinfected lips over the study period. For the sake of clarity, CD4+ve and $CD8^{+ve}$ T cells were merged, so were $CD11B^{+ve}$ and $CD11b^{-ve}$ DC.

Reduced levels of inflammatory chemokines in the superinfected lip

To determine the inflammatory response elicited by viral infection of the lip, inflammatory chemokines were measured after infection by bead-based immunoassay (**Figure 6**). The dynamics of inflammatory chemokine concentrations in TK_{del}- and SC16-infected lips were globally similar over time (**Figure 6 A and B**, respectively), with peak chemokine levels achieved on D4 *post* infection (CCL11 peak occurred on D6) to decline by D6. In TK_{del}-infected lips, only at D4 were concentrations of CCL11, CCL2, CCL3 and CCL4 significantly higher than uninfected lips at D0 (**Figure 6A**; *bar = p <0.03 vs D0*). CCL5, CXCL9 and CXCL10 persisted at concentrations higher than those in lips at D0 for the entire acute phase (D2-D10). However, in SC16-infected lips, chemokine concentrations for CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CXCL1, CXCL9, and CXCL10 were significantly higher than uninfected lips at D0 from D2 to D10 (the entire acute phase, **Figure 6B**; *bar = p < 0.03 vs D0*). CCL2 persisted for longer in SC16-infected lips into latency phase, albeit at low concentrations (D28). The concentration of CXCL13 in SC16-infected lip continued to rise from D4 to D28, though only the concentrations at D6 and D10 were significantly higher than that of D0. CCL5 concentrations were elevated in the SC16-infected lip also, but significant differences to D0 were achieved only on D2 and D4, as variability amongst replicates after this point may have affected the significance.

In SC16-superinfected lips, there were apparent increases in the concentrations of CCL5, CCL11, CCL3, CCL4, and CXCL13. However, these differences in concentration did not reach significance when compared to uninfected lips at D0 (**Figure 6 C**). There were increases of inflammatory chemokine concentrations in the lips contralateral to SC16-superinfection (i.e. the lip that was infected with TK_{del} at D-4; see **Figure 1**) for CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CXCL13 and CXCL5 (**Figure 6 D**). These chemokines were detected at sporadic intervals from D2-10 after the SC16 superinfection, which corresponds to D6-D14 after the TK_{del} infection. These results demonstrate the presence of increased and persisting inflammatory chemokines in SC16-infected lips, in contrast to those infected with TK_{del}. However, in the SC16-superinfected lip there was an obvious reduction/absence of inflammatory chemokines.

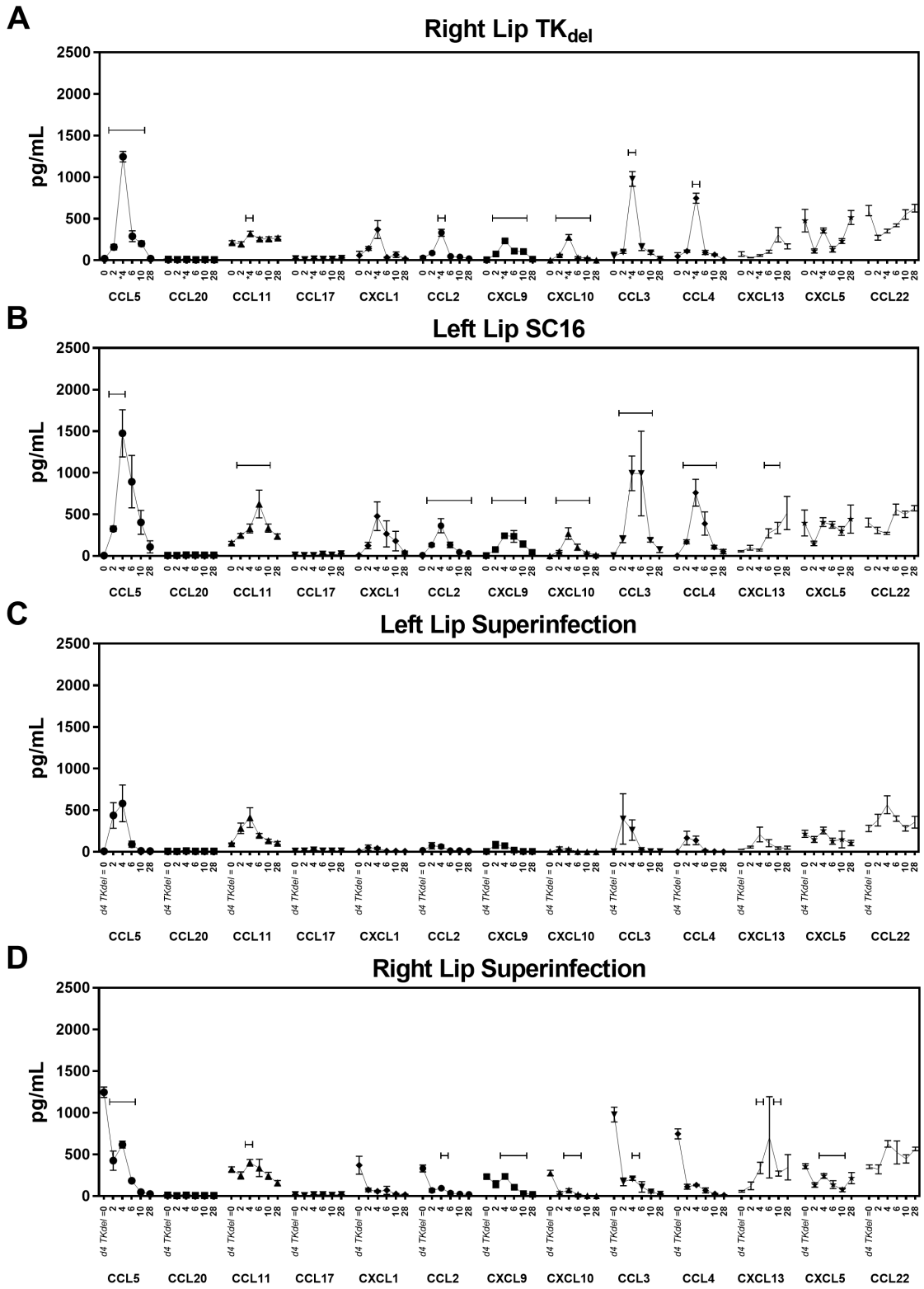


Figure 6: Inflammatory chemokines concentrations (pg/mL) in the lip tissues over the study period (D0, D2, D4, D6, D10, D28). **A)** Inoculated lip (right) of the TK_{del} group; **B)** Inoculated lip (left) of the SC16 group; **C)** SC16 superinfected lip (left) of the superinfection group; **D)** TK_{del} inoculated lip (right) of the superinfection group. Upper bars indicate significant difference from uninfected D0.

Attenuated immune cell infiltrate in TG ipsilateral to SC16-superinfection

We previously demonstrated that HSV-1 lytic viral replication predominantly occurs in the TG ipsilateral (iTG) to the site of lip infection (Labetoulle et al., 2000c; Poccardi et al., 2019). We thus evaluated dynamics of $CD45^{+ve}$ immune cell infiltration into mock-, SC16-, or TK_{del} –infected iTG, and compared to the number of $CD45^{+ve}$ cells in SC16-superinfected iTG (**Figure 7**).

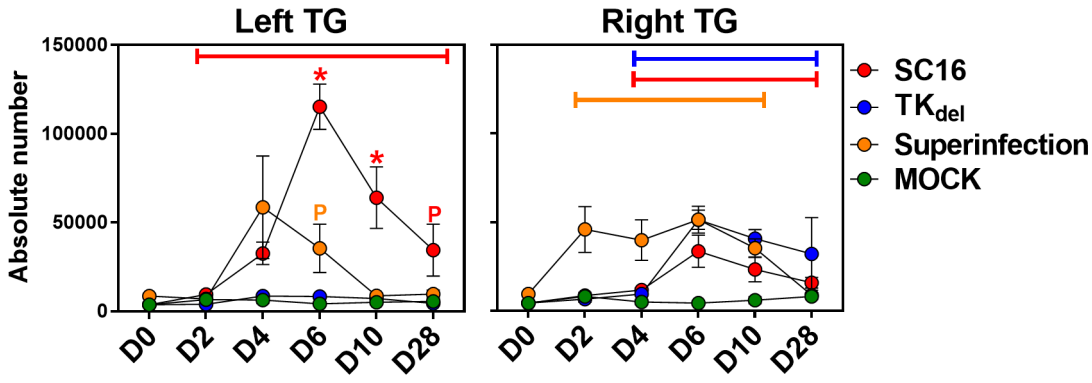


Figure 7: $CD45^{+ve}$ immune infiltrate (absolute number of cells) in the TG over time in the different experimental protocols. Upper coloured bars indicate significant difference from control group (list colour for group). Upper coloured bars indicate significant difference from uninfected D0. *Asterisks* indicate for Superinfection (orange): a significant difference from the Mock and the SC16 group at the same time, or for SC16 (red): a significant difference from the Mock and the Superinfection group at the same time point ($p < 0.03$). *Coloured P* indicates a significant difference between the colour-corresponding group and the Mock group.

