



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la réponse locale à l'infection conjonctivale à *Chlamydia trachomatis* aiguë et chronique

Elodie Paulet

► **To cite this version:**

Elodie Paulet. Caractérisation de la réponse locale à l'infection conjonctivale à *Chlamydia trachomatis* aiguë et chronique. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ057 . tel-04662307

**HAL Id: tel-04662307**

**<https://theses.hal.science/tel-04662307v1>**

Submitted on 25 Jul 2024

**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.

# Caractérisation de la réponse locale à l'infection conjonctivale à *Chlamydia trachomatis* aiguë et chronique

*Characterization of local response to Chlamydia trachomatis acute and chronic conjunctival infection*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (IFTA)  
Spécialité de doctorat : Microbiologie  
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'unité mixte de recherche **IDMIT** (Infectious Diseases Models for Innovative Therapies, U1184/ImVa-HB, Université Paris-Saclay, CEA, Inserm), sous la co-direction de **Marc LABETOULLE**, PUPH Université Paris-Saclay, APHP, et la co-direction d'**Antoine ROUSSEAU**, PUPH Université Paris-Saclay, APHP

Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 17 novembre 2023, par

**Elodie PAULET**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Claire JANOIR-JOUVESHOMME**

Professeure, Université Paris-Saclay

Présidente

**Alexandre DENOYER**

PU-PH, Université de Reims

Rapporteur & Examineur

**Agathe SUBTIL**

Directrice de Recherche, Sorbonne Université

Rapporteur & Examinatrice

**Titre :** Caractérisation de la réponse locale à l'infection conjonctivale à *Chlamydia trachomatis* aiguë et chronique

**Mots clés :** Conjunctivite, Trachome, *Chlamydia trachomatis*, Inflammation muqueuse, Réponse immunitaire

**Résumé :** Le trachome est une kératoconjunctivite bactérienne due à *Chlamydia trachomatis*. Malgré de vastes campagnes d'éradication le trachome reste l'une des principales causes de cécité d'origine infectieuse dans les pays en développement, et aucun vaccin efficace n'a encore été développé. Cette maladie évolue en deux phases : une phase aiguë causée par des infections bactériennes récurrentes, suivie d'une phase chronique qui entraîne des lésions de fibrose conjonctivale responsables de déformations palpébrales (entropion-trichiasis) et d'opacifications cornéennes. Cette étude vise à caractériser la cinétique de l'infection (immunitaire, clinique et histologique) dans deux modèles primates (macaques cynomolgus) reproduisant les phases aiguë et chronique du trachome. Les expositions conjonctivales à la souche B/Tunis-864 de *Chlamydia trachomatis* ont été réalisées de manière unique (modèle d'infection aiguë) ou itérative hebdomadaire pendant 11 semaines (modèle d'infection chronique). Dans les deux cas, les animaux ont été soumis à une réexposition tardive et un suivi longitudinal. Les signes cliniques ont été évalués par 3 observateurs masqués sur des photos standardisées en utilisant une échelle de cotation spécifique de l'inflammation et des follicules conjonctivaux. La charge bactérienne a été monitorée par qPCR. La réaction

immunitaire locale a été étudiée par cytométrie multiparamétrique des cellules recueillies sur les empreintes conjonctivales, ainsi que le suivi des cytokines lacrymales et des immunoglobulines lacrymales spécifiques. L'évolution du microbiote oculaire a été évaluée par séquençage des régions V3-V4 de l'ARN 16S extrait d'écouillons conjonctivaux. Enfin une analyse histologique a été réalisée sur des biopsies conjonctivales en fin d'étude.

Le suivi longitudinal de ces modèles a mis en évidence une reproduction fidèle de l'histoire naturelle chez l'homme (conjunctivite folliculaire mais également fibrose conjonctivale). La caractérisation multiparamétrique de ces deux modèles a retrouvé un influx de lymphocytes T conjonctivaux avec des cytokines anti-inflammatoires lors de la phase aiguë et une majorité de monocytes et de cytokines pro-inflammatoires lors de la phase chronique associées à l'apparition de fibrose conjonctivale. L'exposition bactérienne ainsi que le traitement antibiotique ont causé une dysbiose conjonctivale pérenne.

L'amélioration de nos connaissances de la physiopathologie du trachome, via la caractérisation de ces modèles, est un pas en avant vers la mise au point d'une stratégie vaccinale ou thérapeutique visant à éradiquer définitivement la cécité trachomateuse.

**Title:** Characterization of local response to *Chlamydia trachomatis* acute and chronic conjunctival infection

**Keywords:** Conjunctivitis, Trachoma, *Chlamydia trachomatis*, Mucosal inflammation, Immune response

**Abstract:** Trachoma, a bacterial keratoconjunctivitis caused by *Chlamydia trachomatis*, continues to be a prominent cause of blindness resulting from infectious diseases in developing nations, despite extensive treatment initiatives. Currently, there is no efficient vaccine available for this condition. The disease progresses in two phases: an acute phase resulting from recurrent bacterial infections, and a chronic phase, which leads to conjunctival scarring, lid malposition, and corneal opacification. This study aims to characterize the kinetics of infection (immune, clinical, and histological) in two primate models of *Chlamydia trachomatis* infection: acute and chronic. Cynomolgus macaque models were exposed to the B/Tunis-864 strain of *Chlamydia trachomatis* either with a single exposure or weekly exposures for 11 weeks. Both models were then re-exposed and followed longitudinally. Clinical signs were assessed using standardized images by three masked observers who employed a specific scoring system for evaluating conjunctival inflammation and follicles. Bacterial load was tracked using qPCR. Local immune responses were examined through multiparametric flow

cytometry on cells eluted from conjunctival imprints, as well as monitoring of lacrimal cytokine and immunoglobulins quantifications. Changes in conjunctival microbiota were analyzed by sequencing the 16S rRNA V3-V4 regions extracted from conjunctival swabs. Lastly, histological analysis was conducted on conjunctival biopsies at the end of the study.

Clinical follow-up demonstrated a faithful replication of the clinical history observed in humans, including follicular conjunctivitis and conjunctival fibrosis. Multi-parametric immunological assays revealed an early influx of T lymphocytes associated with anti-inflammatory cytokines during the acute phase, followed by a predominance of monocytes and pro-inflammatory cytokines during the chronic phase, which was associated with conjunctival fibrosis.

Enhancing our understanding of trachoma's pathophysiology through the characterization of these models is a promising step towards the development of vaccines and effective therapeutic strategies aimed at eliminating the burden of blinding trachoma.

L'organisme d'accueil pour ce travail de thèse est l'unité mixte de recherche IDMIT (U1184/ImVa, CEA, Université Paris-Saclay, Inserm), sur le site du CEA Fontenay-aux-Roses.



Le travail présenté dans ce manuscrit a été soutenu financièrement par la Fondation Théa et s'est inscrit dans le projet européen TracVac.



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus sincères remerciements à tous les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter mon invitation.

Un très grand merci à mes deux rapporteurs la docteure Agathe Subtil et le professeur Alexandre Denoyer d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci de m'avoir accordé votre temps ainsi que votre expertise. Vos domaines d'expertises complémentaires respectivement sur *Chlamydia trachomatis* et sur l'immunologie de la surface oculaire et leur maladie sont un atout majeur dans l'analyse du travail présenté ici. Je tiens à vous assurer de ma reconnaissance pour vos retours et commentaires.

Je remercie très vivement la professeure Claire Janoir-Jouveshomme d'avoir accepté de présider ce jury. Votre qualité de professeure en microbiologie ainsi que votre expertise du microbiote sont un ajout essentiel dans l'évaluation de ce travail.

Je tiens enfin à remercier le professeur Serge Resnikoff d'avoir accepté de participer à ce jury. Votre présence en tant qu'examineur amène un éclairage tout particulier. Je tiens à vous remercier de nous apporter vos retours en tant qu'expert internationalement reconnu du trachome et des programmes de lutte pour l'éradication de cette maladie, en particulier dans le cadre de vos fonctions à l'OMS.

Je remercie également mes deux directeurs de thèse, le professeur Marc Labetoulle et le professeur Antoine Rousseau de m'avoir offert cette opportunité de travailler dans cette belle unité de recherche. Votre expertise conjointe de l'œil et plus particulièrement de la surface oculaire m'a permis d'appréhender ce nouveau domaine d'étude. Un merci tout particulier à Antoine pour ton encadrement et le temps que tu as accordé aux sessions de scoring, et nombreuses corrections de ce manuscrit.

Je veux aussi remercier chaleureusement Roger Le Grand de m'avoir accueilli dans son unité de recherche et permis ainsi de travailler dans cet environnement stimulant et enrichissant.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à la Fondation Théa, créée et soutenue par Henri Chibret, relayé désormais par Jean-Frédéric Chibret. Pleinement investie dans la lutte contre les maladies cécitantes, et en particulier contre le trachome, cette Fondation a permis à ma thèse d'avoir lieu et d'être menée à son terme grâce à son soutien financier. Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement Didier Renault, qui a suivi avec attention le déroulement de ce projet.

Après toutes ces années il est venu le temps de remercier toutes les personnes sans qui je n'aurais pu arriver jusqu'ici. Que nos chemins se soient croisés dans les derniers mois, les dernières années ou depuis si longtemps que l'on a arrêté de compter, je tiens à remercier toutes ces personnes qui me sont chères et m'ont aidé et accompagné dans mon parcours. L'exercice périlleux de n'oublier personne (et de ne faire aucune faute d'orthographe) sera sans nul doute raté, mais je vais faire de mon mieux pour que mes mots puissent exprimer toute la gratitude que je ressens pour chacun·e d'entre vous.

À Anne-Sophie Gallouët, merci pour tout ton soutien qu'il ait été scientifique ou personnel, tu as été (et es toujours) la présence au laboratoire qui m'a permis d'avancer autant dans les expériences de cytométrie que dans mon cheminement de jeune scientifique. J'espère avoir l'occasion un jour de retravailler avec toi, mais j'espère encore plus réussir à maintenir ce lien qui nous unis et qui m'est cher, merci pour tout

À Romain Marlin, merci pour ta bonne humeur chaotique, et bien évidemment merci pour tes conseils avisés et ton aide précieuse, j'espère que je pourrais encore compter sur le service « RM Consulting » même une fois partie d'IDMIT

À Quentin Pascal, merci pour ton aide dans mes aventures histologiques et plus généralement dans ma thèse, merci pour la découverte de Ker Beer (évidemment) et d'avoir partagée avec moi autant ta passion pour les immuno-fluos que pour les bars aux sols qui collent

À Vanessa Contreras, merci pour tes conseils et pour m'avoir guidé dans l'écriture de mon tout premier papier

À Mathilde Galhaut, merci de ton aide dans mes premiers pas d'apprentie DE, et plus généralement pour tout ton travail sur ce beau projet TracVac, travailler en binôme avec toi a été un vrai plaisir

À toute l'équipe L3i, merci pour tous ces midis, merci d'avoir fait de moi une membre honorifique de votre équipe, votre soutien et votre aide au quotidien ont été une ressource précieuse. Aux membres présents et passés de l'équipe, Céline, Thibaut, Fiby, Amir, Blanche, Katia, Anaïs, et Tatiana merci pour les moments partagés

À Sophie, merci pour ton soutien et tes râleries toujours divertissantes, merci (je crois) de toujours me convaincre d'acheter plus de vernis

À Camille L., merci pour ta gentillesse et ta patience envers mes blagues, tu es le meilleur des publics pour même les moins drôles des boutades et c'est toujours un plaisir de passer du temps en labo (et ailleurs) avec toi

À Camille M., Mab', merci d'avoir été la source la plus drôle d'histoires abracadabrantiques avec tes colloques étranges, vivement le prochain restau pour le prochain épisode du feuilleton qu'est ta vie

À Lucie, merci pour ta présence bienveillante pendant ton année à nos côtés, je te souhaite toute la réussite dans tes pérégrinations littéraires, et j'ai hâte de pouvoir trouver ton nom en librairie

À Eléana, merci pour ton rire qui égaille même la plus sombre des journées, tu es vraiment une personne (très) chouette (et) rayonnante

À l'équipe du CRB, Elodie, Julien D., Bob et Alexis, merci pour les moments partagés, en pause du midi mais aussi en L3 où vous avez rendu un lieu peu chaleureux plus facile à vivre. Merci également pour votre tout votre travail sur le projet TracVac

À l'équipe L2i, et plus particulièrement à Laetitia, Julie M., Laura et Nathalie, merci pour tout votre travail sur les expériences de qPCR et de Luminex

À l'équipe LFC, et plus particulièrement Mario et Weasley, merci de m'avoir formé en cytométrie, et d'avoir toujours réussi à réparer les accidents fortuits de tuyauterie

À l'équipe ASW, merci pour votre travail au quotidien auprès des animaux et d'avoir été toujours présent·e·s pour répondre à mes (nombreuses) questions et un merci tout particulier aux personnes qui ont été les plus impliquées dans le projet TracVac : Francis, Sébastien, Maxime et Quentin

À l'équipe Life&Soft, et plus particulièrement Natalia, Arthi, Ségolène et Cassandra, merci pour votre aide précieuse. Vous m'avez permis de m'initier aux joies du séquençage et au monde passionnant du microbiote

À l'équipe HSS, Yann, Sébastien et Alicia, merci pour votre aide précieuse et merci de rendre notre travail plus sûr

À Sylvie pour toutes ces discussions, je te souhaite de trouver tout le bonheur que tu souhaites à ceux qui t'entourent

À Natalia, merci pour tes précieux conseils et ta bonne humeur rayonnante, je vous souhaite à toutes les trois une vie remplie de soleil et de joie dont j'espère être le témoin encore longtemps

Aux collègues de pauses cafés et sorties en tout genre, Andréa, Mohit, Candie, Julien L., Julie T., nos interactions ont rendu ces années bien agréables à vivre, merci à tou·te·s

À tou-te-s les doctorant-e-s et post-doc' d'IDMIT, Flora, Stanley, Vincent, Julie, Gaëlle, Camille P., Nadia, merci pour tous nos échanges, que ce soit en labo, devant un café ou pendant le secret santa, c'était un plaisir de travailler à vos côtés

To Krishna, thank you for your support in those hard last months, it's always an absolute pleasure to discuss with you and I hope we'll get to do it again even when I'm gone

To Sonia, thank you for your kindness and your support, it's always a pleasure to work alongside with you and catch up in the lab or in the office, I can't wait to come and see you in Porto

À Alexandra et Alexa, merci pour toutes ces discussions passionnantes que ce soit sur l'éthique, l'écologie, ou encore les podcasts, c'est toujours un plaisir de papoter même si on n'a jamais assez de temps pour finir nos discussions. J'aurai aimé être là pour voir la suite de cette belle aventure du laboratoire en transition, et j'ai hâte de voir tout ce que vous arriverez à mettre en place !

À Camille F., merci pour ta présence énergisante et ton soutien, et même si ce n'était finalement pas pour moi que tu venais, c'était toujours un plaisir de te voir débarquer que ce soit pour un thé, pour papoter ou pour râler

À Florian M., merci pour ton soutien pendant ces années (pas toujours facile) de thèse. Cette aventure n'aurait sans aucun doute pas été la même sans toi. Et même si tes efforts pour transformer notre bureau en jungle de bambou ne vont pas me manquer, nos discussions quotidiennes vont, elles, bien me manquer. Je suis arrivée avec un collègue et je repars avec un ami, merci pour tout

À Justina, merci pour ton soutien et ta bonne humeur, nos discussions de voyage, de cuisine et sur la vie en général me manquent déjà et même si ne plus partager un bureau rend nos rencontres plus distantes, j'attends chacune avec impatience

À Noémie, partage de bureau, partage d'équipe, merci d'avoir partagé cette aventure avec moi, et quelle aventure ce fût, je te souhaite de trouver ta voie et toute la confiance en toi que tu mérites, et j'espère être encore à tes côtés pour voir ces prochaines étapes qui t'attendent de l'autre côté du miroir

To Nina, thank you for all the great moments and discussions we shared during your (unfortunately too short of a) stay with us, I hope I can one day come to visit your wonderful country (I'll just have to avoid the licorice candy)

À Juliette, merci d'avoir ramené ton enthousiasme scientifique dans notre bureau de fin de thésards, c'était un plaisir de te côtoyer pendant ces (trop courts) mois. Et même si je ne serai plus sur place, j'ai hâte de te voir t'épanouir dans ton nouveau rôle de thésarde et brillamment réussir toute cette belle aventure



À tous les membres passés du formidable bureau 308, partager cette pièce et ces moments à vos côtés était un plaisir

À mes estimés collègues d'IDMIT, technicien·ne·s, ingénieur·e·s, chercheur·se·s, toutes nos interactions ont forgé le bébé chercheuse que j'aspire à devenir, merci pour tout

À l'équipe ComSciCon France, et tout particulièrement à Antoine, Arthur, Guglielmo et Roberta, merci pour les heures interminables de réunion, l'aventure ComSciCon est loin d'être finie, mais elle m'a déjà tant apporté que ce soit en formation à la vulgarisation mais aussi en rencontre de gens passionnés. Je n'aurai pas pu rêver une meilleure introduction au monde de la vulga' !

À tou·te·s les professeur·e·s, enseignant·e·s, encadrant·e·s et autres mentor·e·s qui m'ont donné l'envie de continuer d'apprendre et m'ont permis de trouver ma voie, tou·te·s vous nommer serait impossible mais je suis reconnaissante envers chacun·e d'entre vous.

À Florian G., les années passent et le lien reste, que la maternelle et les infinies salades de mâche sont loin, merci d'être la belle personne que tu es, je sais que quoi que tu entreprennes tu le réussiras et j'espère être encore à tes côtés pour toutes tes prochaines aventures (un jour peut-être l'Amérique du Sud...)

À Narimane, mon coupain, les mots sont faibles pour exprimer toute la reconnaissance que j'ai pour notre amitié qui m'a porté et me porte encore chaque jour. Je ne serai pas celle que je suis sans toi dans ma vie, depuis les balades de mamies entre deux cours, aux discussions infinies à n'importe quelle heure dans la twingo du bonheur, les soirées, les cours, le soggy, la plaine, les déter' qui n'ont aucun sens, bref merci d'être toi, merci d'être là, merci tout simplement

À Charlène, le temps ne paraît jamais long lorsqu'on est bien accompagné, et bon sang que je suis bien accompagnée, merci pour cette amitié qui dure malgré l'épreuve du temps et du passage à l'âge adulte, je suis continuellement ravie que l'on soit devenu des adultes semblables, merci pour tout

À Marie, même avec les années je ne sais jamais quelle sera la prochaine étape de ta vie, merci d'être cette même fille imprévisible et incroyablement exubérante que tu étais déjà quand tu refusais de couper ton étiquette de manteau juste par esprit de contradiction, merci d'être là

À Anaïs, ma biche, merci pour tous ces moments partagés, ces discussions interminables, depuis ton studio, à St Roumain et maintenant Dijon, merci pour ton

soutien et ton amitié qui m'est chère, je ne doutais pas que tu deviendrais une femme aussi chouette que tu l'es devenu mais c'est tout de même un vrai plaisir d'en être le témoin privilégié pendant, je l'espère, encore de nombreuses années

À Marlène, je sais que tu n'es pas à l'aise avec les mots d'affection, alors je ferais simple et efficace, merci d'être là année après année, je suis toujours heureuse que l'on se retrouve que ce soit pour un barbecue d'anniversaire, un congrès parisien ou une soirée random. J'espère que tu sais à quel point ton amitié et ton soutien comptent pour moi

À Matthieu, merci pour les heures sans fin passées dans ton appart entre deux cours, ces longues années de fac n'auraient pas été les mêmes sans toi. Et même si l'on ne peut plus se retrouver tous les deux soirs au soggy ou au BXL, j'attendrais toujours la prochaine revoyure avec impatience

Aux personnes qui nous ont rejoint en chemin, Pierre, Nihad, Clémence, et Thiphaine, merci pour tous ces moments partagés et surtout merci de rendre les personnes que j'aime heureuses

À Léna, merci d'être toujours présente dans ma vie que ce soit de l'autre côté d'un océan ou de l'autre côté de Paris. Merci pour ton soutien et ton amitié pendant toutes ces années

À mes amis québécois, et particulièrement à Charles-David et Alice, merci d'avoir été ma famille loin de mon pays, vous revoir est toujours un plaisir renouvelé

À Sarah, merci d'avoir été mon binôme de master, l'aventure lyonnaise n'aurait pas été la même sans toi à mes côtés, sans nos soirées (vin et) révision, et nos discussions sans fin, et j'espère pouvoir venir vous voir bien plus souvent en Isère maintenant que le doctorat touche à sa fin

À Arnaud, Amaury et Adeline, Rémi et Marion, apparus dans ma vie en temps qu'amis de Geoffrey, vous êtes avec le temps devenus bien plus, merci du soutien et des encouragements que vous m'avez apporté pendant ces années, j'ai déjà hâte de notre prochaine aventure tous ensemble !

À la famille Pruneau, Marie-Noëlle et Janny, Florian et Cyrielle, Monique et Michel, Maryse et Etienne, Maryse et Rémi, Elodie et Roberto, Blandine et Nicolas, et tous les petits qui sont venu agrandir la famille ces dernières années, merci pour votre gentillesse et pour m'avoir aussi bien accueilli dans votre famille

À ma famille, mes oncles et tantes, Guy, Henri, Bruno et Patricia, Jean-Pierre et Catherine, Gilette et Maurice, Philippe et Isabelle, Sandrine et Massimo, à mes cousins et leurs familles Thomas et Noémie, Simon et Sonia, Théo, Antoine, merci à tous de me soutenir depuis tant d'années.

À ma grand-mère Hélène, merci d'être toujours au petit soin pour nous, merci pour tout, je t'aime. A mes grands-parents partis trop tôt, Pierre, Madeleine et Robert. Même si ça n'a pas été assez dit lorsqu'on le pouvait encore, je vous aime.

À mes deux sœurs, Laura et Eva, être l'aînée n'est pas toujours tâche aisée, mais je ne changerai pour rien au monde le lien que nous avons. Je suis infiniment fière des femmes incroyables que vous êtes devenues et devenez chaque jour. Dans l'adversité ou dans les moments de bonheur, je suis très heureuse de vous savoir à mes côtés quoi qu'il arrive. Je vous aime toutes les deux.

À mes parents, Mireille et Franck, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, vous avez fait de moi ce que je suis, et je suis particulièrement fière d'être votre fille, merci pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi, je n'aurai pu rêver de meilleurs parents. Papa, merci d'être toujours là pour moi quoi qu'il arrive, ton soutien sans faille et tes principes de vie me guident encore aujourd'hui. Maman, merci d'être la femme qui m'inspire et qui me donne envie de toujours faire de mon mieux. Tu as été, est et restera la personne que j'admire le plus, j'espère te rendre fière autant que je suis fière de toi et de tout ce que tu réalises au quotidien. Je vous aime.

Enfin, dernier mais certainement pas des moindres, merci à Geoffrey. Je ne trouve pas les mots pour te dire à quel point ta présence rend mon quotidien plus beau. Merci pour toute ton aide dans cette période difficile de fin de thèse, ton soutien, tes relectures, tes attentions, et ton amour m'ont porté jusqu'au bout. Merci d'être cette présence positive dans ma vie, merci pour ta patience, merci pour les rires même dans les pires moments, merci pour l'amour. Merci n'est parfois pas assez fort, je terminerai simplement en te disant : à nos souvenirs, aux nouvelles aventures qui nous attendent, je t'aime.

*« N'oublie jamais, celui qui croit savoir n'apprend plus. »*

Pierre Bottero, La Pacte des Marchombres

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	4
<b>Sommaire</b> .....	12
<b>Liste des figures</b> .....	17
<b>Liste des tables</b> .....	20
<b>Liste des annexes</b> .....	20
<b>Liste des abréviations</b> .....	21
<b>Contexte</b> .....	23
<b>Chapitre 1 – Généralités</b> .....	24
I/ La conjonctive et les autres constituants de la surface oculaire.....	24
1) La conjonctive.....	25
a) Anatomie.....	25
b) Histologie.....	26
• L'épithélium conjonctival.....	27
• Le chorion conjonctival et les glandes conjonctivales.....	28
• Le tissu lymphoïde conjonctival.....	30
c) Physiologie.....	31
d) Microbiote conjonctival.....	32
• Microbiote conjonctival physiologique.....	33
• Microbiote conjonctival au cours des pathologies.....	33
2) Les autres constituants de la surface oculaire.....	34
a) Les paupières.....	34
b) La cornée.....	35
c) Le film lacrymal et les glandes lacrymales.....	36
II/ Techniques d'exploration de la surface oculaire.....	37
a) Examen clinique de la surface oculaire.....	38
b) Autres techniques d'imagerie.....	38
c) Analyse des larmes.....	38
d) Écouvillons oculaires.....	39
e) Empreintes conjonctivales.....	40
f) Histologie et cytologie.....	42
III/ Les conjonctivites.....	44
a) Les symptômes et les signes de la conjonctivite.....	44
b) Les formes compliquées de conjonctivites.....	44

• Fibrose conjonctivale.....	45
• Atteintes cornéennes.....	46
IV/ Le trachome.....	47
1) <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	47
a) Description générale, cycle de vie.....	47
b) Autres pathologies causées par <i>C. trachomatis</i> .....	50
2) Historique du trachome.....	51
3) Transmission bactérienne.....	54
4) Epidémiologie.....	54
a) Un problème de santé mondial.....	54
b) La situation actuelle.....	57
c) De nouveaux outils pour l'étude épidémiologique.....	57
5) Clinique.....	58
a) Symptômes et signes cliniques.....	58
b) Histoire naturelle de la maladie.....	60
c) Réponse immunitaire.....	60
d) Diagnostic.....	63
6) Traitements.....	64
a) Stratégie CH.A.N.CE.....	65
b) Les limites de la stratégie CH.A.N.CE.....	66
c) Stratégies vaccinales.....	67
d) Essais cliniques des stratégies vaccinales.....	68
e) Eradication 2020 & projet TracVac.....	70
7) Modèles d'étude du trachome.....	71
a) Modèles in vitro.....	71
b) Modèles animaux.....	73
• Souris et rat.....	73
• Cochon d'Inde (ou cobayes communs).....	74
• Lapins.....	79
• Primates non-humains (PNH).....	79
V/ Objectifs de la thèse.....	85
<b>Chapitre 2 – Matériel &amp; méthodes.....</b>	<b>86</b>
I/ Animaux et éthique.....	86
II/ Bactéries et exposition bactérienne.....	86
1) Méthode d'exposition.....	86

2)	Cohorte « Infection aiguë ».....	87
3)	Cohorte « Infection chronique » .....	88
III/	Suivi de l'état général des animaux.....	90
IV/	Suivi des signes cliniques oculaires.....	90
V/	Quantification de la charge bactérienne .....	93
VI/	Quantification des cytokines lacrymales et sériques .....	93
VII/	Quantification des immunoglobulines lacrymales et sériques .....	94
	• Échantillons sériques .....	95
	• Échantillons lacrymaux .....	95
VIII/	Cytométrie des empreintes conjonctivales .....	96
1)	Empreintes conjonctivales.....	96
2)	Marquage et cytométrie .....	96
IX/	Histologie.....	98
1)	Préparation des échantillons.....	98
2)	Colorations standards .....	98
3)	Marquage Immuno-Histo-Chimique (IHC).....	100
4)	Marquages Immuno-Fluorescent (IF) .....	101
X/	Microbiote oculaire.....	102
1)	Déroulé de l'expérience.....	103
2)	Extraction et séquençage .....	103
XI/	Analyses statistiques .....	104
<b>Chapitre 3 – Résultats</b>	.....	<b>106</b>
I/	Cinétique de l'infection et de la réponse immunitaire au cours d'une infection aiguë ..	106
1)	Evolution de la charge bactérienne .....	106
2)	Observation clinique de conjonctivite folliculaire.....	108
a)	Signes cliniques de fibrose conjonctival préexposition .....	108
b)	Évolution des signes cliniques après exposition bactérienne.....	109
3)	Caractérisation de la réponse immunitaire locale .....	110
a)	Evolution des populations immunitaires majeures .....	110
b)	Suivi des cytokines lacrymales .....	113
c)	Suivi des immunoglobulines lacrymales .....	114
d)	Histologie .....	115
	• Analyse morphologique de la conjonctive .....	116
	• Analyse de la prolifération cellulaire .....	117

	• Analyse des populations cellulaires.....	117
4)	Analyse de la réponse immunitaire systémique à l'exposition bactérienne...	119
	a) Suivi des cytokines sériques .....	119
	b) Suivi des immunoglobulines sériques .....	119
5)	Mise en évidence des corrélations entre l'infection et la réponse immunitaires	121
6)	Évolution du microbiote conjonctival .....	123
	a) L'exposition à un pathogène induit des modifications du microbiote dans le temps .	123
	• Exposition à <i>C. trachomatis</i> .....	123
	• Exposition à H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> .....	123
	b) Influence des expositions pathogènes sur l'abondance relative des genres bactériens	124
	• Exposition à <i>C. trachomatis</i> .....	125
	• Exposition à H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> .....	126
	• Exposition bactérienne vs. exposition virale .....	128
	c) Influence des empreintes conjonctivales sur l'abondance relative des genres bactériens	129
	d) Influence du traitement antibiotique sur l'abondance relative des genres bactériens	129
II/ Cinétique de l'infection et de la réponse immunitaire au cours de l'infection chronique		
.....		132
1)	Evolution de la charge bactérienne .....	132
	a) Cinétique de la charge bactérienne aux cours des expositions itératives .....	133
	b) Cinétique de la charge bactérienne pendant la phase de réexposition .....	133
2)	Observations cliniques .....	134
	a) Apparition des signes cliniques avec les manipulations oculaires hebdomadaires.....	134
	• Sans exposition bactérienne.....	134
	• Avec expositions itératives à <i>C. trachomatis</i> .....	134
	b) Evolution des signes cliniques pendant la phase de réexposition .....	135
	c) Apparition de signes de fibrose conjonctivale.....	135
3)	Caractérisation de la réponse immunitaire locale .....	137
	a) Evolution des populations immunitaires majeures .....	137
	• Suivi du groupe « non-exposé ».....	137
	• Suivi du groupe « expositions itératives » .....	137
	• Suivi du groupe « exposition unique » .....	139
	b) Suivi des cytokines lacrymales .....	140
	• Cinétique des cytokines lacrymal au cours des expositions itératives .....	140



• Cinétique des cytokines lacrymales pendant la phase de réexposition.....	143
c) Histologie .....	143
• Analyse de la morphologie de la conjonctive .....	144
• Analyse de la prolifération cellulaire .....	145
• Analyse des populations cellulaires.....	145
4) Mise en évidence des corrélations entre l'infection et la réponse immunitaire	147
a) Groupe « non-exposé ».....	147
b) Groupe « expositions itératives » .....	149
c) Groupe « exposition unique » .....	151
<b>Chapitre 4 – Discussion</b> .....	<b>153</b>
I/ Cohorte « Infection aiguë » .....	153
II/ Cohorte « Infection chronique » .....	159
III/ Mise en perspective des différents modèles .....	163
IV/ Limites et perspectives.....	164
V/ Conclusion .....	168
<b>Annexes</b> .....	<b>169</b>
<b>Références</b> .....	<b>216</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> – Anatomie de la surface oculaire. ....	24
<b>Figure 2</b> – Anatomie de la conjonctive.....	25
<b>Figure 3</b> – Évolution de la morphologie de l'épithélium conjonctival depuis le limbe ou le bord marginal jusqu'au fornix. ....	27
<b>Figure 4</b> – Schéma de la conjonctive et des différentes parties du chorion conjonctival. ....	28
<b>Figure 5</b> – Glandes conjonctivales et palpébrales [9].....	29
<b>Figure 6</b> – Application d'une empreinte conjonctivale sur la conjonctive bulbaire. .	40
<b>Figure 7</b> – Cytologie directe d'une empreinte conjonctivale.....	41
<b>Figure 8</b> – Coupe histologique d'une conjonctive saine (coloration Hématoxyline-Eosine, grossissement x60).....	43
<b>Figure 9</b> – Différentes positions de la paupière inférieure (A) Normale, (B) Ectropion, (C) Entropion [97], et (D) Trichiasis [98]. ....	45
<b>Figure 10</b> – Cycle de vie de <i>C. trachomatis</i> .....	49
<b>Figure 11</b> – Épidémiologie du trachome en 1936. ....	52
<b>Figure 12</b> – Premières classifications cliniques « modernes » du trachome.....	53
<b>Figure 13</b> – Carte du monde des pays touchés par le trachome.....	57
<b>Figure 14</b> – Différents stades du trachome d'après la classification OMS. ....	59
<b>Figure 15</b> – L'évolution du trachome à travers les âges, représentée comme « La pente qui mène vers la cécité ».....	60
<b>Figure 16</b> – Évolutions immunitaires et histologiques aux différents stades du trachome.....	62
<b>Figure 17</b> – Images cliniques illustrant les différentes atteintes oculaires retrouvées des stades avancés du trachome. ....	64
<b>Figure 18</b> – Échelle de l'OMS des différents stades du trachome situant le moment d'utilisation des différentes facettes de la stratégie CH.A.N.CE. ....	65
<b>Figure 19</b> – Présentation des différents groupes et du déroulé des expériences....	89
<b>Figure 20</b> – Schéma de l'aire de comptage des follicules sur la conjonctive tarsale une fois la paupière éversée. ....	91
<b>Figure 21</b> – Score de cotation des signes cliniques de l'infection conjonctivale à <i>C. trachomatis</i> .....	92

<b>Figure 22</b> – Stratégie de gating appliquée pour analyser les fichiers de cytométrie des empreintes conjonctivales.....	97
<b>Figure 23</b> – Cinétique de la quantification bactérienne de la cohorte « infection aiguë ».....	107
<b>Figure 24</b> – Photos cliniques de RSV1 .....	108
<b>Figure 25</b> – Cinétique du score clinique de la cohorte « infection aiguë ».....	109
<b>Figure 26</b> – Évolution des principales populations immunitaires locales dans la cohorte « infection aiguë ». .....	111
<b>Figure 27</b> – Quantification des cytokines lacrymales de la cohorte « infection aiguë ». .....	113
<b>Figure 28</b> – Quantification des IgG (A) et IgA (B) lacrymales de la cohorte « infection aiguë ».....	115
<b>Figure 29</b> – Coupes tissulaires en coloration en HES (A, C, E) et avec marquage de l'antigène Ki-67 (B, D, F) .....	116
<b>Figure 30</b> – Détection des cellules marquées pour les antigènes CD3 (lymphocytes T), CD20 (lymphocytes B), CD68 (macrophages)(A), $\alpha$ -SMA (myo-fibroblaste), MUC5AC (cellule à mucus), et calprotectine (neutrophiles)(B). .....	118
<b>Figure 31</b> – Cytokines sériques ayant varié significativement au cours du suivi de la cohorte « infection aiguë ». .....	119
<b>Figure 32</b> – Quantification des IgG et IgA dans le sérum pour la cohorte « infection aiguë ».....	120
<b>Figure 33</b> – Matrice de corrélation de tous les paramètres mesurés dans la phase primo-exposition de la cohorte « infection aiguë ».....	122
<b>Figure 34</b> – Évolution dans le temps du microbiote oculaire. ....	124
<b>Figure 35</b> – Analyse statistique des abondances relatives des genres bactériens..	127
<b>Figure 36</b> – Analyse statistique des abondances relatives entre les animaux ayant subis ou non des empreintes conjonctivales. ....	129
<b>Figure 37</b> – Analyse statistique des abondances relatives du traitement antibiotique. ....	130
<b>Figure 38</b> – Cinétique de la quantification bactérienne de la cohorte « infection chronique ». ....	132
<b>Figure 39</b> – Cinétique du score clinique de la cohorte « infection chronique ». ....	134

<b>Figure 40</b> – Photos cliniques de la cohorte « infection chronique » en fin de suivi	136
<b>Figure 41</b> – Évolution des principales populations immunitaires locales dans la cohorte « infection chronique ».....	138
<b>Figure 42</b> – Quantification des cytokines de la cohorte « Infection chronique »..	142
<b>Figure 43</b> – Coupes tissulaires de biopsies de conjonctives tarsales d'EU1 (A, B), EU2 (C, D) et EI2 (E, F).....	144
<b>Figure 44</b> – Détection des cellules marquées pour les antigènes CD3 (lymphocytes T), CD20 (lymphocytes B), CD68 (macrophages)(A), $\alpha$ -SMA (myo-fibroblastes), MUC5AC (cellules à mucus), et calprotectine (neutrophiles)(B).....	146
<b>Figure 45</b> – Matrice de corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « non-exposé ».....	148
<b>Figure 46</b> – Corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « expositions itératives ».....	150
<b>Figure 47</b> – Corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « exposition unique ».....	152
<b>Figure 48</b> – Présentation des différents groupes et du déroulé du projet TracVac dans son intégralité.....	167

## Liste des tables

<b>Tableau 1</b> – Description des espèces du genre Chlamydia (*avec l’ajout de C. caviae non-inclus dans la nomenclature LPSN) .....	47
<b>Tableau 2</b> – Description de l’espèce bactérienne C. trachomatis .....	48
<b>Tableau 3</b> – Résumé des différents modèles animaux de trachome.....	83
<b>Tableau 4</b> – Liste des anticorps utilisés pour marquer les cellules isolées depuis les empreintes conjonctivales.....	97
<b>Tableau 5</b> – Différentes étapes des protocoles de colorations HE, HES, et PAS .....	99
<b>Tableau 6</b> – Références des anticorps utilisés pour les marquages IF des coupes histologiques.....	101

## Liste des annexes

<b>Annexe 1</b> – Grille de score clinique général. ....	169
<b>Annexe 2</b> – Cinétiques des cytokines lacrymales (A) et sériques (B) de la cohorte « Infection aiguë » sans changements statistiquement significatifs.....	170
<b>Annexe 3</b> – Score d’inflammation (A) et de follicules (B) pour la cohorte « infection aiguë ». ....	171
<b>Annexe 4</b> – Score d’inflammation (A) et de follicules (B) pour la cohorte « infection chronique ». ....	172
<b>Annexe 5</b> – Papier soumis dans PLoS Pathogens .....	173

## Liste des abréviations

$\alpha$ -SMA : *alpha-Smooth Muscle Actin*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives

CO : *Cornean Opacification* ou Opacification cornéenne

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DC : *Dendritic cell*

EB : *Essential Body* ou Corps Élémentaire de *Chlamydia trachomatis*

EID<sub>50</sub> : *Egg-Lethal Dose 50*

G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*

IFN $\gamma$  : InterFéron gamma

IFU : *Inclusion Forming Unit*

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IL : InterLeukine

kD : kilo-dalton

kg : kilogramme

mg : milligramme

$\mu$ g : microgramme

mL : millilitre

$\mu$ L : microlitre

MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MIP : *Macrophage Inflammatory Protein*

MMP : Matrice MetalloProtéinase

MOMP : *Major Outer Membrane Protein*

NFS : Numération Formule Sanguine

NK : *Natural Killer*

ompA : *Outer Membrane Protein A*

OD : Œil Droit

OG : Œil Gauche

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTU : *Operational Taxonomic Unit* ou Unité Taxonomique Opérationnelle

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PNH : Primates Non-Humain

RB : *Reticular Body* ou Corps Réticulé de *Chlamydia trachomatis*

sCD40L : *soluble CD40 ligand*

SPG : Sucrose Phosphate Glutamate

TF : Trachoma Follicular ou Inflammation Trachomateuse Folliculaire

Th1 : lymphocyte T auxiliaire 1

Th17 : lymphocyte T auxiliaire 17

TI : *Trachoma Intense* ou Inflammation Trachomateuse Intense

TGF- $\alpha$  : *Transforming Growth Factor alpha*

TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

TS : *Trachoma Scarring* ou Cicatrisation Trachomateuse

TT : *Trachoma Trichiasis* ou Trichiasis Trachomateux

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

## Contexte

Le trachome est une kératoconjonctivite causée par *Chlamydia trachomatis* se déroulant en deux phases aboutissant potentiellement à la cécité. La maladie débute par une première phase aiguë, résultant de l'infection conjonctivale ; puis se poursuit avec une seconde phase chronique, s'accompagnant de cicatrices palpébrales conjonctivales et cornéennes.

La prévalence de cette maladie tropicale négligée a beaucoup diminué au cours des dernières années, notamment grâce aux campagnes de traitement et de prévention mises en place par l'Organisation Mondiale de la Santé. Elle reste de nos jours l'une des premières causes de cécité des suites d'une maladie infectieuse, et pour cette raison, constitue un véritable problème de santé publique dans les pays endémiques. Ce projet de thèse s'inscrit dans une démarche visant à mieux caractériser la réponse locale à l'infection autant aiguë que chronique, dans la perspective de développer les nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou vaccinale ayant pour objectif l'éradication complète de la maladie.

Le trachome est initialement une infection de la conjonctive, un des constituants majeurs de la surface oculaire et une zone dont l'examen direct est aisé mais pour laquelle les moyens d'analyse biologique restent techniquement complexes. Et bien que l'histoire naturelle de la maladie soit connue, les mécanismes physiopathologiques locaux restent encore incomplètement décrits. Les modèles expérimentaux déjà utilisés pour étudier la maladie sont en majorité réalisés sur modèle cobaye ou primate, dans le but de modéliser au mieux la complexité du trachome.

Cette thèse se compose tout d'abord d'une description des différents constituants de la surface oculaire, des moyens d'étude disponibles, des aspects cliniques et épidémiologiques du trachome et d'un état de l'art sur les différents modèles expérimentaux. Nous rapportons ensuite la description de deux modèles *in vivo* mis au point sur le primate non humain, visant respectivement à reproduire la phase aiguë et la phase chronique de la maladie. Une approche multimodale a été utilisée dans ces deux modèles pour caractériser la réponse immunitaire, les signes cliniques, mais aussi les modifications histologiques et du microbiote liées à l'infection conjonctivale aiguë ou chronique à *Chlamydia trachomatis*.



# Chapitre 1 – Généralités

## I/ La conjonctive et les autres constituants de la surface oculaire

La surface oculaire est la partie de l'œil au contact avec l'extérieur. Elle englobe le bord libre des paupières, la conjonctive, la cornée, les glandes lacrymales et le film lacrymal (Figure 1). L'homéostasie de la surface oculaire est essentielle pour le maintien de la fonction visuelle. Elle dépend du bon fonctionnement de l'ensemble de ses constituants, qui interagissent tous entre eux par l'intermédiaire de connexions nerveuses et endocriniennes [1].

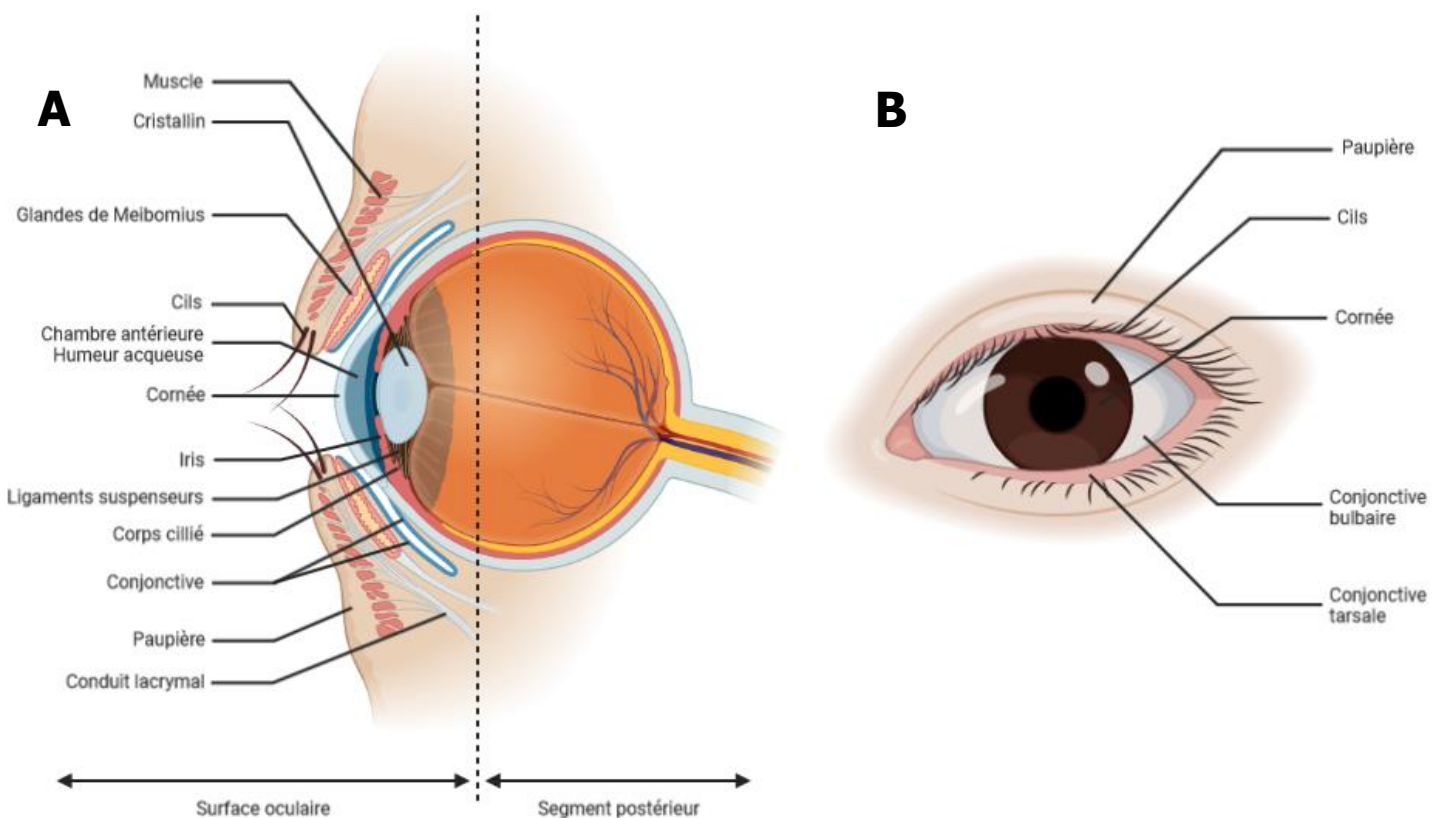


Figure 1 – Anatomie de la surface oculaire. Schématisation des structures principales de la surface oculaire sur (A) une coupe sagittale de l'œil, et (B) une vue frontale de l'œil. Créé sur Biorender.com

Dans cette introduction, nous détaillerons plus particulièrement l'anatomie, l'histologie, la physiologie et le microbiote de la conjonctive, ce tissu étant le siège de l'infection oculaire par *Chlamydia trachomatis*, central dans cette thèse.

## 1) La conjonctive

### a) Anatomie

La conjonctive est une muqueuse richement vascularisée qui tapisse la surface antérieure du globe oculaire et la face interne des paupières (Figure 1). Anatomiquement, elle peut être séparée en trois régions (Figure 2) [2,3] :

- **La conjonctive palpébrale**, qui recouvre la face interne des paupières supérieures et inférieures, depuis le bord libre jusqu'au cul-de-sac conjonctival ou fornix (zone de transition entre la paupière et le globe oculaire),
- **La conjonctive bulbaire**, qui s'étend du fornix jusqu'au limbe scléro-cornéen (zone de transition entre l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen),
- **Le cul-de-sac conjonctival ou fornix**, qui se trouve au creux de la paupière, à la transition entre les conjonctives palpébrales et bulbaires.

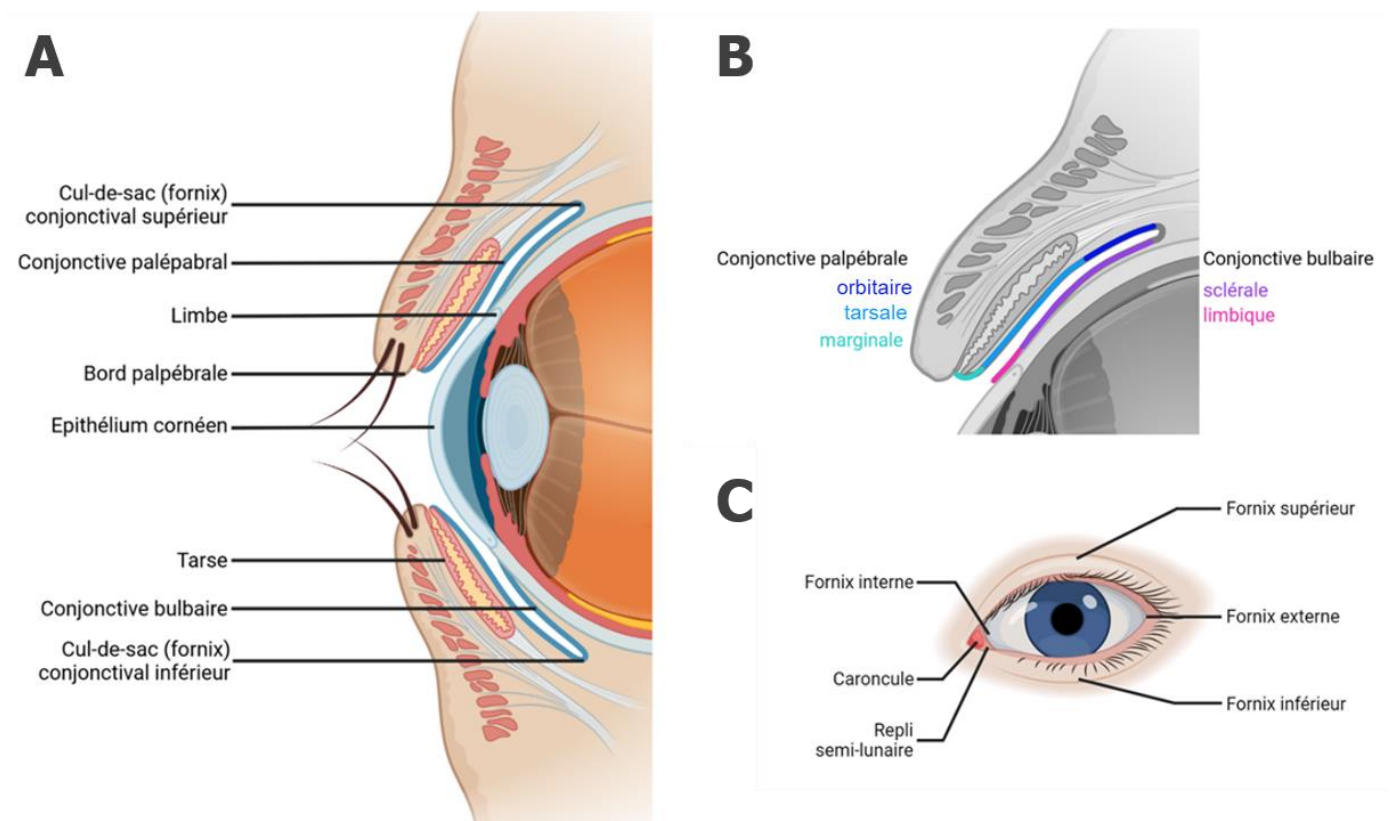


Figure 2 – Anatomie de la conjonctive.

(A) Schéma des différentes parties de la conjonctive, vue en coupe sagittale, (B) Sous-parties des conjonctives palpébrales et bulbaires, (C) Fornix conjonctivaux et structures de l'angle interne de l'œil. Créé sur BioRender.com

Les trois régions de la conjonctive sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs parties (Figure 2) [3].

Pour la **conjonctive palpébrale**, les différentes parties sont, depuis le bord palpébral libre (ou bord marginal) vers le fornix (depuis l'extérieur vers l'intérieur) : la conjonctive marginale, tarsale, puis orbitaire. La conjonctive marginale se trouve directement dans le prolongement de l'épiderme kératinisé palpébral. Elle fait très rapidement place à la conjonctive tarsale, adhérente au tarse (le cartilage de la paupière) et comprend la majorité de la face interne de la paupière. Enfin, la conjonctive orbitaire est la plus proche du fornix. Ces zones de la conjonctive palpébrale sont décrites aussi bien pour la paupière supérieure qu'inférieure.

Pour le **fornix conjonctival**, 4 sous-parties sont observées en fonction de leur localisation : le fornix supérieur (le plus profond, au pli de la paupière supérieure à l'intersection de cette dernière et du globe oculaire), le fornix inférieur (l'homologue du fornix supérieur pour la paupière inférieure), le fornix externe (à l'angle externe de l'œil) et le fornix interne (à l'angle interne), où se trouvent la caroncule et le repli semi-lunaire. La caroncule est une excroissance charnue et visible à l'angle interne, riche en glandes sébacées et sudoripares. Le repli semi-lunaire est tendu entre la caroncule et le globe oculaire. Il s'agit d'un vestige de la membrane nictitante, une paupière supplémentaire translucide présente chez certains animaux comme les reptiles ou les oiseaux.

Enfin la **conjonctive bulbaire**, comporte deux sous-parties : la partie sclérale qui débute au contact du fornix jusqu'à la partie limbique au contact du limbe, qui réalise la transition entre la conjonctive bulbaire et la cornée.

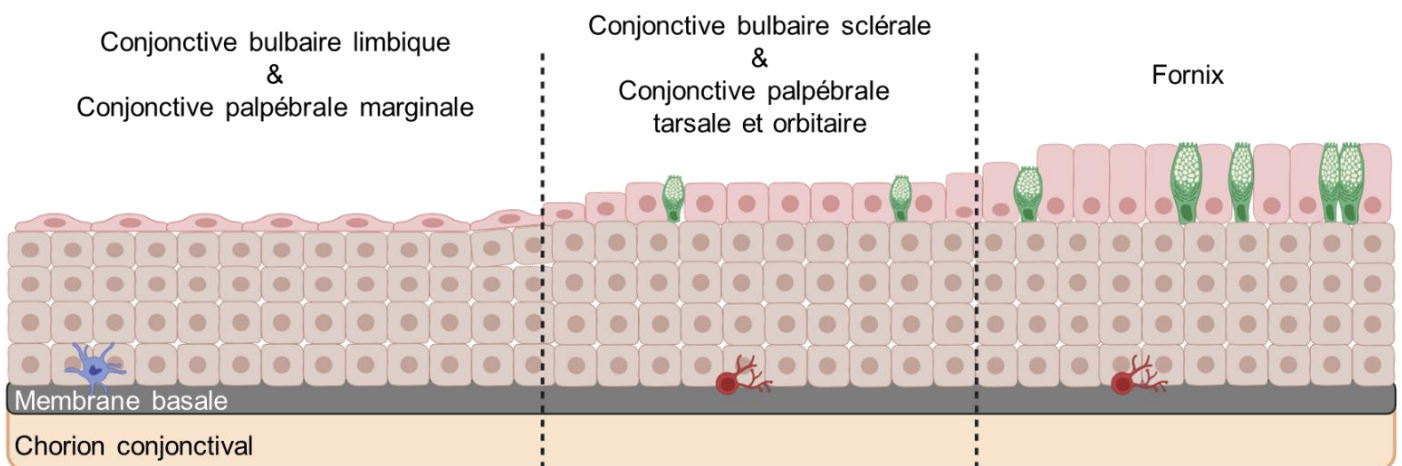
### ***b) Histologie***

L'histologie de la conjonctive varie en fonction des régions anatomiques. La conjonctive tarsale est un tissu épais, très vascularisé et très adhérent au tarse. La conjonctive bulbaire est quant à elle plutôt fine et peu vascularisée. Elle se trouve au contact direct de la capsule de Tenon et de l'épiscière (fine membrane conjonctivo-vasculaire) qui jouent un rôle de tissu conjonctif dense de soutien.

La conjonctive est composée d'un épithélium reposant sur un chorion (contenant des structures glandulaires) et de tissu lymphoïde.

- **L'épithélium conjonctival**

Il s'agit d'un épithélium pluristratifié non-kératinisé dont le nombre de couches cellulaires varie de 3 à 6 suivant les régions. La morphologie des cellules épithéliales superficielles varie également selon les localisations avec une transition depuis des cellules squameuses au limbe jusqu'à des cellules cylindriques au fornix (Figure 3) [2]. Le cytosquelette des cellules conjonctivales est principalement composé de filaments intermédiaires, les cytokératines (CK), au sein desquelles se distinguent les cytokératines basiques (de CK1 à CK8) et les cytokératines acides (de CK9 à CK20).



*Figure 3 – Évolution de la morphologie de l'épithélium conjonctival depuis le limbe ou le bord marginal jusqu'au fornix.*

*Les cellules épithéliales changent respectivement de cellules squameuses à cellules cylindriques en passant par cellules cuboïdes. Les cellules vertes représentent les cellules à mucus, la cellule bleu une cellule de Langerhans (présente dans la conjonctive limbique), et les cellules rouges des lymphocytes T. Créé sur Biorender.com*

Les cellules à mucus (ou caliciformes) représentent le deuxième type cellulaire de l'épithélium conjonctival. Leur proportion au sein de l'épithélium augmente du limbe (où elles sont très rares) vers les fornix et particulièrement au niveau de la caroncule et du repli semi-lunaire (où leur densité est maximale). Les cellules à mucus sont essentielles à l'homéostasie du film lacrymal. En particulier, elles sécrètent les mucines qui permettent l'adhésion de ce dernier sur la surface oculaire [4]. Les principaux marqueurs des cellules à mucus sont MUC5AC et de façon plus minoritaire TFF1/TFF3 [5] ainsi que la cytokératine 7 [6].

Des mélanocytes peuvent être observés dans la couche basale de l'épithélium conjonctival. Leur quantité varie selon l'origine ethnique et la pigmentation cutanée.

Enfin la membrane basale séparant l'épithélium conjonctival du chorium sous-jacent est divisée en deux parties visuellement différenciable en microscopie électronique :

- **La lamina lucida**, au contact des cellules basales, forme une couche peu dense et assez fine (environ 24 $\mu$ m). Les cellules de la lamina lucida sont responsables de la synthèse de la membrane basale,
- **La lamina densa**, au contact du stroma et qui forme une couche dense et plus épaisse (47 $\mu$ m) [7].

- **Le chorium conjonctival et les glandes conjonctivales**

Le chorium conjonctival, ou substantia propria, est le tissu conjonctif sous-jacent de l'épithélium, séparé de ce dernier par la membrane basale. Il est majoritairement composé de matrice extracellulaire synthétisée par de nombreux fibroblastes. Ce tissu de soutien est richement vascularisé (réseaux sanguins et lymphatiques) et innervé (Figure 4).

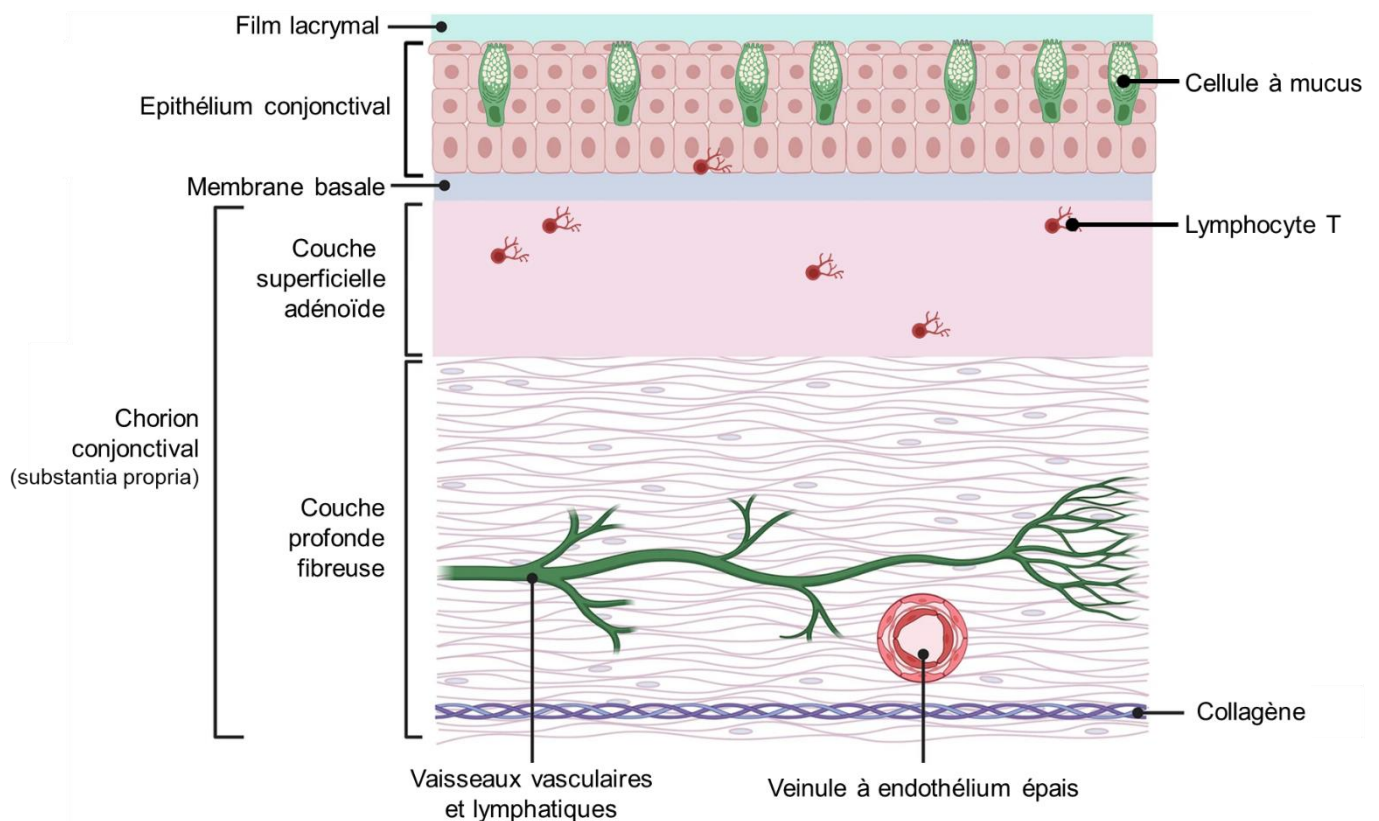


Figure 4 – Schéma de la conjonctive et des différentes parties du chorium conjonctival. D'après Arnous et al. [8]

Enfin, deux parties peuvent être distinguées dans le chorion :

- **Le chorion superficiel**, ou lamina propria, couche adénoïde plus riche en lymphocytes,
- **Le chorion profond**, couche plus fibreuse et fortement vascularisée.

Les glandes lacrymales accessoires représentent le dernier composant du chorion. Il en existe deux types : les glandes séreuses et les glandes muqueuses, différenciées par la nature de leurs sécrétions (Figure 5).

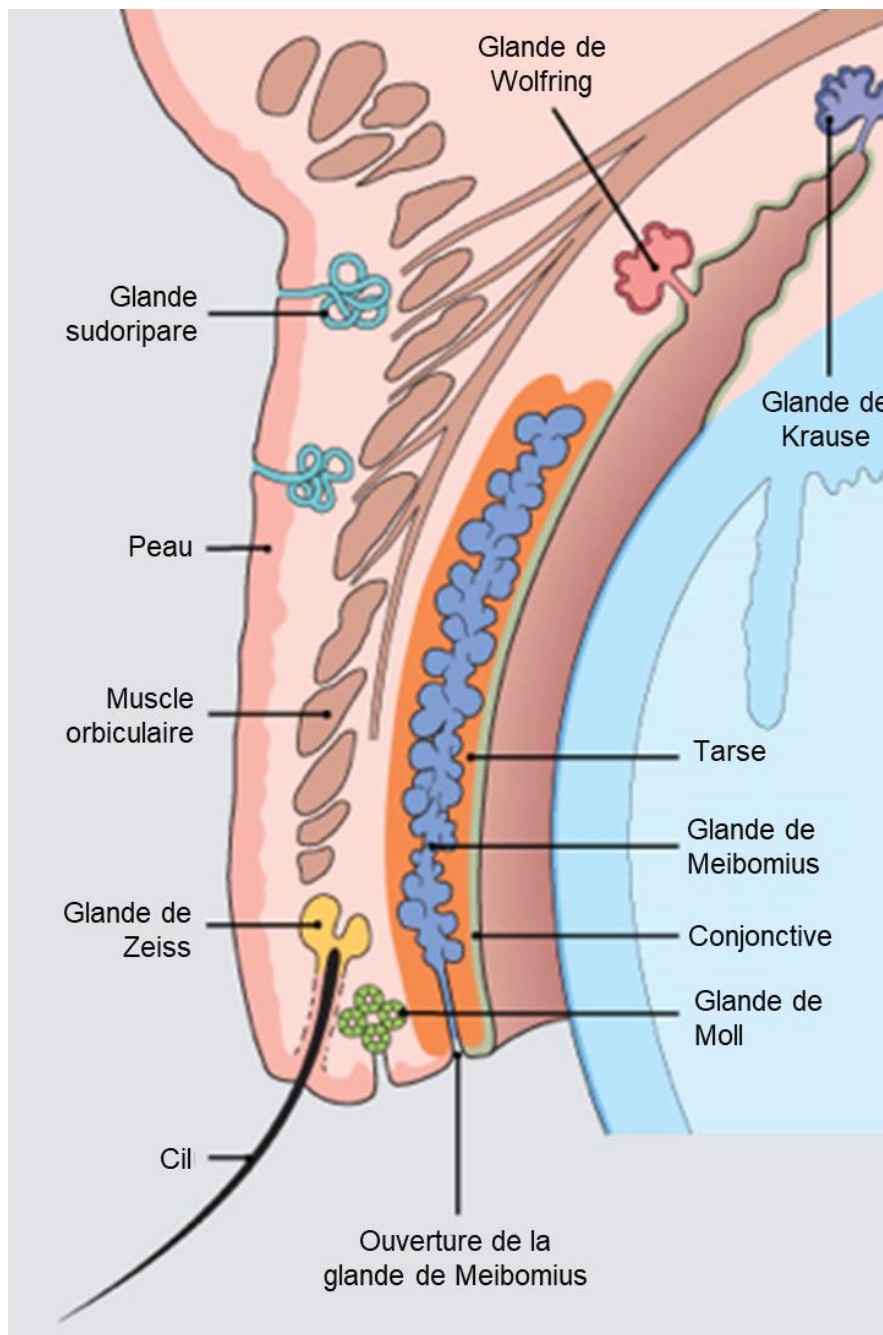


Figure 5 – Glandes conjonctivales et palpébrales [9]

Les glandes séreuses comprennent :

- **Les glandes de Krause**, situées dans le chorion profond du fornix, surtout supérieur (environ 40), mais aussi inférieur (6 à 8). Elles sont histologiquement identiques aux glandes lacrymales principales, et contribuent à la sécrétion du film lacrymal,
- **Les glandes de Wolfring**, présentes dans le chorion des conjonctives tarsales supérieures (entre 2 et 5) et inférieures (au nombre de 2), dans les deux cas proches du cul-de-sac.

Les glandes muqueuses assurent, avec les cellules à mucus, la sécrétion de la phase mucinique du film lacrymal. Elles sont au nombre de deux :

- **Les glandes ou cryptes de Henlé**, présentes dans le chorion superficiel des conjonctives tarsales supérieures et temporales, et constituées d'invaginations de l'épithélium conjonctival dans le chorion, particulièrement riche en cellules à mucus,
- **Les glandes de Manz**, absentes chez l'homme, aussi constituées d'invaginations de l'épithélium conjonctival dans le chorion, riches en cellules à mucus, mais situées au niveau du limbe scléro-cornéen. Elles sont présentes chez plusieurs espèces animales (dont le porc [10] et le primate [11,12]).

- **Le tissu lymphoïde conjonctival**

Le tissu lymphoïde conjonctival ou CALT pour *Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue* est la version spécifique à la conjonctive du MALT ou *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*. Le CALT est l'acteur essentiel de la réponse immunitaire conjonctivale, et est majoritairement constitué de lymphocytes. La répartition de ces derniers varie en fonction des couches et des zones de la conjonctive.

Dans l'épithélium ils sont seulement présents dans la couche des cellules basales. Dans le chorion, les lymphocytes sont retrouvés dans la couche superficielle adénoïde (Figure 4). Ils prédominent dans la région tarsale, et sont plus rares au niveau des fornix et de la conjonctive bulbaire. Cette répartition favorise la présence des cellules immunitaires dans les zones où les contacts avec les antigènes sont les plus fréquents. En conditions physiologiques, les lymphocytes conjonctivaux sont absents à la naissance, leur quantité culmine à l'adolescence, puis diminue avec l'âge [13,14].

La majorité des cellules immunitaires retrouvées dans la conjonctive (que ce soit au niveau de l'épithélium ou du chorion), sont acheminées via les vaisseaux sanguins et les capillaires irriguant le chorion. Dans une conjonctive saine, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (cytotoxiques) sont prédominants. Les lymphocytes B (cellules CD20<sup>+</sup>), très rares

physiologiquement, affluent dans la conjonctive en cas d'infection, d'inflammation ou de réaction allergique.

Le CALT comprend aussi les cellules de Langerhans. Ces cellules présentatrices d'antigènes se trouvent majoritairement au niveau du limbe, dans les couches basales de l'épithélium. Elles sont, en plus de leur rôle de surveillance de l'épithélium, impliquées dans la réponse allergique retardée [15].

Les infiltrats lymphocytaires conjonctivaux sont généralement organisés en follicule constitués d'une couronne de lymphocytes T entourant un centre de lymphocytes B et associés à de nombreux plasmocytes (lymphocytes B différenciés) à l'origine de la sécrétion des immunoglobulines (Ig) A locales. Les lymphocytes sont des acteurs de la réponse immunitaire qu'elle soit anti-infectieuse, anti-inflammatoire ou encore allergique. Dans les cas d'infection sévère, les follicules peuvent devenir visibles macroscopiquement (plus aisément sur la conjonctive tarsale) et prennent alors l'aspect de petites élévations entourées de vaisseaux.

Les infiltrats lymphocytaires peuvent également s'organiser en papilles, constituées d'amas de cellules immunitaires comprenant principalement des lymphocytes, mais également des mastocytes et des éosinophiles entourant un vaisseau.

### ***c) Physiologie***

La muqueuse conjonctivale joue un rôle de barrière contre les différentes agressions. Il s'agit à la fois d'une barrière physique (particules, corps étranger, brûlure), chimique (produits toxiques), mais aussi biologique contre les agents pathogènes (bactériens, viraux, ou bien fongiques). Dans ce but de protection, la conjonctive rassemble la majorité des défenses immunitaires de la surface oculaire, la cornée étant quasi dépourvue de cellules immunitaires à l'état physiologique (phénomène dit du privilège immunitaire) afin de ne pas compromettre sa transparence en cas de réaction inflammatoire.

La conjonctive, assure également une partie de la production du film lacrymal (avec les glandes lacrymales accessoires) et joue donc un rôle de lubrification et protection de la surface oculaire ainsi que dans le maintien de la transparence cornéenne.

Au total, la conjonctive est indispensable au maintien de l'homéostasie de la surface oculaire, et donc au maintien de la vision.



#### ***d) Microbiote conjonctival***

Le microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes (bactérie, virus, champignons, protistes) composant la flore commensale d'un individu [16]. La relation entre l'hôte et le microbiote va du commensalisme au mutualisme : sa présence peut être neutre ou bénéfique pour l'hôte. Le microbiote assure une protection contre les micro-organismes pathogènes dont il limite la prolifération. Le microbiote peut aussi avoir d'autres rôles en fonction de l'organe auquel il est associé, par exemple l'équilibrage du pH via la production d'acide dans le vagin [17], l'aide à la digestion et à l'assimilation de composés non-digestibles dans l'intestin [18], mais aussi une implication du microbiote digestif dans le maintien de la santé mentale [19]. La composition du microbiote varie en fonction de multiples facteurs : l'organe ou tissu concerné, l'âge et le genre de l'hôte, les pathologies générales (en particulier métaboliques et inflammatoires), les prises médicamenteuses (antibiotiques), ou encore le régime alimentaire.

Les modifications quantitatives et qualitatives du microbiote sont qualifiées de dysbiose. Ce déséquilibre du microbiote peut avoir diverses origines allant des changements physiologiques de l'hôte aux infections.

A l'instar des autres muqueuses (intestinale ou bronchique par exemple), la conjonctive possède un microbiote spécifique. Ce dernier se développe dès la naissance, et diffère en fonction du type d'accouchement (voie basse ou césarienne) ; même si cette différence s'estompe dans les premiers jours suivant la naissance [20,21]. En raison d'une surface limitée et de la faible abondance de la flore, l'analyse du microbiote conjonctival requiert des techniques particulières. Son analyse est donc plus techniquement délicate que celle du microbiote intestinal par exemple [16,22].

Historiquement l'étude du microbiote oculaire a débuté avec les techniques de culture qui ne permettaient d'identifier que les micro-organismes cultivables. La méthode la plus utilisée actuellement est celle du séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. Une fois les séquences 16S attribuées au micro-organisme correspondant, l'analyse qualitative du microbiote est possible aux différents niveaux taxonomiques : depuis le règne jusqu'à l'espèce. Le niveau taxonomique de l'attribution dépend du type de séquençage réalisé. L'analyse des régions V3-V4 (la plus fréquemment utilisée) permet une identification fiable du phylum et de nombreux genres. Pour obtenir une identification au niveau de l'espèce, un séquençage du 16S complet est nécessaire [23]. Dans le cas du microbiote oculaire, la pauvreté des échantillons limite les possibilités d'obtenir ce niveau de précision taxonomique. La majorité des études du microbiote oculaire s'intéressent donc au niveau taxonomique du genre, voire parfois du phylum afin d'obtenir des tendances plus claires et des différences significatives entre les groupes comparés.

Du fait de toutes ces spécificités et de la grande sensibilité aux méthodes utilisées, l'analyse du microbiote oculaire (ainsi que la mise en évidence d'un microbiote conjonctival physiologique) reste techniquement très complexe [16].

- **Microbiote conjonctival physiologique**

Le microbiote conjonctival physiologique est majoritairement constitué de bactéries des phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Firmicutes* [24]. Les genres les plus fréquemment retrouvés dans les microbiotes de sujets sains sont *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, et *Acinetobacter* [25–30].

Dans les études du microbiote conjonctival reposant sur des techniques de culture bactérienne, les principaux genres identifiés étaient *Staphylococcus spp.*, *Propionibacterium sp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus aureus*, ou encore *Micrococcus sp.* [31]. Les méthodes de biologie moléculaire désormais employées, et plus particulièrement de séquençage, ont mis en évidence la présence de micro-organismes non-cultivables, mettant en lumière le caractère partiel des études utilisant la méthode de culture. Dans une étude du microbiote conjonctival de sujets sains reposant sur le séquençage de l'ARNr 16S, 88% des séquences appartenaient aux phyla *Proteobacteria* (64%), *Actinobacteria* (20%), et *Firmicutes* (4%) [26].

Les résultats des différentes études ont mis en évidence une grande variabilité interindividuelle qui rend difficile la caractérisation d'un « microbiote physiologique de référence » [23,32]. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer la composition du microbiote oculaire tel que le genre [30], l'environnement [23,33], ou encore l'âge [27,30,34]. D'autres facteurs tel que le port de lentilles de contact modifient également le microbiote conjonctival, avec notamment une diminution quantitative des micro-organismes prélevés [35,36]. Toutes ces variations interindividuelles rendent la description d'un microbiote physiologique difficile, et, à ce jour, toujours inconcluant [23,32].

- **Microbiote conjonctival au cours des pathologies**

Les évolutions du microbiote oculaire ont été étudiées dans de nombreuses pathologies oculaires et systémiques :

- Allergie oculaire [37,38],
- Blépharite [39,40],
- Diabète [41–45],
- Dysfonctionnement des glandes de Meibomius [46–49],
- Kératoconjonctivite [50],

- Lymphome conjonctival [51],
- Maladie greffon contre hôte oculaire [52],
- Ptérygion [53],
- Sécheresse oculaire et syndrome de Sjögren [49,54–60],
- Syndrome de Stevens-Johnson [61],
- Trachome [27,62,63],
- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [64].

Une dysbiose a été observée dans la majorité de ces situations. Mais en l'absence de microbiote conjonctival physiologique de référence, la caractérisation de ces dysbioses et des liens de causalité avec les pathologies reste délicate.

Il est important de noter qu'au-delà de l'impact des pathologies elles-mêmes, les traitements ont aussi une influence sur le microbiote oculaire, particulièrement lorsque la stratégie thérapeutique comporte un traitement antibiotique [65,66].

## ***2) Les autres constituants de la surface oculaire***

### ***a) Les paupières***

Les paupières recouvrent et protègent la surface oculaire et sont constituées de plusieurs couches de l'extérieur vers l'intérieur :

- **Un épiderme** (épithélium pavimenteux stratifié kératinisé) mince en contact avec l'extérieur,
- **Une couche épaisse de tissu conjonctif lâche**. C'est dans cette couche que l'on trouve le muscle orbiculaire de l'œil qui permet la fermeture des paupières,
- **Une couche fibro-élastique cartilagineuse**, ou tarse (présent dans les paupières supérieures et inférieures),
- **Une couche de fibres musculaires lisses**, le muscle de Müller pour la paupière supérieure qui permet l'ouverture de la paupière,
- **La conjonctive tarsale** qui tapisse la face interne des paupières.

Les cils s'implantent en trois ou quatre rangées sur les bords libres de la paupière. Le bord libre supérieur, qui mesure environ 30mm, comprend entre 70 à 160 cils. Enfin, le bord libre inférieur, qui mesure, lui, environ 25mm, comprend 70 cils environ.

Les deux bords libres des paupières comprennent des glandes dont les sécrétions sont essentielles au film lacrymal (Figure 5) :

- **Les glandes de Meibomius**, tubulo-acineuses, présentes dans le tarse (entre 25 et 30) et dont l'orifice s'ouvre sur le bord libre de la paupière, qui sécrètent la partie lipidique du film lacrymal,
- **Les glandes de Moll**, glandes sudoripares, qui jouent un rôle dans la thermorégulation ainsi que dans l'immunité via la production d'immunoglobuline A et de lysozyme. Elles sont associées aux follicules pileux des cils, dans le canal desquels elles s'abouchent,
- **Les glandes de Zeiss**, glandes sébacées associées aux follicules pileux ciliaires, à raison de 2 glandes par cils.

L'intégrité des paupières est indispensable au maintien de l'homéostasie de la surface oculaire. Comme expliqué ci-dessous (voir en page 44), certaines pathologies conjonctivales, en particulier les conjonctivites fibrosantes comme le trachome, peuvent occasionner des déformations palpébrales préjudiciables pour la transparence cornéenne.

### ***b) La cornée***

La cornée est la partie antérieure transparente avasculaire du globe oculaire. Elle est séparée de la conjonctive par le limbe. La cornée est constituée de plusieurs couches tissulaires, de l'extérieur vers l'intérieur :

- **L'épithélium cornéen**, pluristratifié, non kératinisé, d'une épaisseur variant de 50 à 70  $\mu\text{m}$ , reposant sur une membrane basale. Les cellules souches de l'épithélium cornéen se trouvent dans le limbe,
- **La couche de Bowman**, acellulaire, constituée de collagène et séparant l'épithélium du stroma,
- **Le stroma cornéen**, principalement constitué de lamelles de collagène (principalement de type I et V) superposées en couches parallèles, et de kératocytes, en assurant la synthèse,
- **La couche de Dua**, acellulaire, composée de collagène et d'élastine, séparant le stroma de la membrane de Descemet,
- **La membrane de Descemet**, membrane acellulaire limitant le stroma dans sa partie postérieure, sur laquelle repose,
- **L'endothélium cornéen**, couche unicellulaire assurant les échanges métaboliques entre l'humeur aqueuse et le stroma cornéen et le maintien de l'équilibre de l'hydratation du stroma.

La cornée est le siège d'une innervation principalement sensitive constituée de troncs stromaux issus de la branche naso-ciliaire du nerf trigéminal [67]. Ces derniers se ramifient sous la membrane basale épithéliale en un plexus dense, d'où émergent les terminaisons innervant l'épithélium cornéen. La densité de ces terminaisons nerveuses (7000/mm<sup>2</sup>) est la plus importante du corps humain.

En condition physiologique, la cornée est un tissu avasculaire. Les vaisseaux lymphatiques se terminent dans la zone limbique, en périphérie de la cornée. L'immunité cornéenne est assurée par un nombre très limité de cellule, ce qui concourt au statut particulier de privilège immunitaire de ce tissu. Les leucocytes ne sont pas retrouvés dans la cornée en condition physiologique mais des cellules myéloïdes immatures impliquées dans les réponses innées et adaptatives sont toutefois présentes [68]. Des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (cellules de Langherans) sont présentes dans l'épithélium de la cornée périphérique, mais pas en cornée centrale [69]. Enfin, une faible population de cellules dendritiques dérivées des macrophages est retrouvée dans les stromas antérieur et postérieur [68].

L'intégrité du film lacrymal et de l'épithélium cornéen sont indispensables au maintien de la transparence cornéenne, elle-même nécessaire au maintien de la fonction visuelle.

Les kératites désignent les affections inflammatoires de la cornée. Elles peuvent être d'origine mécanique (frottement des cils, malocclusion des paupières), inflammatoires ou infectieuses. Elles peuvent être responsables de cicatrices opaques de la cornée, responsables d'une perte de transparence du tissu cornéen. Comme expliqué ci-dessous (voir en page 44), les atteintes cornéennes dans le cadre du trachome sont causées par une irritation mécanique chronique par malposition des cils et des paupières, elle-même secondaire aux lésions de fibrose conjonctivale.

### ***c) Le film lacrymal et les glandes lacrymales***

Le film lacrymal tapisse l'ensemble de la surface oculaire. Il permet le maintien de la transparence cornéenne et d'une surface réfractive lisse indispensable au cheminement des rayons lumineux vers la rétine. Il joue également un rôle essentiel de lubrification et de protection de la surface oculaire [70]. Il assure en effet la clairance des particules et des toxiques venant au contact de l'œil, mais a également un rôle dans la réponse immunitaire et contient de nombreuses protéines (telles que la lactoferrine, le lysozyme, la lipocaline), cytokines et immunoglobulines.

Le volume du film lacrymal est d'environ de 7 à 10  $\mu\text{L}$  [70], avec une épaisseur de 2 à 6  $\mu\text{m}$ . Il est schématiquement composé de trois couches :

- **La couche mucinique**, sécrétée par les cellules à mucus, se trouvant au contact de l'épithélium et assurant l'ancrage du film lacrymal aux cellules épithéliales de la surface oculaire,
- **La couche aqueuse**, sécrétée par les glandes lacrymales (principale et accessoires), qui a un rôle d'humidification, de transport d'oxygène et de nutriments,
- **La couche lipidique**, principalement sécrétée par les glandes de Meibomius, se trouvant à la surface du film lacrymal et limitant son évaporation.

Les glandes lacrymales à l'origine de la sécrétion de la couche aqueuse intermédiaire du film lacrymal comprennent :

- **Une glande lacrymale principale**, est principalement composée de cellules acineuses [71]. Située dans le coin extérieur supérieur de l'orbite, elle est responsable de la sécrétion lacrymale réflexe qui est déclenchée par une réponse protectrice (pour éliminer par exemple une particule ou toxine) ou émotionnelle,
- **Les glandes lacrymales accessoires**, qui sont des composantes du chorion conjonctival, détaillées ci-dessus.

## II/ Techniques d'exploration de la surface oculaire

L'exploration clinique et l'imagerie de la surface oculaire sont facilitées par son accessibilité et la transparence de certains tissus. A l'opposé, les explorations biologiques posent de nombreux défis, en raison des faibles volumes et concentrations des prélèvements (larmes, écouvillons, empreintes conjonctivales) réalisés.

Le panel de techniques disponibles pour surveiller et analyser la surface oculaire est varié avec, en allant du moins invasif au plus invasif :

- L'examen clinique, que ce soit par observation direct, au biomicroscope où à l'aide de photographies,
- Les autres techniques d'imagerie,
- Le prélèvement de larmes,
- Le prélèvement d'écouvillons conjonctivaux,
- L'empreinte conjonctivale,
- L'histologie et la cytologie.

### **a) Examen clinique de la surface oculaire**

L'examen clinique, idéalement à l'aide d'une lampe à fente (ou biomicroscope), permet une évaluation très précise de la surface oculaire. L'examen direct permet d'analyser le bord palpébral (y compris les cils et les orifices des glandes), la quasi-totalité de la muqueuse conjonctivale (les conjonctives tarsales sont examinées après éversion de la conjonctive) et la cornée. Les lésions élémentaires de conjonctivites (voir ci-dessous en page 44) sont parfaitement identifiables, de même que les atteintes cornéennes. La lampe à fente permet d'analyser la profondeur des atteintes cornéennes (opacité, néovascularisation, ulcérations).