In mock-infected iTG, there was no significant increase in $CD45^{+ve}$ cells at any time. In contrast, there was a subtle yet significant increase in SC16-infected iTG by D2. $CD45^{+ve}$ cell numbers had increased 8.7-fold by D4, and again 32-fold, to peak on D6. At D10 $CD45^{+ve}$ cell numbers had contracted, but remained much higher than in mock-infected or SC16-superinfected iTG (*both* $p < 0.03$). $CD45^{+ve}$ cell infiltrate dynamics were similar in TK_{del}-infected iTG. However, the peak numbers occurring on D6 were at lower levels than in the SC16-infected iTG. In SC16-infected iTG, $CD45^{+ve}$ cell infiltrate persisted until D28 at levels significantly higher than in mock-infected iTG.

Some SC16-superinfected iTG harboured apparent increased numbers of $CD45^{+ve}$ cells by D4 (**Figure 7**). However, the average was not statistically significant when compared to D0. Even so, significantly more $CD45^{+ve}$ cell numbers were detected by D6 in comparison

with mock-infected iTG at this time ($p < 0.03$). $CD45^{+ve}$ cells in SC16-superinfected iTG contracted to numbers comparable to those of mock-infected iTG by D10, and remained low until D28. As expected, there were very similar $CD45^{+ve}$ cell infiltration kinetics in the TG contralateral to SC16 superinfection compared to TK_{del}-infected iTG, as D2 after SC16 superinfection corresponds to D6 of the TK_{del}-infected group (due to the 4-day delay in lip inoculations). Combined, these data demonstrated substantial infiltration of the SC16-infected iTG by D2, which persisted in abundance from D4 and into the latent state of infection. In contrast, there was a gross reduction in $CD45^{+ve}$ cell infiltrate into SC16-superinfected iTG, which resolved by D10.

Reduced numbers and absence of subset infiltrate in SC16-superinfected iTG

To determine how the altered immune responses at the site of lip infection influenced immune responses in the iTG, we quantified the defined immune subsets in iTG over time (**Figure 8**). Increases in every immune cell subset were detected in SC16-infected iTG during the acute phase of infection (D2-D10), to numbers significantly higher than those in TG from uninfected mice at D0. Numbers spiked on D4 for inflammatory monocytes and neutrophils in the SC16-infected iTG (**Figure 8 E and G**), but on D6 for all other subsets: NK cells, DN cells, $CD4^{+ve}$ T cells, $CD8^{+ve}$ T cells, macrophages, eosinophils, $CD11b^{+ve}$ and $CD11b^{-ve}$ DC, and B cells (**Figure 8 A to D, F, and H to K**). Inflammatory monocytes and eosinophils persisted in SC16-infected iTG until the end of acute phase at D10 (**Figure 8 E and H**), while neutrophils declined by D6 (**Figure 8 G**). Remaining cell subsets persisted until the D28 latent phase (**Figure 8 A to D, F, and I to K**), with $CD4^{+ve}$ and $CD8^{+ve}$ T cells, macrophages, $CD11b^{+ve}$ and $^{-ve}$ DC remaining significantly higher than those in mock-infected iTG (**Figure 8 C, D, F, I and J**). In the TK_{del}-infected iTG, similar infiltrate dynamics occurred in all immune subsets in comparison with SC16-infected iTG. However, with the exception of $CD4^{+ve}$, $CD8^{+ve}$ T cells and $CD11b^{-ve}$ DC, TK_{del}-infected iTG infiltrates were much lower (**Figure 8 C, D and J**). Infiltration dynamics of $CD4^{+ve}$ and $CD8^{+ve}$ T cells and $CD11b^{-ve}$ DC subsets were similar in magnitude to those of SC16-infected iTG.

In the TG contralateral to the SC16-infected lip, we detected increases in inflammatory monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, and CD11b^{+ve} DC (**Figure 8 E to I**) only during the acute phase. Whereas, NK cells, DN cells, CD4 and CD8 T cells, CD11b^{-ve} DC and B cells all increased during acute phase and persisted in increased numbers into latency state (**Figure 8 A to D, J and K**).

In SC16-superinfected iTG (**Figure 8**; *orange left*), there was an overall reduction in numbers of immune subset infiltration. NK, DN, CD4^{+ve} T cells, inflammatory monocytes, and B cells (**Figure 8 A to C, and K**) increased significantly above controls for a single time point only (*D4 for inflammatory monocytes, D6 for the remainder*). CD8^{+ve} T cell numbers in SC16-superinfected iTG persisted in increased numbers until D28 (**Figure 8 D**), but at a much lower level than those in SC16-infected iTG. The increase in CD11b^{-ve} DC in the SC16-superinfected iTG was apparent at D4, but was significantly increased from D6 to D28 (**Figure 8 J**), in similar numbers to those observed in SC16-infected iTG. Meanwhile, we did not detect increases in the numbers of macrophages, neutrophils, eosinophils, and CD11b^{+ve} DC in SC16-superinfected iTG (**Figure 7 F to I**).

These data demonstrate robust infiltration of SC16-infected iTG by all immune subsets. Subtle increases in NK cells, DN cells and inflammatory monocytes were present in SC16-infected iTG as early as D2 *post* infection, while numbers increased drastically by D4 or D6. However, in the contralateral TG, innate immune population infiltrates were reduced while adaptive immune populations were similar to the iTG. Similarly, immune infiltration of SC16-superinfected iTG was altered with substantial lack in numbers of key innate immune populations, such as macrophages, eosinophils, neutrophils, and CD11b^{+ve} DC. However, adaptive immune responses were also reduced in the SC16-superinfected TG.

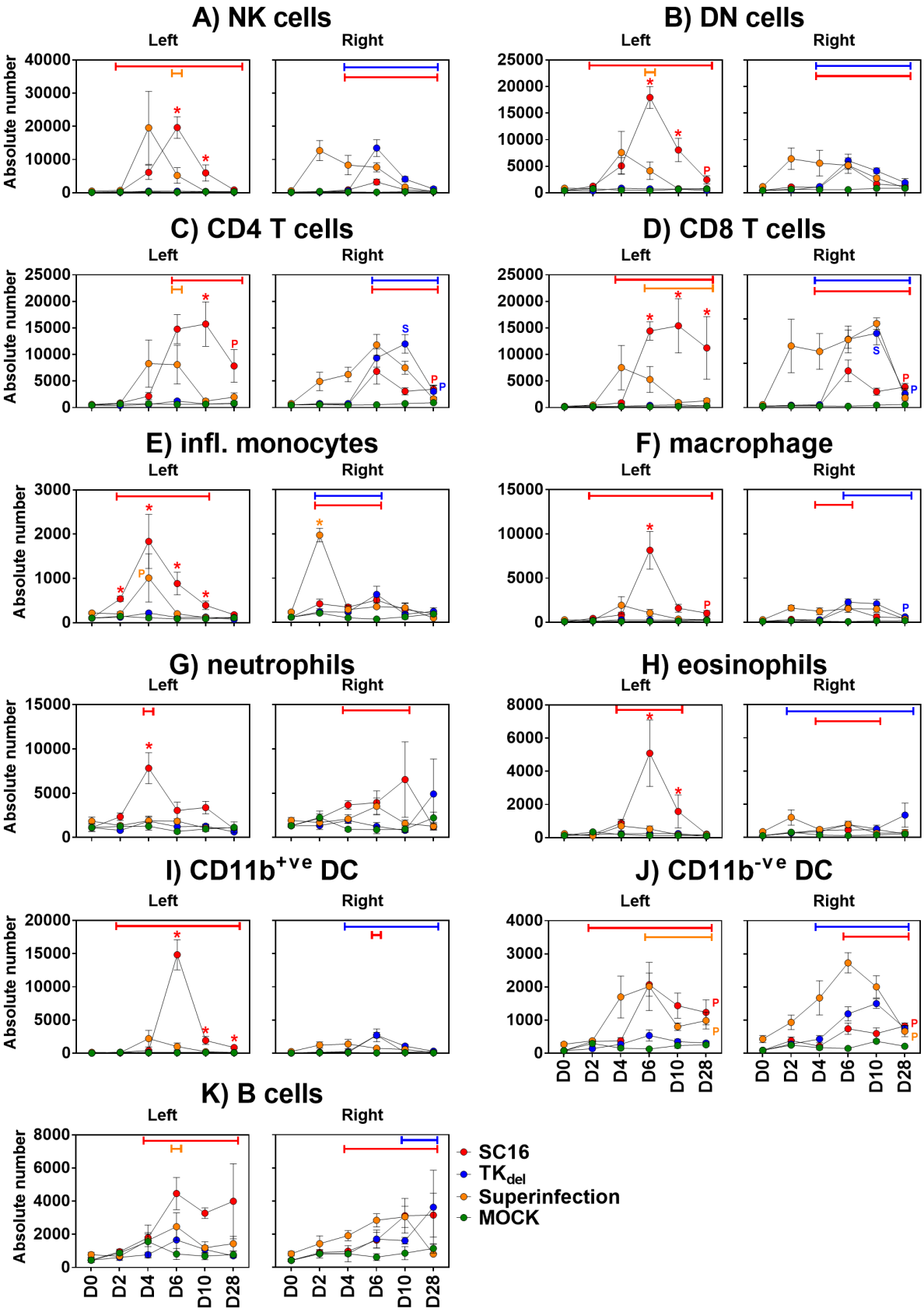


Figure 8 A-K: Immune subsets infiltrates (absolute number of cells) in the TG over time in the different experimental protocols. Upper coloured bars indicate significant difference from uninfected D0. Orange *asterisk* indicates a significant difference for Superinfection group compared to Mock and SC16 groups, and red asterisk indicates a significant difference for SC16 compared to Mock and Superinfection groups ($p < 0.03$). *Coloured P* indicates a significant difference between the colour-corresponding group and the Mock group.

T cells remain the predominant TG infiltrate, while differential kinetics occur during superinfection

To determine how altered immune subset infiltration dynamics changed the global infiltrate in TGs, we compared the frequencies of immune cell subsets relative to total $CD45^{+ve}$ cells in SC16-infected iTG with SC16-superinfected iTG (**Figure 9**). We noted that T cells were the predominant subset in both groups. In SC16-infected iTG, the frequency of T cells increased during the acute phase of infection, from 28% at D4, to 63% at D10 and were similar at D28 (65%). In contrast, T cell prevalence in SC16-superinfected iTG increased from 34% at D2, to 55% at D6, then retracted to 36% at D10, and reached 42% at D28. At D10, T cells were significantly more frequent in SC16-infected iTG than in SC16-superinfected iTG ($p < 0.03$).

Percentages of immune subsets on D2 were similar between SC16-infected and SC16-superinfected iTG, with the exception of monocytes, which were more common in infiltrate of SC16-infected iTG than SC16-superinfected iTG (12% vs 7%; $p < 0.03$). Monocytes were also more abundant in SC16-infected iTG on D4 (8% vs 3%; $p < 0.03$), but by D10 and D28 in SC16-superinfected iTG (5% vs 1% at D10; 4% vs 1% at D28; both $p < 0.03$).

In SC16-infected iTG, the frequency of DC increased from 3% on D4 to 16% on D6, significantly greater than the 9% in SC16-superinfected iTG ($p < 0.03$), which had remained consistent from D2 to D6. On D10, DC density had retracted to 6% in SC16-infected iTG, while in SC16-superinfected iTG increased to 15% ($p < 0.03$).

At this same time, the frequencies of NK cells, monocytes macrophages and eosinophils declined at the expense of increasing T cell and neutrophil frequencies in SC16-infected iTG. However, the converse occurred in SC16-superinfected iTG, where T cells and NK cell abundance declined at the expense of increases in all other subsets. These results illustrate differential kinetics in monocyte, DC and T cell proportions during early and late acute phase infection. T cells remained the major infiltrating population of both SC16-infected and SC16-superinfected iTG, where they increased in prevalence SC16-infected iTG, while contracting over the same period in SC16-superinfected iTG. Monocytes were more frequent in SC16-infected iTG during early acute phase, and in SC16-superinfected iTG during late acute phase and latency. Meanwhile, DC spiked dramatically on D6 in SC16-infected iTG and

retracted quicky, but in SC16-superinfected iTG increased during late acute phase and remained consistent into latency.

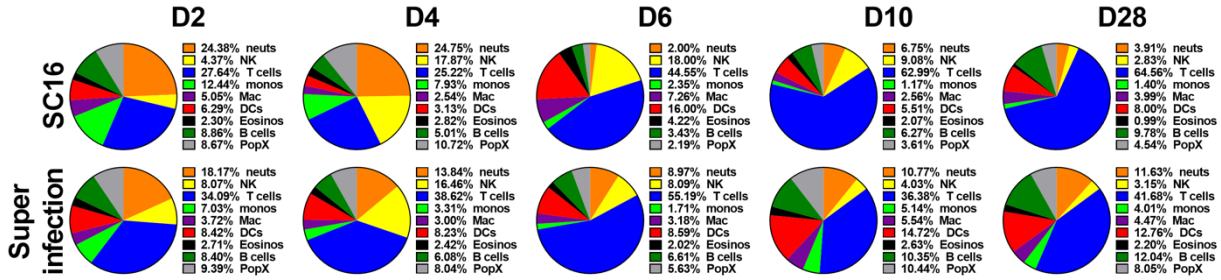


Figure 9: relative frequencies of immune cell subsets as a proportion of total CD45^{+ve} in TG ipsilateral to SC16 infection and SC16 superinfection over the study period. For the sake of clarity, CD4+ve and CD8^{+ve} T cells were merged, so were CD11B^{+ve} and CD11b^{-ve} DC.

Inflammatory chemokines of SC16-infected iTG are diminished in the SC16-superinfected iTG

To determine the inflammatory response elicited by HSV-1 infection of the TG, inflammatory chemokines were measured in TK$_{del}$- or SC16-infected iTG by bead-based immunoassay (**Figure 10**). To confirm that changes occurred in SC16-superinfected iTG, we compared concentrations of inflammatory chemokines to those measured in SC16-infected iTG.

We detected increased concentrations of chemokines CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, CXCL13, and CCL22, which peaked at D6 in TK$_{del}$-infected iTG (**Figure 10 A**). These chemokines, plus CXCL1 and CXCL5, were also detected in SC16-infected iTG (**Figure 10 B**), but at greater concentrations. Interestingly, concentrations of CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 and CXCL10 peaked on D4 in SC16-infected iTG, 2 days earlier than in TK$_{del}$-infected iTG. In contrast to SC16- or TK$_{del}$-infected iTG, only CCL5, CCL11 and CXCL13 were detected in SC16-superinfected iTG (**Figure 10 C**). In TGs contralateral to SC16-superinfection in the lip, (i.e. in the TG ipsilateral to right lip infection with TK$_{del}$ (**Figure 1**), significant concentrations were detected for CCL5, CCL11, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CXCL13 and CXCL5 (**Figure 10 D**). These chemokines were detected from D2, which corresponds to D6 after the TK$_{del}$ infection in the ipsilateral lip, following a similar trend to chemokine dynamics of the TK$_{del}$-infected iTG. These data define inflammatory responses in the TG ipsilateral to HSV-1 infection in the lip. There was a delay in the spike of inflammatory

chemokines in TK_{del}-infected iTG, and overall concentrations were higher in SC16-infected iTG. On the other hand, SC16-superinfected iTG were absent of most inflammatory chemokines, or they were greatly reduced in comparison to inflammatory chemokines of SC16-infected iTG.

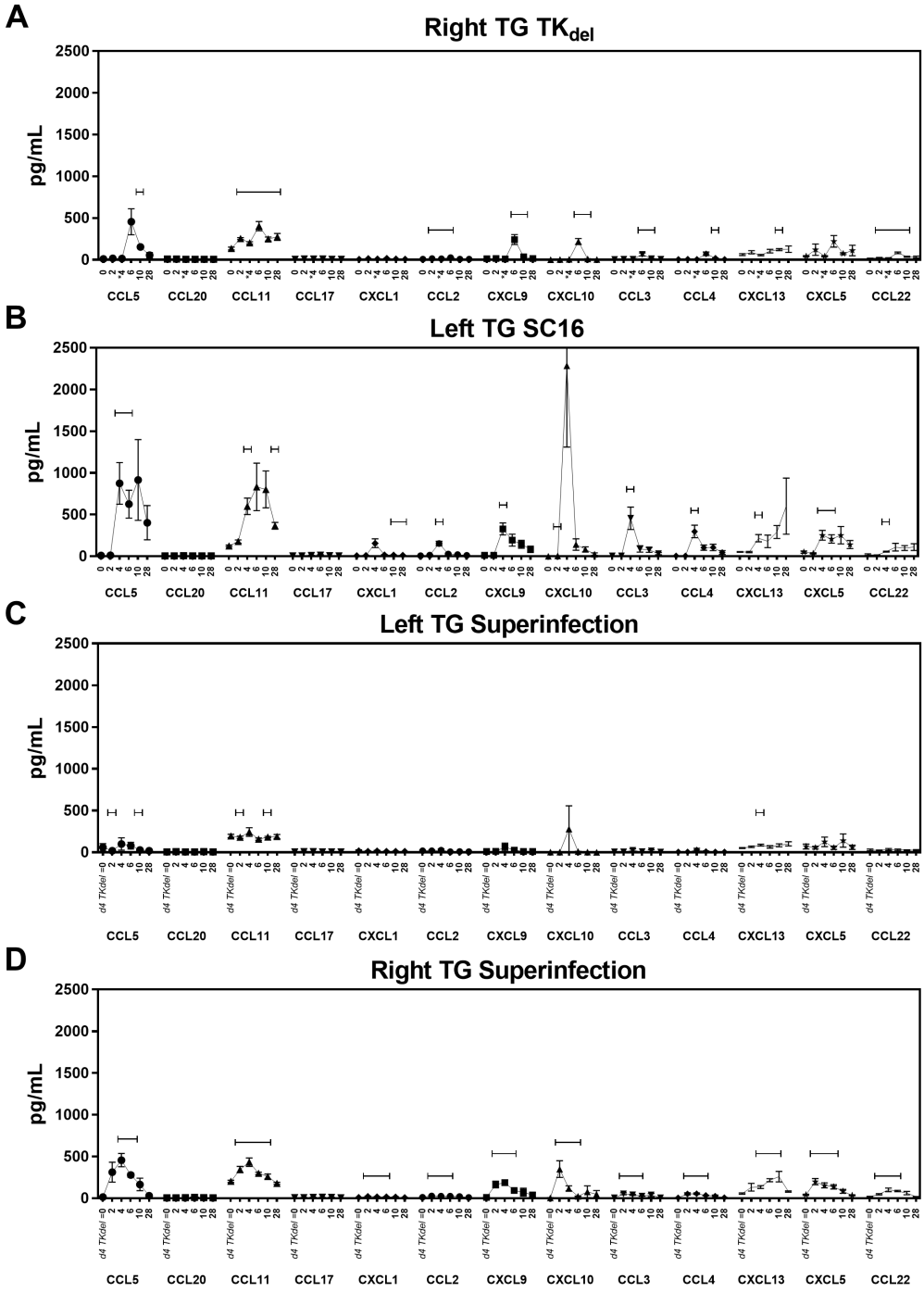


Figure 10: Inflammatory chemokines concentrations (pg/mL) in the TG tissues over the study period (D0, D2, D4, D6, D10, D28). **A)** TG ipsilateral to TK_{del} inoculation (right) of the TK_{del} group; **B)** TG ipsilateral to SC16 inoculation (left) of the SC16 group; **C)** TG ipsilateral to the SC16 superinfection (left) of the superinfection group; **D)** TG ipsilateral to the TK_{del} inoculation lip (right) of the superinfection group. Upper bars indicate significant difference from uninfected D0.