L'instillation de colorants vitaux (fluorescéine, vert de Lissamine, et rose Bengale) et l'observation de la surface à l'aide de lumières de couleur spécifiques (bleu cobalt pour la fluorescéine) et d'un filtre (jaune pour la fluorescéine) permet d'étudier la dynamique du film lacrymal (stabilité mesurée par le temps de rupture du film lacrymal) et les anomalies des épithéliums conjonctivaux et cornéens (telles que des ulcérations). L'examen peut être complété par la réalisation de photographies.

### **b) Autres techniques d'imagerie**

L'accessibilité et la transparence de certains tissus de la surface oculaire ont contribué aux développements de nombreuses modalités d'imagerie de la surface oculaire. Nous ne détaillerons pas ici ces différentes technologies qui permettent une analyse, pour certaines, quasi histologique de la surface oculaire, dans la mesure où elles n'ont pas été mises en œuvre dans ce projet.

Parmi ces techniques, il est intéressant de citer la tomographie par cohérence optique, la microscopie confocale *in vivo* [72], la meibographie infrarouge, ou encore la topographie cornéenne.

### **c) Analyse des larmes**

L'analyse des larmes constitue un moyen non-invasif d'étude des pathologies de la surface oculaire. Leur analyse s'avère aussi utile dans les études d'efficacité de stratégies thérapeutiques. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour prélever les larmes :

- **Par tube microcapillaire, micropipette ou pipette de transfert**, directement dans le fornix inférieur, avec ou sans stimulation du réflexe lacrymal [73]. Ces méthodes sont les plus précises car elles permettent de mesurer le volume prélevé, facilitant ainsi les analyses quantitatives. Ces

techniques de prélèvement n'altèrent pas les composants des larmes, et permettent aussi les analyses qualitatives,

- **Par bandelette de Schirmer**, plus utilisée en cas de difficultés à obtenir une quantité suffisante de larmes (par exemple dans les cas de sécheresse oculaire avec hyposécrétion lacrymale). Cette méthode, utilisée en routine dans l'évaluation des patients atteints de sécheresse oculaire [73], consiste à déposer une bandelette de papier Whatman graduée dans le fornix inférieur, qui absorbe les larmes par capillarité,
- **Par rinçage de l'œil**, qui consiste à rincer la conjonctive à l'aide d'un tampon ou de sérum physiologique pour ensuite récupérer le liquide. La quantité recueillie est alors plus grande mais au prix d'une dilution qui rend parfois les quantifications difficiles.

Suivant la technique utilisée, l'étude des larmes permet la recherche et le dosages de protéines (lactoferrine, transferrine, lysozyme, neuromédiateurs, cytokines, chimiokines, immunoglobulines) mais également de lipides et d'acides nucléiques [74]. Les différentes techniques de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR), protéomique, ou encore transcriptomique sont utilisables sur les larmes ; la principale limite étant le volume et la faible concentration des échantillons.

#### ***d) Écouvillons oculaires***

L'écouvillonnage conjonctival et/ou cornéen est pratiqué en routine pour l'exploration microbiologique. Cette méthode est utilisée pour le diagnostic des pathologies infectieuses de la surface oculaire telles que les conjonctivites, les kératoconjonctivites, et les kératites et permet la mise en évidence d'agents étiologiques.

L'écouvillon permet de prélever à la fois les larmes, le mucus oculaire mais aussi des cellules (microorganismes, populations cellulaires commensale, ou encore infiltrat immunitaire).

Les écouvillons conjonctivaux sont également employés pour l'étude du microbiote conjonctival [31,75]. Le séquençage peut être réalisé depuis des prélèvements de larmes ou de fluides conjonctivaux. Il est à noter que la méthode de prélèvement des fluides conjonctivaux affecte l'analyse qui en découle. En effet, le type d'écouvillon utilisé pour prélever les fluides conjonctivaux impacte la qualité et la quantité du prélèvement effectué [34]. L'analyse de prélèvements réalisés avec des écouvillons en coton donnent des résultats assez différents de ceux obtenus par biopsie conjonctivale, non pratiquée en routine, mais qui constitue la référence [34] (notamment l'absence du genre *Bacteroides* dans les prélèvements d'écouvillons en coton). A l'inverse, les



résultats obtenus sur des prélèvements réalisés à l'aide d'écouvillons en alginate de calcium ont montré des résultats très similaires à ceux retrouvés avec la biopsie [34].

Les échantillons prélevés par écouvillonnage peuvent faire l'objet des mêmes tests que les prélèvements lacrymaux. Tout comme ces derniers, leur analyse est parfois limitée par le volume et la concentration des échantillons (particulièrement les cellules peuvent être difficiles à éluer).

### ***e) Empreintes conjonctivales***

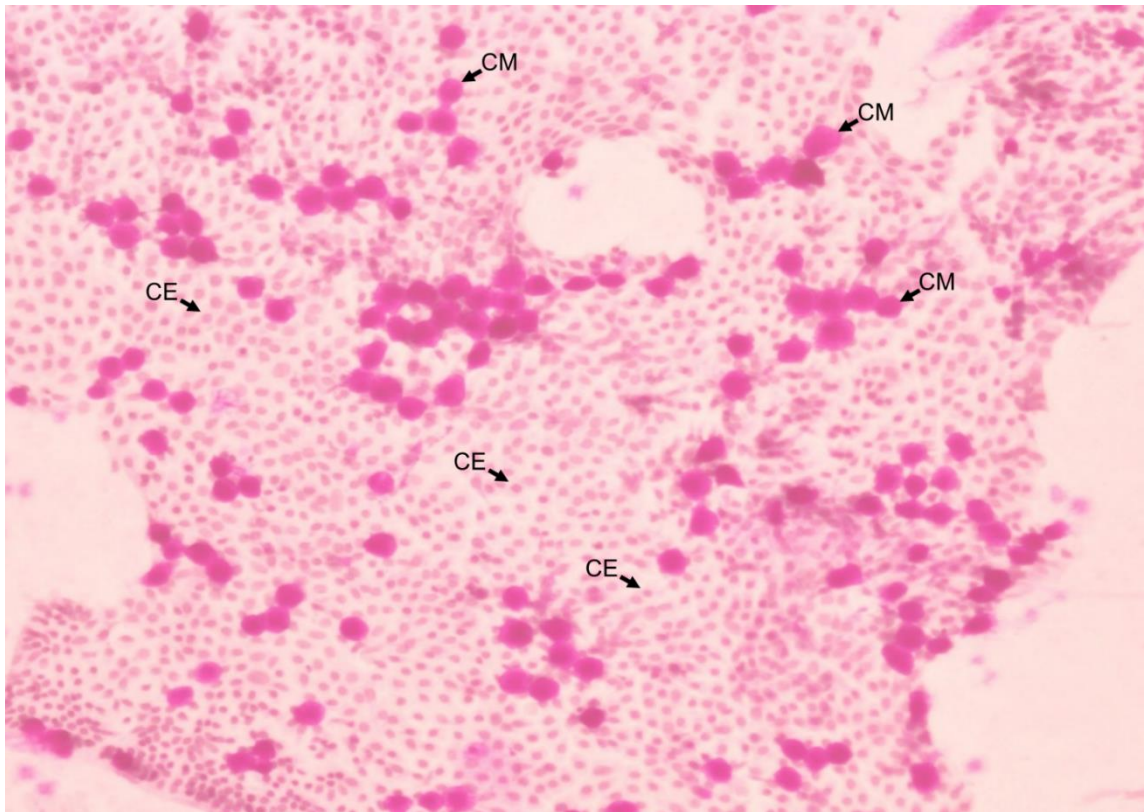
Décrites en premier par Thatcher *et al.* en 1977, les empreintes conjonctivales sont une technique non-invasive d'étude des cellules de la surface oculaire [76]. L'empreinte était initialement réalisée à l'aide d'une spatule en plastique lisse déposée sans anesthésie sur la paupière du patient. Le disque ayant été en contact direct avec la conjonctive était ensuite coloré et fixé puis directement collé à une lame histologique pour une observation au microscope avec une huile à immersion [76].

La technique actuelle consiste à déposer une membrane de nitrocellulose ou de polyéther sulfone sur la conjonctive (bulbaire le plus souvent, et plus rarement tarsale), puis de la décoller délicatement pour prélever la couche superficielle des cellules conjonctivales (Figure 6) [77].



*Figure 6 – Application d'une empreinte conjonctivale sur la conjonctive bulbaire.*

La membrane peut ensuite être directement analysée en cytologie avec une coloration directe qui permet de visualiser les cellules épithéliales et les cellules à mucus (Figure 7). Cette cytologie directe de l’empreinte conjonctivale est utilisée en complément des autres examens pour le diagnostic de certaines pathologies de la surface oculaire (comme la sécheresse oculaire).



*Figure 7 – Cytologie directe d’une empreinte conjonctivale. L’empreinte a été colorée par une coloration Periodic Acid Schiff (grossissement x100). CM = cellule à mucus, CE = cellule épithéliale*

Plusieurs critères peuvent être observés pour aider au diagnostic des pathologies de la surface oculaire [78] :

- La raréfaction des cellules à mucus,
- La métaplasie squameuse,
- La forme atypique de la chromatine à l’intérieur des cellules épithéliales (en serpent ou *Snake-like* [79]),
- Les modifications de morphologie des cellules épithéliales (allongement, gonflement notamment du cytoplasme).

L’observation d’infiltrats immunitaires est aussi un marqueur pathologique. Le type d’infiltrat peut être indicatif de la pathologie. A titre d’exemple, les infiltrats éosinophiles sont typiques des conjonctivites allergiques.

En complément des colorations directes, l’empreinte peut aussi être directement marquée par immunofluorescence, pour mieux visualiser certains types cellulaires (cellules à mucus marquées par MUC5AC [80] ou myo-fibroblastes marqués par  $\alpha$ -SMA [81]), ou identifier des structures d’intérêts comme le cytosquelette (marquage de l’actine par l’ $\alpha$ -SMA [81,82]) ou certaines protéines membranaires (marquage des « Toll like receptors » [83]).

Les empreintes conjonctivales permettent aussi l’analyse des cellules recueillies par cytométrie en flux. Cette analyse a déjà été utilisée à la fois dans l’aide au diagnostic (œil sec, conjonctivite allergique, ou encore atteinte toxique de la conjonctive) ; mais aussi pour étudier les effets bénéfiques et/ou toxiques de stratégies thérapeutiques oculaires [84].

Dans ce but, les marqueurs couramment utilisés pour l’analyse des cellules éluées à partir d’empreintes conjonctivales sont des marqueurs immuno-inflammatoires (comme HLA-DR ou TNF- $\alpha$ ), des marqueurs d’apoptose (comme l’annexine-V ou l’APO2.7) ou des marqueurs du cycle cellulaire. Il est à noter que l’intensité de l’expression du marqueur HLA-DR par les cellules épithéliales conjonctivales est corrélée aux signes et aux symptômes des pathologies inflammatoires de la surface oculaire [85,86]. Ce marquage est utilisé dans les essais cliniques comme un biomarqueur d’efficacité et permet d’évaluer l’effet des traitements immunomodulateurs de la sécheresse oculaire [87]. Il a également permis de confirmer l’inflammation de la surface oculaire (parfois infraclinique) chez les porteurs de lentilles de contact, ou les patients traités par collyre anti-glaucome au long cours [88].

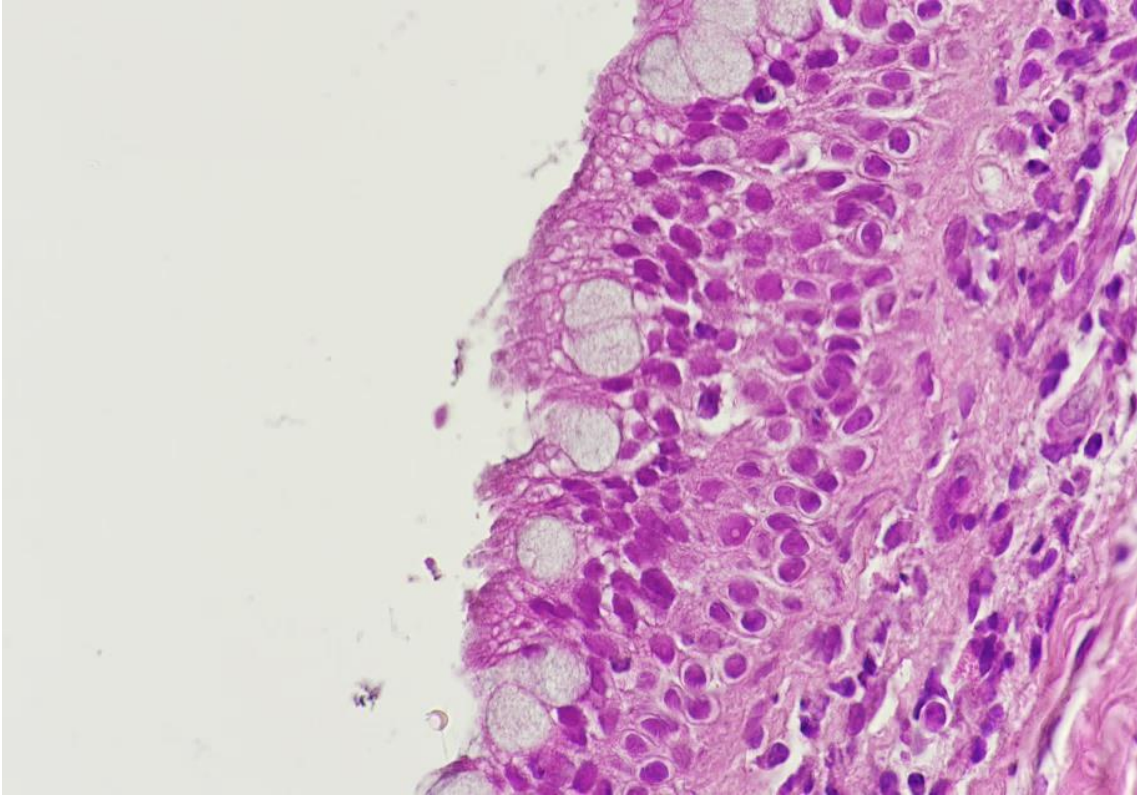
Enfin l’utilisation des empreintes conjonctivales permet aussi des analyses de transcriptomique qui ont déjà permis d’étudier le profil d’expression des gènes dans des cas de sécheresse oculaire [89].

### ***f) Histologie et cytologie***

L’histologie conjonctivale est une technique invasive d’exploration de la surface oculaire. Elle peut être réalisée sur une biopsie (réalisée sous anesthésie locale) ou sur un œil complet.

L’étude histologique comprend l’étude morphologique avec des colorations des coupes tissulaires (par exemple à l’Hématoxyline-Eosine ou *Periodic Acid Schiff*) (Figure 8), mais également des marquages spécifiques en immuno-fluorescence et en immuno-histo-chimie.

Les études histologiques permettent également la recherche et la quantification de pathogènes (par marquage d'antigènes pathogène-spécifiques), ou encore la quantification directe de populations cellulaires (que ce soit par analyse d'immunomarquages de coupes tissulaires ou par analyse en cytométrie en flux après digestion tissulaire).



*Figure 8 – Coupe histologique d'une conjonctive saine (coloration Hématoxyline-Eosine, grossissement x60)*

Une autre méthode d'analyse possible est la cytologie de cellules superficielles de la conjonctive. Le prélèvement de ses dernières est réalisé avec un grattage de la surface oculaire. Bien que moins invasive qu'une biopsie, la technique engendre tout de même une altération de la muqueuse. L'aspect invasif de la technique empêche aussi, tout comme avec une biopsie, qu'elle soit fréquemment répétée. Les cellules ainsi prélevées peuvent ensuite être déposées sur une lame histologique pour subir les mêmes analyses que les coupes tissulaires histologiques issues de biopsies [90]. La cytologie par grattage n'est de nos jours plus utilisée en routine et a été remplacée par la technique moins invasive des empreintes conjonctivales (décrite ci-dessus en page 40).

### III/ Les conjonctivites

Les affections de la conjonctive, ou conjonctivites, peuvent être d'origine infectieuse (le plus souvent virus ou bactéries) ou inflammatoire (allergiques ou auto-immunes), d'évolution aiguë ou chronique.

Les conjonctivites allergiques sont les formes les plus fréquentes. Elles concernent 15 à 40% de la population [91]. Parmi les causes infectieuses, les étiologies virales sont les plus fréquentes (majoritairement liés aux Adénovirus qui représente 65 à 90% des conjonctivites virales [92]) suivies par les infections bactériennes (majoritaires chez l'enfant, avec 50 à 75% des cas de conjonctivites infectieuses infantiles [91]).

#### *a) Les symptômes et les signes de la conjonctivite*

Les symptômes associent rougeur, sensation de gêne et de corps étranger, prurit (ou démangeaison) oculaire, larmoiement, et sécrétions muqueuses ou purulentes (la sécrétion de pus étant particulièrement typique des conjonctivites bactériennes).

L'examen clinique des conjonctivites aiguës montre une hyperhémie conjonctivale (par vasodilatation des vaisseaux sous-muqueux), des papilles, des follicules, et dans les cas les plus sévères des fausses membranes :

- **Les papilles** sont des nodules ou pavés centrés autour d'un vaisseau. Bien que les papilles ne soient pas spécifiques d'une étiologie, elles sont particulièrement évocatrices de conjonctivite allergique [93],
- **Les follicules** sont des nodules lymphoïdes sans vaisseau sanguin central. Ils sont retrouvés dans les conjonctives allergiques, mais également dans les conjonctivites infectieuses, notamment à Adénovirus ou à *Chlamydia* [93],
- **Les fausses membranes** correspondent à des plaques de fibrine adhérentes à la muqueuse conjonctivale témoignant d'une inflammation intense. Elles surviennent le plus souvent au cours des conjonctivites virales ou à *Chlamydia* sévères.

Les conjonctivites aiguës n'ont généralement pas de conséquences visuelles. Le traitement est essentiellement symptomatique. Les traitements étiologiques sont réservés aux formes sévères (antibiotiques pour les conjonctivites bactériennes).

#### *b) Les formes compliquées de conjonctivites*

Bien que la majorité des conjonctivites soit bénignes, les formes sévères ou chroniques de conjonctivite peuvent se compliquer d'atteintes qui peuvent menacer la fonction visuelle, telles que la fibrose conjonctivale et les atteintes cornéennes. Une atteinte

palpébrale de contiguïté (blépharite) ou une extension de l'infection au sac lacrymal (dacryocystite) sont également possibles. Les complications des conjonctivites peuvent dans certains cas amener à la formation d'un pannus, c'est-à-dire une vascularisation anormale de la cornée d'origine inflammatoire.

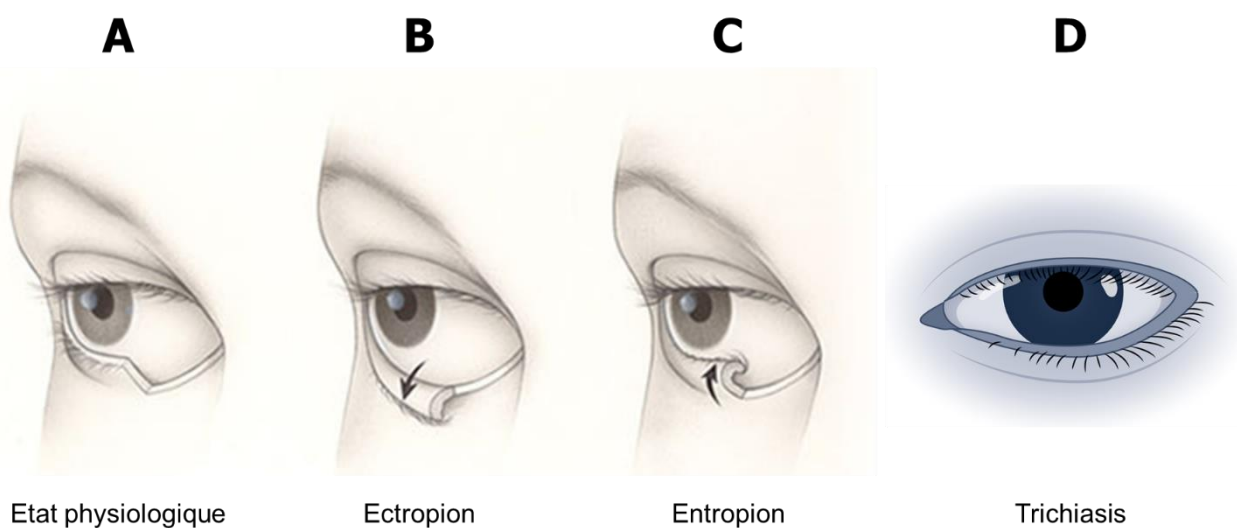
- **Fibrose conjonctivale**

Les lésions de fibrose conjonctivale correspondent à une destruction de l'architecture normale de la muqueuse remplacée par du tissu cicatriciel. La fibrose est associée à un processus inflammatoire et intimement lié à l'action de cellules immunitaires telles que les lymphocytes ou macrophages.

Dans les cas les plus sévères, l'accumulation de tissu cicatriciel va combler les fornix puis occasionner des accolements entre les conjonctives tarsales et bulbaires : les symblépharons [94].

La rétraction palpébrale secondaire à la fibrose peut engendrer une déformation palpébrale qui peut prendre les formes suivantes :

- **Un ectropion**, éversion de la paupière vers l'extérieur entraînant une exposition de la cornée et de la conjonctive palpébrale (Figure 9 B) [95],
- **Un entropion**, bascule de la paupière vers l'intérieur entraînant un frottement des cils contre la surface oculaire (Figure 9 C) [95],
- **Un trichiasis**, c'est-à-dire le frottement des cils contre la cornée, il est généralement précédé de l'entropion (Figure 9 D) [96].



*Figure 9 – Différentes positions de la paupière inférieure (A) Normale, (B) Ectropion, (C) Entropion [97], et (D) Trichiasis [98].*

- **Atteintes cornéennes**

Certaines conjonctivites peuvent se compliquer d'atteintes cornéennes (qualifiées de kératoconjonctivites), d'origine immunologique, toxique (médiateurs de l'inflammation) ou mécanique (frottement de la conjonctive, ou bien des cils et des paupières). Ces atteintes peuvent être responsables d'opacités cicatricielles, parfois accompagnées d'une néovascularisation (panus cornéen), qui font toute la sévérité de ces atteintes.

Parmi toutes ces atteintes conjonctivales, la conjonctivite bactérienne à *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), plus connu sous le nom de trachome, est une des causes majeures de cécité causée par une maladie infectieuse.

## IV/ Le trachome

Le trachome est une kératoconjonctivite bactérienne chronique causée par des infections répétées par *C. trachomatis*. Elle constitue un problème de santé publique et l'une des premières causes de cécité d'origine infectieuse dans le monde.

### 1) *Chlamydia trachomatis*

#### a) Description générale, cycle de vie

Les *Chlamydiae* sont des bactéries gram négatives à développement intracellulaire obligatoire présentes chez de très nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés. La LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) a référencé 12 espèces appartenant au genre des *Chlamydia* [99,100] (Tableau 1).

Tableau 1 – Description des espèces du genre *Chlamydia* (\*avec l'ajout de *C. caviae* non-inclus dans la nomenclature LPSN)

Espèce bactérienne	Espèce(s) infectée(s)	Maladie(s) engendrée(s)
<i>Chlamydia abortus</i>	Humains, Bétail	Accouchements prématurés, avortements [101]
<i>Chlamydia avium</i>	Oiseaux	Infection respiratoire [102]
<i>Chlamydia buteonis</i>	Oiseaux (buse, aigle)	Conjonctivite, mort [103]
* <i>Chlamydia caviae</i>	Cobayes	Conjonctivite, infections respiratoire et génitale, avortements [104]
<i>Chlamydia felis</i>	Félins (chats)	Conjonctivite, infection respiratoire [105]
<i>Chlamydia gallinacea</i>	Oiseaux	Infection respiratoire [102]
<i>Chlamydia muridarum</i>	Rongeurs (souris, hamster)	Infections respiratoire, intestinale et génitale [106]
<i>Chlamydia pecorum</i>	Ruminants (bovins, ovins, caprins)	Retard de développement, infection respiratoire [107]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Humains	Infection respiratoire, arthrosclérose [108]
<i>Chlamydia poikilotherma</i>	Reptiles (serpents)	Conjonctivite, hépatite nécrosante, myocardite nécrosante, mortalité juvénile [109]
<i>Chlamydia psittaci</i>	Oiseaux, rongeurs, humains	Infections non-spécifiques (respiratoire, conjonctivite, toux, etc.), apathie, fatigue, mort subite [110]



<i>Chlamydia suis</i>	Porcs	Conjonctivite, infection respiratoire, polyarthrite, troubles digestif et de la reproduction [111]
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Humains	Trachome, infections uro-génitales, hypertrophie ganglionnaire [98]

Seule l'espèce *C. trachomatis* contient les agents responsables du trachome. Elle se décompose d'ailleurs en 2 biovars (Trachoma et Lymphogranuloma venerum) qui comprennent eux-mêmes 19 sérovars (de A à L3) (Tableau 2).

Les sérovars de *C. trachomatis* sont différenciés par des variations de séquence du gène *ompA* (pour *Outer Membrane Protein A*), codant pour la protéine membranaire externe majeure (ou MOMP pour *Major Outer Membrane Protein*) [112,113].

Tableau 2 – Description de l'espèce bactérienne *C. trachomatis*

Biovars	Sérovars	Maladie(s) associée(s)
Trachoma	A, B, Ba, C	Trachome
	D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J	Infections uro-génitales et infections oculaires non trachomateuses
Lymphogranuloma venerum	L1, L2, L2a, L3	Lymphogranulomatose vénérienne

Les agents étiologiques du trachome appartiennent aux biovars « Trachoma » et aux sérovars A, B, Ba ou C. Les autres sérovars du biovar « Trachoma » (D à J) sont responsables d'infections uro-génitales et d'infections oculaires non trachomateuses (le plus souvent par auto-inoculation). Enfin, les 4 sérovars du biovar « Lymphogranuloma venerum » sont responsables de la lymphogranulomatose vénérienne (ou LGV) [114] (voir ci-dessous en page 50).

En tant que pathogène intracellulaire obligatoire, le cycle de vie de *C. trachomatis* est centré autour de l'infection d'une cellule hôte [115]. Dans l'environnement extracellulaire, la bactérie prend la forme d'un corps élémentaire (EB pour *Elementary Body*), une particule bactérienne ayant la capacité de s'accrocher à la surface membranaire d'une cellule hôte (Figure 10, étape 1). La bactérie utilise un système de sécrétion de type 3 pour sécréter des protéines qui vont interagir avec le cytosquelette de la cellule hôte et déclencher un réarrangement des filaments d'actine. Ce dernier va permettre une invagination de la membrane plasmique de l'EB (Figure 10, étape 2) alors considéré comme une inclusion bactérienne qui va se différencier en un corps

réticulé (RB pour *Reticulate Body*) (Figure 10, étape 3). Le RB a un métabolisme plus actif et la capacité de se répliquer que ne possède pas l'EB (Figure 10, étape 4a). Durant ce processus, le métabolisme du RB produit des protéines d'inclusion qui vont interagir avec différentes voies de signalisation pour pérenniser la présence bactérienne dans la cellule hôte, notamment en inhibant la fusion du lysosome avec les inclusions bactériennes, et ainsi empêcher leur destruction (Figure 10, étape 5).

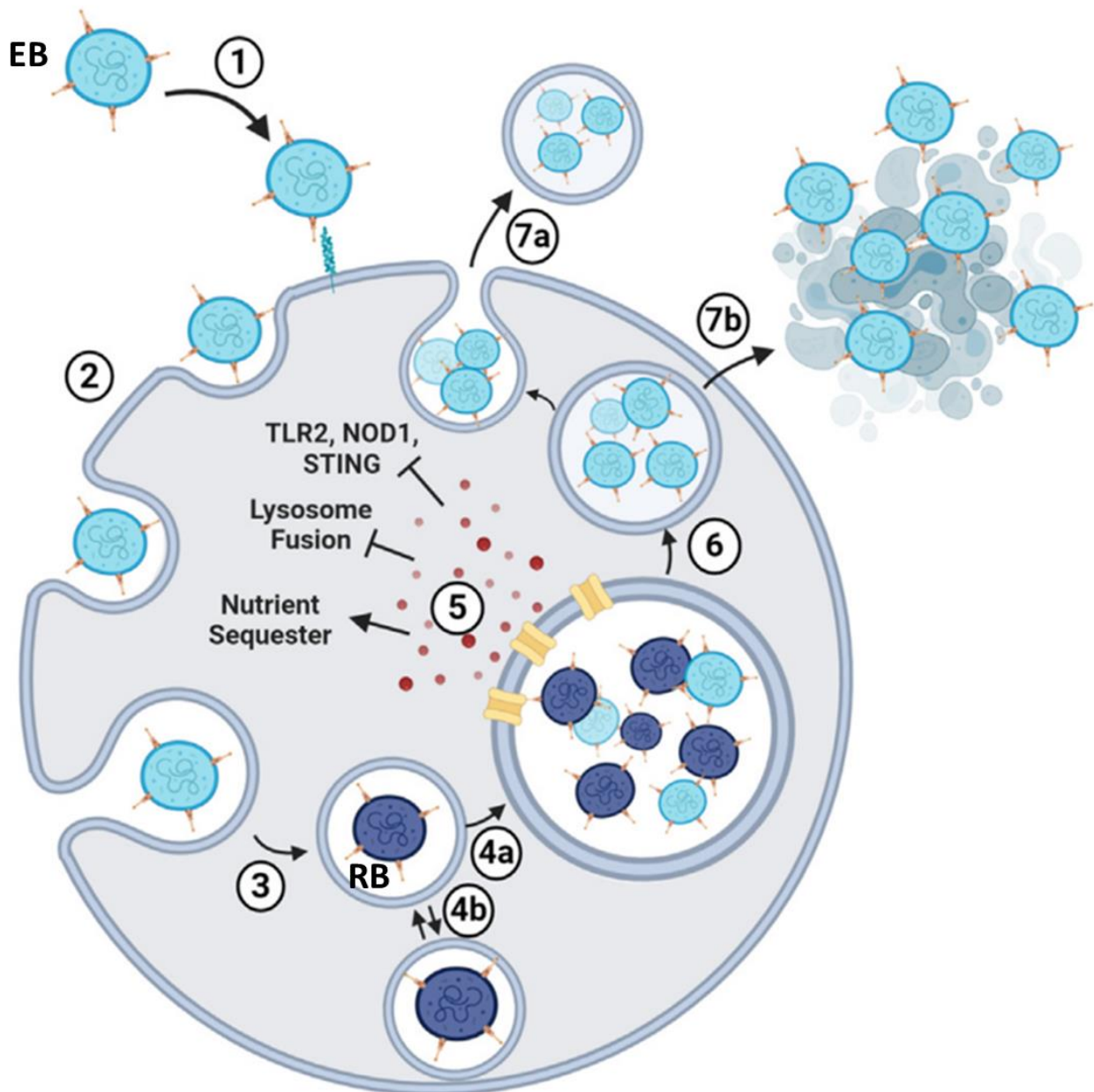


Figure 10 – Cycle de vie de *C. trachomatis*.

EB = Corps élémentaire, RB = Corps réticulaire, D'après Murray et al. 2021 [115].

Au terme d'un nombre suffisant de réplication, les particules bactériennes vont se différencier en EB capables de survivre dans le milieu extracellulaire (Figure 10, étape 6), puis quitter la cellule soit via un mécanisme d'extrusion (Figure 10, étape 7a), soit en déclenchant la lyse cellulaire de la cellule hôte qui libère le contenu de son cytoplasme et donc par la même occasion les EB. (Figure 10, étape 7b).

Lorsque la bactérie se trouve sous forme de RB dans une inclusion cytoplasmique, certaines inclusions ne démarrent pas de cycle de réplication mais restent dans un stade de persistance intracellulaire qui pourra par la suite évoluer pour assurer la réplication de la particule (Figure 10, étape 4b). Cette forme alternative du cycle de vie biphasique de *C. trachomatis* est qualifié de « corps aberrant » et est le plus souvent induit par l'exposition à des facteurs de stress [116].

### ***b) Autres pathologies causées par C. trachomatis***

Les pathologies non-oculaires liées aux infections à *C. trachomatis* sont liées à d'autres sérovars et/ou biovars que l'agent étiologique du trachome (Tableau 2).

**Les infections uro-génitales sexuellement transmissibles** représentent la majorité des infections liées à *C. trachomatis*. En effet, en dehors des sérovars A, B, Ba et C qui ont un tropisme pour les tissus oculaires, tous les autres sérovars de *C. trachomatis* ont un tropisme pour les tissus uro-génitaux. Il est estimé qu'environ 80% des infections uro-génitales à *C. trachomatis* sont asymptomatiques, donc non-diagnostiquées et non-traitées [117], ce qui rend cette maladie d'autant plus contagieuse [115]. En 2016, le nombre de cas de chlamydie génitale a été estimé dans le monde à 127,2 millions (une incidence de 3,8% chez les femmes et 2,7% chez les hommes) [118]. Les hommes comptent la majorité des cas asymptomatiques (les cas symptomatiques présentent le plus souvent une urétrite simple). Chez les femmes, les formes cliniques sont plus sévères, responsables notamment d'inflammations pelviennes, de grossesses extra-utérines ou encore d'infertilité.

**La lymphogranulomatose vénérienne**, (LGV, ou maladie de Nicolas-Favre), est une autre maladie sexuellement transmissible causée par *C. trachomatis*, mais plus agressive. Contrairement aux autres maladies causées par *C. trachomatis*, la LGV touche en large majorité les hommes et a un tropisme pour le système lymphatique. Les premiers signes cliniques sont des lésions cutanées ulcéranes, suivies de rectite hémorragique [119] accompagnées d'adénopathies inguinales douloureuses. En l'absence de traitement, la maladie évolue vers une obstruction lymphatique et un lymphoedème chronique des organes génitaux [114].

## ***2) Historique du trachome***

Le trachome est l'une des maladies infectieuses les plus anciennement connues [120,121]. Les premières traces écrites de la maladie remontent à l'Antiquité.

Des mentions relatives au trachome (notamment d'une chirurgie du trichiasis pratiquée sur l'empereur Huang Ti Nei Ching) ont été retrouvées dans un livre de médecine chinoise datant du 25<sup>ème</sup> siècle avant notre ère [122], indiquant une possible origine de la maladie en Extrême-Orient.

Des descriptions de trachome ont également été retrouvées en Égypte dans les papyrus d'Ebers datant du 15<sup>ème</sup> siècle avant notre ère [123]. Dans ces temps pré-pharaoniques, le traitement comprenait des collyres contenant un assemblage de sels. Des pinces utilisées pour l'épilation des cils trichiasiques ont été retrouvées dans une tombe remontant à 1900 ans avant notre ère [124].

En raison de la rareté des écrits de ces époques et des imprécisions dans les descriptions, il est impossible de situer précisément l'origine du trachome. L'apparition de la bactérie elle-même serait contemporaine de l'apparition des premiers mammifères, il y a environ 100 millions d'années. Les souches génitales et oculaires de la bactérie auraient divergé il y a approximativement 2 à 5 millions d'années [125].

Le nom de la maladie provient du grec ancien « τράχωμα » ou trachoma, signifiant rugosité, et a conduit au terme « conjonctivite granuleuse ou rugueuse » longtemps usité pour cette maladie. La maladie a été décrite plus précisément par Hippocrate au 5<sup>ème</sup> siècle avant notre ère [126].

Au Moyen-Age, des évocations de la maladie sont retrouvées dans différentes régions du monde. La dissémination du trachome a, semble-t-il, été grandement facilitée par les différentes guerres, invasions et colonisations qui ont jalonné l'histoire humaine. C'est d'ailleurs le trachome qui est à l'origine de la création de l'hôpital des Quinze-Vingts par Saint-Louis, pour héberger trois cents aveugles au retour de sa croisade, pendant lesquelles le trachome a largement participé à la perte d'efficacité des troupes en raison de la malvoyance induite. A ce titre, le trachome a par ailleurs été qualifié d'ophtalmie militaire en 1903 par Boldt, en raison de la très forte prévalence chez les militaires revenant de campagnes [127].

Aussi récemment qu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle, le trachome était encore un problème de santé publique dans certains pays européens. Une étude épidémiologique de 1931 décrivait le trachome comme un problème de santé commun dans des pays européens comme l'Italie, la Grèce ou la Pologne, avec des foyers encore importants en France, en Allemagne ou en Espagne [128]. Cette même étude rapportait également que les pays du pourtour méditerranéen avaient tous une forte prévalence, et qu'il existait des foyers infectieux en Australie et aux Etats-Unis (Figure 11).

- (1) *Practically Universal*.—Egypt ; the Levant ; Morocco, Algeria and Tunisia ; Palestine, Arabia, Persia and Iraq.
- (2) *Very Common*.—Italy ; Greece ; Corsica ; Sardinia ; Poland ; Lithuania ; Latvia ; Estonia ; Finland ; Czecho-Slovakia ; Russia ; China ; Indo-China ; Japan ; Argentina ; Mexico ; Turkey.
- (3) *Occasional with Local Heavy Infections*.—Ireland ; Holland ; Belgium ; France ; Spain ; Portugal ; Hungary ; Austria ; Germany (very local : East Prussia) ; Albania ; Yugo-Slavia ; Bulgaria ; Rumania ; Australia (very local) ; United States of America (very localized, especially among the Indians.)
- (4) *Rare*.—England ; Scotland ; Wales ; Norway ; Sweden ; Denmark ; New Zealand ; Canada.

*Figure 11 – Épidémiologie du trachome en 1936.*

*Les pays sont catégorisés selon que la prévalence soit pratiquement universelle (1), très commune (2), occasionnelle avec des foyers infectieux importants (3) ou rare (4). D'après MacCallan 1936 [128]*

L'éradication du trachome en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord a été effective dans les années 1950 [129] bien qu'il ait fallu attendre les années 1980 pour confirmer l'éradication totale du trachome dans les derniers foyers des Etats-Unis qui persistaient dans certaines réserves indiennes du Sud-Ouest du pays [130].

La première description des inclusions conjonctivales à *C. trachomatis* ont été réalisées en 1907 par Halberstaedter et Von Prowasek. Leurs observations ont été faites sur des prélèvements de patients ainsi que sur leur modèle animal (Orang-outan) [131]. Bien qu'ils aient observé et décrit pour la première fois ces inclusions typiques, elles étaient alors attribuées à un protozoaire et non pas à une bactérie.

La description elle-même de la maladie a évolué depuis la description de « conjonctivite granuleuse » utilisée dans l'Antiquité. La première classification moderne, proposée par MacCallan en 1936, distinguait 4 stades allant de la conjonctivite folliculaire à la fibrose conjonctivale complète (Figure 12), et a posé les bases des classifications actuelles de la maladie [128].

L'OMS a pour sa part proposé une première classification en 1966 [132], dont la version simplifiée, parue en 1987, fait encore référence de nos jours (Figure 14) [133].

MACCALLAN'S STAGES OF TRACHOMA

**A**

Stage I or Tr. I	Early stage of "pin's head" follicles.
Stage II or Tr. II	Subdivided into:—
Tr. II $\alpha$	where follicles are large and gelatinous.
Tr. II $b'$	papillary enlargement as well as follicles.
Tr. II $b''$	follicles with the added complication of spring catarrh.
Tr. II $c$	trachoma complicated by gonococcal conjunctivitis.
Stage III or Tr. III	Where cicatrization has commenced; often non-contagious.
Stage IV or Tr. IV	Where cicatrization of the conjunctiva is complete. This stage is non-contagious.

**B**

PHYSICAL SIGN	DEGREE OF INVOLVEMENT	SCORE <sup>1</sup>
<i>Ptoxis</i>	Detectable . . . . .	1
	Definite, but not completely covering the pupil	2
	Covering the pupil . . . . .	3
<i>Sinuous outline of the upper lid border (Herbert's sign)</i>	Present . . . . .	1
<i>Exudate (observed without previous cleaning)</i>	Minimal . . . . .	1
	Moderate, but lids not stuck together . . . . .	2
	Lids stuck together . . . . .	3
<i>Pre-auricular lymph nodes</i> Size	Just palpable. . . . .	1
	Easily palpable (but not detected by observation). . . . .	2
	Visibly enlarged . . . . .	3
Tenderness	Slight, elicited on palpation . . . . .	1
	Moderate, elicited on palpation (patient resenting palpation) . . . . .	2
	Severe, associated with pain . . . . .	3
<i>Hyperaemia of bulbar conjunctiva</i>	Circumcorneal flush or slight extension from the fornices . . . . .	1
	Patchy. . . . .	2
	Total, with or without minute haemorrhages. . . . .	3
<i>Oedema of upper lunula<sup>1</sup> (Wilson's sign)</i>	Detectable by major biomicroscope. . . . .	1
	Detectable by the naked eye or binocular loupe	2
	Bulbar chemosis . . . . .	3
<i>Conjunctival follicles<sup>2</sup></i> Upper tarsal conjunctiva	Involving less than 1/3 of the surface area . . . . .	1
	Involving 1/3 to 2/3 of surface area . . . . .	2
	Involving the entire surface area (not confluent)	3
	Total confluent involvement (Stellwag's sign)	4
Upper fornix	Slight involvement . . . . .	1
	Moderate or marked involvement but not confluent. . . . .	2
	Total confluent involvement . . . . .	3
Semilunar folds	Slight involvement . . . . .	1
	Moderate or marked involvement but not confluent . . . . .	2
	Total confluent involvement . . . . .	3
Bulbar conjunctiva	Presence of follicles. . . . .	1
Lower tarsal conjunctiva and fornix	Involving less than 1/3 of the surface area . . . . .	1
	Involving 1/3 or more of surface area short of total involvement . . . . .	2
	Involving the entire surface area . . . . .	3

Figure 12 – Premières classifications cliniques « modernes » du trachome. (A) Différents stades du trachome d'après MacCallan, 1936 [60]. (B) Score clinique de l'OMS décrivant les signes cliniques associés au trachome en 1966 [64].