Cytological comparison of lip and TG immune infiltrates

To further characterise cells present in lip and TG samples, we sorted live $CD45^{+ve}$ single cells that were $CD11b^{+ve}$ or $CD11b^{-ve}$ by flow cytometry, then cytospin and Giemsa staining were performed before analysis by microscopy (**Figure 11**). Cells harvested from the lip or TG at D6 were characterised based on morphology as neutrophils, mononuclear phagocytes, lymphocytes, eosinophils or plasmocytes. Neutrophils appeared to be of "late-phase" lifecycle, indicated by their polynucleated appearance in both lip and TG (**Figure 11A and F**). Vacuolar structures of mononuclear phagocytes (**Figure B and G**), and concentrated blue staining at the membrane of lymphocytes (**Figure C, E, H and J**) indicated activated states.

There was an obvious difference in the composition of the $CD11b^{+ve}$ compartment when comparing cells from the lip and from the TG. $CD11b^{+ve}$ cells from lip were primarily composed of 69% neutrophils and 17% mononuclear phagocytes, plus 11% lymphocytes and 3% eosinophils (**Figure 11 K**). In contrast, $CD11b^{+ve}$ populations in the TG were either mononuclear phagocytes (56%) or lymphocytes (40%) on D6 (**Figure 11 L**). Lymphocytic cells made up the vast majority of the $CD11b^{-ve}$ compartment in the lip (91%) and in the TG (93%). These data confirmed drastic differences in the immune infiltrate within lip and TG tissues at D6 after lip infection with HSV-1, with neutrophils being predominant in the lips, and lymphocytes in the TG.

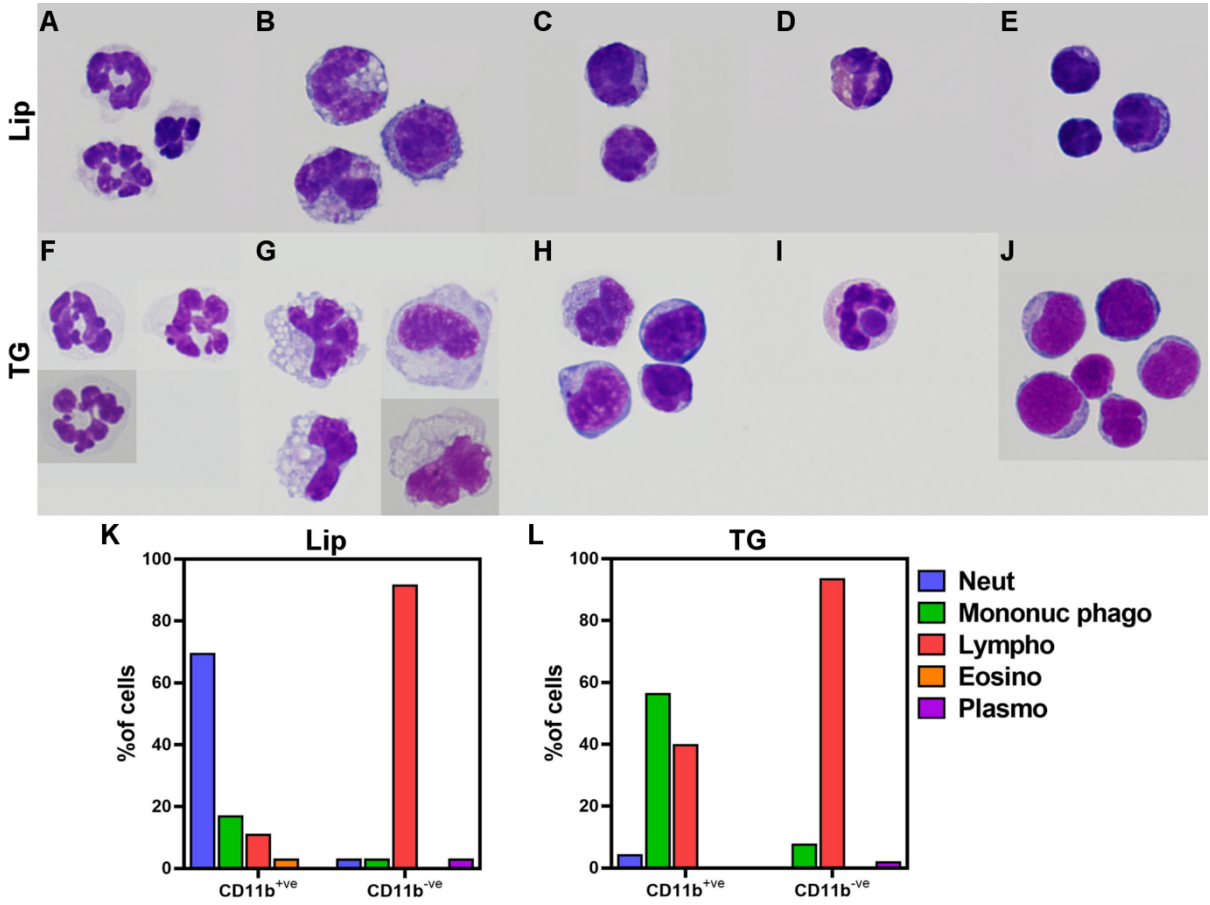


Figure 11: upper part : illustrative examples of $CD11b^{+ve}$ and $CD11b^{-ve}$ immune subsets observed in lip and TG tissues cells suspensions at D6 after SC16 inoculation. **A)** Lip $CD11b^{+ve}$ neutrophils, **B)** Lip $CD11b^{+ve}$ monocytes / phagocytes, **C)** Lip $CD11b^{+ve}$ lymphocytes, **D)** Lip $CD11b^{+ve}$ eosinophils, **E)** Lip $CD11b^{-ve}$ lymphocytes, **F)** TG $CD11b^{+ve}$ neutrophils, **G)** TG $CD11b^{+ve}$ monocytes / phagocytes, **H)** TG $CD11b^{+ve}$ lymphocytes, **I)** TG $CD11b^{+ve}$ eosinophils, **J)** TG $CD11b^{-ve}$ lymphocytes. Neutrophils appeared to be of "late-phase" lifecycle, indicated by their polynucleated appearance in both lip and TG **(A, F)**. Vacuolar structures of mononuclear phagocytes **(B, G)**, and concentrated blue staining at the membrane of lymphocytes (**C, E, H and J**) indicated activated states.
Lower part : Relative proportions of neutrophils, Mononuclear phagocytes, lymphocytes, eosinophils and plasmocytes in lip **(K)** and TG **(L)** samples.

DISCUSSION

Our previous study identified that lytic viral replication, ocular disease, and viral reactivations occur restricted to the side of lip inoculation with a virulent strain of HSV-1 (SC16) (Poccardi et al., 2019). When inoculation was performed using a non-neurovirulent strain (TK_{del}), this protective state developed to include both sides. Indeed, upon virulent viral superinfection challenge in the contralateral lip 4 days (or more) later, superinfecting virus replication was attenuated to almost undetectable levels in the iTG, while disease and reactivations from latency were absent. Interestingly, this 4-day interval corresponds with a time in our present study, when maximal immune cell infiltrate was occurring at the site of initial

lip infection with SC16 or TK_{del} (**Figure 3**). When TK_{del} was inoculated into the right lip of mice, and 4 days later superinfected with SC16 in the left lip, we even witnessed a more rapid recruitment of $CD45^{+ve}$ cells into the superinfected lip 2 days earlier, on D2. This infiltrate was similar in magnitude to that of the SC16-infected lip at its D4 peak, and was a major discernable immune feature at the site of lip superinfection. Canivet *et al.*, have demonstrated that the early recruitment of immune cells into HSV-1-infected central nervous system (CNS) tissues plays an important role in the reduced clinically susceptibility of C57BL/6 mice to HSV-1-mediated encephalitis (Canivet et al., 2019). The rapid immune response of this mice strain, after intranasal infection with virus, lead to greater control of viral replication and protection against disease. In contrast, BALB/c mice were more susceptible due to a delayed infiltration of the CNS by immune cell subsets (Canivet et al., 2019). These results explain how, in our experiments, the more rapid recruitment of immune cells into superinfected lip, elicited by the antecedent inoculation with TK_{del}, may provide more efficient control of HSV-1 replication, and reduce the viral burden reaching the TG in our model.

The roles and sources of inflammatory chemokines in HSV-1 disease have been studied in various experimental models. HSV-1 is first detected by the immune system via PRR sensing within hours of infection (Melchjorsen, 2012). The detection of HSV-1-derrived PAMP drives local proinflammatory process, where secretion of inflammatory chemokines occurs to recruit different immune cell subsets into the site of inflammation (Melchjorsen, 2012; Gianni et al., 2013; Sokol and Luster, 2015). However, some chemokines are reliant on the presence of specific cell subsets for expression, due to different PRR expression profiles. Thus, different signalling profiles, which will trigger altered immune dynamics, can be achieved by the presence of virus and viral PAMP in the absence of lytic infection (Megjugorac et al., 2004; Soby et al., 2012; Molesworth-Kenyon et al., 2015). Furthermore, the production of type I and III interferons, TNF-α, IL-6 and CXCL10 are a direct consequence of HSV-1 sensing (Melchjorsen, 2012), while type II interferon and IL-10 can feedback and limit expression of chemokines, to shape the type of immune response in infected areas (Tumpey et al., 1998; Molesworth-Kenyon et al., 2015). Noteworthy, we use an ultra-fine glass needle (hand-made by elongation) for the inoculation in the lip, whit no previous scarification or incision (Labetoulle

et al., 2000a), which likely reduces the level of inflammation at the site of virus inoculation in comparison to other models. But even minimal, this insult to the skin barrier likely induces a post-traumatic inflammatory reaction (Brazil et al., 2019). Indeed, we detected a subtle increase in innate immune subsets at the site of mock infection (PBS injection) on D2, which resolved by D4 (**Figure 4 E to J**). While the D2 increases also occurred in SC16- or TK_{del}-infected lips, infiltration was exacerbated on D4 (**Figure 4 E to J**). Comparatively, no monocytes and CCL2 was observed at D4 in SC16-superinfected lips, (**Figure 6C**), suggesting that the key signaling processes that recruit monocytes to site of HSV-1 lip infection, such as lytic viral replication early after viral inoculation, is severely reduced by the previous infection with the TKdel strain in the contralateral lip.

While similar levels of inflammatory chemokines (CCL5, CCL11, CXCL1, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4) were observed in the lips just after the inoculation of SC16- or TK_{del}-strains (**Figure 6 A and B**, *respectively*), much lower levels were detected in the iTG of the TK_{del} versus SC16 group (**Figure 10 A and B**, *respectively*). This difference is likely directly related to the non-neurovirulent nature of TK_{del}: the lack of of viral replication within the neuronal somata (Efstathiou et al., 1989), located in the TG, likely reduced cellular exposure to HSV-1 PAMP (Marques et al., 2006). It is interesting to note that peak chemokine levels occurred delayed at D6 in TK_{del}-infected iTG compared to D4 in SC16-infected iTG (**Figure 10 A** vs **B**), this phenomenon corresponded with trending peaks of inflammatory monocyte infiltrate in the respective iTGs at these times (**Figure 8 E**). These data suggest that, compared to single SC16 inoculation, viral sensing in the TG ipsilateral to TK_{del} inoculation is delayed, and that inflammatory chemokines in the TG are produced by, or directly involved in the recruitment of, inflammatory monocytes. In mice of the superinfection group, the SC16-superinfected iTG was characterized by reduced and delayed inflammatory monocyte burden (**Figure 8 E**), accompanied by an absence in other inflammatory immune subsets, such as macrophages, neutrophils, eosinophils (**Figure 8 E to I**). These data corroborate our previous findings on the blockade of viral replication control in SC16-superinfected iTG (Poccardi et al., 2019). In contrast, the important and persistent expression of inflammatory chemokines in

single SC16-infected iTG adds clues that lytic viral replication exacerbates the recruitment of additional inflammatory cells.

Many innate immune subsets work in concert for the control of HSV-1 (Lucinda et al., 2017). Monocytes perform inflammatory functions, and also differentiate into DC and macrophage subsets (Conrady et al., 2013; Katsumoto et al., 2014; Vogel et al., 2014; Menasria et al., 2015). NK cells recognise and lyse HSV-1-infected cells (Dai and Caligiuri, 2018), while $CD11b^{+ve}$ cells have been found to enhance the histological lesions in the cornea, and concomitantly reduce the viral replication in the TG (Chucair-Elliott et al., 2017). However, it is difficult to ascertain the real functions of immune subsets during the natural course of HSV-1 infection when their roles are assessed in animal models (e.g. corneal scarification) that do not correspond with the vast majority (>96%) of primary HSV-1 infections at the orofacial mucocutaneous tissues as observed in humans (Liesegang, 1989). Indeed, the ocular scarification route modifies experimental HSV-1 disease outcomes (Cavallero et al., 2014) and first exposes the virus to an immune privileged tissue (Knickelbein et al., 2007; Taylor and Ng, 2018; Lee et al., 2019) instead of the skin, which is a professional antiviral immune organ (Levin et al., 2015; Handfield et al., 2018). We detected neutrophils as the major population infiltrating lip tissue (**Figure 5**), and the TG soon after inoculation (**Figure 9**). In other mucocutaneous infection models, these cells were not involved in the control of the disease (Wojtasiak et al., 2010), nor in the antigen transport to the lymph nodes (Hor et al., 2017). In the ocular scarification models, neutrophils have been considered as providing inflammatory signaling (Molesworth-Kenyon et al., 2012), and promoting exacerbation of disease (Shen et al., 2013). In our experiments, neutrophil infiltrate peaked at D4 in the lip and TG, and maintained a dominance during early acute phase disease (**Figure 4, 5, 8 and 9**), while their "aged" appearance at D6 (**Figure 10 A and F**) suggests they likely remain in SC16-infected tissues until they die. Their late persistence into SC16-infected lips compared to their rapid clearance in the SC16-superinfected suggest that these cells are not associated with protection in our model.

Noteworthy, we observed an increased presence of eosinophils in HSV-1-infected lips (**Figure 4H**), and in the TGs ipsilateral to single SC16 inoculation (**Figure 8H**), concomitant

with elevated levels of CCL11 in lip and TG samples (**Figures 6 and 10**). To the best of our knowledge, the role of eosinophils in the context of HSV-1 infection has not yet been described while they are well known as major effectors in the context of allergic diseases. Clinical reports had already emphasized that allergic people may experience i) more severe course of HSK than non-allergic controls (Rezende et al., 2006; Borkar et al., 2014), and ii) severe superinfections of atopic dermatitis lesions (Ong and Leung, 2016). However, the mechanistic relationship of these association remains undeciphered (Doutlik et al., 1989). Eosinophils are also known to be involved in the anti-helminth immune reaction where they play equivocal roles (Fabre et al., 2009; Huang and Appleton, 2016), and in the pathophysiology of respiratory virus infections where they participate in innate and adaptive responses (Flores-Torres et al., 2019). Altogether eosinophils seem to be important components of anti-infectious immunity, with equivocal functions, maybe due to their multifunctionality during different inflammatory conditions (Weller and Spencer, 2017). One interesting function of eosinophils is the ability to increase neuronal axon branching without direct contact with the neuron itself (Foster et al., 2011). Thus, in the context of our experiments, eosinophils could facilitate viral cell-to-cell transmission (Carmichael et al., 2018) within the infected lip or TG under inflammatory conditions.

Dendritic cells are known to play a central role in the immune response to skin infections (Eyerich et al., 2018). Transmission of HSV-1 antigen from skin to the lymph node occurs via a relay between Langerhans cells and dermal DCs, to conventional DC1 (cDC1) (Kim et al., 2015) that prime T cell responses (Whitney et al., 2018). Globally, numbers of $CD11b^{+ve}$ DC in SC16-infected lip infection did not increase until late acute phase and into latency (**Figure 4**). However, $CD11b^{+}$ve DC numbers were increased by D2 in SC16-superinfected lips (**Figure 4 I**), and may include DCs that prime tissue-homing T cell responses (Hain et al., 2019). This suggests that a heightened level of immunosurveillance is established by D4 in mice initially infected with TK_{del}, which allows greater exposure of virus to professional antigen-presenting cells that prime HSV-1-specific adaptive T cell responses. Furthermore, both DC subsets were present during virus latency (D28) in the TGs and lips (**Figures 4 I and J, and 8 I and J**), suggesting heightened levels of immunosurveillance even after lytic viral replication has

693 stopped. We acknowledge we were unable to discriminate CD11b^{+ve} DC subsets using our
694 staining panel, which may include monocyte-derived DC, cDC2, macrophages or satellite glial
695 cells (Xu et al., 2005; van Velzen et al., 2009; Conrady et al., 2013; Segura and Amigorena,
696 2013; Hain et al., 2019). Thus, complementary experiments will necessary to further define the
697 subpopulations of CD11b^{+ve} DC and their specific roles in our model, a question that was
698 beyond the scopus of this wide range exploratory study about immune kinetics following
699 different regimen of HSV-1 inoculation.