### **3) Transmission bactérienne**

*Paragraphe adapté du chapitre « Infections à Chlamydia », du Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie à paraître en 2024 [134]*

« Le trachome est une pathologie liée au manque d'hygiène et à la promiscuité [98]. La contamination et les réinfections se font par transmission directe à partir d'objets (notamment linges souillés) ou mains contaminées par des sécrétions oculaires et nasales. Les mouches de l'espèce *Musca sorbens* peuvent jouer le rôle de vecteurs passifs [135]. La distribution géographique correspond globalement à la « ceinture de pauvreté » du globe, elle-même initialement superposée avec les zones tropicales, bien que le trachome ne soit pas déterminé par des facteurs climatiques. Plus la maladie est prévalente, plus elle débute tôt [136]. Dans les communautés les plus fortement touchées, la plupart des enfants sont infectés dès l'âge de 1 ou 2 ans. Ils constituent donc un réservoir d'autant plus vaste qu'ils représentent une proportion importante de la population. Dans les communautés moins atteintes, l'apparition de la maladie est plus tardive et son évolution est souvent moins grave. Le trachome finit par disparaître spontanément dès lors que la prévalence de l'infection descend au-dessous d'un certain seuil, de l'ordre de 5 % des enfants de moins de 10 ans. »

### **4) Epidémiologie**

Les études épidémiologiques sur le trachome sont particulièrement difficiles et coûteuses, en raison du manque de moyens matériels et humains, des conditions géopolitiques dans certaines zones endémiques mais aussi de la grande hétérogénéité de prévalence constatée sur le terrain, qui impose la réalisation de multiples relevés sur des zones géographiques limitées : les districts [137]. Les districts sont décrits comme les zones (ou unités) administratives normalement utilisées dans les politiques de santé public ; les régions étant désignées comme le niveau administratif supérieur au district [138].

#### **a) Un problème de santé mondial**

Le trachome reste toujours un problème de santé publique dans de très nombreux pays en développement [139]. Une zone est considérée comme endémique et nécessitant une intervention de la part de l'OMS lorsque la prévalence de trachome folliculaire (maladie active et potentiellement contagieuse) est supérieure ou égale à 5% et/ou que la prévalence du trichiasis trachomateux (phase cicatricielle) est supérieure ou égale à 0,2% [140]. Actuellement les zones endémiques sont

caractérisées par des problèmes d'hygiène, d'accès à l'eau et aux systèmes d'assainissement.

En mars 2022, l'OMS comptabilisait encore 44 pays comme « nécessitant une intervention », répartis en Amérique centrale et du Sud, en Afrique, en Asie, et en Océanie, avec une prédominance (26 sur 44 pays) sur le continent africain [141]. C'est aussi dans ces zones endémiques africaines que le plus de campagne de distribution d'antibiotiques en masse ont été réalisées. Pour 6 pays supplémentaires, le statut d'éradication du trachome reste à confirmer avec de plus amples études (Figure 13 B) [98].

En seulement 6 ans, entre 2015 (Figure 13 A) et 2021 (Figure 13 B), la situation mondiale du trachome a évolué avec 12 pays comme le Mexique qui sont passés d'une situation « sous surveillance » à un statut de pays « ayant éliminé le trachome comme problème de santé public » (Figure 13).

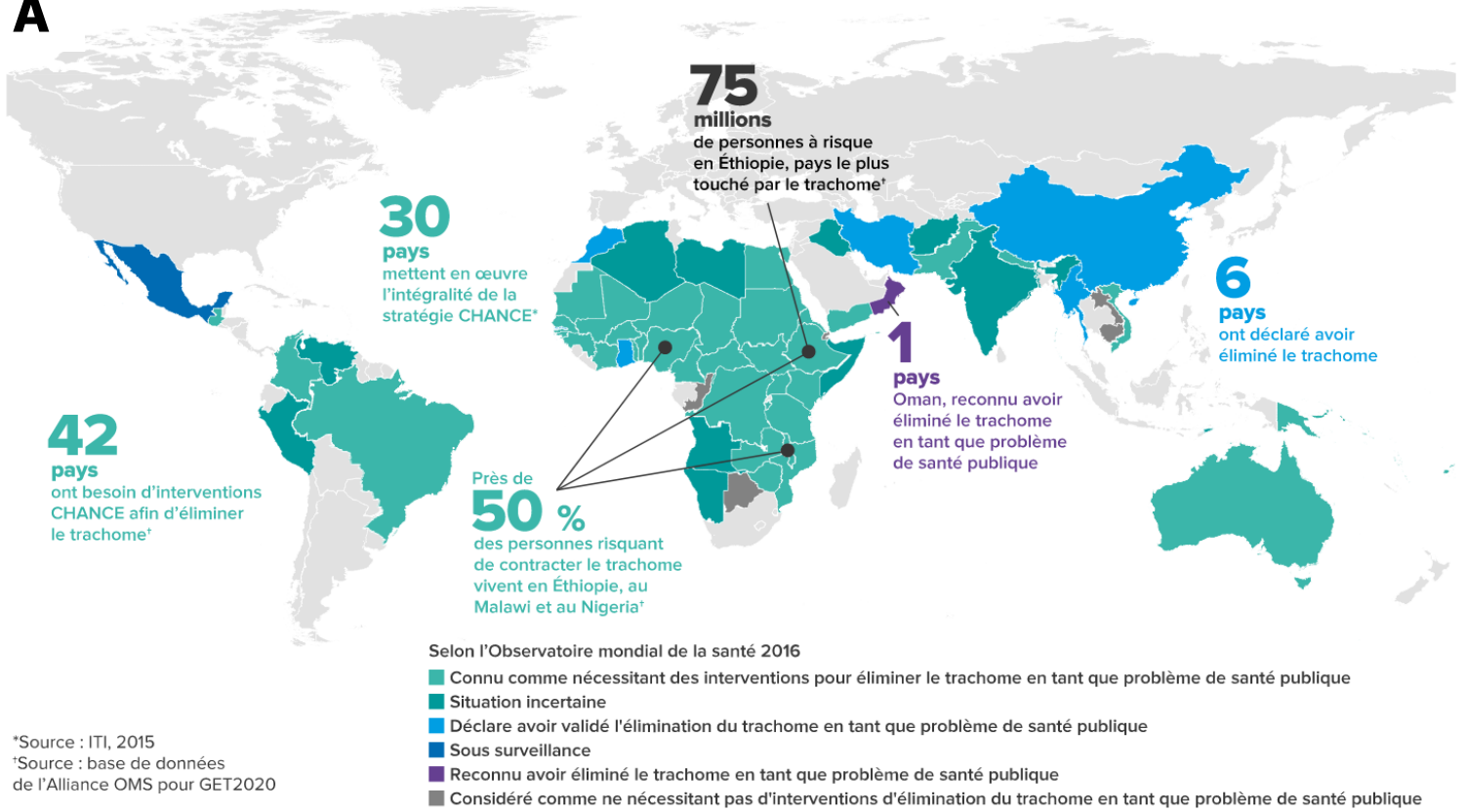
Un pays est considéré comme « ayant éliminé le trachome » lorsqu'il remplit les trois conditions suivantes [142] :

- Une prévalence du trichiasis trachomateux (phase cicatricielle) chez les personnes de plus de 15 ans inférieure à 0,2%,
- Une prévalence du trachome folliculaire (maladie active, contagieuse) chez les enfants de 1 à 9 ans inférieure 5%,
- Un système de santé publique du pays en capacité d'assurer la surveillance épidémiologique et de prendre en charge les patients atteints de trichiasis.

La présence de ces trois conditions a pour but d'encadrer au mieux l'éradication de la maladie. A titre d'exemple une étude réalisée en Gambie entre 2011 et 2013 retrouvait une prévalence du trachome folliculaire inférieure au seuil de 5% (entre 0,2% et 3,2% selon le district) mais une prévalence du trichiasis supérieure à 0,2% (entre 0 et 1,7%) [143,144]. Les deux indicateurs ont finalement été validés en 2021 (soit 8 ans plus tard), validant le pays comme « ayant éliminé le trachome » [140,144].

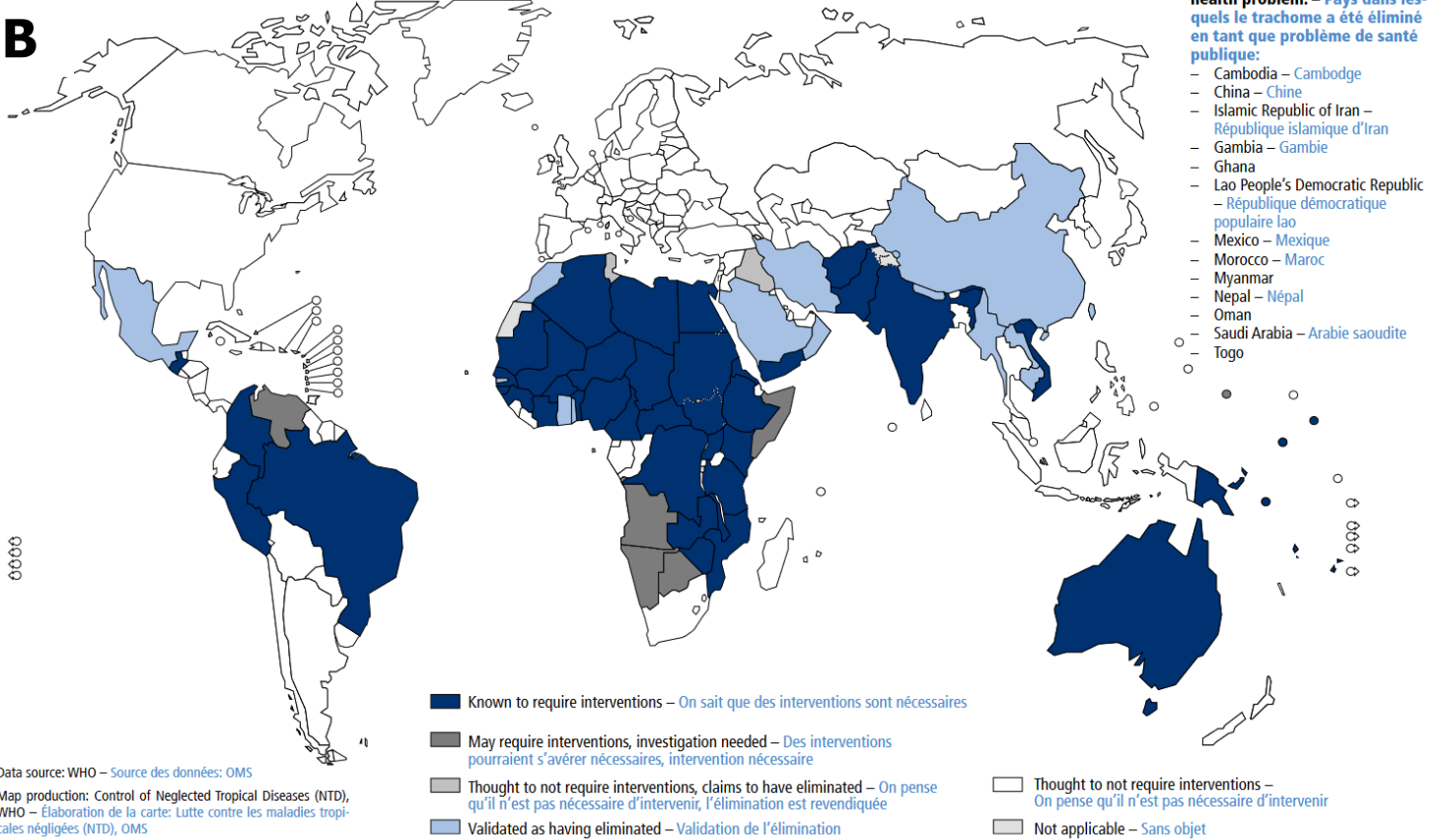


**A**



Map 1 **Status of elimination of trachoma as a public health problem, 2022**  
Carte 1 **Situation de l'élimination du trachome en tant que problème de santé publique, 2022**

**B**



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © World Health Organization (WHO) 2021. All rights reserved. – Les limites et appellations figurant sur cette carte ou les désignations employées n'impliquent de la part de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les lignes en pointillés sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif. © Organisation mondiale de la Santé (OMS) 2021. Tous droits réservés.

*Figure 13 – Carte du monde des pays touchés par le trachome.  
Réalisée par l'OMS, d'après des données de l'Alliance OMS pour l'élimination du trachome en (A) 2015 et (B) 2021 [140]*

### **b) La situation actuelle**

La situation actuelle s'améliore continuellement : le nombre de personnes habitant dans une zone endémique a diminué de 8% entre 2021 et 2022 (passant de 136,2 millions de personnes à 125,0 millions de personnes vivant en zone endémique) [139]. Cette diminution est d'autant plus grande lorsqu'elle est comparée aux chiffres épidémiologiques moins récents avec un recensement de 1 517 millions de personnes en zone endémique en 2002 [145].

Les études épidémiologiques récentes rapportent 1 224 districts endémiques (où la prévalence du trachome folliculaire est supérieure ou égale à 5%) soit un total de 125 millions d'habitants à risque de développer un trachome, dont 86% en Afrique et 49% en Ethiopie [139].

En 2022, 36 millions de personnes ont reçu un traitement antibiotique dans 21 pays différents, et 129 224 personnes ont subi une chirurgie pour un trichiasis dans 36 pays différents. Il est à noter que le pays ayant rapporté le plus de chirurgie palpébrales dans le cadre du trachome est l'Ethiopie avec 94 849 opérations, soit 73% des procédures réalisées en 2022 [146].

Ces données encourageantes, et l'absence de trachome dans les pays développés ont considérablement diminué la couverture médiatique de cette pathologie, et conduit l'OMS à inscrire le trachome dans la liste des 20 maladies tropicales négligées [147].

Au total, les améliorations observées dans les récentes années restent loin de l'éradication mondiale complète souhaitée [148,149].

### **c) De nouveaux outils pour l'étude épidémiologique**

Afin de faciliter le suivi de l'évolution de la prévalence du trachome, et ainsi d'aider la prise de décisions de santé publique, une modélisation mathématique du trachome notamment de ces paramètres de transmission, de contrôle et d'élimination a été mis au point en 2009 [150,151]. Ce modèle *in silico* a permis d'étudier les effets de la diminution de l'immunité collective engendrée par les traitements antibiotiques, et de l'interruption de ces derniers. Ainsi, Gambhir *et al.* suggéraient un risque plus élevé de récurrences des infections à l'interruption des traitements, notamment dans les communautés à faible prévalence, et soulignaient la nécessité de poursuivre la surveillance après l'arrêt des campagnes de traitements [152].

L'utilisation de la modélisation mathématique a aussi mis en évidence une distribution exponentielle de la diminution de la prévalence lors de l'élimination du trachome. En effet une forte diminution de la prévalence est tout d'abord observée mais passée cette phase exponentielle un plateau est atteint, qui pourrait signifier une persistance très longue de communauté avec une prévalence élevée [153]. Ce sont ces poches de persistance avec une prévalence élevée qui sont montrées comme un blocage dans l'objectif d'éradication mondiale. Une étude réalisée sur une cohorte Tanzanienne a montré qu'une fois la transmission du trachome sous contrôle, d'autres facteurs (âge, sexe, situation familiale, l'accès aux sanitaires et à l'eau) entrent en jeu et peuvent maintenir l'augmentation du nombre de cas de trachome cicatriciel [154].

## **5) Clinique**

La maladie comporte deux phases : une première phase infectieuse (ou active) contagieuse, suivie d'une seconde phase cicatricielle (ou chronique) qui peut durer toute la vie.

La première phase consiste en de nombreuses réinfections par *C. trachomatis*, à l'origine de conjonctivites folliculaires. Les multiples conjonctivites vont avoir pour conséquences la dégradation du tissu conjonctival et l'apparition de cicatrices fibreuses, caractéristiques de la deuxième phase de la maladie. Avec les années, la fibrose conjonctivale rétractile va provoquer un entropion et un trichiasis (voir b) ci-dessus en page 44) à l'origine de frottements des cils sur la cornée qui vont finir par entraîner son opacification irréversible et la perte de vision.

### **a) Symptômes et signes cliniques**

La phase active de la maladie s'accompagne des symptômes typiques de la conjonctivite : gêne oculaire avec sensation de sable dans les yeux, picotement, et parfois accompagnés de douleurs oculaires.

La phase cicatricielle est caractérisée par l'apparition d'une photophobie (non-systématique), puis d'une baisse de vision liée à l'atteinte cornéenne [155]. Des symptômes de sécheresse oculaire chronique sont très fréquents. Une étude menée en 1980 en Arabie-Saoudite retrouvait plus de 50% de sécheresse oculaire chez les malades atteints d'une forme sévère de trachome (29 sur 46 patients) [156].

L'OMS a mis au point une classification du trachome pour le diagnostic de la maladie qui décrit les principaux signes cliniques des différents stades de la maladie (Figure 14) [157] :

- **Inflammation trachomateuse folliculaire**, ou TF (pour *Trachoma follicular*), correspondant à une conjonctivite folliculaire classique avec un nombre de follicules peu élevé (5 follicules ou moins),
- **Inflammation trachomateuse intense**, ou TI (pour *Trachoma intense*), correspondant à une conjonctivite folliculaire exacerbée avec de nombreux follicules, une inflammation prononcée, et un épaissement de la muqueuse conjonctivale. Il s'agit du stade le plus sévère de la phase infectieuse,
- **Cicatrice trachomateuse**, ou TS (pour *Trachoma scaring*), correspondant à l'apparition de cicatrices conjonctivales. Le stade TS marque le début de la phase cicatricielle de la maladie,
- **Trichiasis trachomateux**, ou TT (pour *Trachoma trichiasis*), correspondant à une déformation du bord libre de la paupière avec un frottement actif des cils sur la cornée,
- **Opacification cornéenne**, ou CO (pour *Corneal opacification*), correspondant au dernier stade de la maladie, accompagné d'une baisse visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité.



Inflammation trachomateuse – folliculaire (TF).

**INFLAMMATION TRACHOMATEUSE – FOLLICULAIRE (TF):** Présence de cinq follicules ou plus sur la conjonctive tarsienne supérieure.

Les follicules sont des protubérances (blanches, grises ou jaunes) plus pâles que la conjonctive voisine. Pour être retenus, les follicules doivent mesurer au moins 0,5 mm de diamètre.



Inflammation trachomateuse – folliculaire et intense (TF + TI).

**INFLAMMATION TRACHOMATEUSE – INTENSE (TI):** Epaissement inflammatoire prononcé de la conjonctive tarsienne masquant plus de la moitié des vaisseaux profonds du tarse.

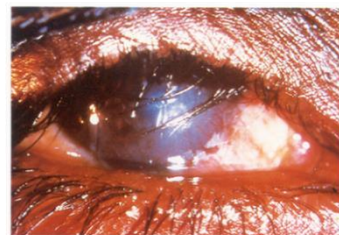
Le conjonctive tarsienne apparaît rouge, rugueuse, épaissie. On compte généralement de nombreux follicules, partiellement ou totalement masqués par la conjonctive épaissie.



Cicatrice trachomateuse (TS)

**CICATRICE TRACHOMATEUSE (TS):** Présence de cicatrices sur la conjonctive tarsienne.

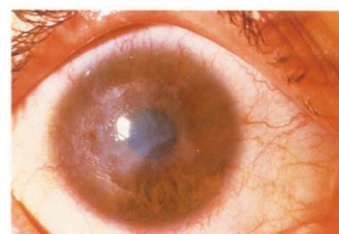
Les cicatrices se voient facilement: ce sont soit des lignes, soit des bandes, soit des plages blanches. Elles sont luisantes et d'aspect fibreux. Les cicatrices, surtout en cas de fibrose diffuse, peuvent masquer les vaisseaux tarsiens.



Trichiasis trachomateux (TT)

**TRICHIASIS TRACHOMATEUX (TT):** Un cil, au moins, frotte le globe oculaire.

L'évidence de l'épilation récente de cil(s) dévié(s) sera considérée comme un trichiasis.



Opacité cornéenne (CO)

**OPACITE CORNEENNE (CO):** Opacité cornéenne évidente recouvrant l'aire pupillaire.

Le bord pupillaire est estompé ou vu flou à travers l'opacité. De telles opacités cornéennes sont responsables d'une importante détérioration visuelle (moins de 0,3 ou de 6/18). Dans ces cas l'acuité visuelle sera, si possible, mesurée.

Figure 14 – Différents stades du trachome d'après la classification OMS. D'après Thylefors et al. [133,157]. Les stades TF et TI sont la phase inflammatoire du trachome, tandis que les stades TS, TT et CO correspondent à la phase cicatricielle de la maladie.

### **b) Histoire naturelle de la maladie**

Sans traitement particulier, l'infection à *C. trachomatis* s'inscrit dans la durée [158], ce qui facilite la transmission entre les individus et, par le biais des multiples réinfections, le développement des formes sévères de trachome. La première phase de la maladie et les multiples réinfections et conjonctivites folliculaires commencent dès le plus jeune âge et touchent majoritairement les enfants (Figure 15). Une analyse par modèle mathématique a estimé que l'apparition du TS nécessiterait 102 épisodes infectieux, tandis que le TT nécessiterait 151 épisodes infectieux, ce qui adviendrait au plus tôt vers l'âge de 20 ans [151]. Le même modèle mathématique montre aussi que le pic des infections aurait lieu aux alentours de 5 ans (un âge qui peut être inférieur dans les zones de transmission bactérienne plus élevée) [151].

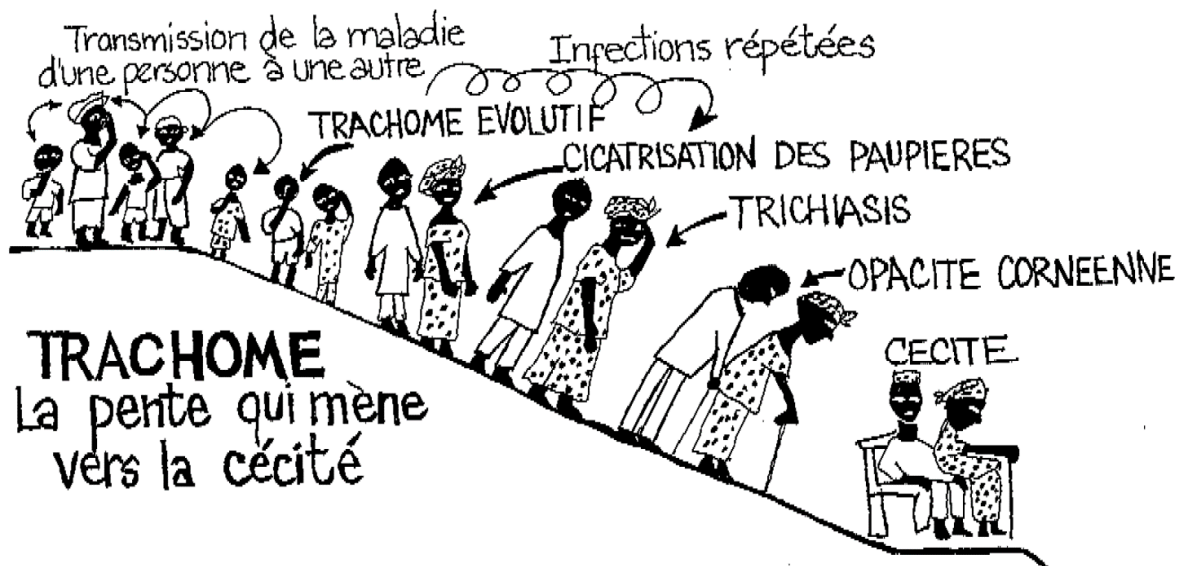


Figure 15 – L'évolution du trachome à travers les âges, représentée comme « La pente qui mène vers la cécité ».

D'après Francis et al. [159]

### **c) Réponse immunitaire**

L'infection bactérienne et **la phase initiale** de la maladie entraînent, avec l'infiltration de cellules immunitaires dans l'épithélium et la colonisation des cellules épithéliales par *C. trachomatis*, des changements histologiques : une plus grande vascularisation du chorion lymphoïde, ainsi que l'apparition des follicules. Ces derniers vont déformer l'épithélium une fois qu'ils ont accumulé une quantité suffisante de lymphocytes, rendant la structure visible macroscopiquement. Des études histologiques ont aussi

révélé la nature plus complexe des infiltrats immunitaires en présence, composés notamment de macrophages, de cellules dendritiques et de polynucléaires neutrophiles [160,161] (Figure 16 A). Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, le GRO $\alpha$  (growth-regulated oncogene  $\alpha$ ) ou encore le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) ont été associées à l'infection par *C. trachomatis in vitro* [162] (Figure 16 B).

La conjonctivite folliculaire causée par l'infection à *C. trachomatis* peut ensuite soit être naturellement résolue, soit prendre la voie de l'aggravation via des mécanismes pro-inflammatoires qui vont amener au TS. La résolution de l'infection bactérienne est associée à la réponse lymphocytaire T auxiliaires 1 CD4<sup>+</sup> (ou Th1 pour T helper). La réponse Th1 est associée à l'augmentation des cytokines tels que IFN $\gamma$ , IL-12B ou encore de l'IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygénase) [163,164]. L'augmentation des marqueurs CD56, CD247 ou encore NCR1 reflète l'implication des cellules NK dans la réponse à l'infection à *C. trachomatis* [165]. Cet influx des cellules NK lors de l'infection illustre l'implication de l'immunité innée dans le TS [166] (Figure 16 A).

La résolution de la phase infectieuse initiale est également associée à une réponse lymphocytaire auxiliaire 17 (ou Th17) avec une augmentation de l'expression des IL-17, 21 et 22 [167].

Quand la résolution de la maladie n'advient pas, le trachome entre dans **la phase chronique**. Lors de cette évolution vers le TS, la réponse immunitaire et les mécanismes pro-inflammatoire persistent après l'élimination du pathogène. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce phénomène [168] :

- Une hypersensibilité retardée à des antigènes de *C. trachomatis* (entre autre la protéine Hsp60) et/ou le développement de phénomènes auto-immuns qui rendent la conjonctive hypersensible aux expositions bactériennes ultérieures [169],
- Une infection persistante (et indétectable) des cellules épithéliales à l'origine d'une synthèse par ces dernières de cytokines et chémokines pro-inflammatoires [168].

Tout comme dans l'infection aiguë, la conjonctive est le siège d'un infiltrat leucocytaire dont la quantité fluctue en fonction de l'inflammation.

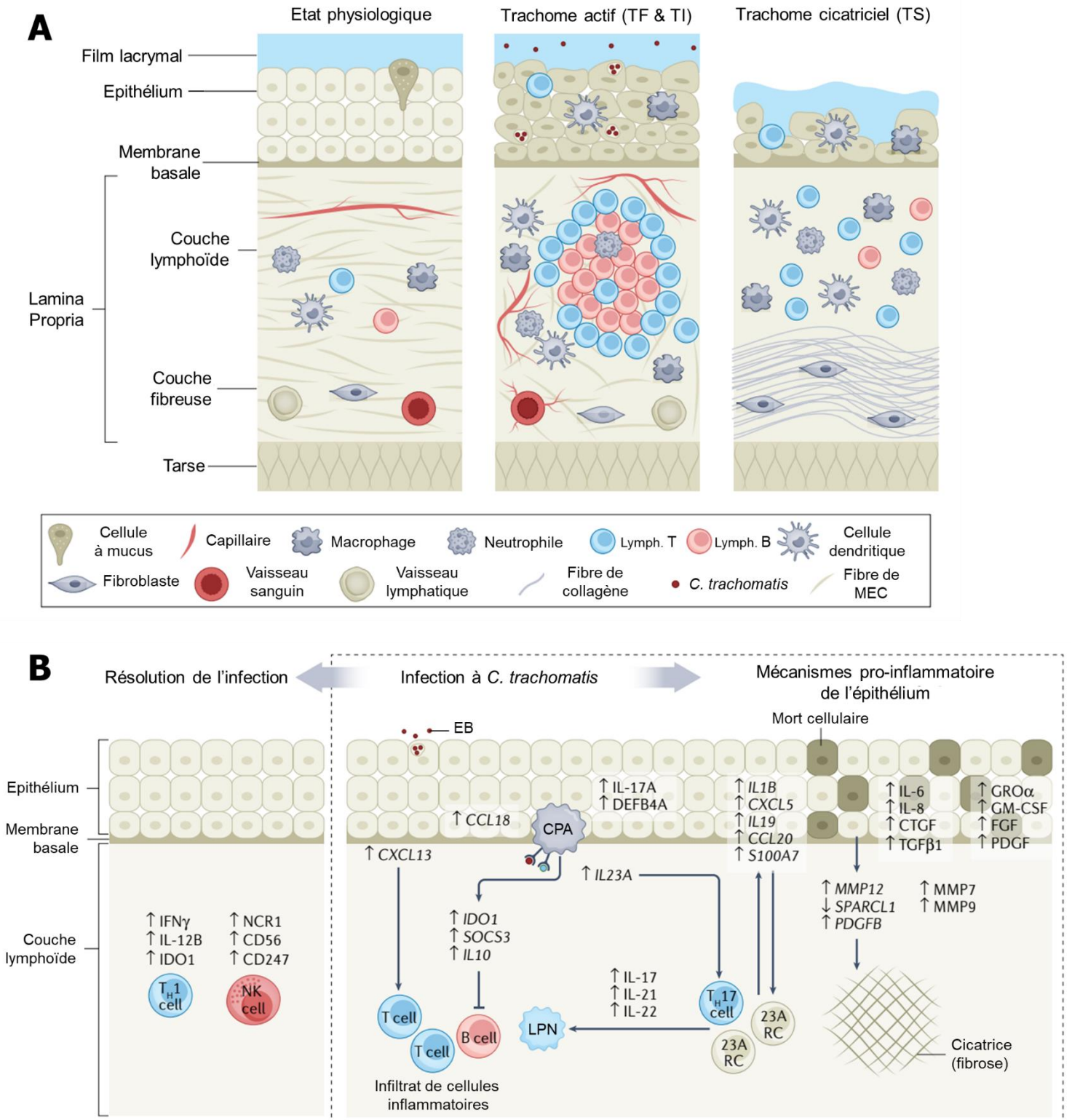


Figure 16 – Évolutions immunitaires et histologiques aux différents stades du trachome.

D'après Solomon et al. [98], (A) Changements histologiques et modifications tissulaires entre l'état physiologique, TF ou TI et TS. (B) Mécanismes immunitaires mises en jeu dans l'infection à *C. trachomatis*, sa résolution et la mise en place de fibrose.

La seconde phase du trachome étant caractérisée par l'inflammation et l'apparition de la fibrose conjonctivale, les marqueurs mis en évidence durant cette phase sont majoritairement (Figure 16 B) :

- **Des marqueurs pro-inflammatoires**, tels que le peptide antimicrobien S100A7, la défensine DEFB4A, les cytokines et chimiokines IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-19, IL-23 $\alpha$ , CCL18, CCL20, CXCL5, et CXCL18 [164,170,171],
- **Des marqueurs de fibrose**, comme les facteurs de croissance (FGF, CTGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF, CTGF), ainsi que la famille des métalloprotéinases (MMP7, MMP9, MMP12) [164,170,172,173].

Une implication de la réponse Th17 dans les atteintes tissulaires cicatricielles a aussi été mise en évidence [167].

Tous ces facteurs ont pour effet de provoquer des modifications histologiques combinant une augmentation du tissu interstitiel et de la matrice extracellulaire (MEC) associée à une désorganisation du stroma conjonctival, et en particulier du collagène [160]. En outre, les fibroblastes adoptent un phénotype de myofibroblastes contractiles contribuant au développement des lésions de fibrose conjonctivale [174] (Figure 16 A).

#### ***d) Diagnostic***

Le diagnostic du trachome est porté sur les critères suivants :

- Présence de follicules sur la conjonctive tarsale supérieure,
- Présence de follicules limbiques ou de séquelles de ces derniers (fossettes ou ocelles d'Herbert, Figure 17 A),
- Présence de pannus vasculaire sur la conjonctive limbique supérieure,
- Présence de signes de fibrose conjonctivale (ligne d'Arlt, Figure 17 B).

Le diagnostic est confirmé lorsqu'au moins deux des quatre critères sont observés [175]. Les follicules causés par l'infection perdurant plus longtemps que l'infection bactérienne elle-même, la bactérie n'est pas systématiquement retrouvée dans les stades avancés de la maladie, rendant l'analyse microbiologique infructueuse. Le diagnostic causal est donc en pratique très rarement confirmé par une identification du pathogène. L'utilisation de l'analyse qPCR, bien que fiable dans sa détection de *C. trachomatis* [176], est, de plus, rarement disponible sur le terrain dans des délais courts.



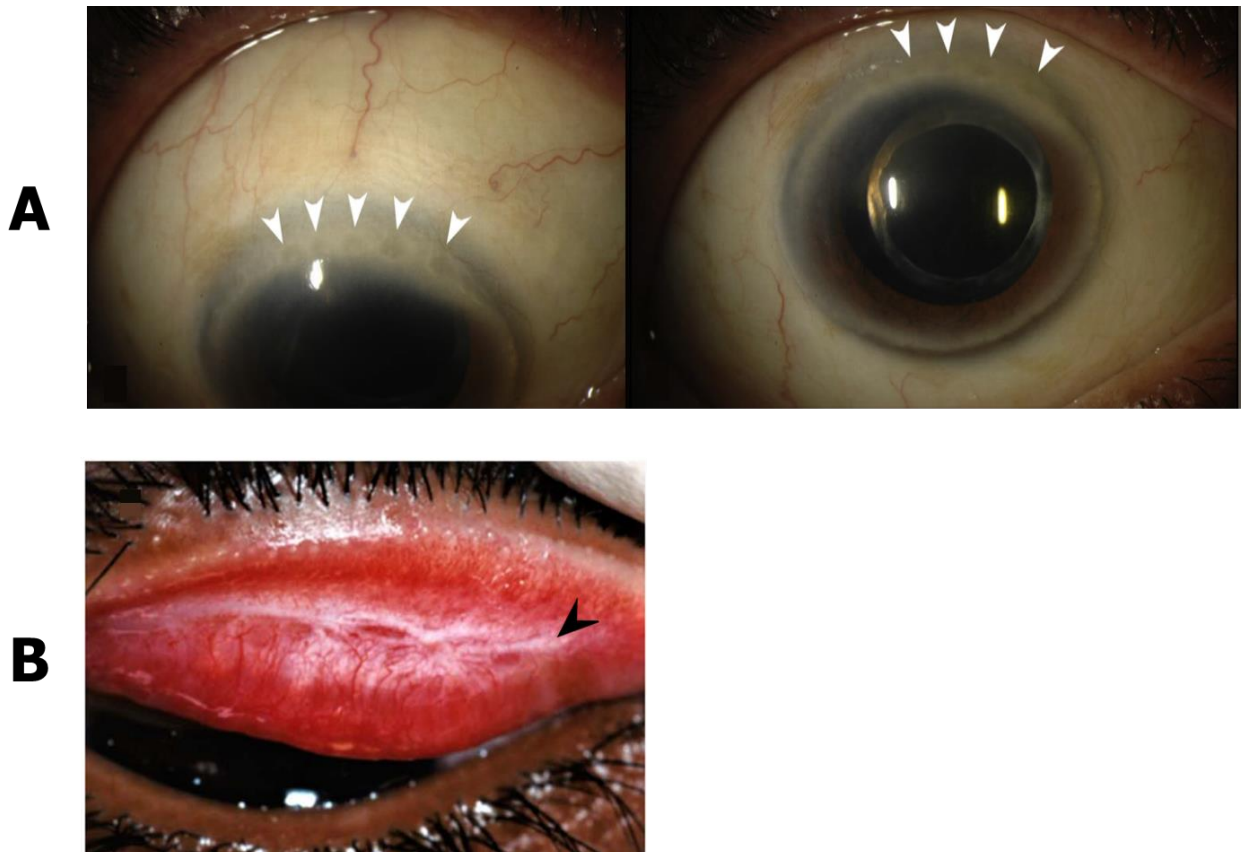


Figure 17 – Images cliniques illustrant les différentes atteintes oculaires retrouvées des stades avancés du trachome.  
 (A) Ocelles d'Herbert (flèches blanches), d'après Mustafa et al. [177] (B) Ligne d'Arlt (flèche noire), d'après Gupta et al. [178]

Le stade plus précis de la maladie peut ensuite être évalué d'après l'échelle de l'OMS (Figure 14), une étape importante pour le choix du traitement approprié, mais aussi afin de recueillir les données épidémiologiques nécessaires à la surveillance de la maladie à l'échelle nationale et mondiale.

## **6) Traitements**

À la phase active, le traitement repose sur l'antibiothérapie. L'antibiotique utilisé est généralement l'azithromycine, sous la forme de collyre dans le cas d'une phase précoce (TF) et en local et/ou systémique dans le cas d'une phase plus avancée (TI) [179].

La phase cicatricielle n'est pas accessible à un traitement médical. En revanche, même à ce stade, d'éventuelles récurrences de conjonctivite bactérienne active doivent être traitées par de nouvelles cures d'antibiotiques [180].

Le trichiasis et l'entropion peuvent faire l'objet d'une prise en charge chirurgicale par différentes techniques (non-détaillées ici) visant à rétablir l'anatomie de la paupière et ainsi éviter le frottement des cils sur la cornée.

Le seul traitement disponible pour le stade CO est la greffe de cornée (ou kératoplastie). En pratique, cette chirurgie n'est pas possible pour tous les patients, mais surtout non-réalisable ni réalisée dans les zones endémiques où des patients pourraient en bénéficier [98].

### a) **Stratégie CH.A.N.CE.**

Pour appliquer ces traitements dans les zones endémiques de la bactérie, l'OMS a mis en place la stratégie « CH.A.N.CE. » [181] pour :

- **CH**irurgie,
- **A**ntibiotique,
- **N**ettoyage du visage et,
- **C**hangement **E**nvironnementaux.

Aussi appelée S.A.F.E. dans sa version anglaise (pour *Surgery, Antibiotic, Facial cleanness, and Environmental improvement*), la stratégie consiste à appliquer les traitements adéquats dans une zone géographique endémique précise afin d'endiguer la maladie territoire par territoire. Les différents stades du trachome requièrent différentes composantes de cette stratégie (Figure 18).

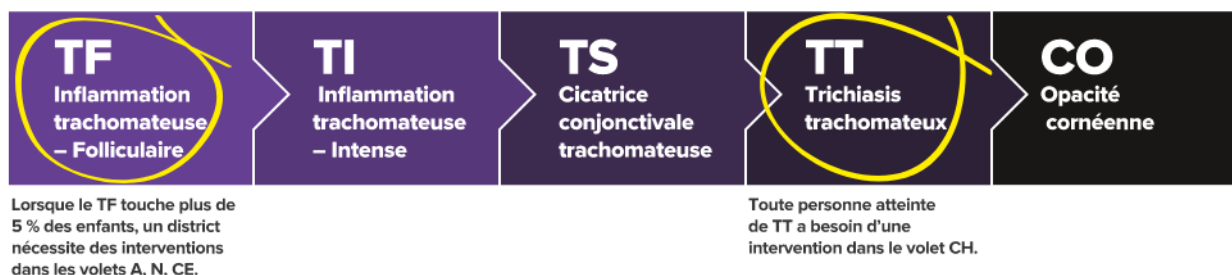


Figure 18 – Échelle de l'OMS des différents stades du trachome situant le moment d'utilisation des différentes facettes de la stratégie CH.A.N.CE.

La prise de décision d'application de l'une ou plusieurs des composantes de cette stratégie dans une zone endémique est basée sur l'utilisation d'une méthodologie de « *Rapid Assessment* » ou évaluation rapide, qui prend en compte l'environnement (accès à l'eau, système d'assainissement, structures de santé ou encore d'éducation à disposition), l'hygiène personnelle, et la présence de signes de trachome (de la conjonctivite folliculaire jusqu'au trichiasis nécessitant une intervention chirurgicale) [182,183]. L'efficacité de cette méthode d'évaluation a été validée sur le terrain [184].

L'efficacité de la distribution massive d'antibiotique dans les zones endémiques a été étudiée de façon isolée ou en combinaison avec les autres mesures de la stratégie CH.A.N.CE. L'association des axes « Nettoyage du visage » et « Changements Environnementaux » (désignée sous l'appellation « WaSH » pour *Water, Sanitation, and Hygiene*) a été évaluée par de nombreuses études en zones endémiques. Une méta-analyse des résultats de ces études a mis en évidence le fort impact du WaSH sur la diminution de la prévalence du trachome [185]. Récemment Wu *et al.* ont montré une corrélation positive entre la prévalence du trachome et les difficultés d'accès à l'eau et aux infrastructures sanitaires [186].

Bien que la stratégie CH.A.N.CE. ait permis une nette diminution de la prévalence du trachome et contribué à diminuer le nombre de zones endémiques ; le trachome reste encore un problème de santé publique dans certaines zones [187].

### ***b) Les limites de la stratégie CH.A.N.CE.***

Les campagnes de distribution d'antibiotiques ont eu un impact très positif ; cependant elles ne sont pas systématiquement adaptées à toutes les zones nécessitant une intervention [188]. Dans les zones à très forte prévalence, la durée habituelle des campagnes de traitement est trop courte pour être efficaces. À titre d'exemple, dans une région où la prévalence du trachome est de 50%, au moins 7 ans de traitements antibiotiques annuels avec une couverture de 75% de la population sont nécessaires pour réduire la prévalence en dessous de 5%, alors que l'OMS préconise 3 ans de traitements antibiotiques annuels [189].

Les effets de l'antibiothérapie sont diminués lorsqu'une communauté traitée reste en contact proche avec une autre ne recevant pas de traitement antibiotique [190]. De même, une autre étude soulignait l'importance crucial d'appliquer le traitement antibiotique à l'ensemble des membres du foyer familial [191]. Par ailleurs, l'utilisation de l'azithromycine aurait un impact sur le microbiote intestinal et oculaire des patients et serait responsable d'une augmentation des résistances bactériennes [66,192,193].

Certains facteurs, comme la difficulté d'accès à l'eau (que ce soit tout au long de l'année ou bien lors de fluctuations saisonnières des réserves d'eau), peuvent contrarier la mise en œuvre de la stratégie (notamment pour les points N. et CE.) [186,194,195]. L'amélioration concrète des accès à l'eau, à un système d'assainissement, et de ce fait l'amélioration de l'hygiène, sont des éléments indispensables pour diminuer la prévalence du trachome [196,197]. Une autre étude s'intéressant à des cohortes éthiopiennes a montré que l'implémentation du WaSH seule n'avait, dans certaines zones étudiées, pas empêché l'augmentation des

infections à *C. trachomatis*, soulignant l'importance de la mise en place simultanée de WaSH et des traitements antibiotique de masse [198].

L'un des aspects les plus important de la stratégie CH.A.N.CE. repose sur la combinaison de ses différents axes et la surveillance continue des populations à risque [152,199]. Il en va de même en ce qui concerne la chirurgie du trichiasis : la guérison totale nécessite un environnement où la bactérie ne circule plus et où les mesures d'hygiène et d'assainissement ont pu être mis en place efficacement [200]. Dans les zones où ce n'est pas le cas, le taux de récives post-chirurgie atteint 30% [201].

Dans ces zones endémiques persistantes, l'utilisation de nouvelles stratégies, notamment vaccinales, semble nécessaire pour éradiquer le trachome [202,203].

### ***c) Stratégies vaccinales***

Actuellement, la majorité des vaccins testés contre *C. trachomatis* sont des vaccins sous-unitaires protéiques. Les principales protéines d'intérêts sont :

- **La Heat Shock Protein 60** (ou Hsp60), une protéine de stress à l'origine de l'inflammation mononucléaire causée par *C. trachomatis* [204],
- **La Major Outer Membrane Protein** (ou MOMP, codé par ompA), une protéine transmembranaire qui joue un rôle dans l'adhésion de *C. trachomatis* à la cellule hôte [205],
- **Les protéines membranaires polymorphiques** (ou Pmp), une famille de protéines de surface jouant notamment un rôle dans l'adhésion à la cellule hôte [206].

Outre leur rôle dans la physiopathologie et la stimulation immunitaire, l'intérêt porté à ces protéines pour la mise au point d'un vaccin est également justifié par leur faible taux d'évolution, même dans les zones fortement endémiques (comme observé avec le gène ompA [113]) [207]. Les expérimentations *in vivo* et les modélisations *in silico* ont confirmé le potentiel des protéines membranaires polymorphiques (PmpC *in vivo* [208], et PmpG *in silico* [209]).

A l'heure actuelle, aucune stratégie vaccinale n'a démontré son efficacité contre le trachome [210]. Cependant plusieurs candidats vaccins ont montré des résultats encourageants. Dans les années 90, plusieurs stratégies dont un anticorps anti-idiotypique administré par voie orale [211] et l'injection sous-cutanée de protéine Hsp60 [212] avaient montré une diminution des signes cliniques dans des modèles animaux. En 2009, trois injections intramusculaires de l'antigène de *Chlamydia* CT043 (supposé responsable de l'induction de la réponse lymphocytaire Th1) permettait une

réduction significative de la charge bactérienne sur un modèle murin (BALB/c) d'infection par *Chlamydia* [213]. En 2014, Olivares-Zavaleta *et al.* rapportaient des résultats précliniques encourageants d'un vaccin vivant atténué sur un modèle simien [214].

Le trachome étant avant tout une infection locale, la question de la voie d'immunisation est un élément essentiel dans le choix de la stratégie vaccinale. L'étude de différentes voies d'immunisation chez le rat a montré une efficacité accrue de la voie oculaire topique [215]. Inic-Kanada *et al.* observaient des réponses immunitaires positives et équivalentes lors d'immunisation par voies oculaire et intramusculaire dans un modèle murin (BALB/c) [216].

A ce jour, deux études cliniques de phase I ciblant des manifestations uro-génitales de *C. trachomatis* sont en cours ou prévues [210].

#### ***d) Essais cliniques des stratégies vaccinales***

Les premières tentatives de vaccination contre le trachome remontent au début des années 60, avec dès 1959 un début d'essai clinique publié.

Une première étude de Grayston *et al.* publiée en 1963 incluait 405 enfants taiwanais suivi sans signes de trachome mais appartenant à une fratrie contaminée. Les vaccins inactivés (dans une solution de tampon phosphate et de formaldéhyde 0,2%) étaient élaborés soit à partir d'une souche unique (TRIC-Taiwan-1-TW-1 ou TRIC-Taiwan-3-TW-3) soit des 2 souches combinées en un vaccin bivalent. Suivant la zone géographique les enfants recevaient 4 injections intramusculaires de vaccin soit monovalent (souche TW-3 dans la région de Lung-ching) ou bivalent (souches TW-1 et TW-3 dans la région de Ta-an). Un groupe contrôle avec une injection d'adjuvant seul était mis en place dans les deux provinces. L'incidence du trachome au cours du suivi (2,5 ans) était réduite de 60% dans les groupes vaccinés comparativement au groupe contrôle [217]. Malheureusement, les résultats du suivi à 6 ans ne montraient pas de différence significative de prévalence entre les différents groupes vaccinés et le groupe placebo, avec près de 50% des sujets présentant des signes de trachome dans les 2 groupes [218].

Woolridge *et al.* ont publié en 1967 les résultats d'une étude au design comparable qui suivait pendant 3 ans 1217 enfants taiwanais ayant reçu des vaccins (ou l'adjuvant) élaborés avec les mêmes souches que dans l'étude précédente, mais adjuvantés par une huile minérale. Ils retrouvaient une plus forte incidence du trachome dans le groupe immunisé par le vaccin monovalent (TW-3) par rapport au groupe adjuvant, attribuée à une hypersensibilité hétérologue à la souche TW-1 (l'exposition à la souche vaccinale TW-3 rendait l'individu plus sensible à l'exposition hétérologue à la souche

TW-1). Un léger effet protecteur était observé avec le vaccin bivalent (TW-1 et TW-3) [219].

Sowa *et al.* rapportaient en 1969 un essai ayant comparé le même vaccin (testé avec deux adjuvants différents) sur une cohorte de 278 enfants Gambien non-trachomateux au moment de l'inclusion dans l'étude. Après 2 années de suivi, des résultats mitigés étaient observés sans différences significatives entre les groupes vaccinés et contrôles. Au terme du suivi, les auteurs constataient une prévalence plus importante et des signes cliniques plus sévères dans le village le plus densément peuplé [220].

Des études cliniques similaires ayant évalué des vaccins respectivement bivalent (souches SAU/HAR-2 et ET/HAR-2) et monovalent (souche Asmara 3/1960) eurent aussi lieu en Arabie-Saoudite [221] et en Ethiopie [222], avec là encore des résultats non-significatifs (bien qu'une protection modérée et de courte durée fut observée dans l'étude éthiopienne [222]).

Il est à noter que dans les années 60, en plus des études cliniques réalisées dans des zones endémiques et sur des cohortes d'enfants, des essais cliniques étaient aussi fréquemment réalisés sur des adultes volontaires sains qui étaient exposés à *C. trachomatis* avec ou sans immunisation préalable [223]. Ces études ont montré :

- Des signes cliniques moins sévères avec une vaccination conjonctivale (n=2, un volontaire vacciné et un contrôle) [224],
- Une infectivité similaire chez les volontaires humains et les embryons de poulet ainsi que des résultats non-concluants d'une vaccination avec la même souche (n=6, avec 3 volontaires vaccinés et 3 contrôles) [225],
- Un effet protecteur d'un vaccin inactivé contre l'infection de l'œil controlatéral dans un cas d'infection d'un seul œil (n=6, avec 3 vaccinés et 3 contrôles) [226],
- Une induction d'anticorps spécifiques par vaccin inactivé mais sans protection contre la réexposition (nombre de volontaires non-précisé) [227],
- Des résultats de protection (remis en cause depuis) avec un vaccin vivant [228],
- Une résistance partielle à l'infection induite par 11 expositions itératives réalisées en 6 ans avec différents sérovars de *C. trachomatis* (B, D et F) chez un volontaire aveugle suivi pendant 20 ans [229].

Dans les études récentes, l'impact des infections *C. trachomatis* oculaires étant devenu minoritaires par rapport aux infections *C. trachomatis* génitales dans le monde occidental, les essais vaccinaux ont été réorientés vers les infections vaginales. Une revue de la littérature publiée en 2019 [210] montrait que les essais de stratégies vaccinales étaient jusqu'alors restés en phase préclinique et décrivaient seulement une

étude d'infection génitale avançant en phase clinique I [230] et une seconde prévue peu de temps après la publication de l'article.

En 2019, Abraham *et al.* rapportaient les résultats d'une étude de phase I avec un vaccin protéique recombinant sous-unitaire ciblant une sous-unité de la protéine MOMP (CTH522). Cette étude de la sécurité et de l'efficacité à induire une réponse immunitaire du vaccin a été testée par injection intramusculaire et a montré une bonne tolérance ainsi qu'une bonne immunogénicité (meilleure avec l'utilisation de l'adjuvant liposomal CAF01) [231].

Pour ce qui est des études récentes sur des souches oculaires, toutes ont été réalisées sur des modèles précliniques (animaux).

### ***e) Eradication 2020 & projet TracVac***

L'objectif « GET2020 » (*Global Elimination of Trachoma by 2020*) mis en place par l'OMS avait pour but l'éradication totale du trachome en 2020, par la mise en œuvre par les pays endémiques de la stratégie CH.A.N.CE., mais aussi par un travail conjoint pour en analyser les résultats afin de l'améliorer.

Cet objectif, non-atteint en 2020, a été reporté à 2030. L'analyse des progrès déjà effectués en matière de prévalence permet des projections optimistes sur les capacités de la communauté internationale à atteindre ce nouvel objectif [232].

Parmi les initiatives mises en place dans ce cadre, se trouve le projet européen « TracVac » (*Trachoma Vaccine*) [233] financé dans le cadre de l'appel à projet européen Horizon 2020 (n° 733373). Le projet a pour objectif la mise au point d'un vaccin efficace contre le trachome et a pour cela réuni plusieurs partenaires danois, anglais et français :

- Le *Statens Serum Institut* de Copenhague, Danemark,
- La *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, Londres, Angleterre,
- L'*Imperial College of Science Technology and Medicine*, Londres, Angleterre,
- Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, France, notre équipe.

Le candidat vaccin mis au point par le consortium est un vaccin sous-unitaire protéique basé sur la répétition de motifs antigéniques de la protéine MOMP [233,234]. Nous avons profité des études de la réponse au vaccin pour étudier la physiopathologie de l'infection oculaire à *C. trachomatis*.

## **7) Modèles d'étude du trachome**

De nombreux modèles d'étude ont été utilisés pour étudier la physiopathologie du trachome, caractérisée par la complexité des relations entre *C. trachomatis* et l'hôte.

### ***a) Modèles in vitro***

Les modèles *in vitro* sont, de par leur simplicité, adaptés pour la caractérisation de mécanismes précis [235], mais ont le défaut de ne pas permettre une étude globale des relations hôte-pathogène. Ils constituent souvent la première étape avant toute étude préclinique et/ou clinique.

Les cellules non-épithéliales, notamment des fibroblastes murins (cellules McCoy), sont principalement utilisées pour la culture des *Chlamydia*, et dans une moindre mesure pour la modélisation de l'infection [236].

Le tropisme de *C. trachomatis* pour les cellules épithéliales (des muqueuses conjonctivales ou des muqueuses génitales) justifie le choix de ces lignées pour l'expérimentation. Parmi les lignées utilisées dans les études sur *C. trachomatis* se trouvent les cellules épithéliales :

- Conjonctivales humaines immortalisées (HCjE) [237,238],
- De rein de singes rhésus (LLC-MK2) [239],
- Cervicales tumorales (HeLa) [239–243],
- D'oviducte porcin [244],
- D'oviducte de souris (Bm1.11) [245],
- Conjonctivales primaires humaines [246].

Une visualisation des inclusions de *Chlamydia* a été réalisée en 1939 par Poleff sur des cellules épithéliales conjonctivales isolées de patients trachomateux. Ces observations lui ont permis de décrire le lien entre les EB bactériens et la formation d'inclusions [247].

Les lignées primaires ont l'avantage de s'approcher des conditions de l'infection chez l'hôte naturel. Kim *et al.* ont utilisé la microscopie électronique pour décrire les phases du cycle de *C. trachomatis* dans des lignées primaires de cellules conjonctivales de lapin [248]. L'infection des lignées primaires de cellules conjonctivales humaines a permis de caractériser l'effet inhibiteur de l'IFN $\gamma$  sur la croissance intracellulaire de *C. trachomatis* via la stimulation du catabolisme du tryptophane [246].

Les cultures primaires de cellules épithéliales ont également été employées pour l'étude des souches vaginales de *C. trachomatis*. Tang *et al.* ont comparé les réponses



immunitaires innées à l'infection par *Chlamydia* de lignées primaires de cellules épithéliales ectocervicales à celles de cellules HeLa. Leurs résultats montrent une réponse immunitaire plus forte dans la lignée primaire [249].

Les cellules HeLa, particulièrement utilisées dans les études *in vitro*, sont des cellules tumorales d'épithélium cervical adaptées à l'étude de *C. trachomatis*. L'observation en microscopie électronique de cellules HeLa ainsi que de fibroblastes infectés a permis d'étudier les mécanismes de destruction des jonctions serrées des cellules épithéliales mises en jeu lors de l'infection par *C. trachomatis* [240].

Les cellules HeLa ont aussi été utilisées pour étudier la pathogénicité du plasmide Pgp3 de *C. trachomatis*. La production de cytokines inflammatoires induite par la stimulation des cellules par Pgp3 a permis de confirmer le rôle de ce plasmide dans la pathogénicité de *C. trachomatis* [241].

L'efficacité d'agents anti-*Chlamydia* a aussi été étudiée sur des cellules HeLa avec notamment l'observation de l'inhibition de la formation des inclusions à *C. trachomatis* par l'ajout d'un acide gras polyinsaturé (DHA) ciblant une des voies métaboliques essentielles de *C. trachomatis* (la biosynthèse de la ménaquinone) [242]. L'effet probiotique de la bactérie *Lactobacillus crispatus* sur des cellules infectées par *C. trachomatis* a été testé sur des co-infections *in vitro* de cellules HeLa et J774 (lignées de macrophages/monocytes de souris BALB/c). Cette étude permettait de mettre en évidence une modulation du profil de cytokines pro et anti-inflammatoires qui pourrait indiquer un effet prophylactique de *L. crispatus* vis-à-vis de l'infection à *C. trachomatis* [243].

L'efficacité d'un traitement par irradiation aux infrarouges A filtrés à l'eau (*water-filtered infrared A irradiation*) sur la diminution de la charge bactérienne a aussi été démontrée à l'aide de tests *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales conjonctivales humaines immortalisées (HCjE) [238].

Les études *in vitro* ont également été utilisées en complément d'expérimentations *in vivo*. Dans le cadre de l'étude d'une stratégie vaccinale, Lorenzen *et al.* ont utilisé des expérimentations *in vitro* pour valider l'effet neutralisant d'anticorps sériques d'animaux vaccinés sur l'infection par *C. trachomatis* de cellules HaK (lignée de cellules épithéliales rénales de hamster) [250]. Dans une autre étude vaccinale, l'effet neutralisant a été évalué sur la lignée HCjE [251].

Les voies de signalisation impliquant les récepteurs du TNF- $\alpha$  et les récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R) ont été étudiées sur des cellules épithéliales d'oviducte de souris. Nagarajan *et al.* ont retrouvé une stimulation mutuelle de ces deux cytokines menant à l'aggravation de la réponse inflammatoire causée par *C. trachomatis* [245]. Un modèle similaire d'infection de cellules d'oviducte de porc a permis de mettre en

évidence une réponse immunitaire similaire à celle observée chez l'homme (notamment une augmentation des interférons) ainsi qu'une altération des jonctions serrées épithéliales [244].

Les modèles d'études *in vitro* les plus perfectionnés restent les modèles en 3 dimensions qui simulent plus fidèlement l'architecture spatiale du tissu (et permettent de faire co-exister plusieurs types cellulaires). Nogueira *et al.* ont ainsi mis au point un modèle d'épithélium pluristratifié squameux qui leur a permis de confirmer que les couches superficielles squameuses de la muqueuse génitale contribuent à la protection contre l'infection à *C. trachomatis* en diminuant l'accès de la bactérie aux couches basales [252].

### ***b) Modèles animaux***

- **Souris et rat**

Les rongeurs sont fréquemment utilisés pour modéliser des maladies humaines : leur proximité avec l'humain ainsi que leur petite taille en font un modèle préclinique efficace.

Whittum-Hudson *et al.* ont mis au point un modèle murin de trachome (souris BALB/c) avec inoculation conjonctivale de la souche TW/3 du sérovar humain C de *C. trachomatis* de façon unique, ou itérative, à raison de 5 fois par semaines pendant 3 semaines. Les animaux ont développé des signes cliniques proches de ceux observés chez l'homme : hyperhémie, sécrétions conjonctivales, chémosis. Les signes cliniques les plus sévères ont été observés pour les souris ayant reçu des expositions bactériennes répétées (en comparaison du groupe exposé de façon unique) [253]. L'étude des biopsies conjonctivales a retrouvé une diminution du nombre des cellules épithéliales et des cellules à mucus, un œdème épithélial ainsi que des infiltrats immunitaires dans le stroma conjonctival. Ce modèle a ensuite été utilisé pour valider l'efficacité thérapeutique d'un anticorps anti-idiotypique (c'est-à-dire ciblant la partie variable d'un autre anticorps). L'anticorps testé ciblait l'exoglycolipidique de *C. trachomatis* et a montré un effet protecteur contre l'infection bactérienne [211].

Badamchi-Zadeh *et al.* ont aussi utilisé les souris BALB/c pour évaluer une immunisation intramusculaire avec la protéine MOMP. Bien que des anticorps oculaires anti-MOMP aient été détectés après immunisation sur la surface oculaire (écouvillons conjonctivaux), le vaccin n'a pas été cliniquement efficace contre l'exposition bactérienne [254]. Une autre étude d'immunisation par la protéine MOMP administrée par voie intrapéritonéale sur modèle murin a permis de caractériser la réponse lymphocytaire T et la sécrétion d'IgG spécifiques et d'anticorps anti-*C. trachomatis* [255,256].

Récemment, Lanfermann *et al.* ont comparé l'efficacité d'une administration intranasale ou sous-cutanée d'un vaccin protéique combinant 4 protéines Pmp et la protéine Catd1 sur des souris C57BL/6J inoculées par voie intranasale avec des souches des sérovars A (souche HAR-13), E (souche DK20), D (souche UW3/CX) ou L2 (souche 434) de *C. trachomatis*. Une protection contre les différents sérovars (diminution des signes cliniques associés à une augmentation des anticorps anti-*C. trachomatis*) a été observée dans le groupe immunisé par voie intranasale, mais n'a pas été observée dans le groupe immunisé par voie sous-cutanée [257].

L'effet de la voie d'immunisation a été évalué sur un modèle de rat vacciné avec des EB de la souche TW du séovar C par voies topique oculaire, sous-conjonctivale, gastro-intestinale et intrapéritonéale. L'efficacité a été mesurée d'après la réponse IgA avec une meilleure réponse associée à la voie d'immunisation topique oculaire [215].

Des résultats non-concluants ont été obtenus avec une étude évaluant l'effet protecteur d'une administration sous-cutanée d'anticorps anti-MOMP sur un modèle murin de trachome. Les résultats observés avec ce candidat vaccin ont été comparables à ceux obtenus après une exposition directe aux EB bactériens et n'ont pas induit de protection contre l'infection oculaire [258].

- **Cochon d'Inde (ou cobayes communs)**

Les cobayes ont la particularité d'être naturellement sensibles à une espèce de *Chlamydiae*: *Chlamydia caviae*. Cette espèce désigne les souches causant une conjonctivite à inclusion chez le cobaye, qui faisaient auparavant partie de l'espèce *C. psittaci* [259]. Les études les plus anciennes décrites ci-dessous ont donc utilisé la nomenclature *C. psittaci*, que nous avons remplacé par *C. caviae*, par souci de clarté.

La sensibilité des cobayes à *C. caviae* ainsi que leur propension à développer une atteinte oculaire a été découverte en 1964 par sérendipité au cours du développement d'un modèle expérimental d'infection à *C. trachomatis* [260].

Le premier modèle d'infection oculaire à *C. caviae* a été développé en 1974 et reposait sur une exposition conjonctivale unique de la souche GPIC (pour *Guinea-Pig Inclusion Conjunctivitis*) sur des cobayes Hartley. Des signes cliniques de conjonctivite ont été induits par l'exposition à cette souche après 4 à 7 jours, spontanément résolutifs, même en cas d'exposition à un fort inoculum [261]. La quasi-totalité des modèles cobayes d'infection conjonctivale mis au point par la suite l'ont été sur la même espèce (la plus communément employée en expérimentation animale), avec cette souche de *C. caviae*, et ont servi, par analogie, comme modèle d'étude du trachome.

Les premiers développements de ce modèle comme un « substitut » de conjonctivite à *C. trachomatis* ont été publiés en 1977 par Ahmad *et al.* Leur étude avait pour objectif de confirmer les similitudes entre les signes cliniques obtenus chez les cobayes (n=19) après multiples réinfections par la souche GPIC et ceux observés chez les patients trachomateux. La première exposition bactérienne a induit des signes cliniques conjonctivaux (hyperémie et chémosis) et des inclusions bactériennes avec toutes les doses testées. Lors de la seconde exposition bactérienne, seules les doses infectieuses les plus élevées ont induit des signes cliniques avec une résolution spontanée plus rapide de ces derniers. Ces observations ont confirmé l'effet protecteur de l'exposition à la souche GPIC, ainsi que les similarités avec l'infection humaine par *C. trachomatis* [262].

#### *Etudes de physiopathologie du trachome*

Le rôle de vecteur passif des mouches dans l'infection par *Chlamydia* a été démontré sur un modèle cobaye. En effet, Forsey *et al.* ont démontré un transfert efficace de *C. caviae* depuis un cobaye infecté vers un cobaye non-exposé à la bactérie par l'intermédiaire de *Musca domestica* [135].

Watkins *et al.* ont ensuite utilisé ce modèle pour étudier l'hypersensibilité retardée à *Chlamydiae*, c'est-à-dire la réaction des lymphocytes T sensibilisés par les antigènes de *Chlamydia*. L'infection expérimentale a été réalisée par instillation conjonctivale de la souche GPIC, qui a induit des inclusions conjonctivales à partir de 3 à 4 jours et jusqu'à 14 à 20 jours post-exposition (p.e.). Six semaines p.e. (soit environ 1 mois après la résolution des signes cliniques), les animaux ont été exposés aux antigènes de *C. caviae* par voie conjonctivale, ce qui a induit une conjonctivite similaire. Par la suite, les auteurs ont réalisé une primo-exposition vaginale ou intestinale suivie d'une exposition conjonctivale antigénique, ce qui a entraîné dans les deux cas des signes cliniques oculaires comparables à ceux observés après primo-exposition conjonctivale [263].

A l'aide du protocole de Watkins *et al.* [263], Morrison *et al.* ont établi un lien entre une protéine de stress de *C. trachomatis* (caractérisée par son poids moléculaire de 57 kD) et l'hypersensibilité oculaire. L'étude des biopsies conjonctivales a retrouvé un infiltrat immunitaire majoritairement macrophagique et lymphocytaire. Ces résultats ont suggéré que l'exposition de la conjonctive à cette protéine de stress pourrait être impliquée dans l'inflammation chronique conjonctivale du trachome [264,265].

Monnickendam *et al.* ont comparé les réactions d'hypersensibilité au niveau dermique et oculaire en réexposant des cobayes à la souche GPIC à 6 mois d'intervalle. Des quantités de bactéries, même faibles, instillées par voie conjonctivale, ont induit une

hypersensibilité oculaire ; tandis que l'exposition bactérienne dermique devait être mille fois plus concentrée ( $10^5$  Egg-Infection Dose 50 – la dose nécessaire à l'infection de 50% des jaunes d'œuf inoculés ou EID<sub>50</sub> – par voie dermique contre  $10^2$  EID<sub>50</sub> par voie conjonctivale) pour déclencher une hypersensibilité dermique, témoignant des caractéristiques immunologiques particulières de la muqueuse conjonctivale [266].

Le modèle cobaye a également permis d'étudier l'implication des neutrophiles dans la physiopathologie du trachome. En effet, une réduction des signes cliniques et histologiques ainsi que des modifications de la réponse immunitaire (augmentation des IgA et diminution des lymphocytes T) ont été observées après déplétion des neutrophiles (par administration intrapéritonéale d'antisérum neutrophile stérile filtré). Ces résultats suggéraient l'implication des neutrophiles dans la réponse immunitaire adaptative à *Chlamydia*, ainsi que dans les dommages tissulaires résultant de l'infection [267].

En 2009, Wilson *et al.* utilisaient ce même modèle cobaye pour développer un modèle mathématique prédictif de l'évolution de la maladie trachomateuse qui pourrait, sur le long terme, aider à prendre les décisions en matière de traitements et d'interventions dans les zones endémiques. L'observation des signes cliniques et de la cinétique de la maladie a permis de valider ce modèle prédictif [268].

L'exposition conjonctivale à la souche GPIC chez le cobaye (25 µL de  $10^6$  IFU) a aussi été utilisée dans une étude de 2008 visant à comprendre la sortie d'EB des cellules hôtes épithéliales. À l'aide d'études histologiques en microscopie électronique à transmission, Rank *et al.* ont mis en évidence des infiltrats de polynucléaires dans l'épithélium conjonctival infecté. Ces infiltrats pourraient participer aux lésions épithéliales, induire le détachement des cellules infectées, et donc faciliter la diffusion des EB de *Chlamydia* au moment de la mort de la cellule hôte [269].

Filipovic *et al.* ont utilisé une exposition à *C. caviae* pour comprendre l'effet de l'inoculum sur la pathogénicité et la réponse immunitaire muqueuse locale. L'étude a comparé des instillations conjonctivales de différentes doses de la souche GPIC de *C. caviae* :

- Un inoculum « faible » ( $10^2$  IFU), considéré comme proche de l'inoculum naturel,
- Un inoculum « modéré » ( $10^4$  IFU), considéré comme suffisant pour déclencher une manifestation oculaire chez tous les animaux,
- Un inoculum « fort » ( $10^6$  IFU), considéré comme suffisant pour déclencher une maladie oculaire sévère.

Tous les cobayes ont développé des signes cliniques oculaires avec des sévérités variables en fonction de la dose de l'inoculum. Des différences majeures ont été

observées dans la réponse immunitaire locale, avec une détection d'IgA anti-*Chlamydia* uniquement dans les infections avec la dose la plus élevée [270]. Les inoculums modérés et forts ont aussi été testés dans une étude d'inoculations répétées où les cobayes ont été exposés 3 fois (à 0, 46, et 126 jours). Bien que ces 2 doses aient déclenché une réaction immunitaire spécifique, les expositions itératives avec la dose modérée ont apporté une protection complète, tandis que les expositions itératives avec la dose forte n'ont apporté qu'une protection partielle [271].

Monnickendam *et al.* ont comparé les paramètres cliniques, l'histologie conjonctivale et l'immunité humorale induite par une exposition conjonctivale unique [272] ou des expositions itératives à la souche GPIC chez le cobaye. Les expositions itératives ( $10^6$  EID<sub>50</sub> de souche A10, 5 fois à 30 jours d'intervalle) ont visé à mimer la pathologie humaine [273]. Avec l'exposition bactérienne unique, les signes cliniques et histologiques ont été détectés dès le 2<sup>ème</sup> jour après l'exposition bactérienne, avec un pic à 7 jours [272]. Lors des expositions multiples, les animaux ont développé des follicules, un œdème, une hyperhémie de la conjonctive bulbaire, des lésions de fibrose conjonctivale (dès la 4<sup>ème</sup> exposition et plus diffuses et fréquentes à partir de la 5<sup>ème</sup>), ainsi qu'un pannus cornéen (après la 5<sup>ème</sup> exposition). Bien que les inoculations fussent unilatérales (gauche), l'œil controlatéral (droit) a également développé des signes cliniques similaires mais moins sévères. Enfin, alors que la réponse à une exposition unique a été associée à de nombreuses inclusions et un infiltrat composé en majorité de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes ; les expositions itératives ont induit un infiltrat majoritairement mononuclé sans inclusions épithéliales ni polynucléaires [273].

Malaty *et al.* ont également étudié l'effet des réexpositions et de différentes doses bactériennes. Les animaux ont reçu entre une et six expositions bactériennes de doses faibles (25 *Egg-Lethal-Dose*<sub>50</sub> ou ELD<sub>50</sub>) ou de doses fortes (250 ELD<sub>50</sub>) d'inoculum. Les auteurs ont observé une corrélation entre la sécrétion d'IgG lacrymale, la sécrétion d'anticorps lacrymal, et l'exposition à une dose élevée d'inoculum [274].

#### *Etudes de stratégies thérapeutiques*

Inic-Kanada *et al.* ont mis au point à la fois un modèle murin (BALB/c) et un modèle cobaye pour tester l'efficacité protectrice et la distribution sur la surface oculaire d'une sous-unité de la protéine Pmp-C de *C. trachomatis*. Le modèle murin n'a pas été exposé à *C. trachomatis*, mais a été utilisé pour tester la réponse immunitaire à ces antigènes [275]. Pour le modèle cobaye, l'évaluation de l'efficacité protectrice des antigènes a été réalisée par exposition conjonctivale de *C. caviae* ( $1 \times 10^6$  PFU dilué dans 25  $\mu$ L de tampon SPG). Les auteurs ont rapporté une protection partielle contre l'infection à *C. caviae* (non significative chez les animaux immunisés par voie sous-cutanée, mais significative pour les animaux immunisés par voie conjonctivale) [216].

Malaty *et al.* ont étudié l'application topique d'un sérum immunitaire (sérum enrichi en IgG) contre l'exposition à 250 ELD<sub>50</sub> de la souche GPIC, avec pour résultat une diminution des *Chlamydia* conjonctivales. Cette équipe a également testé l'efficacité d'une vaccination topique par des *Chlamydia* (GPIC) inactivées qui n'a pas suscité la sécrétion d'anticorps lacrymaux ni d'effet protecteur contre les signes cliniques oculaires lors de l'exposition ultérieure à une dose faible de GPIC (25 ELD<sub>50</sub>) [274].

Le modèle cobaye d'inclusion conjonctivale à *C. caviae* a aussi été utilisé pour tester l'efficacité anti-*Chlamydia* de la carraghénane de *Chondrus crispus* (un polysaccharide ayant des propriétés anti-bactériennes et anti-virales utilisable de façon topique). L'algue avait déjà été décrite comme capable de réduire l'infectivité de *C. trachomatis* dans les tests *in vitro* (sur des cellules conjonctivales humaines immortalisées), et a montré une légère réduction des signes cliniques oculaires ainsi qu'une diminution de la quantité d'EB excrétée lors des tests sur cobaye (aussi bien en cas d'application précédente ou concomitante à l'exposition bactérienne) [237].

Le modèle cobaye a été utilisé récemment pour évaluer l'efficacité d'un traitement par irradiation infrarouges A filtrés à l'eau sur l'infectivité de *C. trachomatis*. Une diminution de l'infectivité de la bactérie et des signes d'inflammation conjonctivale a été observés *in vivo* [276].

La même équipe a utilisé le modèle cobaye pour tester la cross-réactivité et l'effet protecteur d'anticorps spécifiques anti-tétanos (mAb26 et mAb51) contre l'infection à *C. caviae*. Un effet protecteur de mAb26 a été observé avec une diminution des signes cliniques *in vivo* mais aucun effet de mAb51 [251].

Pham *et al.* ont réalisé des autogreffes sous-cutanée de tissu conjonctival au niveau de poches abdominales du cobaye. Ces autogreffes ont été effectuées afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en maximisant les réplicats réalisés et les résultats obtenus. Les poches greffées ont été exposées par injection sous-cutanée à la souche GPIC pour évaluer la réponse anticorps spécifique ainsi que la réponse immunitaire conjonctivale. Une réponse dose-dépendante a été identifiée, avec, pour la dose la plus élevée ( $7 \times 10^7$  IFU), une réponse anticorps spécifique, des inclusions épithéliales à *Chlamydia* et un infiltrat immunitaire (avec des cellules polynucléaires ainsi que des lymphocytes) [277].

Le modèle cobaye a également été employé pour évaluer d'autres vaccins. Rank *et al.* ont comparé l'immunisation anti-chlamydia induite par une injection sous-cutanée de la protéine Hsp60 de la souche GPIC par voie sous-cutanée ou oculaire. Les deux groupes ont ensuite été soumis à un challenge oculaire (20  $\mu$ L de  $10^6$  IFU de la souche GPIC instillé dans le fornix conjonctival). Aucune des 2 stratégies n'a été efficace sur les signes cliniques sans qu'aucune n'induisse non plus d'exacerbation de la maladie [212].

- **Lapins**

Le lapin est une espèce particulièrement utilisée dans les études ophtalmologiques car combinant une manipulation relativement aisée et des globes oculaires dont la taille s'approche de celle de l'humain.

Un premier modèle de lésions oculaires à *C. trachomatis* a été développé en 1969 sur des lapins blancs de Nouvelle-Zélande par injection dans la chambre antérieure de l'œil de la 0,2 mL d'inoculum (concentré à  $10^{6,1}$  ELD50 de la souche T'ang TE55). Ce protocole a permis l'observation de lésions de l'épithélium cornéen et d'une opacification cornéenne [278].

Un autre modèle a été décrit avec une exposition bactérienne utilisant la méthode du grattage cornéen et une exposition hebdomadaire pendant 3 semaines. La première exposition bactérienne a entraîné des signes cliniques modérés proches de ceux de la phase aiguë du trachome ainsi qu'un infiltrat de polynucléaires. Les expositions itératives ont entraîné une réaction oculaire plus sévère, la formation d'un pannus et un infiltrat immunitaire lymphocytaire mais aussi de leucocytes polynucléaires [279].

- **Primates non-humains (PNH)**

Le PNH est un modèle particulièrement approprié pour l'étude des maladies humaines, grâce notamment à ses similitudes anatomiques et immunitaires. La première description des inclusions conjonctivales de *Chlamydia* a d'ailleurs été mise en évidence chez l'orang-outan (bien que les inclusions aient été à l'époque attribuées à des protozoaires) [131]. La majorité des études sur le PNH ont été réalisées chez le singe cynomolgus (*Macaca Fascicularis*).

#### *Etudes de physiopathologie du trachome*

Dans une revue de littérature de 1975, Grayston *et al.* ont décrit leurs multiples modélisations du trachome exclusivement réalisées chez le PNH. Leurs études ont mis en évidence la nécessité d'une primo-exposition bactérienne et/ou de vaccins (antigène de Chlamydia ou souche hétérologue) pour obtenir la formation d'un pannus (12% de pannus pour les animaux ayant subis une primo-infection et/ou une immunisation, contre 0% des animaux contrôles). Leurs expériences ont également comparé les effets de l'exposition à différentes souches de *C. trachomatis* de tous les sérovars disponibles et ont montré, de façon inattendue, que les sérovars oculaires A, B et C déclenchaient des signes cliniques moins prononcés et moins fréquents que les autres sérovars (seulement 0,5% de pannus) [280].



Taylor *et al.* ont étudié chez le PNH les co-infections de *C. trachomatis* avec des pathogènes humains communs (*Haemophilus influenzae* et *aegyptius*, et *Streptococcus pneumoniae*). Aucune de ces co-infections n'a contribué au développement de signes cliniques de trachome plus spécifiques [281].

Patton *et al.* ont développé leur modèle PNH avec des macaques rhésus (*Macaca mulatta*, n=6) et avec des macaques à queue de cochon des îles de la Sonde (*Macaca nemestrina*, n=10) avec la méthode des autogreffes conjonctivales sous-cutanées, similaire à celle décrite chez le cobaye (voir ci-dessus) [277]. Avec cette méthode, le tissu conjonctival palpébral et bulbaire préalablement prélevé a été transplanté dans des poches de la paroi abdominale antérieure. Ces poches d'autogreffe ont ensuite été exposées à deux souches de *C. trachomatis* (B/TW-5/OT et C/TW-3/OT) par injection sous-cutanée avec des concentrations allant de  $5 \times 10^4$  à  $1 \times 10^5$  IFUs. Les poches ont été prélevées par excision chirurgicale à un rythme d'une par jour entre 2 et 8 jours p.e., puis à 10, 14 et 16 jours p.e.. Les tissus excisés ont ensuite été mis en culture et faisaient l'objet d'une analyse histologique [282,283]. Deux phases ont été observées dans la réponse immunitaire avec d'abord un infiltrat polynucléaire suivi d'un infiltrat mononucléaire.

Ce modèle d'autogreffe a ensuite été complété par des inoculations bactériennes itératives (3 dans la même poche à 30 jours d'intervalle), afin d'étudier l'effet des multiples expositions sur les réponses inflammatoire et immunitaire. L'étude a retrouvé un infiltrat mononucléaire du greffon, l'apparition de follicules et de lésions de fibrose conjonctivale [284]. L'étude histologique des poches excisées a révélé un infiltrat mononucléaire et polynucléaire à la suite de la première exposition, tandis qu'après la seconde, l'infiltrat était majoritairement composé de lymphocytes B et T, principalement regroupés en follicules [284].

Dans l'étude de Cosgrove *et al.*, des macaques à queue de cochon âgés de 6 semaines (n=5) ont été exposés à 2 reprises par instillation conjonctivale de *C. trachomatis* (sérovary E, souche E/UW-5/Cx puis sérovary C, souche C/TW-3/PT) à 10 semaines d'intervalle pour modéliser l'infection chez l'enfant [285].

Snacks *et al.* ont utilisé l'espèce de primate *Aotus trivirgatus* (Douroucouli commun) pour modéliser le trachome. Les animaux (n=9) ont été exposés à 2 reprises à un mois d'intervalle par instillation conjonctivale avec le sérovary B de *C. trachomatis* (souche TRIC/B/SAU/HAR-36/OT) [286,287]. Leur étude a révélé le rôle central de la réponse immunitaire cellulaire dans la protection contre l'infection conjonctivale à *C. trachomatis* mais également son rôle potentiel dans l'exacerbation de la réaction inflammatoire et les lésions qui y sont associées [286].

Taylor *et al.* ont mis au point un modèle de TS par exposition hebdomadaire de cynomolgus à *C. trachomatis* (instillation d'EB du sérotype E dans le fornix

conjonctival) pendant 54 semaines [288]. L'exposition bactérienne a induit une première phase de conjonctivite non-spécifique [289], suivie par un tableau similaire au TS associant une conjonctivite folliculaire tarsale avec des lésions de fibrose conjonctivale, et un pannus cornéen. Des cicatrices de fibrose sous-conjonctivale typique du trachome ont été observées dès 3 à 6 semaines après la première exposition (pour 3 des 6 animaux). Les réexpositions hebdomadaires ont semblé indispensable à l'apparition de lésions de fibrose d'autant plus qu'un autre groupe d'animaux exposés seulement 3 fois (à deux semaines d'intervalle) n'a pas développé de lésions de fibrose, mais une simple conjonctivite folliculaire [290]. Le modèle de Taylor a mis en lumière le rôle crucial des réinfections dans la survenue du trachome cicatriciel [169]. La même équipe a utilisé ce modèle pour mettre au point une méthode de détection de *C. trachomatis* à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-*Chlamydia* conjugués à la fluorescéine. Cette technique diagnostique par immunofluorescence a une sensibilité plus élevée et un seuil de détection plus bas que la méthode de culture classique [291].

Whittum-Hudson *et al.* se sont intéressés à l'effet des réinfections en comparant des expositions à un inoculum de *C. trachomatis* (sérovary B souche HAR-36) sur des cynomolgus soit deux fois à 18 semaines d'intervalle, soit 18 semaines de suite. Les follicules ont persisté pendant toute la période de réinfection pour le groupe des réexpositions hebdomadaires. Sur le plan immunitaire, les biopsies conjonctivales effectuées dans les deux groupes ont montré des réponses locales similaires avec des lymphocytes B intra-folliculaires accompagnés d'IgM, et un important infiltrat de lymphocytes T à la fois périfolliculaires et sous-épithélial (avec une majorité de lymphocytes T cytotoxiques mais aussi quelques lymphocytes T auxiliaires) [292].

Plus récemment en 2013, Kari *et al.* ont aussi étudié l'effet d'une réexposition à *C. trachomatis* (sérovary A, souche A2497) chez des cynomolgus. La première exposition a induit une conjonctivite folliculaire modérée à sévère. La seconde exposition a été réalisée 3 mois après la résolution naturelle des signes cliniques de la première exposition (au total 269 jours post-primo exposition). Les signes cliniques et la charge bactérienne mesurés à la suite de la seconde exposition ont été atténués et de plus courte durée. La réponse des sérums à différents antigènes de *C. trachomatis* (MOMP, Hsp60, ou encore Pgp3) a montré une reconnaissance de MOMP tout au long du suivi, mais une reconnaissance des autres antigènes seulement dans les temps d'analyse plus tardifs. Les auteurs ont conclu à une maturation de la réponse immunitaire humorale qui confère une protection partielle contre la réinfection [207]. L'étude de l'évolution naturelle de l'infection entre les deux expositions bactériennes a retrouvé une stabilité dans le temps des antigènes bactériens.

En 1992, Hudson *et al.* ont étudié la persistance bactérienne non-détectée avec un modèle d'exposition conjonctivale unique par *C. trachomatis* (sérovary B, souche TW5)

chez des cynomolgus. L'étude a été réalisée en parallèle sur des échantillons de patient. Dans les deux cas, des échantillons négatifs en cytologie fluorescente ont été positifs par détection de l'ARN de *C. trachomatis* (par Northern blot), confirmant des persistance bactériennes non-détectées avec les méthodes classiques [293–295]. Enfin, la même équipe a utilisé leur modèle PNH de trachome pour étudier le profil immunitaire local. La réponse spécifique à *C. trachomatis* a été testée en stimulant (par des lymphocytes ou des EB de *Chlamydia*) des biopsies conjonctivales ayant subi une digestion enzymatique. Pal *et al.* ont pu observer des follicules et une réponse cellulaire *Chlamydia*-spécifique par des lymphocytes T [296].