700 T cells are major component of HSV-1 immunity. We demonstrated a ~10 to 8-fold
701 increases in the number of CD4^{+ve} and CD8^{+ve} T cells infiltrating into SC16- or TK_{del}-infected
702 lips at D4 after lip infection **(Figure 4 C and D**). Interestingly, Coles *et al.*, using a cutaneous
703 murine model of HSV-1 disease, where effector T cells, primed by DCs in the lymph node,
704 were migrating throughout the body from D4 post infection (Coles et al., 2002). The same
705 group later demonstrated that these "armed" effector T cells were able to eliminate HSV-1-
706 infected cells during the lytic replication but did not prevent viral dissemination to the sensitive
707 neuronal ganglia (van Lint et al., 2004). Noteworthy, this time point also corresponds to the
708 minimal interval needed by TK_{del} to confer protection against SC16 superinfection (Poccardi
709 et al., 2019). Due to the HSV-1 infection kinetics after single lip infection, viral replication can
710 not be prevented in the SC16-infected iTG, as long as it is already ongoing at D4 (Labetoulle
711 et al., 2003). However, as lytic viral replication starts from D6 in the contralateral TG, we
712 believe that triggering the mobilisation of HSV-1-specific effector T cells by lip infection could
713 be a major factor that protects the contralateral TG from HSV-1 thus restricting disease to
714 unilaterality. Under superinfection conditions, the antecedent TK_{del} inoculation of the lip may
715 elicit effector T cell immunosurveillance (Gebhardt et al., 2013) to place T cells as early
716 responders in the SC16-superinfected lip (**Figure 4 C and D**).

717 TK_{del} is unable to replicate in neurons due to the lack of viral thymidine kinase
718 (Efstathiou et al., 1989). However, this strain is able to penetrate the nerve endings at the site
719 of inoculation after local replication in the epithelia (where cellular thymidine kinase is
720 expressed, contrary to neurons), with subsequent persistent infection in TG neurons
721 (Efstathiou et al., 1989; Rosato and Leib, 2015), but with no possibility of reactivation (Coen et

al., 1989; Poccardi et al., 2019). We observed an obvious reduction of the inflammatory immune response in the TK_{del}-infected iTG compared to SC16-infected iTG (**Figure 8 E to I**), while similar levels of lip infiltration ocurred (**Figure 4 E to I**). Thus, this modified strain of HSV-1 appears as ideal for triggering protective immune mechanisms, while constraining lytic viral replication to the site of infection, i.e. in the lip.

It is also possible that the TK_{del} strain may be non-virulent in some immune cells that do not express cellular thymidine kinase, such as mature neutrophils, but remain susceptible to wild-type HSV-1 infection (Gill et al., 2009). If so, TK_{del} initial infection alone could modulate immune responses to HSV-1, through the potential antigen presenting abilities of these cell subsets (Takashima and Yao, 2015).

Our study provides important insights into the relationship between immune response kinetics and HSV-1 infection kinetics, according to the fitness of the viral strain and the sequence of inoculation (single versus reinfection). Based on the OO model, that mimics most of the key clinical aspects of human HSV-1-associated disease, our data help in the comprehension of the unilateral nature of the HSK in humans, and also provide arguments for the feasibility of a preventive strategy against HSV-1 ocular disease based on the use of modified HSV-1 strains as vaccinal tools. Indeed, we demonstrated changes in the local immune landscape i.e. early recruitment of lymphocytes into the primary infection site, and an absence/reduction of inflammatory cells and chemokines during acute phase of virus replication, which were associated with development or protection against disease, including reactivations from latency. The state of immunity that occurs naturally after viral inoculation into the lip could thus be exploited as the basis for a vaccine design rationale. This final objective will however require further studies to complete the characterisation of all mechanisms involved in that protection.

REFERENCES

Borkar, D.S., Gonzales, J.A., Tham, V.M., Esterberg, E., Vinoya, A.C., Parker, J.V., et al. (2014). Association between atopy and herpetic eye disease: results from the pacific ocular inflammation study. *JAMA Ophthalmol* 132(3), 326-331. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.6277.

Brazil, J.C., Quiros, M., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2019). Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. *J Clin Invest* 130. doi: 10.1172/jci124618.

Canivet, C., Uyar, O., Rheaume, C., Piret, J., and Boivin, G. (2019). The recruitment of peripheral blood leukocytes to the brain is delayed in susceptible BALB/c compared to resistant C57BL/6 mice during herpes simplex virus encephalitis. *J Neurovirol* 25(3), 372-383. doi: 10.1007/s13365-019-00730-5.

Carmichael, J.C., Yokota, H., Craven, R.C., Schmitt, A., and Wills, J.W. (2018). The HSV-1 mechanisms of cell-to-cell spread and fusion are critically dependent on host PTP1B. *PLoS Pathog* 14(5), e1007054. doi: 10.1371/journal.ppat.1007054.

Catez, F., Picard, C., Held, K., Gross, S., Rousseau, A., Theil, D., et al. (2012). HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons. *PLoS Pathog* 8(8), e1002852. doi: 10.1371/journal.ppat.1002852.

Cavallero, S., Huot, N., Francelle, L., Lomonte, P., Naas, T., and Labetoulle, M. (2014). Biological features of herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(12), 7761-7774. doi: 10.1167/iovs.14-14673.

Chucair-Elliott, A.J., Gurung, H.R., Carr, M.M., and Carr, D.J.J. (2017). Colony Stimulating Factor-1 Receptor Expressing Cells Infiltrating the Cornea Control Corneal Nerve Degeneration in Response to HSV-1 Infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(11), 4670-4682. doi: 10.1167/iovs.17-22159.

Coen, D.M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J.G., Leib, D.A., Bogard, C.L., Schaffer, P.A., et al. (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.

Cohrs, R.J., Randall, J., Smith, J., Gilden, D.H., Dabrowski, C., van Der Keyl, H., et al. (2000). Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. *J Virol* 74(24), 11464-11471. doi: 10.1128/jvi.74.24.11464-11471.2000.

Coles, R.M., Mueller, S.N., Heath, W.R., Carbone, F.R., and Brooks, A.G. (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168(2), 834-838. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.834.

Conrady, C.D., Zheng, M., Mandal, N.A., van Rooijen, N., and Carr, D.J. (2013). IFN-alpha-driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. *Mucosal Immunol* 6(1), 45-55. doi: 10.1038/mi.2012.46.

Dai, H.S., and Caligiuri, M.A. (2018). Molecular Basis for the Recognition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Human Natural Killer Cells. *Front Immunol* 9, 183. doi: 10.3389/fimmu.2018.00183.

Decman, V., Freeman, M.L., Kinchington, P.R., and Hendricks, R.L. (2005). Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunol* 18(3), 466-473. doi: 10.1089/vim.2005.18.466.

Doutlik, S., Kutinova, L., Benda, R., Kaminkova, J., Krcmar, M., Votruba, T., et al. (1989). Some immunological characteristics of subjects suffering from frequent herpes simplex virus recrudescences. *Acta Virol* 33(5), 435-446.

Efstathiou, S., Kemp, S., Darby, G., and Minson, A.C. (1989). The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. *J Gen Virol* 70 (Pt 4), 869-879. doi: 10.1099/0022-1317-70-4-869.

Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., and Biedermann, T. (2018). Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol* 39(4), 315-327. doi: 10.1016/j.it.2018.02.004.

Fabre, V., Beiting, D.P., Bliss, S.K., Gebreselassie, N.G., Gagliardo, L.F., Lee, N.A., et al. (2009). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol* 182(3), 1577-1583. doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1577.

Flores-Torres, A.S., Salinas-Carmona, M.C., Salinas, E., and Rosas-Taraco, A.G. (2019). Eosinophils and Respiratory Viruses. *Viral Immunol* 32(5), 198-207. doi: 10.1089/vim.2018.0150.

Foster, E.L., Simpson, E.L., Fredrikson, L.J., Lee, J.J., Lee, N.A., Fryer, A.D., et al. (2011). Eosinophils increase neuron branching in human and murine skin and in vitro. *PLoS One* 6(7), e22029. doi: 10.1371/journal.pone.0022029.

Gebhardt, T., Mueller, S.N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells. *Trends Immunol* 34(1), 27-32. doi: 10.1016/j.it.2012.08.008.

Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.U., Siler, D.A., et al. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40(5), 1849-1857. doi: 10.1161/strokeaha.108.534503.

Gianni, T., Leoni, V., and Campadelli-Fiume, G. (2013). Type I interferon and NF-kappaB activation elicited by herpes simplex virus gH/gL via alphavbeta3 integrin in epithelial and neuronal cell lines. *J Virol* 87(24), 13911-13916. doi: 10.1128/jvi.01894-13.

Gill, M.B., Wright, D.E., Smith, C.M., May, J.S., and Stevenson, P.G. (2009). Murid herpesvirus-4 lacking thymidine kinase reveals route-dependent requirements for host colonization. *J Gen Virol* 90(Pt 6), 1461-1470. doi: 10.1099/vir.0.010603-0.

Hain, T., Melchior, F., Kamenjarin, N., Muth, S., Weslati, H., Clausen, B.E., et al. (2019). Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. *J Invest Dermatol* 139(2), 422-429. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.022.