### *Etudes de stratégies vaccinales*

Campos *et al.* ont publié une étude vaccinale dans un modèle cynomolgus (n=10). Les animaux ont été immunisés par 3 doses de protéines MOMP de *C. trachomatis* (sérovary C, souche C/TW-3) par voie muqueuse (instillation buccale ou conjonctivale) ou systémique (intramusculaire). Tous les animaux ont ensuite été challengés avec 5x10<sup>3</sup> IFU d'EB de *C. trachomatis* instillés par voie conjonctivale (sérovary C, souche C/TW-3) deux semaines après leur dernière immunisation. Une protection partielle contre l'infection à *C. trachomatis* a été observée, avec une bonne réponse IgA muqueuse dans le groupe immunisé par voie muqueuse et une bonne réponse IgG systémique dans le groupe immunisé par voie systémique [297].

Kari *et al.* ont testé l'efficacité d'un vaccin vivant atténué (souche A2497P<sup>-</sup> de *C. trachomatis*, délétée d'un plasmide de virulence [298]). Les animaux (espèce cynomolgus) ont été immunisés 3 fois (aux semaines 0, 4, et 8) par instillation conjonctivale bilatérale avec cette souche atténuée. Tous les animaux ont ensuite été exposés par voie conjonctivale avec la souche parentale non-atténuée (A2497P), possédant le plasmide de virulence. D'une part, l'exposition à la souche A2497P<sup>-</sup> a induit des formes cliniques moins sévères que la souche parentale (ce qui a confirmé l'importance de ce plasmide pour la virulence de la bactérie), mais surtout, une protection contre les effets de la souche parentale A2497P, et même une protection complète contre la conjonctivite bactérienne chez la moitié des animaux (n=3 parmi 6 vaccinés) [299].

Dans une autre étude, Kari *et al.* ont immunisé les animaux (cynomolgus) (n=6) avec une sous-unité de la protéine MOMP de *C. trachomatis*. Les animaux ainsi immunisés ont ensuite été challengés par instillation conjonctivale de la souche A2497. Une protection partielle a été obtenue avec une réduction de la charge bactérienne (suivie par culture depuis des écouvillons conjonctivaux) mais sans avoir d'effet sur les manifestations oculaires [300].

Tableau 3 – Résumé des différents modèles animaux de trachome

Catégorie	Réf.	Article	Espèce animale	Exposition bactérienne	Objectif de l'étude	Conclusion(s) principale(s)
Souris, Rat	253	Whittum-Hudson, <i>et al.</i> Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995	Souris BALB/c	Conjonctivale, sérovac humain C (souche TW/3), unique ou itérative (5 fois par semaine pendant 3 semaines)	Comparaison expositions unique et itératives	Signes cliniques similaires à l'humain (hyperémie, sécrétions conjonctivales, chémosis), signes cliniques plus sévères avec les expositions itératives
	211	Whittum-Hudson, <i>et al.</i> Nat Med. 1996	Souris BALB/C	/	Test d'efficacité anti-corps anti-idiotypique	Effet protecteur de l'anti-corps contra l'infection bactérienne
	254	Badamchi-Zadeh, <i>et al.</i> PLoS One. 2015	Souris A/J	/	Test d'efficacité intramusculaire (protéine MOMP)	Pas d'efficacité sur les signes cliniques malgré des anti-corps anti-MOMP conjonctivaux
	255	Su, <i>et al.</i> J Exp Med. 1992	Souris C57BL/6J	Intranasale, sérovac A, E, D et L2	Caractérisation réponse T à vaccin intramusculaire (protéine MOMP) Test d'efficacité sur sérum d'animal immunisé par peptide chimère identifié dans l'étude précédente	Plusieurs peptides MOMP déclenche une réponse T helper (candidats vaccins à étudier)
	256	Lanfermann, <i>et al.</i> Vaccines (Basel) 2021	Rat	/	Comparaison immunisation intranasale et sous-cutanée (protéine Pmp et Catd1)	Protection contre l'infection avec l'immunisation intranasale (diminution signes cliniques et anti-corps locaux)
	215	Davidson, <i>et al.</i> Reg Immunol. 1993	Souris (BALB/c, C3H/HeJ, C3H/HeSnJ, DBA/2J, C3D2F1/J, BALB/K)	/	Comparaison des voies d'immunisation oculaire, sous-conjonctivale, gastro-intestinale, intrapéritonéale (EB sérovac C)	Meilleure réponse IgA avec l'immunisation topique oculaire
	258	Westbay, <i>et al.</i> Infect Immun. 1994	/	/	Test d'efficacité sur sérum et rate d'anti-corps anti-MOMP sous-cutanée	Pas de protection
	259	Everett, <i>et al.</i> Intérieur J Syst Bacteriol. 1999	/	/	Description de l'espèce <i>C. caviae</i>	
	260	Murray, J Infect Dis. 1964	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Découverte des conjonctivites à <i>Chlamydia</i> chez les cobayes	
	261	Rodolakis, Ann Rech Vet. 1987	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, itératives	Mise au point du modèle cobaye d'infection à <i>C. caviae</i>	Signes cliniques conjonctivites (après 4 à 7 jours), résolution spontanée
	262	Ahmad, <i>et al.</i> Invest Ophthalmol Vis Sci. 1977	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, itératives	Comparaison modèle cobaye aux patients trachomateux	Signes cliniques similaires à l'humain, effet protecteur des expositions itératives
	135	Forsy, <i>et al.</i> Br J Ophthalmol. 1981	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Etude de la transmission bactérienne via la mouche	Validation de la mouche ( <i>Musca sorbens</i> ) comme vecteur passif de <i>C. caviae</i>
	263	Watkins, <i>et al.</i> Proc Natl Acad Sci USA. 1986	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC	Etude physiopathologie du trachome	Seconde exposition amène une sensibilité oculaire retardée (nécessite <i>Chlamydia</i> viable mais pas forcément RB)
	264	Morrison, Lyng <i>et al.</i> J Exp Med. 1989	/	/	Identification de la protéine à l'origine de l'hypermensibilité	Identification d'une protéine de 57-kD spécifique au genre <i>Chlamydia</i>
	265	Morrison, Belland <i>et al.</i> J Exp Med. 1989	/	/	Etude du rôle de la protéine identifiée	La protéine est induite par le stress, homologie avec les heat-shock protéin
	266	Monnickendam, <i>et al.</i> Clin Exp Immunol. 1981	Cobaye Hartley	Conjonctivale ou intradermique, souche GPIC, une exposition 6 mois après une série de 4 expositions	Etude de l'hypermensibilité retardée	Hypermensibilité avec les deux types d'exposition, mais inculcum doit être 1000 fois plus concentré avec une exposition intradermique
	267	Lacy, <i>et al.</i> Infect Immun. 2011	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Etude de l'implication des neutrophiles dans la réponse immunitaire à <i>Chlamydia</i>	Rôle important des neutrophiles dans la réponse adaptative au trachome et dans les dommages tissulaires
	268	Wilson, <i>et al.</i> J Infect Dis. 2009	/	/	Mise au point d'un modèle mathématique prédicteur de l'évolution du trachome	Validation du modèle prédictif avec les données cliniques
	269	Rank, <i>et al.</i> FEBS Immunol Med Microbiol. 2008	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Etude de la sortie des EB de la cellule hôte	Observation d'infiltrat polynucléaire dans l'épithélium conjonctival (cause possible de lésions épithéliales aidant au détachement des cellules infectées et sortie des EB)
	270	Filipovic, <i>et al.</i> PLoS One. 2017	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Comparaison de différentes doses d'inoculum - unique	IgA anti-chlamydia et augmentation des % de CD4+ et CD8+ seulement avec les doses les plus élevées
	271	Belli-Rammerstorfer, <i>et al.</i> Microbes Infect. 2016	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, itératives (3 fois)	Comparaison de différentes doses d'inoculum - itératives	Protection complète avec la dose la plus faible (sans altération du système immunitaire hôte)
	272	Monnickendam, <i>et al.</i> Br J Ophthalmol. 1980	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Etude de la physiopathologie de l'infection unique	Observation de signes cliniques et histologique dès 2 jours post-exposition (pic à 7 jours)
	273	Monnickendam, <i>et al.</i> Br J Ophthalmol. 1980	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, itérative (5 fois à 30 jours d'intervalle)	Etude de la physiopathologie de l'infection itérative	Observation de signes cliniques (follicules, œdème, hyperhémie) et de fibrose conjonctivale avec pannus cornéen (à partir de la 5ème exposition)
	274	Melaty, <i>et al.</i> Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, entre 1 et 6 expositions(s)	Comparaison de différentes doses d'inoculum avec ou sans expositions itératives et test d'immunisation	IgG et anticorps lacrymaux avec la dose d'inoculum élevé, pas d'effet protecteur de l'immunisation (GPIC inactif conjonctival)
	275	Inic-Kanada, <i>et al.</i> PLoS One. 2016	Souris BALB/c	/	Etude de la réponse à l'immunisation conjonctivale (protéine N-PmpC)	Stimulation de la réponse immunitaire humorale (lymphocytes T)
	216	Inic-Kanada, <i>et al.</i> PLoS One. 2015	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Test d'efficacité vaccin protéique (N-PmpC) avec différentes voies d'immunisation	Protection partielle à l'infection significative pour l'immunisation conjonctivale, non-significative pour l'immunisation sous-cutanée
237	Inic-Kanada, <i>et al.</i> J Appl Phycol. 2018	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Test d'efficacité traitement avec <i>Chlamydia trypsi</i>	Réduction des signes cliniques et de la quantité d'EB excrétée (en prophylactique comme en traitement)	
276	Inic-Kanada, <i>et al.</i> J Photochem Photobiol B. 2020	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Test d'efficacité traitement aux irradiations infrarouges A filtrées à l'eau	Diminution de l'ineffectivité de la bactérie & signes cliniques	
251	Stojanovic, <i>et al.</i> Vaccines (Basel) 2020	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Test d'efficacité d'anti-corps anti-téanos	Effet protecteur (diminution des signes cliniques) pour un des deux anti-corps testé (mAb26)	
277	Pham, <i>et al.</i> Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990	Cobaye Hartley	Injection sous-cutanée d'auto-greffes conjonctivales, souche GPIC	Mise au point modèle auto-greffe et test de doses d'inoculum	Réponse anti-corps spécifique avec la dose la plus élevée, avec inclusions conjonctivales et infiltrat immunitaire	
212	Rank, <i>et al.</i> Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995	Cobaye Hartley	Conjonctivale, souche GPIC, unique	Test d'efficacité vaccin (Hsp60 sous-cutanée ou oculaire)	Pas de protection	

Cobaye

Catégorie	Réf.	Article	Espèce animale	Exposition bactérienne	Objetif de l'étude	Conclusion(s) principale(s)
Lapin	278	Oh, et al. J Bacteriol. 1969	Lapin blanc de Nouvelle-Zélande	Injection dans la chambre antérieure de l'œil, souche T ang TE55	Description des lésions oculaires dans un modèle lapin de trachome	Observation de lésions de l'épithélium cornéen et opacification cornéenne
	279	Abu-el-Asrar, et al. Doc Ophthalmol. 1988	Lapin (non-spécifié)	Oculaire après grattage corneen, itérative (hebdomadaire pendant 3 semaines)	Etude de l'effet d'expositions répétées	Signes cliniques modéré après la 1ère exposition, plus sévère après les expositions suivantes (pannus, infiltrat immunitaire)
	131	Halberstaedter, Arb K Gesundh Amt. 1907	Orang-outan	/	Observation des inclusions à <i>C. trachomatis</i>	Première description des inclusions conjonctivales
	280	Grayston, et al. J Infect Dis. 1975	Plusieurs espèces PNH	Multiple modalités	Review des différentes études de l'équipe de Grayston et al.	Signes oculaires plus sévères avec les sérovars non-oculaires, formation d'un pannus dans les cas de primo-infection ou vaccin
	281	Taylor, et al. Infect Immun. 1984	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar E (souche Bour), unique	Etude des confections <i>C. trachomatis</i> et pathogènes humains communs	Pas d'aggravation des signes cliniques avec aucune des confections
	282	Patton, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1987	Macaques rhésus et macaques à queue de cochon	Injection sous-cutanée d'auto-greffes conjonctivales, sérovar B et C	Analyse histologique des auto-greffes à différents temps post-exposition	Observation d'inclusion à <i>Chlamydia</i> , épithélium alléré avec œdème, infiltrat inflammatoire, follicules (mais sans centre germinatif), IgM et IgG spécifiques
	283	Patton, et al. Br J Exp Pathol. 1989			Améliorations du modèle d'auto-greffe	Modèle utilisable pour des études de vaccins, ajout des expositions itératives et de types tissulaires supplémentaires
	284	Patton, et al. J Reprod Fertil. 1989			Etude d'inoculations itératives (3 à 30 jours d'intervalle) sur le modèle d'auto-greffe	Obtention de fibrose (activité fibroblastique), infiltrats immunitaires et formation de follicules
	285	Cosgrove, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1989	Macaques à queue de cochon	Conjonctivale, sérovar E puis sérovar C 10 semaines plus tard	Modéliser l'infection conjonctivale chez l'enfant	Observations histologiques similaires à l'adulte (épithélium aminci, follicule avec un centre de lymphocytes B entouré de lymphocytes T)
	286	Sacks, et al. Clin Exp Immunol. 1978	Douroucouli commun	Conjonctivale, sérovar B deux fois à un mois d'intervalle	Etude de la réponse immunitaire	Rôle central de l'immunité dans la protection à la réinfection mais aussi dans l'exacerbation des lésions (via réaction inflammatoire)
Primates non-humain	287	Murray, et al. Amsterdam. 1971			Mise au point du modèle trachome chez le Douroucouli cicatriciel	Protection contre la réinfection pendant les 6 mois suivant la résolution de l'infection
	288	Taylor, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981	Rhesus & Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar E (Bour), hebdomadaire pendant 54 semaines	Mise au point d'un modèle de trachome cicatriciel	Obtention de cicatrices conjonctivales (fibrose) apparu à partir des semaines 3 à 6
	289	Dawson, et al. Ann NY Acad Sci. 1962	Rhesus & Cynomolgus	Conjonctivale, multiples souches	Développement du modèle primate trachome	La première exposition induit une conjonctivite non-spécifique, meilleur modèle obtenu avec les cynomolgus
	290	Taylor, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1982	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar E (Bour), hebdomadaire pendant 54 semaines	Etude physiopathologie du modèle de trachome cicatriciel	Validation de la nécessité des expositions hebdomadaires pour obtenir les cicatrices conjonctivales
	169	Grayston, et al. Rev Infect Dis. 1985	/	/	Review des études épidémiologiques trachome	Mise en évidence de l'importance des infections itératives dans le trachome
	291	Taylor, et al. J Clin Microbiol. 1984	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar B (HAR36), unique ou itérative (hebdomadaire pendant 18 semaines)	Mise au point d'une méthode de détection de <i>C. trachomatis</i>	Validation de la méthode de détection par immunofluorescence avec une sensibilité plus élevée que la méthode de culture classique
	292	Whitum-Hudson, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1986	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar B, hebdomadaire pendant 18 semaines ou 2 fois à 18 semaines d'intervalle	Comparaison de deux expositions espacées aux expositions itératives hebdomadaires	Persistance des follicules, réaction immunitaire similaire entre les deux modalités
	207	Kari, et al. PLoS Negl Trop Dis. 2013	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar A, deux fois à 3 mois d'intervalle	Etude des effets de la réexposition	Signes cliniques et charge bactérienne atténués et de plus courte durée (protection partielle attribué à la maturation de l'immunité humorale)
	293	Hudson, et al. Curr Eye Res. 1992	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar B (TW5), unique	Etude de persistance bactérienne non-détectée	Confirme les faux-négatifs de certaines méthodes (analyse cytologique négative à partir de 70 jours post-exposition mais toujours positive pour la détection d'ARN)
	294	Holland, et al. Infect Immun. 1992	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar C (TW-3), deux expositions à 20 semaines d'écart	Etude de persistance bactérienne en cas d'expositions itératives	Confirme aussi une présence de <i>Chlamydia</i> une fois que les tests microbiologiques sont négatifs
Lapin	295	Cheema, et al. Am J Med Sci. 1991	Cynomolgus	/	Mise au point du système de détection d'ARN de <i>C. trachomatis</i>	Validation de la méthode pour la détection de <i>C. trachomatis</i>
	296	Pai, et al. Reg Immunol. 1990	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar A (HAR-13) ou C (TW-3)	Etude de la physiopathologie du trachome	Observation de follicules et réponse lymphocytes T <i>Chlamydia</i> -spécifique
	297	Campos, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar C, unique 2 semaines après la dernière immunisation	Test efficacité vaccin protéique (MOMP)	Protection partielle, bonne réponse IgA
	298	Kari, et al. J Infect Dis. 2008	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar A (souche non-atténué A2497 et AHAR-13)	Etude des variations génétiques de la bactérie	Mise en évidence de facteurs de virulence
	299	Kari, et al. J Exp Med. 2011	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar A (souche non-atténué A2497P), unique	Test efficacité vaccin vivant atténué	Signes cliniques atténués après exposition à la souche vivante atténuée, protection complète contre la souche parentale non-atténuée pour 3/6 animaux
	300	Kari, et al. J Immunol. 2009	Cynomolgus	Conjonctivale, sérovar A	Test efficacité immunisation unitaire MOMP)	Protection partielle sur la charge bactérienne mais pas de protection sur les signes cliniques

## V/ Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu, le trachome, bien qu'en net recul grâce aux stratégies mises en place, reste un problème de santé publique dans de nombreux pays. L'étude de la physiopathologie du trachome, encore loin d'être complètement comprise, ainsi que la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, restent donc d'actualité.

Une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'installation de la fibrose conjonctivale des phases avancées du trachome, ainsi que l'identification de marqueurs précliniques de cette dernière, permettraient sans doute d'optimiser les stratégies thérapeutiques visant à éviter le développement des formes les plus sévères.

Dans cette perspective, nous avons utilisé un modèle de trachome aiguë chez le PNH, mis au point par notre équipe d'accueil dans le cadre d'un projet européen d'étude de vaccin anti-trachome (projet TracVac). Pour cela, nous avons mis en place un suivi clinique standardisé et adapté à notre modèle, tout en l'enrichissant d'analyses immunologiques locales et systémiques multimodales jusque-là jamais employées dans ce contexte, ainsi que d'une étude des modifications histologiques et du microbiote conjonctival.

En s'appuyant sur des modèles déjà décrits dans la littérature [288,290,299,301], un second modèle PNH d'infections récurrentes a été développé grâce à des expositions itératives (similaires au processus observé chez l'homme). L'étude de ce second modèle à l'aide des mêmes analyses multimodales a pour objectif d'améliorer notre compréhension des facteurs mis en cause dans l'installation des stades avancés du trachome, notamment la fibrose conjonctivale qui est encore une source de malvoyance sans solution thérapeutique dédiée.

## Chapitre 2 – Matériel & méthodes

### I/ Animaux et éthique

Les expériences présentées ici ont été réalisées avec des macaques cynomolgus (espèce *Macaca fascicularis*) dont 12 étaient des femelles et 7 des mâles. Tous les animaux provenaient de l'île Maurice (Ltd, Port Louis, établissement d'élevage primate accrédité) et ont été hébergés dans le bâtiment de l'unité de recherche IDMIT (CEA, Fontenay-aux-Roses, France, autorisation d'animalerie #D92-032-02, Préfecture des Hauts de Seine, France), en zone de confinement de type BSL-2 avec une température ambiante fixe. Les animaux ont été maintenus en cages séparées durant les phases d'exposition bactériennes afin d'éviter les contaminations inter-animaux.

Toutes les expériences ont été pratiquées selon les directives européennes pour le bien-être animal (Journal Officiel de l'Union Européenne, directive 2010/63/UE, 22 septembre 2010) ainsi que les directives institutionnelles du CEA. L'ensemble des prélèvements a été réalisé sous anesthésie générale, obtenue par injection intramusculaire de tilétamine à 5mg/kg (Zoletil 100®). Tous les protocoles mis en œuvre au cours de ce projet ont été approuvés par le comité d'éthique animale de la Direction de la Recherche Fondamentale du CEA sous le numéro de demande 21\_008 et autorisés par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro d'autorisation APAFIS#31037-2021041418019968v1.

L'ensemble des manipulations et des prélèvements sur les animaux a été réalisé par l'équipe du laboratoire « Sciences de l'animal et bien-être animal » (ASW) d'IDMIT.

### II/ Bactéries et exposition bactérienne

La souche B/Tunis-864 du sérovar B de *C. trachomatis* a été utilisée pour toutes les expositions bactériennes. Les aliquots de bactéries ont été fournis par le Statens Serum Institut (SSI, Copenhague, Danemark).

#### 1) Méthode d'exposition

Les expositions bactériennes ont été réalisées par le dépôt à l'aide d'une micropipette de 20  $\mu$ L d'une solution à  $0,5 \times 10^4$  IFU/mL dans les fornix conjonctivaux supérieurs et inférieurs de chaque œil. L'inoculum a été obtenu par dilution du stock bactérien (titré à  $8 \times 10^5$  IFU/mL) avec du tampon SPG. La concentration d'inoculum a été retenue suite à une étude préliminaire ayant comparé les effets cliniques d'inoculum concentrés à  $0,5 \times 10^4$  IFU/mL (n=2) et à  $0,5 \times 10^5$  IFU/mL (n=2).

Cette étude préliminaire avait montré l'apparition des signes cliniques attendus (follicules et inflammation conjonctivale) pour les deux concentrations. En l'absence de différences entre ces groupes, les expériences ont été poursuivies avec l'inoculum le plus faiblement concentré, afin de minimiser l'exposition des animaux, de limiter le risque de contamination extra-oculaire (notamment les voies aériennes supérieures par passage de surplus dans les voies lacrymales) et *in fine*, de se rapprocher au plus des conditions naturelles chez l'homme. Les inocula surnuméraires ont été congelés afin de vérifier la charge bactérienne inoculée en qPCR.

Les groupes utilisés dans les expériences présentées ici différaient principalement par le nombre d'expositions à *C. trachomatis* (Figure 19).

## **2) Cohorte « Infection aiguë »**

Cette cohorte a eu pour principal objectif d'étudier la cinétique de l'inflammation et la réponse immunitaire locale et systémique après une exposition conjonctivale à *C. trachomatis* ainsi que l'effet d'une réexposition tardive. La cohorte est composée de deux groupes :

- **Groupe réexposition sans vaccin** (n=6, avec les animaux RSV1 à RSV6),
- **Groupe réexposition vaccin protéine** (n=6, avec les animaux RP1 à RP6).

Les deux groupes ont tout d'abord été exposés à *C. trachomatis* (selon le protocole décrit ci-dessus) puis ont reçu un traitement par azithromycine *per os* (40 mg/kg le premier jour, puis 20 mg/kg pendant 4 jours suivants) 7 semaines plus tard.

La phase d'immunisation s'est ensuite déroulée en deux temps : une première immunisation suivie d'un rappel. Les deux immunisations ont consisté en deux injections intramusculaires (une dans chaque cuisse) de 0,5 mL contenant 50 µg de trois sous-unités de la protéine MOMP : CTH522 [231], CTH121ext et CTH122ext. Le mélange protéique était dilué dans du tampon Tris avec l'adjuvant CAF10b (tous deux fournis par le SSI). Le groupe non-vacciné a reçu une injection de tampon Tris seul. Les deux immunisations ont été réalisées respectivement 13 et 19 semaines après l'exposition bactérienne initiale.

Enfin les deux groupes ont été à nouveau exposés à *C. trachomatis* selon un protocole identique à la première exposition pour les deux groupes.



### **3) Cohorte « Infection chronique »**

Cette cohorte a eu pour principal objectif d'étudier la cinétique de l'inflammation et la réponse immunitaire locale lors d'une infection chronique. L'infection chronique est un modèle expérimental plus proche de l'histoire naturelle du trachome et permet de provoquer le développement de phases plus tardives de la maladie (fibrose conjonctivale). La cohorte est composée de trois groupes :

- **Groupe non-exposé** (n=2, avec les animaux NE1 et NE2),
- **Groupe expositions itératives** (n=3, avec les animaux EI1 à EI3),
- **Groupe exposition unique** (n=2, avec les animaux EU1 et EU2).

Les groupes « non-exposé » et « exposition unique » ont servi de contrôles pour le groupe « expositions itératives » aux différentes phases. Le groupe « non-exposé » a été suivi et prélevé entre les semaines 0 et 16 ; le groupe « exposition unique » a été suivi et prélevé entre les semaines 46 et 64 ; tandis que le groupe « expositions itératives » a été suivi et prélevé entre les semaines 0 et 64.

La première phase de l'étude de cette cohorte a été celle des expositions itératives où tous les yeux des animaux ont été manipulés à un rythme hebdomadaire. Le groupe « expositions itératives » a été inoculé par *C. trachomatis* toutes les semaines pendant 11 semaines tandis que le groupe « non exposé » a reçu du tampon SPG selon les mêmes modalités (remplissant la fonction d'un groupe « *mock-exposé* »).

Les animaux ont ensuite été suivis pendant un 1 mois suivant la dernière manipulation oculaire pour le groupe « non-exposé », et pendant 4 mois suivant la dernière exposition bactérienne pour le groupe « expositions itératives ».

Enfin, pour cette cohorte, la dernière phase a consisté en une réexposition tardive. Les 3 animaux du groupe « expositions itératives » ont été à nouveau exposés à *C. trachomatis* 39,5 semaines après la dernière exposition itérative (soit 50 semaines après la première exposition bactérienne) selon le même protocole. Parallèlement pour le groupe « exposition unique », 2 animaux naïfs (n'ayant pas été au préalable mis en contact avec *C. trachomatis*) ont été exposés avec le même protocole à *C. trachomatis*.

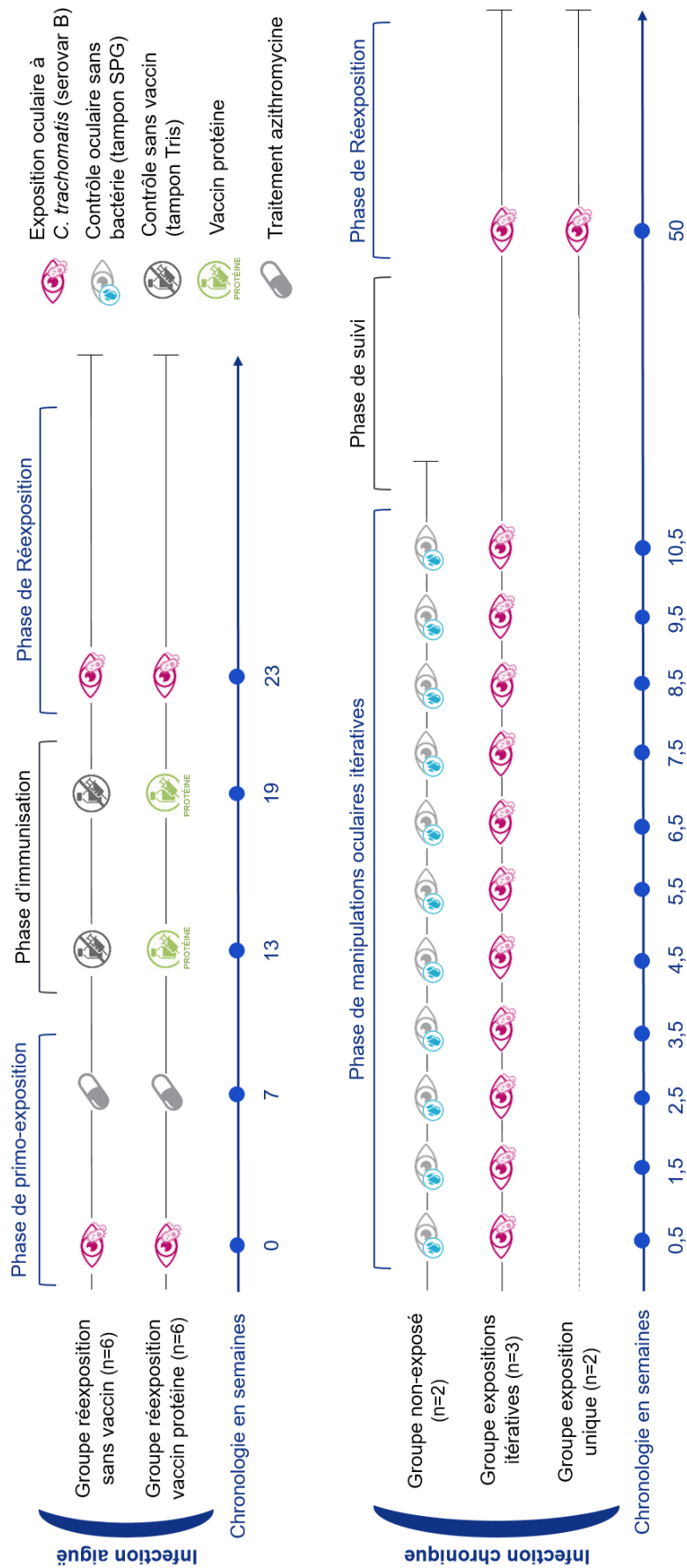


Figure 19 – Présentation des différents groupes et du déroulé des expériences

### III/ Suivi de l'état général des animaux

Les animaux ont fait l'objet d'une surveillance clinique quotidienne visant à vérifier leur bon état de santé général (alimentation, comportement).

Un bilan plus complet a été réalisé à chaque point de prélèvement (donc lors de chaque anesthésie générale) avec :

- **Un score clinique général** (activité, interaction avec le soigneur, posture du corps, score d'état corporel, prise alimentaire, consommation d'eau, aspect du poil, présence de stéréotypies,) ainsi que sur des signes extérieurs de sévérité de l'atteinte oculaire (mobilité des paupières, photosensibilité, frottement des yeux, saignements oculaires) (Annexe 1),
- **Une mesure du poids et de la température rectale,**
- **Une numération formule sanguine** (NFS) concomitante à chaque prélèvement sanguin (réalisée sur un prélèvement veineux d'un tube EDTA de 1 mL et techniquée avec l'automate DxH800, Beckman Coulter).

La crainte d'une exacerbation majeure des signes et symptômes d'atteinte oculaire lors des expositions bactériennes itératives nous a incité à mettre en place des points limites, associés à des mesures (intervention vétérinaire, traitement somatique). Les modalités de ce suivi ont été définies en collaboration avec la structure de bien-être animal d'IDMIT. Les points supplémentaires surveillés en même temps que le score clinique général et le score clinique oculaire, ont été la photophobie, le grattage des yeux et les saignements oculaires (Annexe 1).

### IV/ Suivi des signes cliniques oculaires

Afin d'assurer un suivi le plus objectif possible des signes de conjonctivite à *C. trachomatis*, un score clinique a été mis au point basé sur le score de l'OMS (Figure 14) et adapté aux signes cliniques observés chez le macaque *Cynomolgus*. Ce score, élaboré en concertation avec Matthew Burton et Martin Holland (*London School of Hygiene and Tropical Medicine*), a été concentré sur les signes cliniques de la phase aiguë du trachome, c'est-à-dire la conjonctivite folliculaire.

La cotation a été réalisée sur des photos cliniques de la conjonctive tarsale supérieure prises sous anesthésie générale, l'animal ayant été placé en décubitus dorsal. Pour la prise des photos, la paupière a été maintenue éversée à l'aide d'une spatule en métal et d'une pince atraumatique (Dutscher 956507). Les photos ont été prises avec un appareil photo (Canon EOS 80D) équipé d'un objectif macrophotographique (Canon

Macro 100mm Image stabilizer ultrasonic) et d'un flash circulaire (Canon Macro ring lite MR-14EXII), le tout monté sur un trépied stable.

Le score est composé de deux parties : l'évaluation de l'inflammation et l'évaluation des follicules. La cotation de l'inflammation est déclinée en 3 stades :

- **Minime**, caractérisé par la présence de papilles conjonctivales, un signe clinique non-spécifique et a pu être observé chez des animaux non exposés,
- **Modéré**, caractérisé par un épaissement/œdème de la conjonctive s'accompagnant d'une perte de la visibilité des vaisseaux du chorion conjonctival, sur moins de la moitié de la surface de la conjonctive tarsale supérieure,
- **Sévère**, l'œdème/épaississement conjonctival entraîne une perte de visibilité des vaisseaux sanguins sur plus de la moitié de la surface de la conjonctive tarsale supérieure.

La cotation des follicules est réalisée par dénombrement dans une zone prédéfinie de la conjonctive tarsale supérieure où ils prédominent et sont facilement observables (Figure 20).

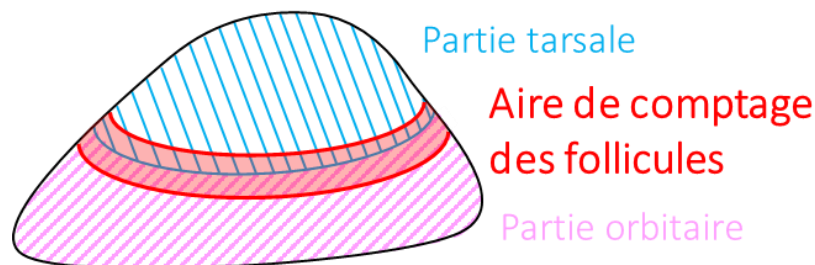


Figure 20 – Schéma de l'aire de comptage des follicules sur la conjonctive tarsale une fois la paupière éversée.

Chaque stade inflammatoire et nombre de follicules est associé à un score décrit dans la Figure 21.

Après anonymisation des photos, la cotation a été réalisée par 3 examinateurs (dont un ophtalmologiste spécialisé dans les infections oculaires, AR) *de facto* masqués pour le statut de l'animal.

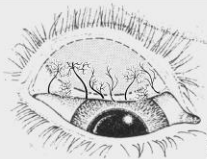

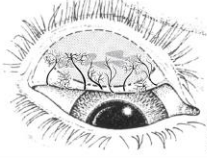

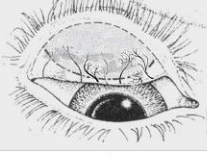

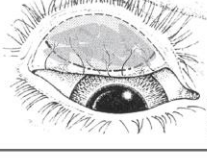






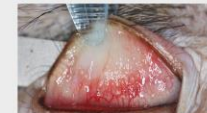
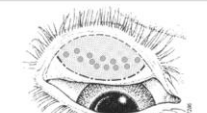

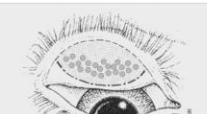

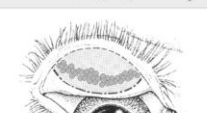

	Schémas	Scores	Caractéristiques	Images cliniques
<b>I N F L A M M A T I O N</b>		<b>0</b>	Pas d'inflammation	
		<b>1</b>	Inflammation minime Papilles, pas de vaisseaux obscurcis	
		<b>2</b>	Inflammation modérée Epaississement inflammatoire, vaisseaux opacifiés sur moins de la moitié de la surface	
		<b>3</b>	Inflammation prononcée Conjonctive épaisse et opaque, vaisseaux obscurcis sur plus de la moitié de la surface	
<b>F O L L I C U L E S</b>		<b>0</b>	Pas de follicules	
		<b>1</b>	1 – 5 follicules	
		<b>2</b>	6 – 10 follicules	
		<b>3</b>	11 – 20 follicules	
		<b>4</b>	21 – 30 follicules	
		<b>5</b>	> 30 follicules	

Figure 21 – Score de cotation des signes cliniques de l'infection conjonctivale à *C. trachomatis*.

Le score total est obtenu en ajoutant les scores d'inflammation (de 0 à 3) et de follicules (de 0 à 5). La représentation de la paupière tarsale supérieure a été adaptée d'après l'Organisation Mondiale de la Santé<sup>©</sup> avec permission [133].

L'agrégation des résultats a été réalisée suivant les modalités suivantes :

- Pour des scores identiques entre les 3 examinateurs, le score est validé,
- Pour des scores identiques pour 2 examinateurs mais différent pour le 3<sup>ème</sup> avec une différence  $\leq 1$ , le score majoritaire est validé,
- Pour des scores différents pour les 3 examinateurs ou une différence  $\geq 2$  entre 2 examinateurs, une nouvelle cotation collégiale est réalisée.

Chaque score a ensuite été réassocié aux données expérimentales (animal, date, groupe). Pour chaque point de mesure une moyenne des deux yeux a été gardé comme score clinique de chaque animal, les différences entre les deux yeux étant non-significatives.

## **V/ Quantification de la charge bactérienne**

La charge bactérienne a été quantifiée par qPCR spécifique de *C. trachomatis* sur écouvillon conjonctival en collaboration avec le laboratoire d'immunologie et d'infectiologie (L2i) d'IDMIT. Après prélèvement dans le fornix inférieur, l'écouvillon a été placé dans 1 mL de milieu Amies. Le tube contenant le milieu et l'écouvillon a été agité à l'aide d'un vortex, puis l'écouvillon a été retiré en prenant garde d'en extraire la majorité du milieu. Le liquide ainsi obtenu a ensuite été aliquoté non-dilué en 4 tubes de 250  $\mu$ L et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit « QIAamp DNA Mini kit » (Qiagen, 51306).

Les amorces spécifiques de *Chlamydia* ciblant un plasmide endogène bactérien (CtPI+ : 5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3' et CtP2 : 5'-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3' [302]) et les différents réactifs PCR du kit « Presto combined qualitative real-time CT/NG assay » (Goffin Molecular Technologies, CG160100) ont ensuite été ajoutés à l'ADN extrait. La qPCR a été réalisée à l'aide du thermocycleur CFX96TM (Bio-Rad). La quantification bactérienne a été calculée par le thermocycleur à l'aide d'une gamme étalon obtenue par des dilutions allant de  $4 \times 10^5$  à  $4 \times 10^0$  IFU/mL de la bactérie inoculée (souche B/Tunis-864 diluée dans du dPBS 1X). Les quantités bactériennes obtenues ont été exprimées en IFU équivalent copies/mL en gardant une moyenne des deux yeux pour chaque animal à chaque point de prélèvement.

## **VI/ Quantification des cytokines lacrymales et sériques**

La quantification des cytokines lacrymales et sériques a été réalisée en collaboration avec la plateforme l'équipe de biologie moléculaire d'IDMIT (L2i) avec le kit Luminex

d'analyse multiparamétrique par billes (Millipore, Miliplex MAP PCYTMG-40K-PX23). Ce kit permet la quantification des cytokines suivantes : G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23(p40), IL-13, IL-15, IL-17 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , sCD40L, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, et IL-18.

Les larmes ont été prélevées à l'aide d'une bandelette de Schirmer (Dina strip Schirmer-Plus, Coveto 677828) placée dans le fornix conjonctival inférieur. La bandelette a ensuite été placée dans un tube Eppendorf avec un ajout de 100  $\mu$ L de NaCl et centrifugée (19 000 x g pendant 20 minutes) afin d'en extraire les larmes. Les échantillons de larmes étant de faibles volumes, les prélèvements obtenus des deux yeux d'un même animal ont été rassemblés en un seul tube. Ce dernier a été dilué dans du PBS pour atteindre une quantité finale de 70  $\mu$ L. Le facteur de dilution de chaque échantillon a été noté pour être pris en compte dans la quantification finale.

Le sérum a été prélevé à l'aide d'un tube sec (c'est-à-dire sans anticoagulant). Une fois le sang coagulé dans le tube (temps d'attente de 30 minutes à 2 heures), le tube a été centrifugé (1 800 x g, pendant 10 minutes) afin de séparer le coagulum du sérum. Le sérum a ensuite été prélevé et déposé dans un tube séparé.

Des standards ont été préparés avec une série de 7 dilutions au quart. Des puits de contrôle qualité ont aussi été inclus au début de la plaque. La plaque finale a donc été composée de la série de dilution du standard, puis des contrôles qualités et enfin des échantillons préparés. Les billes ont ensuite été ajoutées dans tous les puits puis la plaque a été incubée pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après deux lavages, les anticorps de détections ont été ajoutés dans tous les puits avant une incubation d'une heure à température ambiante. A la suite de cette incubation, un conjugué de streptavidine phycoérythrine (25 $\mu$ L par puit, L-SAPE4) a été ajouté pour une nouvelle incubation de 30 minutes à température ambiante. La plaque a ensuite été lavée deux fois puis re-suspendue dans du tampon pour obtenir une quantité de 150  $\mu$ L par puit.

L'acquisition des plaques a eu lieu sur l'analyseur Luminex Bio-Plex 200 System avec HTF (*high throughput fluidics* ou fluide à haut débit) (BioRad, serial n° X10008281405).

## **VII/ Quantification des immunoglobulines lacrymales et sériques**

La quantification des immunoglobulines (Ig) A et G a été effectuée dans les larmes ainsi que dans le sérum par une équipe du SSI à l'aide d'un protocole d'ELISA sensible et spécifique.

- **Échantillons sériques**

Les plaques MaxiSorp (Nunc, Danemark) ont d'abord été « coatées » pendant une nuit à 4°C avec 4 µg/mL d'EB de *C. trachomatis* UV-atténués dans un tampon carbonaté à pH 9,6 ; puis lavées avec du tampon PBS complétementé par 20% de Tween® ; et enfin bloquées avec du PBS complétementé par 2% d'albumine de sérum bovin (BSA). Les échantillons de sérum ont été déposés dans les puits, testés en duplicat avec une série de dilutions de facteur 2 dans du PBS avec 1% de BSA.

Les IgA et IgG ont été détectées par des anticorps conjugués de chèvre anti-Fc α IgA et IgG humain couplés à la biotine (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Les échantillons ont été incubés pendant une heure à 37°C avec les anticorps dilués au 1/20 000<sup>ème</sup> dans du PBS avec 1% de BSA, puis pendant 40 minutes dans l'obscurité avec un conjugué de streptavidine Poly-HRP40 (Fitzgerald, Acton, MA, USA) dilué au 1/20 000<sup>ème</sup> dans du PBS avec 1% de BSA. Le substrat de détection TMB-PLUS (Kem-En-Tec, Danemark) a été utilisé avant blocage de la réaction par l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'absorbance a été mesurée à 450 nm (en soustrayant la valeur d'absorbance mesurée à 620 nm).

La quantification a été réalisée à l'aide d'une gamme étalon de références IgA et IgG (exprimé en unité arbitraire ELISA AEU/mL). Le calcul a été réalisé sur la courbe logistique à 5 paramètres avec le logiciel statistique R (pack « drc »).