Handfield, C., Kwock, J., and MacLeod, A.S. (2018). Innate Antiviral Immunity in the Skin. *Trends Immunol* 39(4), 328-340. doi: 10.1016/j.it.2018.02.003.

Hill, T.J., Field, H.J., and Blyth, W.A. (1975). Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. *J.Gen.Virol.* 28(3), 341-353.

Hor, J.L., Heath, W.R., and Mueller, S.N. (2017). Neutrophils are dispensable in the modulation of T cell immunity against cutaneous HSV-1 infection. *Sci Rep* 7, 41091. doi: 10.1038/srep41091.

Huang, L., and Appleton, J.A. (2016). Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol* 32(10), 798-807. doi: 10.1016/j.pt.2016.05.004.

Iyer, A.V., Pahar, B., Chouljenko, V.N., Walker, J.D., Stanfield, B., and Kousoulas, K.G. (2013). Single dose of glycoprotein K (gK)-deleted HSV-1 live-attenuated virus protects mice against lethal vaginal challenge with HSV-1 and HSV-2 and induces lasting T cell memory immune responses. *Virol J* 10, 317. doi: 10.1186/1743-422X-10-317.

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

Kaswin, G., Rousseau, A., M'Garrech, M., Barreau, E., Pogorzalek, N., De Monchy, I., et al. (2013). Optical aberrations in patients with recurrent herpes simplex keratitis and apparently normal vision. *Br J Ophthalmol* 97(9), 1113-1117. doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-302294.

Katsumoto, A., Lu, H., Miranda, A.S., and Ransohoff, R.M. (2014). Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *J Immunol* 193(6), 2615-2621. doi: 10.4049/jimmunol.1400716.

Kaye, S., and Choudhary, A. (2006). Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 25(4), 355-380. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.001.

Kim, M., Truong, N.R., James, V., Bosnjak, L., Sandgren, K.J., Harman, A.N., et al. (2015). Relay of herpes simplex virus between Langerhans cells and dermal dendritic cells in human skin. *PLoS Pathog* 11(4), e1004812. doi: 10.1371/journal.ppat.1004812.

Knickelbein, J.E., Divito, S., and Hendricks, R.L. (2007). Modulation of CD8+ CTL effector function by fibroblasts derived from the immunoprivileged cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(5), 2194-2202. doi: 10.1167/iovs.06-1321.

Labetoulle, M., Auquier, P., Conrad, H., Crochard, A., Daniloski, M., Bouee, S., et al. (2005). Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. *Ophthalmology* 112(5), 888-895. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.11.052.

Labetoulle, M., Kucera, P., Ugolini, G., Lafay, F., Frau, E., Offret, H., et al. (2000a). Neuronal pathways for the propagation of herpes simplex virus type 1 from one retina to the other in a murine model. *J Gen Virol* 81(Pt 5), 1201-1210.

Labetoulle, M., Kucera, P., Ugolini, G., Lafay, F., Frau, E., Offret, H., et al. (2000b). Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 41(9), 2600-2606.

Labetoulle, M., Kucera, P., Ugolini, G., Lafay, F., Frau, E., Offret, H., et al. (2000c). Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(9), 2600-2606.

Labetoulle, M., Maillet, S., Efstathiou, S., Dezelee, S., Frau, E., and Lafay, F. (2003). HSV1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1), 217-225.

Lee, D.H., and Ghiasi, H. (2017). Roles of M1 and M2 Macrophages in Herpes Simplex Virus 1 Infectivity. *J Virol* 91(15). doi: 10.1128/jvi.00578-17.

Lee, D.H., Jaggi, U., and Ghiasi, H. (2019). CCR2+ migratory macrophages with M1 status are the early-responders in the cornea of HSV-1 infected mice. *PLoS One* 14(4), e0215727. doi: 10.1371/journal.pone.0215727.

Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., et al. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J Exp Med* 206(2), 359-370. doi: 10.1084/jem.20080601.

Legroux, L., Pittet, C.L., Beauseigle, D., Deblois, G., Prat, A., and Arbour, N. (2015). An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J Neurosci Methods* 247, 23-31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.021.

Levin, C., Perrin, H., and Combadiere, B. (2015). Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum Vaccin Immunother* 11(1), 27-36. doi: 10.4161/hv.34299.

Liesegang, T.J. (1989). Epidemiology of ocular herpes simplex. Natural history in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch Ophthalmol* 107(8), 1160-1165.

Lucinda, N., Figueiredo, M.M., Pessoa, N.L., Santos, B.S., Lima, G.K., Freitas, A.M., et al. (2017). Dendritic cells, macrophages, NK and CD8(+) T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virol J* 14(1), 37. doi: 10.1186/s12985-017-0692-x.

M'Garrech, M., Rousseau, A., Kaswin, G., Sauer, A., Barreau, E., Bourcier, T., et al. (2013). Impairment of lacrimal secretion in the unaffected fellow eye of patients with recurrent unilateral herpetic keratitis. *Ophthalmology* 120(10), 1959-1967. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.02.037

S0161-6420(13)00215-7 [pii].

Maillet, S., Naas, T., Crepin, S., Roque-Afonso, A.M., Lafay, F., Efstathiou, S., et al. (2006). Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. *J Virol* 80(18), 9310-9321. doi: 10.1128/JVI.02615-05.

Maroui, M.A., Calle, A., Cohen, C., Streichenberger, N., Texier, P., Takissian, J., et al. (2016). Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment. *PLoS Pathog* 12(9), e1005834. doi: 10.1371/journal.ppat.1005834.

Marques, C.P., Hu, S., Sheng, W., and Lokensgard, J.R. (2006). Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res* 121(1), 1-10. doi: 10.1016/j.virusres.2006.03.009.

Megjugorac, N.J., Young, H.A., Amrute, S.B., Olshalsky, S.L., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 75(3), 504-514. doi: 10.1189/jlb.0603291.

Melchjorsen, J. (2012). Sensing herpes: more than toll. *Rev Med Virol* 22(2), 106-121. doi: 10.1002/rmv.716.

Menasria, R., Canivet, C., Piret, J., and Boivin, G. (2015). Infiltration Pattern of Blood Monocytes into the Central Nervous System during Experimental Herpes Simplex Virus Encephalitis. *PLoS One* 10(12), e0145773. doi: 10.1371/journal.pone.0145773.

Molesworth-Kenyon, S.J., Milam, A., Rockette, A., Troupe, A., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (2015). Expression, Inducers and Cellular Sources of the Chemokine MIG (CXCL 9), During Primary Herpes Simplex Virus Type-1 Infection of the Cornea. *Curr Eye Res* 40(8), 800-808. doi: 10.3109/02713683.2014.957779.

Molesworth-Kenyon, S.J., Popham, N., Milam, A., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (2012). Resident Corneal Cells Communicate with Neutrophils Leading to the Production of IP-10 during the Primary Inflammatory Response to HSV-1 Infection. *Int J Inflam* 2012, 810359. doi: 10.1155/2012/810359.

Motani, H., Sakurada, K., Ikegaya, H., Akutsu, T., Hayakawa, M., Sato, Y., et al. (2006). Detection of herpes simplex virus type 1 DNA in bilateral human trigeminal ganglia and optic nerves by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 78(12), 1584-1587. doi: 10.1002/jmv.20742.

Ong, P.Y., and Leung, D.Y. (2016). Bacterial and Viral Infections in Atopic Dermatitis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 51(3), 329-337. doi: 10.1007/s12016-016-8548-5.

Poccardi, N., Rousseau, A., Haigh, O., Takissian, J., Deback, C., Trouillaud, L., et al. (2019). The kinetics of primary herpetic infection in ipsilateral and contralateral TGs determine the nature of HSV-1 acute infection and reactivation. *submitted*.

RDC, T. (2011). "R: A Language and Environment for Statistical Computing". Austria: R Foundation for Statistical Computing).

Reynaud, C., Rousseau, A., Kaswin, G., M'Garrech, M., Barreau, E., and Labetoulle, M. (2017). Persistent Impairment of Quality of Life in Patients with Herpes Simplex Keratitis. *Ophthalmology* 124(2), 160-169. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.10.001.

Rezende, R.A., Bisol, T., Hammersmith, K., Rapuano, C.J., Lima, A.L., Webster, G.F., et al. (2006). Efficacy of oral antiviral prophylaxis in preventing ocular herpes simplex virus recurrences in patients with and without self-reported atopy. *Am J Ophthalmol* 142(4), 563-567. doi: 10.1016/j.ajo.2006.05.025.

Richter, E.R., Dias, J.K., Gilbert, J.E., 2nd, and Atherton, S.S. (2009). Distribution of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus in ganglia of the human head and neck. *J Infect Dis* 200(12), 1901-1906. doi: 10.1086/648474.

Rosato, P.C., and Leib, D.A. (2015). Neurons versus herpes simplex virus: the innate immune interactions that contribute to a host-pathogen standoff. *Future Virol* 10(6), 699-714. doi: 10.2217/fvl.15.45.

Rousseau, A., Boutolleau, D., Titier, K., Bourcier, T., Chiquet, C., Weber, M., et al. (2017). Recurrent herpetic keratitis despite antiviral prophylaxis: A virological and pharmacological study. *Antiviral Res* 146, 205-212. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.09.013.

Royer, D.J., Gurung, H.R., Jinkins, J.K., Geltz, J.J., Wu, J.L., Halford, W.P., et al. (2016). A Highly Efficacious Herpes Simplex Virus 1 Vaccine Blocks Viral Pathogenesis and Prevents Corneal Immunopathology via Humoral Immunity. *J Virol* 90(11), 5514-5529. doi: 10.1128/jvi.00517-16.

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 34(9), 440-445. doi: 10.1016/j.it.2013.06.001.

Shen, F.H., Wang, S.W., Yeh, T.M., Tung, Y.Y., Hsu, S.M., and Chen, S.H. (2013). Absence of CXCL10 aggravates herpes stromal keratitis with reduced primary neutrophil influx in mice. *J Virol* 87(15), 8502-8510. doi: 10.1128/jvi.01198-13.

Smith, G.A., Gross, S.P., and Enquist, L.W. (2001). Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6), 3466-3470. doi: 10.1073/pnas.061029798.

Soby, S., Laursen, R.R., Ostergaard, L., and Melchjorsen, J. (2012). HSV-1-induced chemokine expression via IFI16-dependent and IFI16-independent pathways in human monocyte-derived macrophages. *Herpesviridae* 3(1), 6. doi: 10.1186/2042-4280-3-6.

Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(5). doi: 10.1101/cshperspect.a016303.

Takashima, A., and Yao, Y. (2015). Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol* 98(4), 489-496. doi: 10.1189/jlb.1MR1014-502R.

Taylor, A.W., and Ng, T.F. (2018). Negative regulators that mediate ocular immune privilege. *J Leukoc Biol*. doi: 10.1002/jlb.3mir0817-337r.

Tumpey, T.M., Cheng, H., Yan, X.T., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (1998). Chemokine synthesis in the HSV-1-infected cornea and its suppression by interleukin-10. *J Leukoc Biol* 63(4), 486-492. doi: 10.1002/jlb.63.4.486.

van Lint, A., Ayers, M., Brooks, A.G., Coles, R.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2004). Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *J Immunol* 172(1), 392-397. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.392.

van Velzen, M., Jing, L., Osterhaus, A.D., Sette, A., Koelle, D.M., and Verjans, G.M. (2013a). 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. doi: 10.1371/journal.ppat.1003547.

van Velzen, M., Laman, J.D., Kleinjan, A., Poot, A., Osterhaus, A.D., and Verjans, G.M. (2009). Neuron-interacting satellite glial cells in human trigeminal ganglia have an APC phenotype. *J Immunol* 183(4), 2456-2461. doi: 10.4049/jimmunol.0900890.

van Velzen, M., van de Vijver, D.A., van Loenen, F.B., Osterhaus, A.D., Remeijer, L., and Verjans, G.M. (2013b). Acyclovir prophylaxis predisposes to antiviral-resistant recurrent herpetic keratitis. *J Infect Dis* 208(9), 1359-1365. doi: 10.1093/infdis/jit350.

Vogel, K., Thomann, S., Vogel, B., Schuster, P., and Schmidt, B. (2014). Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. *Immunology* 143(4), 588-600. doi: 10.1111/imm.12337.

Weller, P.F., and Spencer, L.A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* 17(12), 746-760. doi: 10.1038/nri.2017.95.

Whitney, P.G., Makhlouf, C., MacLeod, B., Ma, J.Z., Gressier, E., Greyer, M., et al. (2018). Effective Priming of Herpes Simplex Virus-Specific CD8(+) T Cells In Vivo Does Not Require Infected Dendritic Cells. *J Virol* 92(3). doi: 10.1128/jvi.01508-17.

Wilhelmus, K.R., Beck, R.W., Moke, P.S., Dawson, C.R., Barron, B.A., Jones, D.B., et al. (1998). Acyclovir for the prevention of recurrent herpes simplex virus eye disease. Herpetic Eye Disease Study Group. *N Engl J Med* 339(5), 300-306. doi: 10.1056/nejm199807303390503.

Wojtasiak, M., Pickett, D.L., Tate, M.D., Londrigan, S.L., Bedoui, S., Brooks, A.G., et al. (2010). Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. *J Gen Virol* 91(Pt 9), 2158-2166. doi: 10.1099/vir.0.021915-0.

Xu, H., Manivannan, A., Dawson, R., Crane, I.J., Mack, M., Sharp, P., et al. (2005). Differentiation to the CCR2+ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. *J Immunol* 175(10), 6915-6923. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6915.

Young, R.C., Hodge, D.O., Liesegang, T.J., and Baratz, K.H. (2010). Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976-2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol* 128(9), 1178-1183. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.187.

Yu, Y.R., O'Koren, E.G., Hotten, D.F., Kan, M.J., Kopin, D., Nelson, E.R., et al. (2016). A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. *PLoS One* 11(3), e0150606. doi: 10.1371/journal.pone.0150606.

Titre : Cinétique des effecteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le virus HSV-1 après primo-infection par une autre souche non neurovirulente : vers un modèle vaccinal.

Mots clés : HSV-1, Immunité, protection, infiltrat immunitaire, chémokines

Résumé : Chez l'homme, la primo-infection par le vírus Herpès simplex de type 1 (HSV-1) a lieu au niveau de la muqueuse oro-pharyngée. Après une phase de réplication, les virions pénètrent les terminaisons axonales et migrent vers le ganglion trijumeau ipsilatéral (TG), puis vers le TG controlatéral. Le virus entre alors dans un état de latence dans les 2 TG. Les réactivations d'HSV-1 dans ces neurones sont responsables des kératites herpétiques (KH), unilatérales et survenant toujours du même côté chez un patient donné.
En utilisant un modèle murin oro-oculaire, qui reproduit les aspects essentiels de la maladie chez l'homme, nous avons précédemment démontré que l'inoculation virale latéralisée d'un côté de la bouche entraine une réplication virale dans la lèvre, suivie d'une KH ipsilatérale à l'inoculation 6 jours plus tard. De manière concomitante, le virus se propage aux 2 TG, mais les réactivations ne surviennent que du côté ipsilatéral à l'inoculation. Nous avons également observé qu'après une primo-infection dans une lèvre avec une souche d'HSV-1 non-neurovirulente, les souris étaient protégées contre les signes de la maladie et contre la réactivation d'une souche sauvage pleinement virulente inoculée secondairement dans l'autre lèvre (souche ré-infectante). Afin de comprendre les mécanismes immunitaires en jeu dans cet état de protection, nous avons combiné une analyse en cytométrie en flux multiparamétrique à des tests immunologiques, pour quantifier et définir l'infiltrat immunitaire hématopoïétique et les chémokines inflammatoires au site d'inoculation et dans les TG. Nous avons démontré qu'après une inoculation unique avec la souche sauvage virulente, un infiltrat immun riche en cellules pro-inflammatoires, survenaient de manière retardée dans les lèvres inoculées, et persistaient dans les TG. A l'opposé, l'infiltrat immunitaire était plus précoce dans les tissus réinfectés (après une primo-infection par la souche non neurovirulente), plus riche en cellules de l'immunité adaptative, et associé à des concentrations moindres de chémokines inflammatoires. En outre, cet infiltrat s'estompait plus rapidement, avec une disparition concomitante des chémokines inflammatoires. Ces données permettent de mieux comprendre la nature et la cinétique de la réponse immunitaire anti-HSV-1, et pourront être utiles pour le développement futur de stratégies vaccinales anti-HSV-1.

Title: Kinetics of immune effectors involved in protection against HSV-1 after a primary infection by a non-virulent strain: toward a vaccinal model.

Keywords: HSV-1, immunity, protection, immune infiltrate, chemokines

Summary: In humans, Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), primary infection occurs in the oral mucocutaneous tissues. Virions replicated here penetrate sensitive neuronal axons, migrate to both trigeminal ganglion (TG) where it established a lifelong latency. Reactivations of HSV-1 in the TG neurons induce clinical recurrences in the connected peripheral tissues. This process is involved in herpes simplex keratitis (HSK), a condition that, strikingly, occurs almost exclusively in the same eye for a given patient. Based on an experimental oro-ocular (OO) model of HSV-1 infection, that recapitulates most of these human clinical features, we previously demonstrated that a virus inoculation on one side of the mouth, leads to viral replication in the lip, followed by HSK. Virus concomitantly disseminates to both TG, but reactivation only occurs in the TG ipsilateral to the inoculation site. We also observed that after a primary inoculation with a non-neurovirulent strain of HSV-1 in one lip, mice are protected against both acute phase disease and reactivation after a superinfection with a fully virulent wild-type strain of HSV-1 in the contralateral lip.
In order to understand the underlying mechanisms involved in this state of protection, we combined high resolution flow cytometry and bead-based immunoassays, to quantify hematopoietic subsets and inflammatory chemokines in the site of inoculation and in the TG. We demonstrated that after a single inoculation with the wild-type strain, a delayed immune infiltrate, boasting more proinflammatory subsets, occurred in the lip and persisted in the TG. In contrast, the immune infiltrate occurred earlier in the superinfected lip and ipsilateral TG, with less inflammatory chemokines but more adaptive immune subsets. Moreover, cellular infiltrate resolved faster, correlating with nullification of inflammatory chemokines locally. These data show that immune response kinetics influence the development of natural immunity to HSV-1, and can be harnessed to protect against disease and reactivations.