- **Échantillons lacrymaux**

Le même protocole a été mis en œuvre pour les échantillons de larmes avec les modifications suivantes :

- Le revêtement des plaques MaxiSorp a été réalisé pendant une nuit avec un anticorps murin anti-chaînes légères kappa et lambda (Southern Biotech) dilué à 1 µg/mL dans du PBS,
- La série de dilutions des échantillons a été réalisé avec un facteur 4,
- Les standards (IgG et IgA humaines purifiées – Sigma, St. Louis, MO, USA) ont subi une série de dilutions de facteur 2,
- Les Ig quantifiées ont été exprimées en ratio d'Ig spécifique sur Ig total quantifiées, afin de normaliser les différences liées à l'échantillonnage.

L'analyse des immunoglobulines étant réalisée sur les mêmes prélèvements lacrymaux que ceux des cytokines, les larmes des deux yeux d'un même animal ont aussi été regroupées amenant à une seule quantification par animal par point de prélèvement.



## VIII/ Cytométrie des empreintes conjonctivales

### 1) Empreintes conjonctivales

Chez l'homme, les empreintes conjonctivales sont le plus souvent prélevées sur la conjonctive bulbaire. Chez le macaque cynomolgus, cette dernière est très pigmentée et difficilement accessible. Par conséquent, les empreintes conjonctivales ont donc été réalisées sur la conjonctive tarsale supérieure des animaux.

Pour s'adapter au mieux à la morphologie des macaques, les membranes de nitrocellulose (Supor PES membrane disc filters, 0,2  $\mu\text{m}$  x 47 mm, S-Pack white gridded,  $\gamma$ -irradiated, référence 66234, Pall, Ann Arbor, Michigan, USA) ont été découpées en demi-ovales de 1,6 mm x 0,6 cm de diamètre.

Une fois la paupière éversée à l'aide d'une spatule métallique et d'une pince atraumatique (Dutscher 956507), la membrane a été appliquée sur la conjonctive puis retirée délicatement et déposée dans un tube cryotubes (3,6 mL, Nunc 10070731) avec 2 mL de tampon phosphate.

Les tubes ainsi préparés ont ensuite été disposés sur un plateau à bascule pendant une heure afin d'initier le processus d'élution des cellules conjonctivales. Ce dernier a été complété par un *flushage* (ou pipetage) du tampon directement sur les empreintes pour décoller un maximum de cellules, en évitant tout contact avec la membrane. Une fois l'empreinte flushée, les 2 mL de tampon ont été transférés dans un tube FACS 5 mL (Falcon). Un volume de 2 mL de tampon a été ajouté dans le cryotube contenant l'empreinte puis le processus d'élution a été répété une seconde fois (bascule des tubes pendant 30 minutes, puis flush, puis récupération du tampon). Le tampon recueilli (4 mL) a ensuite été centrifugé (500 x g, 5 minutes à 4°C). Les culots des deux yeux d'un même animal ont ensuite été regroupés afin d'obtenir des échantillons plus concentrés en considérant les différences entre les deux yeux comme négligeables.

### 2) Marquage et cytométrie

Le culot obtenu a été incubé pendant 10 minutes avec du sérum de rat dilué à 10% pour bloquer les récepteurs Fc. Après un lavage avec un tampon phosphaté, les échantillons ont été marqués avec 50 $\mu\text{L}$  du mélange d'anticorps (Tableau 4). Une seconde étape de lavage a été réalisée après 30 minutes d'incubation en présence des anticorps fluorescents. Enfin les échantillons ont été re-suspendus dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon de fixation (BD Cell fix).

Les échantillons ainsi préparés ont été acquis sur le cytomètre à 5 lasers et 27 filtres, ZE5 de BioRad. Les données générées ont été analysées avec le logiciel FlowJo

(v10.8.1, Becton Dickinson), avec une stratégie de gating (Figure 22) mise au point pour sélectionner les populations immunitaires majeures.

Tableau 4 – Liste des anticorps utilisés pour marquer les cellules isolées depuis les empreintes conjonctivales

Antigène cible	Fluorochrome couplé	Clone	Référence	Quantité par test
<b>CD3</b>	BUV395	SP34-2	Becton Dickinson 564117	5 µL
<b>CD14</b>	BUV737	M5E2	Becton Dickinson 612764	2 µL
<b>CD8</b>	BUV805	SK1	Becton Dickinson 612890	2 µL
<b>CD4</b>	BV421	L200	Becton Dickinson 562842	5 µL
<b>Live-Dead</b>	Aqua		Fisher Scientific – 10321873	0,2 µL
<b>CD45</b>	BV786	D058-1283	Becton Dickinson 563861	2 µL
<b>CD66</b>	FITC	TET2	Miltenyi 130-116-663	1 µL
<b>CD326(EpCam)</b>	PE	1B7	Thermo Fischer 12-9326-42	2 µL
<b>CD20</b>	PE-Cy7	2H7	Becton Dickinson 560735	1 µL
<b>CD159a(NKG2A)</b>	APC	Z199	Beckman Coulter A60797	1 µL
<b>HLA-DR</b>	AF700	L243 G46-6	Becton Dickinson 560743	1 µL

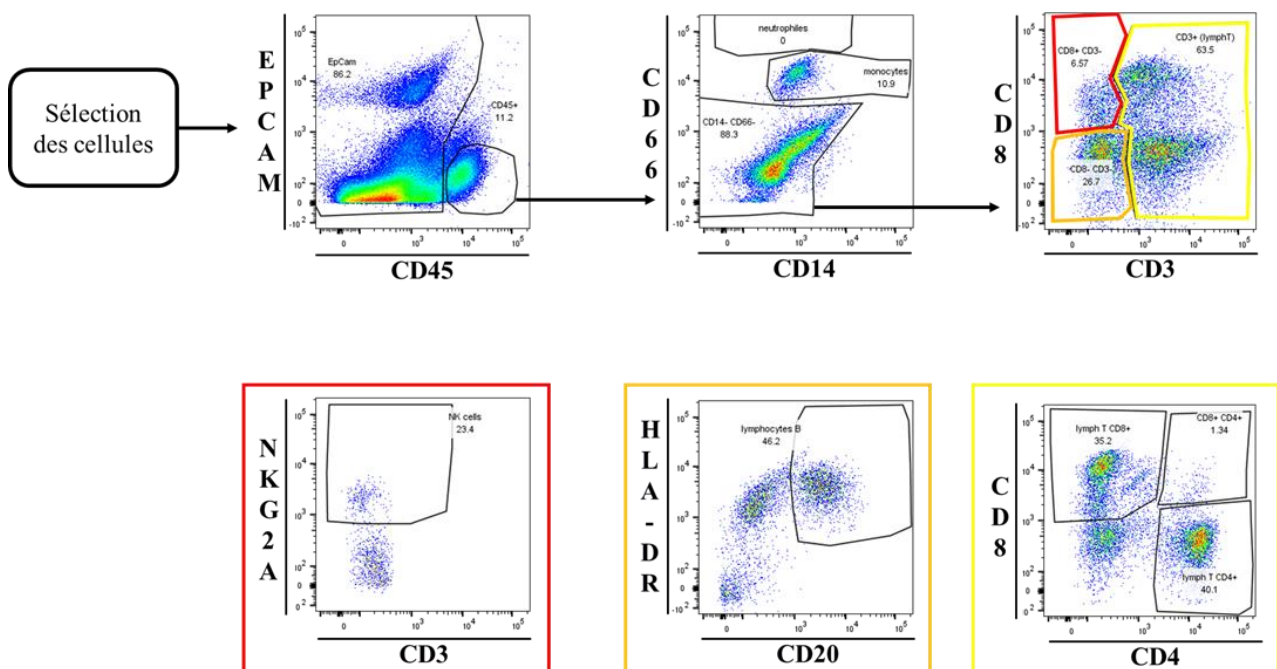


Figure 22 – Stratégie de gating appliquée pour analyser les fichiers de cytométrie des empreintes conjonctivales

## **IX/ Histologie**

### ***1) Préparation des échantillons***

Les biopsies conjonctivales ont été prélevées sous anesthésie générale. Après éversion de la paupière supérieure à l'aide d'une pince atraumatique (Dutscher 956507), puis infiltration sous-conjonctivale de lidocaïne 2% à l'aide d'une aiguille 25G, des fragments i) tarso-conjonctivaux ou ii) de conjonctive bulbaire ont été prélevés à l'aide de matériel micro-chirurgical (ciseaux de Vanas et pince de Bonn).

Les prélèvements de globes oculaires, paupières, et annexes oculaires ont été réalisés à l'occasion d'euthanasies des animaux d'intérêts.

Les tissus ont été fixés par immersion dans le formol (formalin 10%) pendant 4 heures pour les biopsies et 24h pour les prélèvements de tissus oculaires complets. Pour les globes oculaires, plusieurs orifices ont été percés dans la sclère pour faciliter la fixation. Les échantillons ont ensuite été transférés dans du PBS pour une durée minimum de 24h, puis imprégnés dans la paraffine (appareil Thermo Scientific Excelsior ES), avant d'être finalement inclus dans un bloc de paraffine (appareil Leica EG1160). Après avoir été refroidis sur une plaque froide à -3°C, les blocs de paraffine ont été découpés à l'aide d'un microtome (Microm HM340E), suivi du montage des coupes sur lame histologique (Superfrost Plus, EpreDia, référence J1800AMNZ). Les lames non-colorées ni marquées ont été mises à sécher en étuve (Thermo Scientific Heraeus T6) pendant 24h à 37°C.

Avant d'effectuer les marquages, au moins une lame par bloc histologique a été colorée (colorations hématoxyline-éosine et hématoxyline-éosine-safran) à l'aide de l'automate de coloration Leica ST5020 afin d'observer la morphologie du tissu et valider l'emplacement correct de la coupe (orientation du prélèvement et présence des structures d'intérêts).

Des tests ont été également effectués avec une inclusion des tissus en milieu d'enrobage cryogénique « OCT » après fixation en milieu Gerner. Les blocs ont été congelés à -80°C puis coupés à l'aide d'un cryostat Leica (référence CM3050) avant montage sur lame Superfrost Plus (EpreDia, référence J1800AMNZ). Les lames blanches ainsi obtenues ont ensuite été utilisées de la même manière que les lames obtenues en paraffine. Les mauvais résultats de la coloration à l'Hématoxyline-Eosine ont conduit à poursuivre les analyses histologiques sur des tissus inclus en paraffine.

### ***2) Colorations standards***

Avant d'être colorées, les coupes tissulaires ont subi une étape de déparaffinage consistant en 9 étapes successives de chacune 4 minutes, avec dans l'ordre : 3 bains

successifs de xylène, 2 bains successifs d'alcool 100%, 2 bains successifs d'alcool 95%, 1 bain d'alcool 75%, 1 bain d'eau distillée.

Les lames ainsi préparées pouvaient ensuite être colorées avec :

- **Une coloration Hématoxyline-Eosine (HE)**, pour une étude de la morphologie tissulaire, avec marquage en violet des noyaux par l'hématoxyline et en rose des cytoplasmes par l'éosine,
- **Une coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)**, pour une mise en évidence des fibres de collagène (en jaune orangé),
- **Une coloration *Periodic Acid Schiff* (PAS)**, pour une mise en évidence des cellules à mucus en colorant en rose les glucides, le glycogène et les mucines.

Les différents protocoles de ces colorations sont décrits dans le Tableau 5.

*Tableau 5 – Différentes étapes des protocoles de colorations HE, HES, et PAS*

<b>HE</b>	<b>HES</b>	<b>PAS</b>
Hématoxyline de Gill's (45 secondes)	Hématoxyline de Gill's (45 secondes)	Acide périodique 0,5% (5 minutes)
Lavage à eau clair (3 minutes)	Lavage à eau clair (3 minutes)	Eau distillée (3 minutes)
Eosine (3 minutes)	Eosine (3 minutes)	Réactif de Schiff (15 minutes)
Alcool 95% (15 secondes)	Alcool 95% (15 secondes)	Eau distillée tiède (5 minutes)
Alcool 100% (45 secondes)	Alcool 100% (45 secondes)	Hématoxyline de Gill's (45 secondes)
Alcool 100% (1 min. & 30 sec.)	Safran (5 minutes)	Lavage à eau claire (4 minutes)
Xylène (4 minutes)	Alcool 100% (3 secondes)	Alcool 70% (4 minutes)
Xylène (4 minutes)	Xylène (4 minutes)	Alcool 95% (4 minutes)
	Xylène (4 minutes)	Alcool 100% (4 minutes)
		Alcool 100% (4 minutes)
		Xylène (4 minutes)
		Xylène (4 minutes)

Les dernières étapes de ces protocoles (c'est-à-dire les passages dans des bains successifs de pourcentages croissant d'alcool suivi de 2 bains de xylène) permettent la déshydratation des coupes avant le montage des lames pour leur préservation. Le montage lame-lamelle (VWR n°631-0145 et n°631-0146) a été réalisé à l'aide du milieu de montage Eukitt (référence 6.00.01.0001.04.01.01, O. Kindler, Orsa-tec) à base de xylène. La lame une fois montée a été mise à sécher sous sorbonne pendant 30 minutes avant observation au microscope optique.

### **3) Marquage Immuno-Histo-Chimique (IHC)**

Le marquage immuno-histochimique au Ki-67 a été réalisé afin de mettre en évidence les zones de prolifération cellulaire à l'aide de l'automate IHC Ventana Discovery Ultra (Roche, 05987750001). Cette machine a permis de réaliser à la fois le déparaffinage de la lame, le prétraitement nécessaire à la mise en évidence des antigènes d'intérêt puis leur marquage.

Le déparaffinage a été réalisé avec le réactif EZ-Prep Discovery Wash (Roche 950-510, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée) et a consisté en 3 cycles d'incubation de 8 minutes à 69°C. Les lames ont ensuite été prétraitées par une incubation pendant 8 minutes à 95°C avec le réactif ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1, Roche 950-224, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée). Le reste du procédé de marquage a été réalisé à 37°C.

L'inhibition a ensuite été réalisée avec une incubation de 8 minutes avec l'inhibiteur CM (Roche 760-4307). Les lames ont ensuite été incubées pendant 60 minutes avec l'anticorps marquant le Ki-67 (2 µg/mL, Roche 790-4286).

Les lames ont ensuite été incubées avec dans l'ordre :

- Une peroxydase pendant 16 minutes (OMap anti-Rb HRP, Roche 760-4311),
- Un bloqueur de peroxydases pendant 4 minutes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CM, Roche 760-4306),
- Le chromogène 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) pendant 8 minutes (DAB CM, Roche 760-4304),
- Un catalyseur pendant 4 minutes (Copper CM, Roche 760-4303),
- L'Hématoxyline pendant 8 minutes (Hematoxylin II counterstain, Roche 790-2208),
- L'agent bleuissant pendant 8 minutes (*Bluing reagent*, Roche 760-2037).

Entre chaque étape, les lames ont été rincées avec un tampon (*Reaction buffer*, Roche 950-300, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée), excepté entre l'étape de blocage des

péroxydases et l'incubation avec la DAB pour lesquels il n'y avait aucune étape intermédiaire.

Les lames ont ensuite été sorties de l'automate puis lavées 3 fois en bac d'eau tiède et savonneuse puis 2 fois à l'eau claire tiède. Les lames ont ensuite été déshydratées dans l'automate de coloration Leica ST5020 selon le protocole de déshydratation raccourci suivant :

- Alcool 70% pendant 10 secondes,
- Alcool 95% pendant 10 secondes,
- Alcool 100% pendant 1 minutes,
- Alcool 100% pendant 15 secondes,
- Xylène pendant 1 minute.

Les lames ainsi marquées et déshydratées ont été montées avec une lamelle de verre et le milieu de montage Eukitt comme expliqué précédemment.

#### **4) Marquages Immuno-Fluorescent (IF)**

Les marquages immuno-fluorescents (IF) ont été réalisés à l'aide du Ventana Discovery Ultra sous le format de deux triplex permettant le marquage des 6 antigènes suivants : MUC5AC, Calprotectine, et CD68 d'une part ; puis CD20, CD3, et  $\alpha$ -SMA d'autre part (Tableau 6). L'ordre des anticorps a été sélectionné après test des différentes positions (1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> marqueur) de chacun des anticorps. Les anticorps ont été associés respectivement aux fluorochromes suivants : Opal 520 (Akoya Biosciences, SKU FP1487001KT), Opal 650 (Akoya Biosciences, SKU FP1496001KT), et enfin Opal 570 (Akoya Biosciences, SKU FP1488001KT).

*Tableau 6 – Références des anticorps utilisés pour les marquages IF des coupes histologiques*

<b>Antigène cible</b>	<b>Concentration</b>	<b>Ordre d'utilisation</b>	<b>Référence</b>	<b>Fournisseur</b>
CD20	0,1 µg/mL	Triplex 1 – Anticorps 1	M0755	Dako
CD3	1 µg/mL	Triplex 1 – Anticorps 2	551916	BD
$\alpha$ SMA (SM actin)	0,02 µg/mL	Triplex 1 – Anticorps 3	760-2833	Roche
MUC5AC	1 µg/mL	Triplex 2 – Anticorps 1	MA5-12175	invitrogen
Calprotectine	0,1 µg/mL	Triplex 2 – Anticorps 2	MA5-12213	invitrogen
CD68	1 µg/mL	Triplex 3 – Anticorps 3	M0814	Dako

L'automate a d'abord effectué un cycle de déparaffinage avec le réactif EZ-Prep Discovery wash (Roche 950-510, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée) puis un prétraitement avec l'ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1, Roche 950-224, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée) avec un prétraitement de 32 minutes pour le premier triplex (MUC5AC, Calprotectine, CD68) et 16 minutes pour le second triplex (CD20, CD3,  $\alpha$ -SMA).

Une fois le prétraitement réalisé, les lames ont été maintenues dans un milieu aqueux avec le réactif SSC (Roche 950-110, dilué au quart dans de l'eau distillée). Des lavages ont été effectués entre chaque étape avec le *Reaction Buffer* (Roche 950-300, dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée).

Les lames ont ensuite été incubées pendant 8 minutes avec un inhibiteur (Discovery Inhibitor, Roche 760-4840). Puis, pour chaque marqueur, les lames ont été incubées 32 minutes avec l'anticorps, puis 16 minutes avec un anticorps conjugué à une enzyme peroxydase (OMap anti-Ms HRP, Roche 760-4310), et enfin 8 minutes avec le fluorochrome correspondant à l'anticorps.

Entre chaque anticorps les lames ont été dénaturées par une incubation avec le réactif CC1 à 95°C pendant 8 minutes. Enfin, une fois les lames incubées avec les 3 anticorps, elles ont été incubées pendant 8 minutes avec le DAPI (QD Dapi, Roche 760-4196). Les lames ont ensuite été sorties de l'automate puis lavées avec 3 lavages successifs dans un bac d'eau tiède et savonneuse puis 2 rinçages à l'eau claire tiède.

Les lames ont ensuite été montées avec un milieu de montage aqueux (ProLong Gold *antifade agent*, invitrogen P36930) avec des lamelles en verre, puis mise à sécher pendant 12 heures à température ambiante avant d'être stockées à 4°C.

Les lames ont été observées à l'aide du scanner de lame (AxioScan7, Zeiss) puis les images générées ont été analysées avec le logiciel QuPath (version 0.4.3).

## **X/ Microbiote oculaire**

Le microbiote oculaire a été analysé à partir des écouvillons conjonctivaux par séquençage des régions V3-V4 de l'ARN 16S ribosomal. Toutes les expériences ont été réalisées sur les fluides conjonctivaux (élution à partir des écouvillons selon le protocole utilisé pour la quantification bactérienne) congelés et stockés à -80°C. Toutes l'analyse du microbiote oculaire a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Life&Soft.

## **1) Déroulé de l'expérience**

L'analyse a été réalisée sur des échantillons provenant de la cohorte « Infection aiguë » lors de la phase de primo-exposition en amont de l'immunisation (Figure 19) (n=8, réparti avec 4 animaux de chaque groupe ainsi que 4 ayant été prélevés d'empreintes conjonctivales). Les animaux sélectionnés ont tous montré une réaction modérée à l'exposition bactérienne. Pour chaque animal 4 temps de prélèvement ont été étudiés : un prélèvement de référence (4 semaines avant l'exposition à *C. trachomatis*), puis à 2, 4, 6, 9, et 11 semaines après l'exposition à *C. trachomatis*. Les prélèvements aux semaines 9 et 11 ont eu lieu après le traitement antibiotique.

Afin de comparer les effets sur le microbiote conjonctival d'une infection bactérienne avec ceux d'une infection virale systémique, une analyse du microbiote oculaire a de plus été réalisée sur des échantillons congelés d'animaux ayant été exposés par voies nasale (500 µL), trachéale (4,5 mL) et pharyngée (1 mL) au virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (H1N1/2009/Cal07, concentré à 2,1x10<sup>6</sup> PFU pour 6 mL) de la grippe (n=4). Pour chaque animal, 11 temps de prélèvement ont été étudiés : 4 prélèvements de référence (8, 4, 3, et 2 semaines avant l'exposition au virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), un prélèvement le jour de l'exposition, puis 4, 7, 14, 21, 28, et 60 jours après l'exposition au virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>.

## **2) Extraction et séquençage**

Une extraction de l'ADN a tout d'abord été effectuée sur les échantillons à l'aide du kit QiAmp PowerFecal Pro (Qiagen, 51804) selon le protocole du fabricant.

L'approche de séquençage utilisée est une adaptation du protocole « 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation » d'Illumina, optimisé par l'équipe de Life&Soft pour les échantillons faiblement concentrés en ajoutant une étape de pré-amplification par PCR ciblant la région V3-V4 de l'ARN 16S.

Puis le protocole Illumina de préparation de la librairie de séquençage a été employé avec une succession de 2 cycles de PCR et 2 étapes de lavages en série. Les PCR ont pour rôle dans l'ordre d'amplifier l'ADN, et l'ajout d'un double index (Nextera XT index Kit v2, Illumina 2140531), c'est-à-dire des fragments ADN qui permettent le codage (bar-code) de chaque échantillon et donc la traçabilité de chaque séquence à l'étape d'analyse. Les séquences adaptatrices P5 et P7 (des fragments d'ADN qui permettent l'hybridation à la Flow Cell) ont également été ajoutées à cette étape. L'ajout des séquences adaptatrices ainsi que des index a été réalisé à l'aide du TrueSeq Index Plate (Illumina). Les amplicons des différentes PCR ont été purifiés et nettoyés afin de retirer les primers restants ainsi que les dimères de primers. Ces étapes de nettoyage ont été réalisées à l'aide de billes magnétiques AMPure XP beads (Beckman Coulter, A63880). Après les différentes étapes d'extraction et de PCR, la quantité d'ADN a été



contrôlée avec le QuBit (invitrogen, 15860210) et leur qualité a été contrôlée avec la TapeStation (Agilent Technologies, 5067-5584 et 5067-5585).

Enfin la quantité d'ADN a été normalisée pour obtenir l'équivalent de 4 nM d'ADN par échantillon afin qu'un nombre comparable de lectures soit réalisé pour chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été dénaturés, puis mélangés à la librairie PhiX (Illumina FC-110-3001, contrôle interne de l'expérience) à hauteur de 20% du volume total des échantillons (ajouté comme contrôle interne de l'expérience) et chargés sur la *Flow cell* (Illumina, v3 600 cycles, MS-102-3003) qui a ensuite été placée dans le séquenceur (MiSeq d'Illumina).

Les séquences obtenues ont été assignées sur la base de données SILVA 16S (pintail 100) via le logiciel Galaxy en utilisant Blastn pour l'assignation et le pipeline d'analyse FROGS (*Find Rapidly OTU with Galaxy Solution*). Les taxons montrant 99% d'homologie ont été agrégés en un seul taxon. Les multi-affiliations ont été, si possible, corrigées en gardant la meilleure annotation possible. Les abondances brutes ont ensuite été converties en fichiers biom et un objet Phyloseq a été créé. Enfin, les différences d'abondance des espèces ont été analysées en fonction des paramètres étudiés (exposition au pathogène, traitement antibiotique, ou encore utilisation d'empreinte conjonctivale) à l'aide d'une analyse DESeq2 (logiciel d'analyse statistique R).

## **XI/ Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de deux logiciels : GraphPad Prism (version 10.0.2) et R (version 4.3.2 Beagle Scouts) [303].

Les analyses réalisées à l'aide de GraphPad Prism ont permis de tester la significativité des modifications au cours des cinétiques. Les tests non-paramétriques suivants ont été utilisés : le test de Wilcoxon, ainsi que de Friedman avec ajout d'une procédure de correction linéaire en deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli.

Dans le but de comparer les différents groupes d'animaux, des aires sous la courbe (ou AUC) ont été calculées, toujours à l'aide de GraphPad Prism. Les différences entre les groupes ont ensuite été testées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple à l'aide d'une correction de Dunn's. Ces analyses d'AUC ont permis des comparaisons au cours des différentes études mais ne sont pas représentées graphiquement dans ce manuscrit.

Pour tous les tests statistiques réalisés avec GraphPad Prism, les valeurs de p ont été représentées dans les graphiques comme suit : \*\*\*\* p<0,0001 ; \*\*\* 0,0001<p<0,001 ; \*\* 0,001<p<0,01 ; \* 0,01<p<0,1.

Le logiciel R a été utilisé afin de réaliser les corrélations multiparamétriques, l'analyse des immunoglobulines ainsi que l'analyse du microbiote oculaire. Les corrélations ont été réalisées avec le test non-paramétrique de corrélation de Spearman avec une p-value bilatérale. Ce test a permis d'obtenir un score r de corrélation entre tous les paramètres mesurés (un score r pour chaque couple de paramètres) allant de -1 (la corrélation négative maximale) à 1 (la corrélation positive maximale). Chaque corrélation a aussi été associée à une p-value avec les représentations suivantes : \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$ .

Le paquet « drc » a été utilisé par l'équipe de SSI pour obtenir les quantifications des Ig.

L'analyse des résultats des études du microbiote a été réalisée à l'aide d'un script d'analyse de la société Life&Soft utilisant le test statistique DESeq2 (version 1.40.1 avec un seuil de significativité de 0,05).

## Chapitre 3 – Résultats

### I/ Cinétique de l'infection et de la réponse immunitaire au cours d'une infection aiguë

La cohorte « infection aiguë » est composée de deux groupes : « réexposition sans vaccin » et « réexposition vaccin protéine ». Le plan expérimental a consisté pour les deux groupes en une première exposition à la bactérie suivie d'une observation des signes cliniques et des paramètres biologiques pendant 7 semaines, temps auquel un traitement antibiotique a été administré. Les animaux ont ensuite été immunisés à deux reprises aux semaines 13 et 19 p.e. (avec un vaccin protéique MOMP pour le groupe « réexposition vaccin protéique » ou bien un tampon de dilution pour le groupe « réexposition sans vaccin ») avant d'être réexposés à la bactérie, 23 semaines après l'exposition initiale.

#### 1) Evolution de la charge bactérienne

La colonisation bactérienne conjonctivale a été vérifiée à l'aide d'une qPCR réalisée sur les fluides conjonctivaux prélevés par écouvillons (Figure 23).

L'exposition bactérienne a été suivie d'une augmentation des charges bactériennes des deux groupes, constatée dès le premier prélèvement analysé (2 semaines p.e.). Les charges bactériennes ont culminé à 4 semaines p.e. (sauf pour l'animal RP1 dont la charge bactérienne culminait à 6 semaines p.e.). Ces observations ont confirmé l'efficacité de l'infection conjonctivale des yeux exposés à *C. trachomatis* dans notre modèle.

La charge bactérienne a ensuite diminué avec un retour spontané en dessous des niveaux de détection pour 2 animaux du groupe « réexposition sans vaccin » (RSV2 et RSV6) et 2 animaux du groupe « réexposition vaccin protéine » (RP3 et RP4). Le traitement antibiotique administré à la semaine 7 p.e. a été suivi d'une diminution des charges bactériennes des 8 autres animaux, qui sont passés sous le seuil de détection à la semaine 9.

La charge bactérienne est restée nulle après administration du traitement par azithromycine (en semaine 7) et ce pendant la phase d'immunisation et jusqu'à la réexposition (en semaine 23) (Figure 23). L'absence de ré-augmentation de la charge bactérienne a bien confirmé la résolution de l'infection à *C. trachomatis* une fois le traitement appliqué.

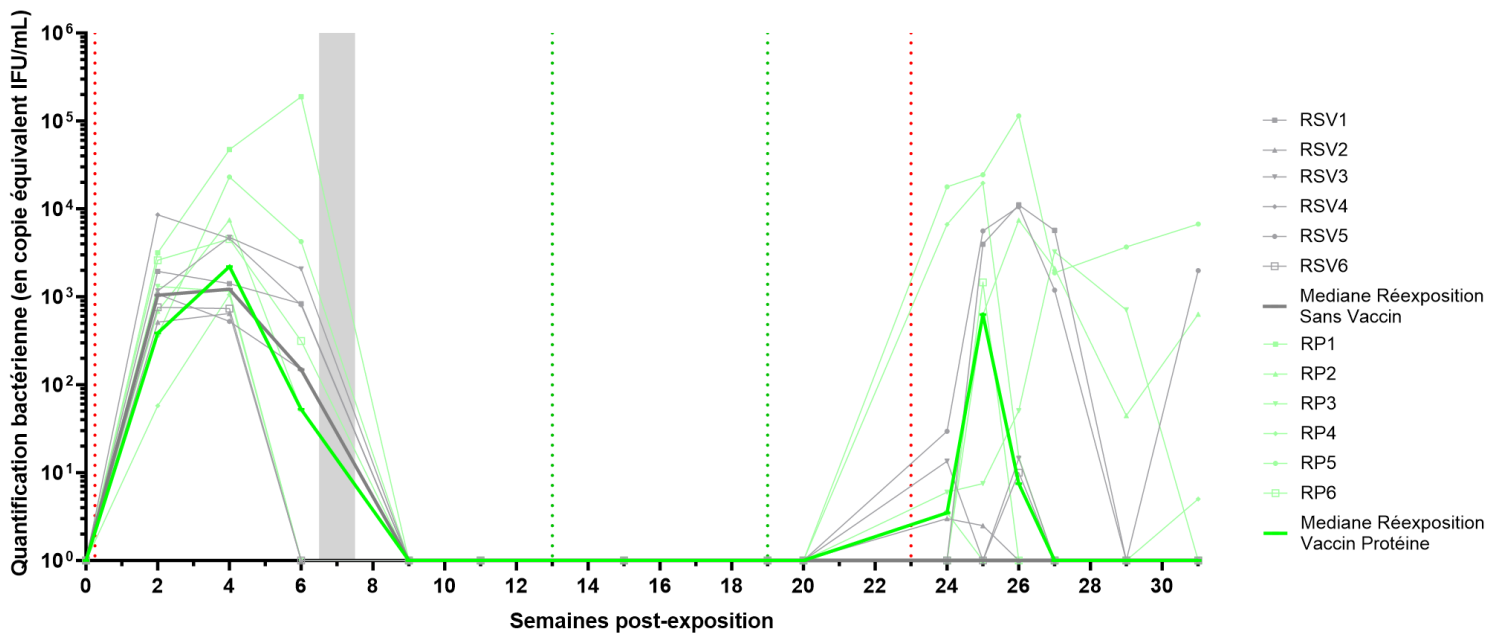


Figure 23 – Cinétique de la quantification bactérienne de la cohorte « infection aiguë ». Les lignes pointillées rouges représentent les expositions bactériennes oculaires, les lignes pointillées vertes les immunisations, et l'intervalle gris le traitement antibiotique.

La réexposition bactérienne à la semaine 23 post-primo-exposition n'a pas été suivie d'une détection de la bactérie chez tous les animaux. En particulier pour le sous-groupe « réexposition sans vaccin » avec une charge bactérienne nulle dans les deux yeux d'un individu (RSV4) et dans l'un des deux yeux de 2 autres individus (RSV1 et RSV6). La médiane des charges bactériennes de ce sous-groupe est restée à  $10^0$  copie équivalent IFU/mL pendant tout le suivi.

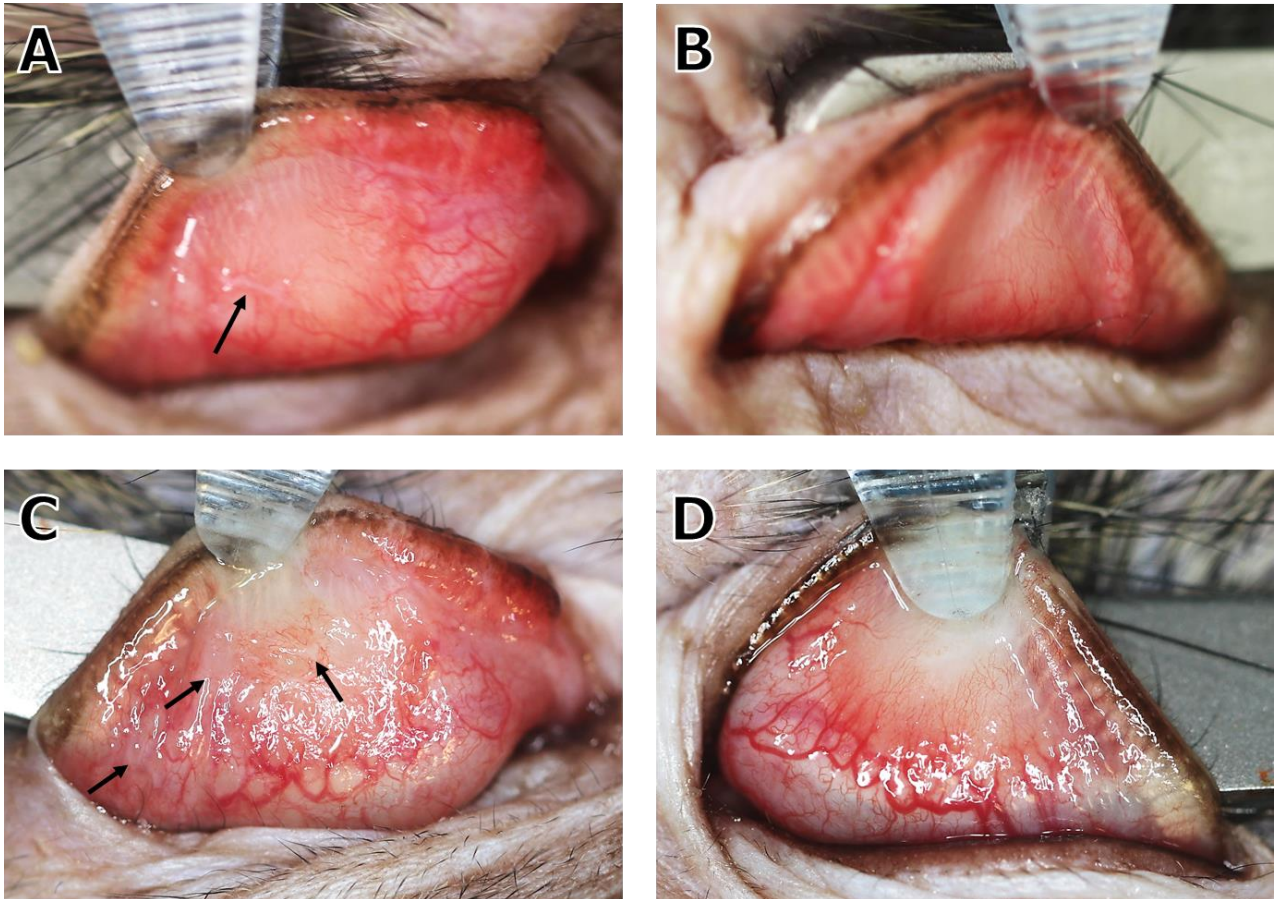
Bien qu'une tendance similaire fût observée dans le groupe « réexposition vaccin protéine » (2 animaux avec un œil sans charge bactérienne détectable : RP1 et RP6) ; la majorité du groupe a présenté une ré-augmentation de la charge bactérienne à la suite de la réexposition. La bactérienne médiane a culminé à la semaine 25, soit à la semaine 2 post-réexposition. L'animal ayant présenté la charge bactérienne la plus élevée après la primo-exposition (RP1) a eu une charge bactérienne quasiment nulle à la suite de cette seconde exposition.

Enfin une charge bactérienne a encore été détectée au tout dernier point de suivi (semaine 31, soit 8 semaines post réexposition) pour 1 animal du groupe « réexposition sans vaccin » (RSV5) et 3 animaux du groupe « réexposition vaccin protéine » (RP2, RP4, et RP5).

## **2) Observation clinique de conjonctivite folliculaire**

### **a) Signes cliniques de fibrose conjonctival préexposition**

L'examen clinique initial a révélé que RSV1 présentait des stigmates de fibrose conjonctivale sur son œil droit avant le début des expérimentations (Figure 24 A) avec la présence d'une cicatrice, sans anomalie spécifique sur son œil gauche (Figure 24 B).



*Figure 24 – Photos cliniques de RSV1*

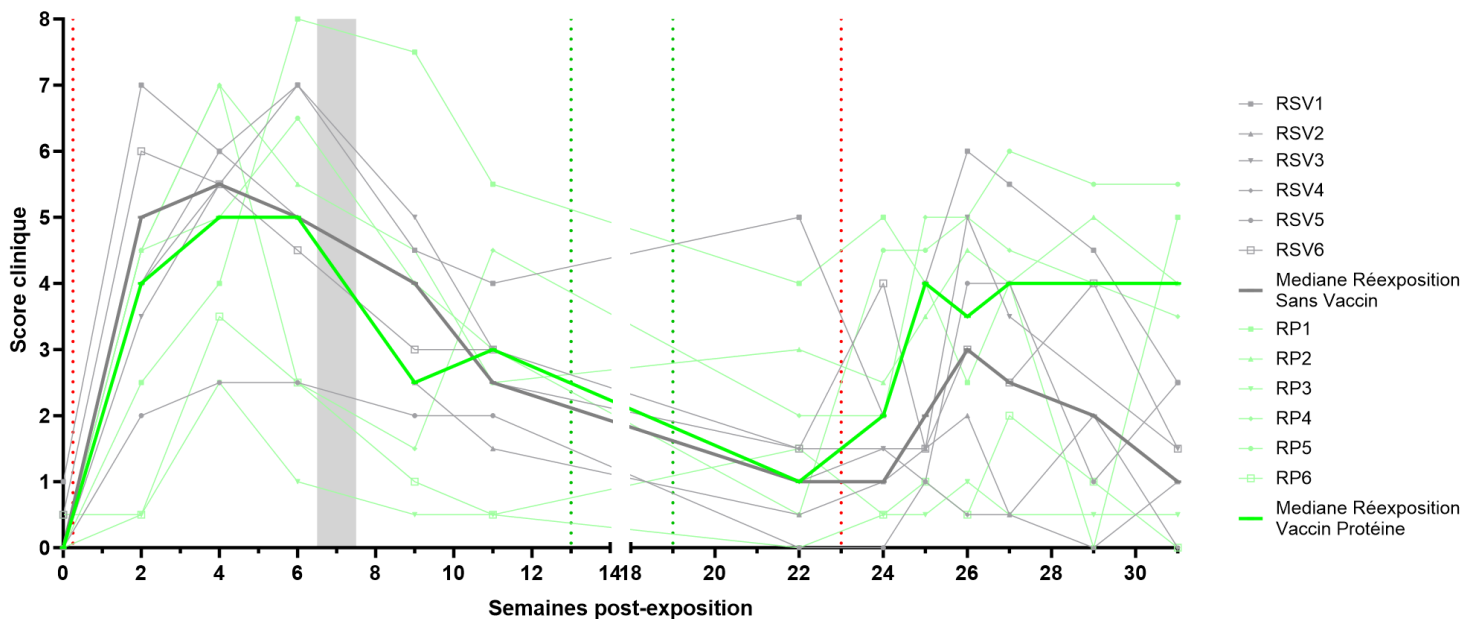
*Les photos ont été prises au point de référence (A, B) et au dernier point de suivi à la semaine 31 (C, D) pour l'œil droit (A, C) et l'œil gauche (B, D), montrant des zones de fibrose conjonctivale (flèches noires)*

Les photos cliniques de RSV1 prises avant la biopsie (en fin de suivi, à semaine 31, soit 8 semaines après la réexposition bactérienne) ont permis de confirmer la persistance et l'amplification de la fibrose conjonctivale sur l'œil droit (Figure 24 C) et l'absence de fibrose après les deux expositions bactériennes sur l'œil gauche (Figure 24 D).

## ***b) Évolution des signes cliniques après exposition bactérienne***

L'évolution des manifestations cliniques a été suivie par cotation des signes cliniques en suivant l'échelle de score clinique oculaire (Figure 21). Les deux groupes de la cohorte « infection aiguë » ont développé des signes cliniques à la suite de l'exposition bactérienne (Figure 25).

La cotation réalisée avant l'exposition (par convention : semaine 0 sur le graphique) n'a retrouvé presque aucune inflammation ni follicules avec une médiane des scores des deux groupes à 0. Seuls 3 animaux ont eu un score non-nul en préexposition (score clinique de 1 pour RSV1 et de 0,5 pour RSV6 et RP6). L'exposition bactérienne a été suivie d'une augmentation des scores des deux groupes dès la cotation suivante (semaine 2) avec un pic des scores à la semaine 4 (scores de 5,5 et de 5 pour les groupes « réexposition sans vaccin » et « réexposition vaccin protéine », respectivement). L'animal RP1 a atteint le score maximal de l'échelle à la semaine 6 p.e.



*Figure 25 – Cinétique du score clinique de la cohorte « infection aiguë ». Les lignes pointillées rouges représentent les expositions bactériennes oculaires, les lignes pointillées vertes les immunisations, et l'intervalle gris le traitement antibiotique.*

Les scores cliniques de tous les animaux ont diminué après le traitement antibiotique. Bien qu'une ré-augmentation ait été observé pour RP4 (augmentation de +3), la tendance majoritaire a été à la diminution progressive du score clinique.

Entre la semaine 11 p.e. et le prélèvement précédant la réexposition (11 semaines plus tard) la majorité des scores cliniques ont continué à diminuer. Le score a toutefois augmenté chez 3 animaux (0,5 unité chez RP2, une unité chez RSV1 et RP6). Deux animaux sont revenus à un score clinique nulle à la semaine 22 (RSV5 et RP3).

La réexposition bactérienne (à la semaine 23) a entraîné une augmentation du score clinique chez tous les animaux (excepté RP3) dans les deux premières semaines post-réexposition. La tendance globale a été à l'augmentation pour les deux groupes avec un pic du score 2 semaines et 3 semaines après la réexposition respectivement pour les groupes « réexposition vaccin protéine » et « réexposition sans vaccin ». Au dernier point de suivi (semaine 31 post-primo-exposition), 10 des 12 animaux ont présenté une inflammation et des follicules conjonctivaux. Un score clinique de 0 a été observé seulement pour 2/12 animaux (RSV4 et RP6).

Aucune différence statistiquement significative de score clinique entre les deux groupes n'a été observée durant toute la période de suivi.

### ***3) Caractérisation de la réponse immunitaire locale***

#### ***a) Evolution des populations immunitaires majeures***

L'étude des populations immunitaires conjonctivales a été réalisée par cytométrie en flux multiparamétrique des cellules prélevées par empreintes conjonctivales (Figure 26).

Le prélèvement de référence a retrouvé une faible quantité de leucocytes (de 310 et 386 leucocytes pour 50 000 cellules détectées pour respectivement les groupes « réexposition sans vaccin » et « réexposition vaccin protéine »). L'infiltrat immunitaire (cellules CD45<sup>+</sup>) a été majoritairement composé de lymphocytes T (65,5% du groupe « réexposition sans vaccin » et 48,5% du groupe « réexposition vaccin protéine »), et de monocytes en plus faible proportion (3,8% et 6%). Pour le groupe « réexposition sans-vaccin », 0,8% de cellules NK ont été observés, tandis que pour le groupe « réexposition vaccin protéine » les autres population immunitaires (lymphocytes B, neutrophiles et cellules NK) ont représenté moins de 0,5% de l'infiltrat (respectivement 0,1%, 0,2% et 0,2%).

L'exposition bactérienne a entraîné une augmentation des leucocytes dès la première semaine avec un pic observé à la semaine 3 p.e.. Cette augmentation des leucocytes a été majoritairement dû à un influx de lymphocytes T dont la proportion a augmenté après l'exposition bactérienne. La proportion de lymphocytes T a culminé à la semaine 2 p.e. avec respectivement 67% et 70% pour les groupes « réexposition sans vaccin » et « réexposition protéine » (représentant une augmentation de 2%, 44%). A la

semaine 6 la proportion de lymphocytes T a diminué au profit des monocytes qui ont augmenté à ce point de prélèvement d'un facteur 5 (groupe « réexposition sans vaccin ») et 3 (groupe « réexposition vaccin protéine »). Enfin pour les deux groupes, un infiltrat de lymphocytes B a été détecté aux semaines 4, 6 et 9 p.e. (avec une proportion de 1 à 2%).

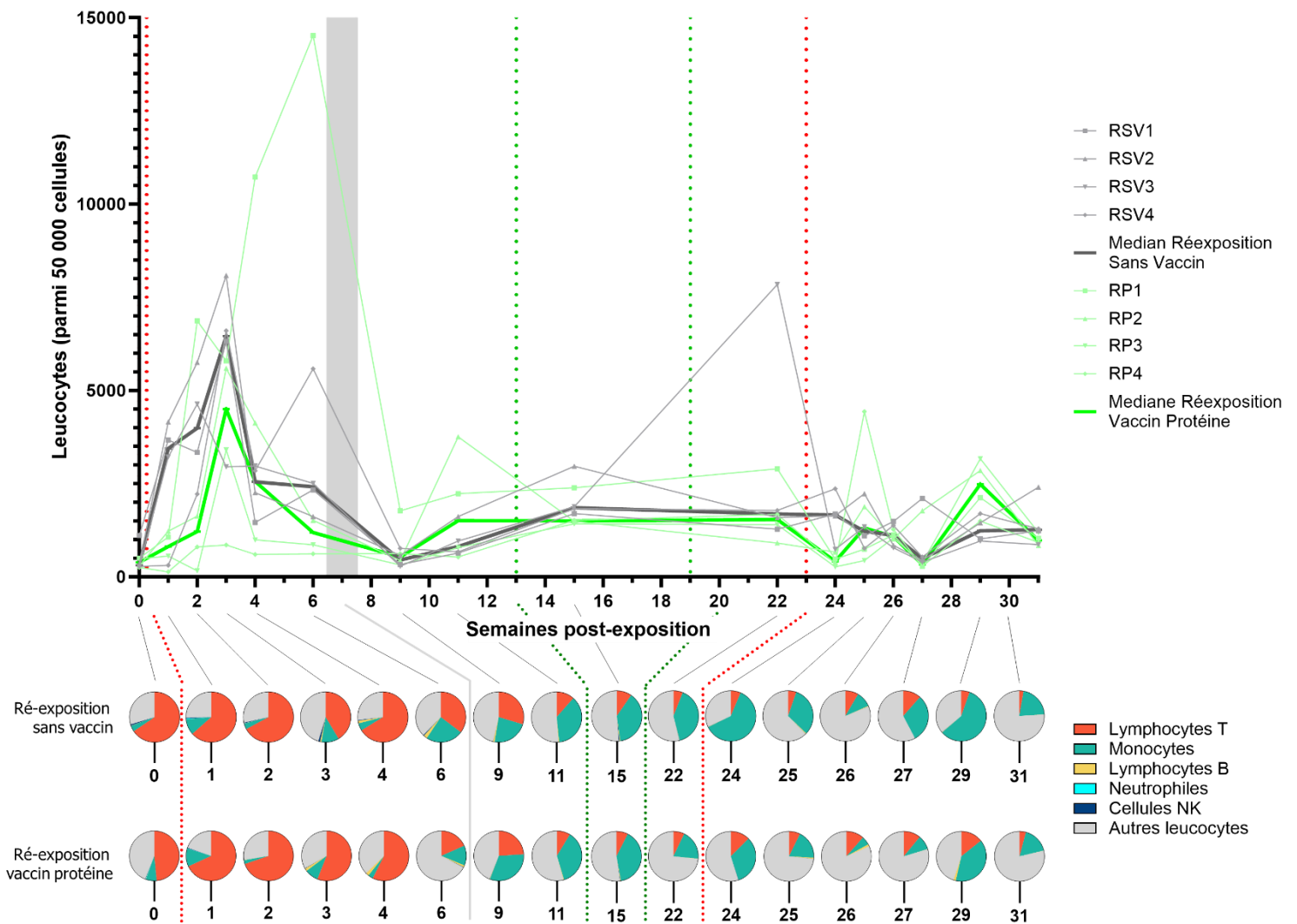


Figure 26 – Évolution des principales populations immunitaires locales dans la cohorte « infection aiguë ».

Les lignes pointillées rouges représentent les expositions bactériennes oculaires, l'intervalle gris le traitement antibiotique et les lignes pointillées vertes les immunisations. La quantité de leucocyte est normalisé sur 50 000 cellules détectées. La représentation en diagramme circulaire représente, pour chaque point de prélèvement, la médiane de répartition des populations immunitaires identifiées de chaque groupe pour 100 leucocytes.



Le traitement azithromycine à la semaine 7 a entraîné une diminution de la quantité de leucocytes pour la majorité des animaux (7/8). Une augmentation minime (0,98%) de la proportion des leucocytes n'a été observée que pour RP4. La proportion de leucocytes retrouvée sur les empreintes conjonctivales entre le traitement antibiotique et la réexposition a été globalement stable (excepté une augmentation de RSV3 à la semaine 22). A partir de la semaine 9 p.e. (qui correspond également à la semaine 1 post-traitement) et pendant tout le suivi précédent la réexposition, les monocytes ont constitué la population immunitaire majoritaire, avec une proportion maximale de 40% à la semaine 22 pour le groupe « réexposition sans vaccin » et à la semaine 15 pour le groupe « réexposition vaccin protéine ».

La réexposition bactérienne n'a pas entraîné le même profil que la primo-exposition avec une réponse immunitaire globalement beaucoup plus faible. En effet, bien qu'une augmentation des leucocytes ait été observée chez certains animaux, la tendance médiane a été une faible diminution dans les 4 premières semaines suivant l'exposition suivie d'une légère ré-augmentation (culminant à la semaine 29). Le profil des populations immunitaires identifiées a été différent, en particulier pour le groupe « réexposition sans vaccin ». Dans ce dernier, l'infiltrat immunitaire a été majoritairement composé de monocytes (augmentation de 53% une semaine après la réexposition). Une augmentation des lymphocytes T a été observée plus tardivement que pour la primo-exposition (3 et 4 semaines après la réexposition vs 2 semaines après la primo-exposition). La proportion de lymphocytes T a été très différente de la primo-exposition avec seulement 11,5 % de lymphocytes T au maximum (semaine 27 post-primo-exposition) comparée au pic de 67% observé à la semaine 2.

La même tendance a été observée pour la population des monocytes dans le groupe « réexposition vaccin protéine ». En revanche, un influx de lymphocyte T a été observé dès la semaine suivant la réexposition avec augmentation de 73% des lymphocytes T, bien que pour ce groupe, la proportion soit restée minoritaire (14% à la semaine 29). La proportion de lymphocytes T est restée stable dans le temps avec la plus grande proportion observée à la semaine 29 (6 semaines post-réexposition). Une petite population de lymphocytes B a aussi été détectée 3 semaines et 6 semaines post-réexposition (respectivement 1,4% et 1,5%).

La quantité finale de leucocytes quantifiée a été plus élevée que celle détectée au prélèvement de référence avec une augmentation d'un facteur de 3 et de 1,5 respectivement pour le groupe « réexposition sans vaccin » et « réexposition vaccin protéine ». Les proportions de populations immunitaires ont été inversées par rapport aux prélèvements de référence avec une proportion finale de monocytes plus élevée que celle des lymphocytes T (21% versus 3% respectivement pour le groupe « réexposition sans vaccin » et 17% versus 4% pour le groupe « réexposition vaccin protéine »).

## b) Suivi des cytokines lacrymales

Nous avons choisi de limiter notre présentation des résultats aux cytokines ayant évolué de façon significative (Figure 27). Les données des autres cytokines (TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-6, IL 18, et G-CSF) sont présentées en Annexe 2.

Les analyses présentées ici s'arrêtent à la semaine 11. Au cours de cette première phase, il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes qui sont donc décrits conjointement ci-après.

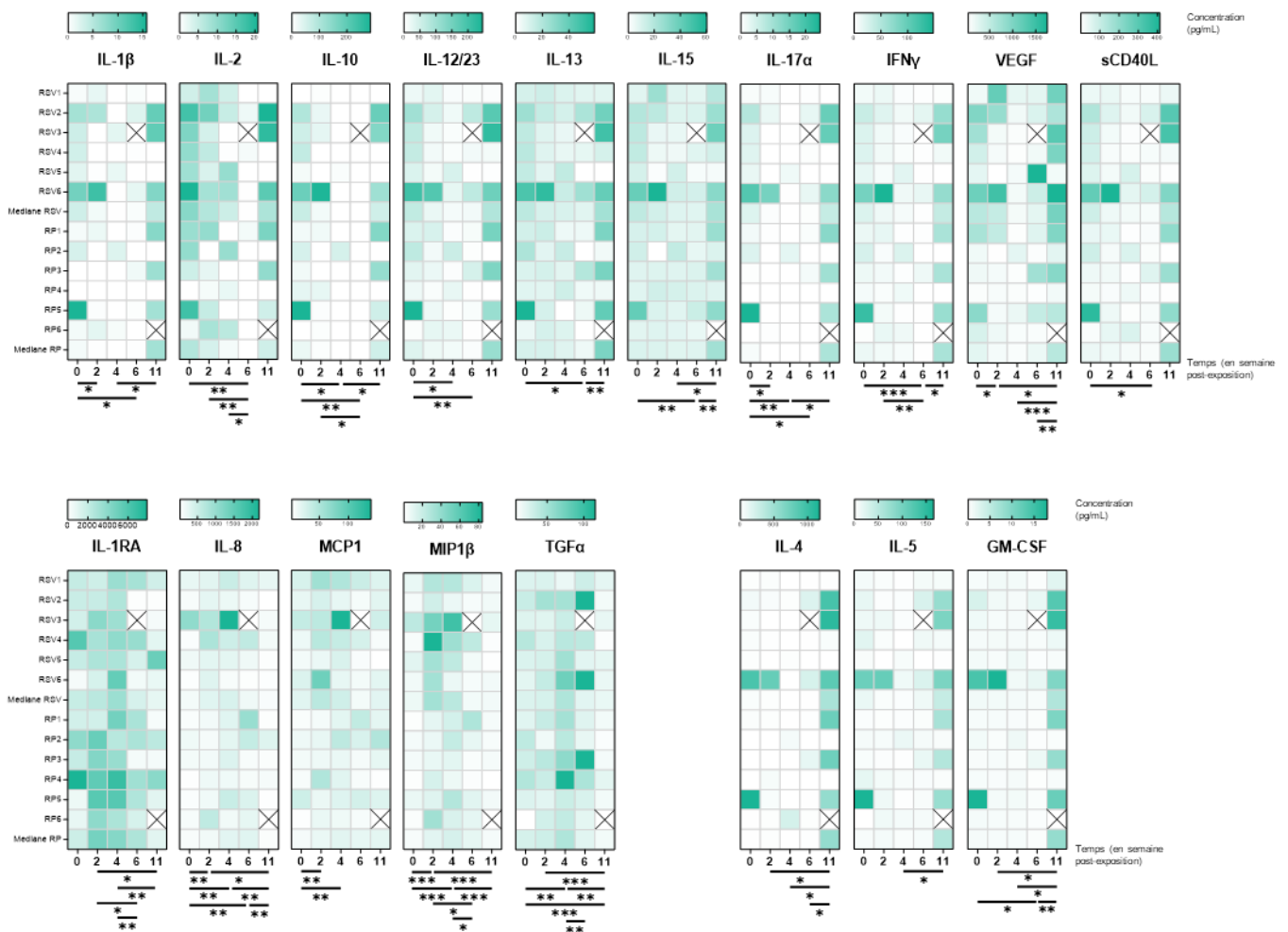


Figure 27 – Quantification des cytokines lacrymales de la cohorte « infection aiguë ». L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Friedman avec l'ajout d'une correction par la procédure à deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli. Les résultats sont représentés avec les étoiles suivantes : \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $0,0001 < p < 0,001$ , \*\*  $0,001 < p < 0,01$ , \*  $0,01 < p < 0,1$ .

Plusieurs profils de réaction à l'exposition bactérienne ont été observés. Une diminution initiale significative a été observée pour 10/18 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-12/23,

IL-13, IL-15, IL-17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, et sCD40L) après l'exposition à *C. trachomatis*. Les concentrations les plus faibles ont été observées aux semaines 4 et 6 p.e.. Une augmentation de l'ensemble de ces cytokines a ensuite été observée à la semaine 11.

Le second profil a consisté en une augmentation tardive. Les cytokines IL-4, IL-5 et GM-CSF présentes en quantité faible et stable les premières semaines ont augmenté en fin de suivi.

Enfin, les cytokines TGF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, et IL-1RA ont augmenté initialement à la suite de l'exposition bactérienne, atteignant une valeur maximale entre les semaines 2 et 6 p.e., puis ont diminué pour revenir à leur niveau initial à la semaine 11.

### ***c) Suivi des immunoglobulines lacrymales***

Les dosages ont été réalisés au cours la phase de primo-exposition (du prélèvement de référence jusqu'à la semaine 11) (Figure 28).

Pour compenser l'impact potentiel du faible volume des échantillons de larmes (et leur évaporation potentielle lors du transport) sur la quantification des Ig, les dosages ont été exprimés en ratio des Ig lacrymales spécifiques de *C. trachomatis* sur les Ig lacrymales totales.

Les IgG ont augmenté suite à l'exposition bactérienne, dès la semaine 2 avec un pic aux semaines 4 et 6 (respectivement pour les groupes « réexposition sans vaccin » et « réexposition vaccin protéine ») suivi d'une diminution à la semaine 11 (4 semaines après le traitement (Figure 28 A). Les IgA ont augmenté plus tardivement à partir de la semaine 4, culminé à la semaine 6, puis diminué à la semaine 11 après le traitement, indifféremment pour les deux groupes (Figure 28 B).

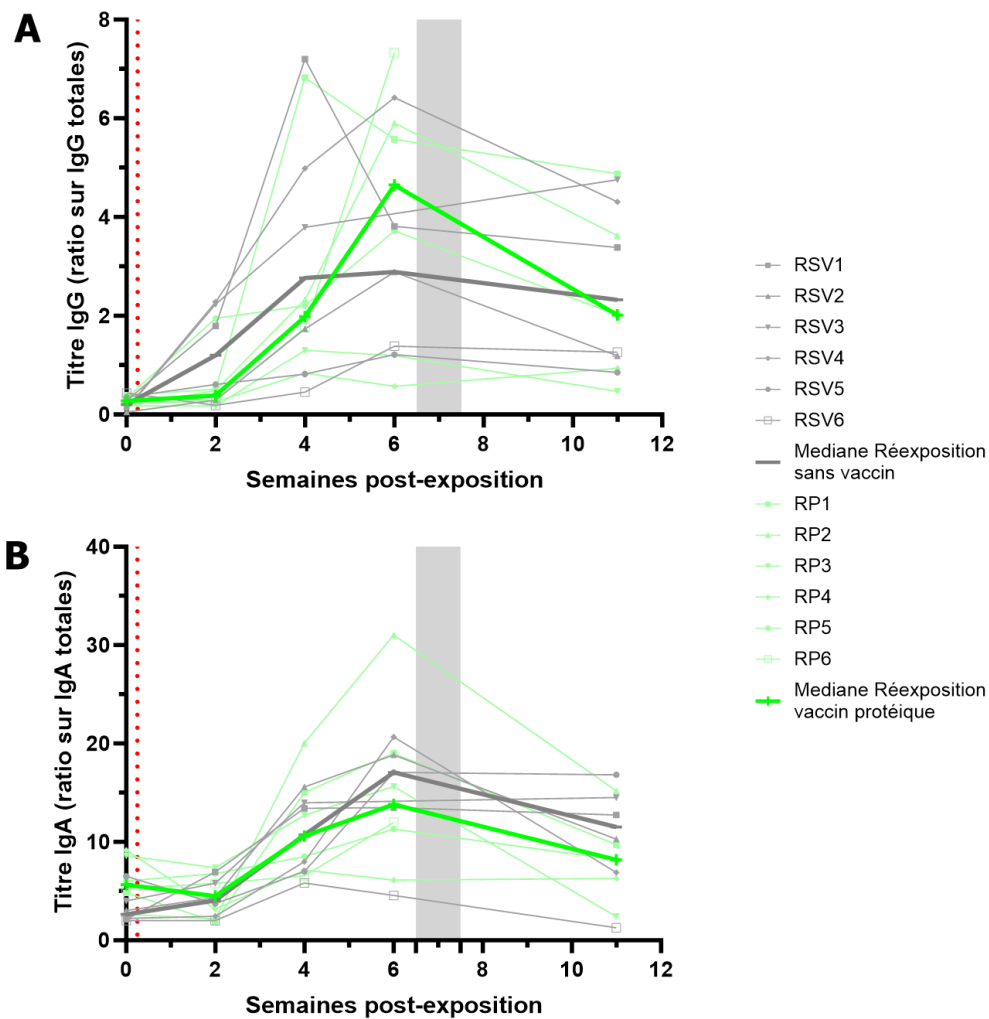


Figure 28 – Quantification des IgG (A) et IgA (B) lacrymales de la cohorte « infection aiguë ».

Les titres d'Ig sont exprimé en ratio des Ig lacrymales *C. trachomatis* spécifiques sur le total des Ig lacrymales pour supprimer l'impact du prélèvement sur la quantification. La ligne pointillée rouge représente l'exposition bactérienne oculaire, et l'intervalle gris le traitement antibiotique.

#### d) Histologie

Les analyses histologiques de la cohorte « infection aiguë » ont été réalisées sur un animal de la cohorte appartenant au groupe « réexposition sans vaccin », RSV1, sélectionné car ayant présenté des signes de fibrose conjonctivale précédant l'étude (comme mentionné ci-dessus). Seulement un des deux yeux de l'animal (œil droit) ayant été atteint de fibrose, l'objectif a été de comparer l'effet de l'exposition à *C. trachomatis* avec et sans fibrose pré-existante. Les analyses ont porté sur des coupes de biopsies de la conjonctive tarsale et bulbaire ainsi que sur des coupes de la paupière et du segment antérieur du globe oculaire (conjonctive bulbaire et cornée).

- **Analyse morphologique de la conjonctive**

En parallèle les mêmes analyses ont été réalisées sur des biopsies conjonctivales bulbaires et tarsales d'un animal contrôle enrôlé dans une autre étude et n'ayant pas été exposé à *C. trachomatis*.

La coloration HES a permis d'observer la morphologie des coupes tissulaires (Figure 29 A, C, E). La conjonctive saine a montré un épithélium sain avec de nombreuses cellules à mucus mais aussi des infiltrats de cellules immunitaire sous-épithéliales (Figure 29 A).

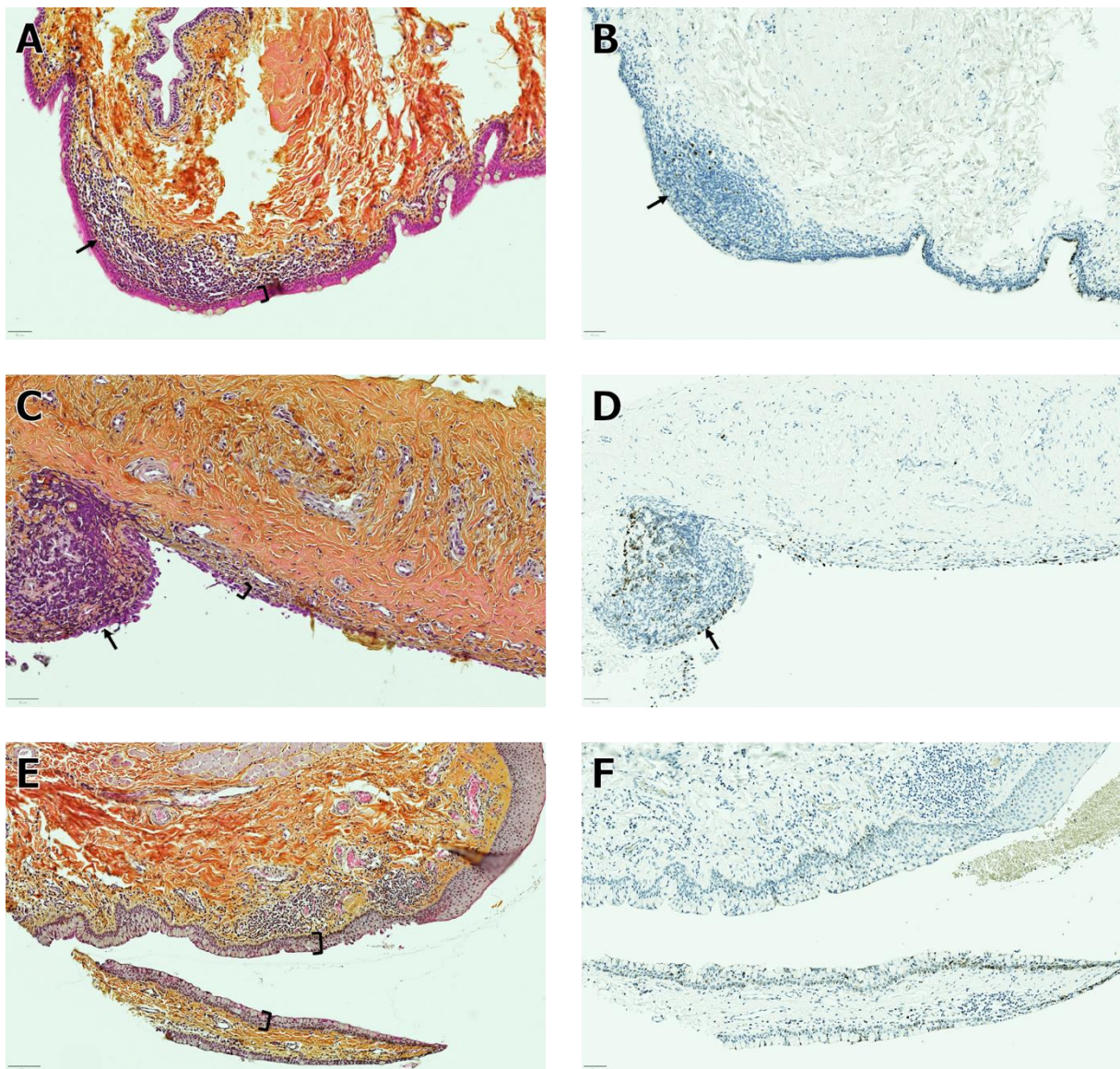


Figure 29 – Coupes tissulaires en coloration en HES (A, C, E) et avec marquage de l'antigène Ki-67 (B, D, F)

Les expériences ont été réalisées sur des biopsies de la conjonctive bulbaire d'un contrôle non-exposé (A, B), et de la conjonctive tarsale de RSV1 (C, D) ainsi que sur une coupe de la paupière de RSV1 (E, F). Les flèches désignent des follicules et les accolades désignent l'épithélium conjonctival.

La biopsie de la conjonctive tarsale de RSV1 a mis en évidence un épithélium très fin (une seule couche cellulaire) ainsi qu'un follicule faisant saillie sous l'épithélium (Figure 29 C). L'épithélium conjonctival présent sur la coupe de paupière de RSV1 n'a pas été altéré et comprenait de nombreuses cellules à mucus, mais aussi plusieurs foci de cellules immunitaires (Figure 29 E).

- **Analyse de la prolifération cellulaire**

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée avec le marquage de l'antigène Ki-67 (Figure 29 B, D, F). Le marquage de la conjonctive contrôle n'a pas montré de zones en prolifération (Figure 29 B). En revanche, le follicule présent dans la conjonctive de RSV1 a présenté plusieurs zones éparses de marquage (Figure 29 D). Enfin aucune zone de prolifération n'a été observée sur la coupe de paupière de RSV1 (réalisé plusieurs semaines après le prélèvement de la biopsie) (Figure 29 F).

- **Analyse des populations cellulaires**

L'utilisation des marqueurs CD3, CD20, CD68,  $\alpha$ -SMA, MUC5AC et calprotectine ont permis respectivement l'analyse des lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages, myo-fibroblastes, cellules à mucus, et neutrophiles (Figure 30). Les coupes analysées ont été séparées en différentes zones histologiques : épithélium conjonctival, follicule et tissu interstitiel (ce dernier n'étant étudié que dans les coupes d'organe complet).

Les lymphocytes T et B ont été majoritairement retrouvés dans les structures folliculaires. De manière inattendue, les lymphocytes ont été retrouvés en plus grande quantité dans les prélèvements conjonctivaux du contrôle. Peu de macrophages ont été détectés dans les coupes histologiques étudiées, avec la plus grande proportion détectée dans les zones folliculaires de l'OG de RSV1 (Figure 30 A).

Le marquage « *alpha-smooth actin muscle* » cible les fibres musculaires mais également les myo-fibroblastes associés aux lésions de fibrose. Le marquage  $\alpha$ -SMA a été proportionnellement celui qui a été le plus détecté, en majorité dans les follicules pour la conjonctive saine et RSV1 OD. Dans l'œil gauche de RSV1, le marquage  $\alpha$ -SMA a été plus faible dans les zones folliculaires mais a surtout été quasi absent dans le tissu interstitiel. La quantification de MUC5AC a été assez faible (inférieur à 12,5%) pour toutes les lames analysées. Enfin les neutrophiles ont été retrouvés en plus grande quantité dans la conjonctive fibrosée de RSV1 OD (avec un pic à 31%), la proportion restant assez faible pour toutes les autres conjonctives analysées (strictement inférieur à 8%).

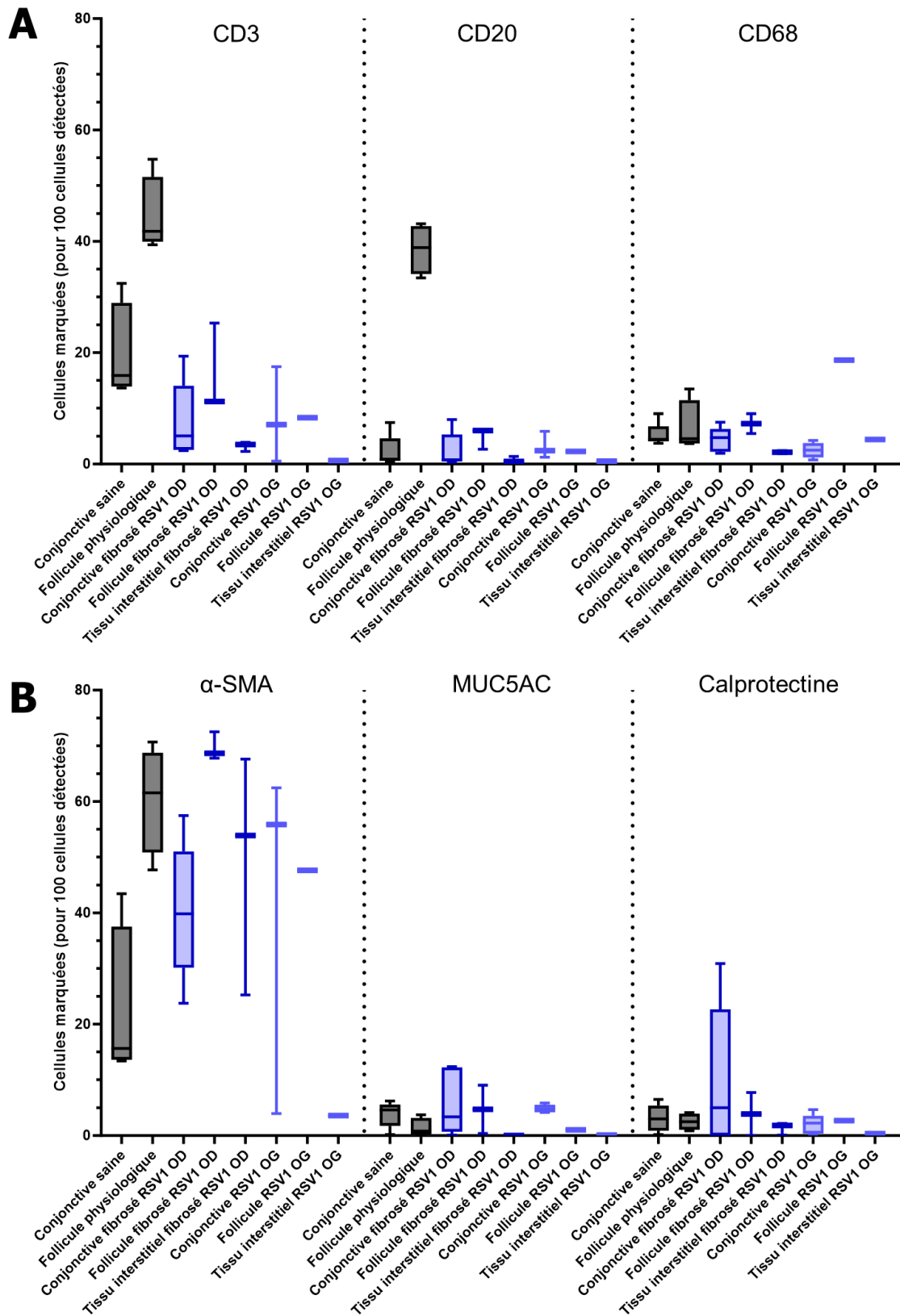


Figure 30 – Détection des cellules marquées pour les antigènes CD3 (lymphocytes T), CD20 (lymphocytes B), CD68 (macrophages)(A),  $\alpha$ -SMA (myo-fibroblaste), MUC5AC (cellule à mucus), et calprotectine (neutrophiles)(B).

OD = œil droit, et OG = œil gauche. Conjunctive désigne une zone d'épithélium conjonctival. Le nombre de cellules positives pour chaque marqueur a été normalisé pour 100 cellules. La détection a été réalisée avec le logiciel d'analyse d'image QuPath.

#### 4) Analyse de la réponse immunitaire systémique à l'exposition bactérienne

##### a) Suivi des cytokines sériques

Les analyses statistiques ont retrouvé, indifféremment pour les deux groupes, des variations significatives de sCD40L, IL-8, MIP1 $\beta$  et TGF $\alpha$  au cours du suivi (Figure 31). sCD40L a augmenté de manière constante à tous les points de mesures tandis que MIP1 $\beta$  a augmenté jusqu'à la semaine 4 puis diminué à la semaine 11. L'IL-8 a diminué dans un premier temps (semaine 4) puis augmenté à la semaine 11. Enfin TGF- $\alpha$  a atteint un pic à la semaine 4 et est ensuite resté détectable à la semaine 11.

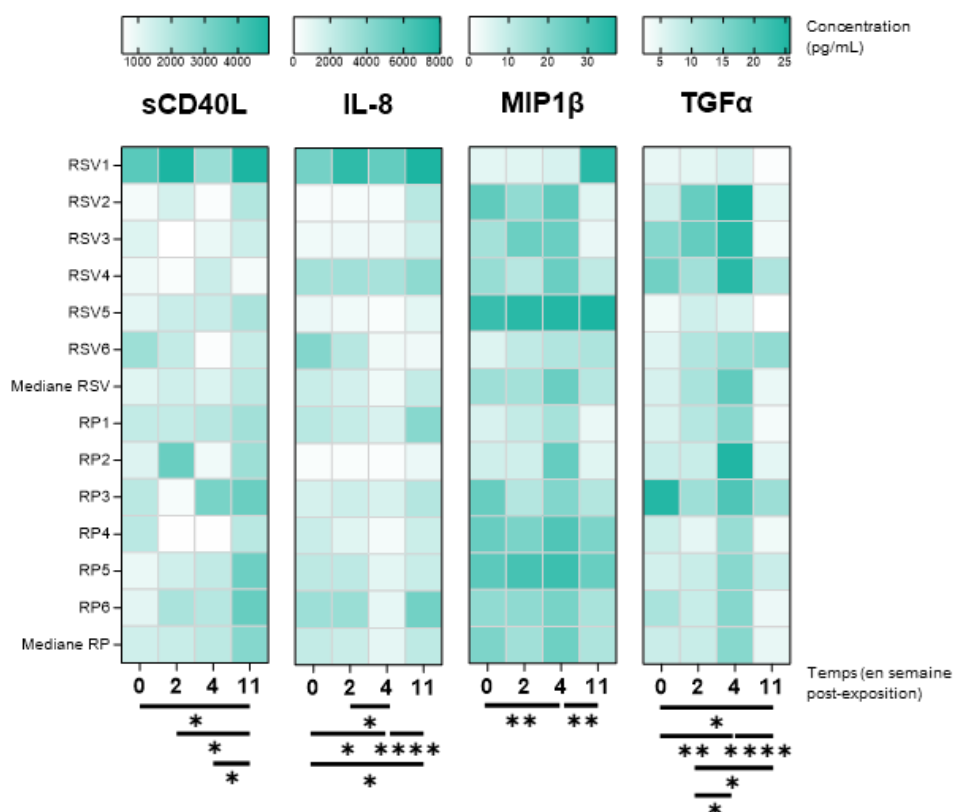


Figure 31 – Cytokines sériques ayant varié significativement au cours du suivi de la cohorte « infection aiguë ».

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Friedman avec l'ajout d'une correction par la procédure à deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli. Les résultats sont représentés avec les étoiles suivantes : \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $0,0001 < p < 0,001$ , \*\*  $0,001 < p < 0,01$ , \*  $0,01 < p < 0,1$ .

##### b) Suivi des immunoglobulines sériques

Les IgG et les IgA ont augmenté à la suite de l'exposition bactérienne (Figure 32). Les IgG ont culminé à 4 semaines après l'exposition pour le groupe « réexposition sans



vaccin » et à 6 semaines p.e. pour le groupe « réexposition vaccin protéine ». Une quantité beaucoup plus élevée d'IgG a été observé chez RSV4 (3,4 fois plus importante que la médiane de son groupe à la semaine 4). Après ce pic, le taux sérique d'IgG a diminué chez la majorité des animaux à la semaine 11 (10/12, à l'exception de RSV6 et RP1).

Les IgA sériques ont augmenté de manière plus continue au cours du suivi. En effet la médiane du groupe « réexposition sans vaccin » a atteint son pic à la semaine 11. La médiane du groupe « réexposition vaccin protéine » a atteint son pic à la semaine 6 avec une légère diminution en semaine 11 (facteur de 0,2).

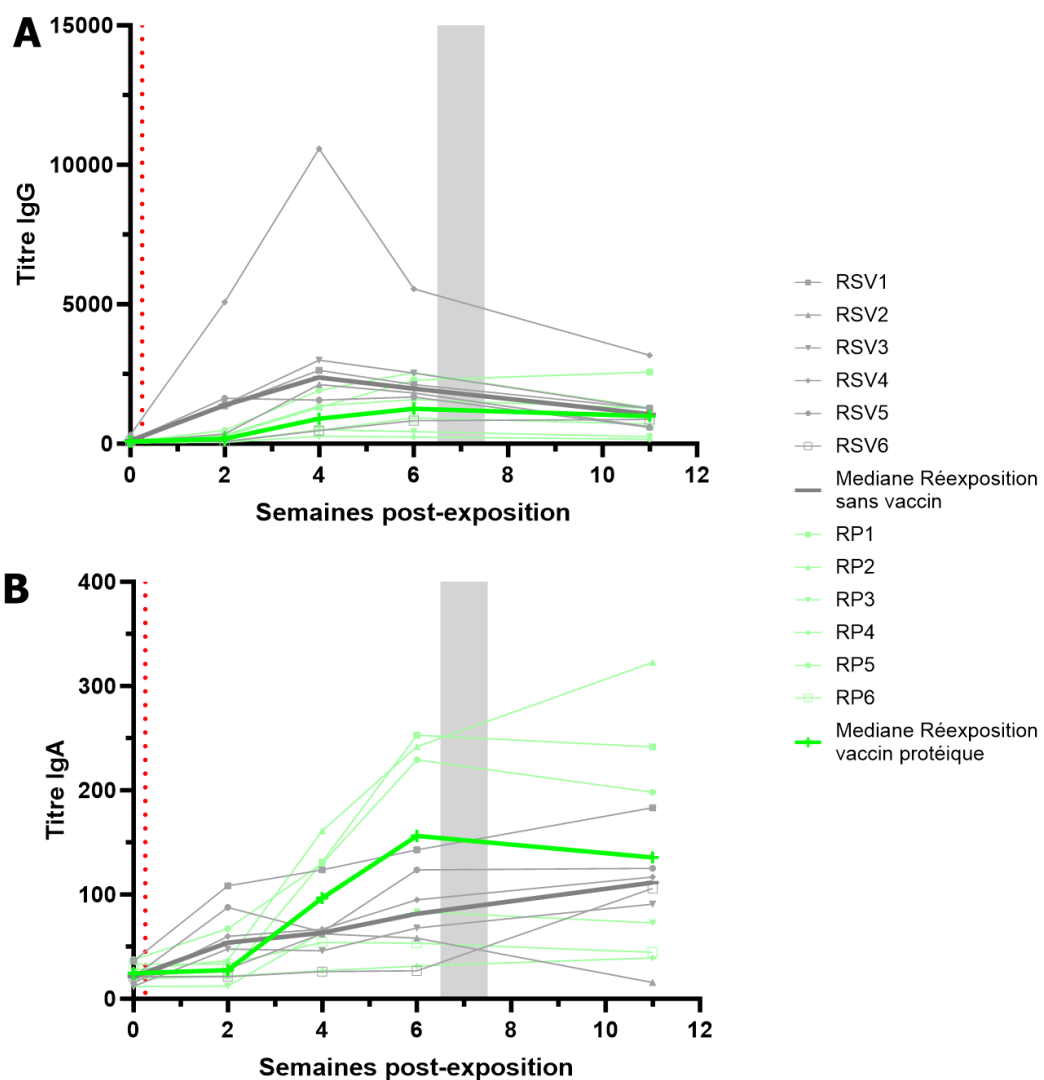


Figure 32 – Quantification des IgG et IgA dans le sérum pour la cohorte « infection aiguë ».

La ligne pointillée rouge représente l'exposition bactérienne oculaire, et l'intervalle gris le traitement antibiotique

### ***5) Mise en évidence des corrélations entre l'infection et la réponse immunitaires***

Les différents paramètres biologiques mesurés au cours de la phase de primo-exposition (semaine 0 à 11) ont été intégrés dans une matrice de corrélation (Figure 33) réalisée avec le test de corrélation non-paramétrique de Spearman.

La matrice de corrélation obtenue a révélé deux types de réponses qui sont respectivement corrélés positivement et négativement avec la quantification de la charge bactérienne.

La première réponse caractérisée par une corrélation positive avec la charge bactérienne comprend :

- Les signes cliniques, le score d'inflammation, le score de follicule et le score clinique total avec  $p < 0,0001$  pour tous ces paramètres entre eux et avec la charge bactérienne,
- Les leucocytes totaux (cellules CD45<sup>+</sup>) recueillis sur les empreintes conjonctivales, corrélés aussi bien avec la charge bactérienne qu'avec les scores cliniques ( $p < 0,0001$  pour toutes ces comparaisons),
- Les lymphocytes B ( $p = 0,048$ ),
- Les IgG lacrymales ( $p = 0,004$ ),
- Les IgG et IgA sériques ( $p = 0,0003$  et  $p = 0,034$  respectivement),
- Plusieurs cytokines lacrymales (MIP1 $\beta$ , MCP-1, IL-8, TGF $\alpha$ , et IL-1RA).

La seconde réponse, corrélée négativement avec la charge bactérienne, regroupe de multiples cytokines lacrymales qui sont toutes corrélées positivement entre elles : GM-CSF, IL-15, VEGF, IL-5, IL-4, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12/23, IL-17 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-13, and sCD40L. Ces dernières sont corrélées négativement avec la charge bactérienne, les signes cliniques, les cytokines lacrymales IL-1RA et IL-8, mais aussi dans une moindre mesure les IgG et IgA lacrymales. La corrélation positive des Ig avec la charge bactérienne et les signes cliniques suggèrent un rôle des Ig dans la réduction de la charge bactérienne et ses manifestations.

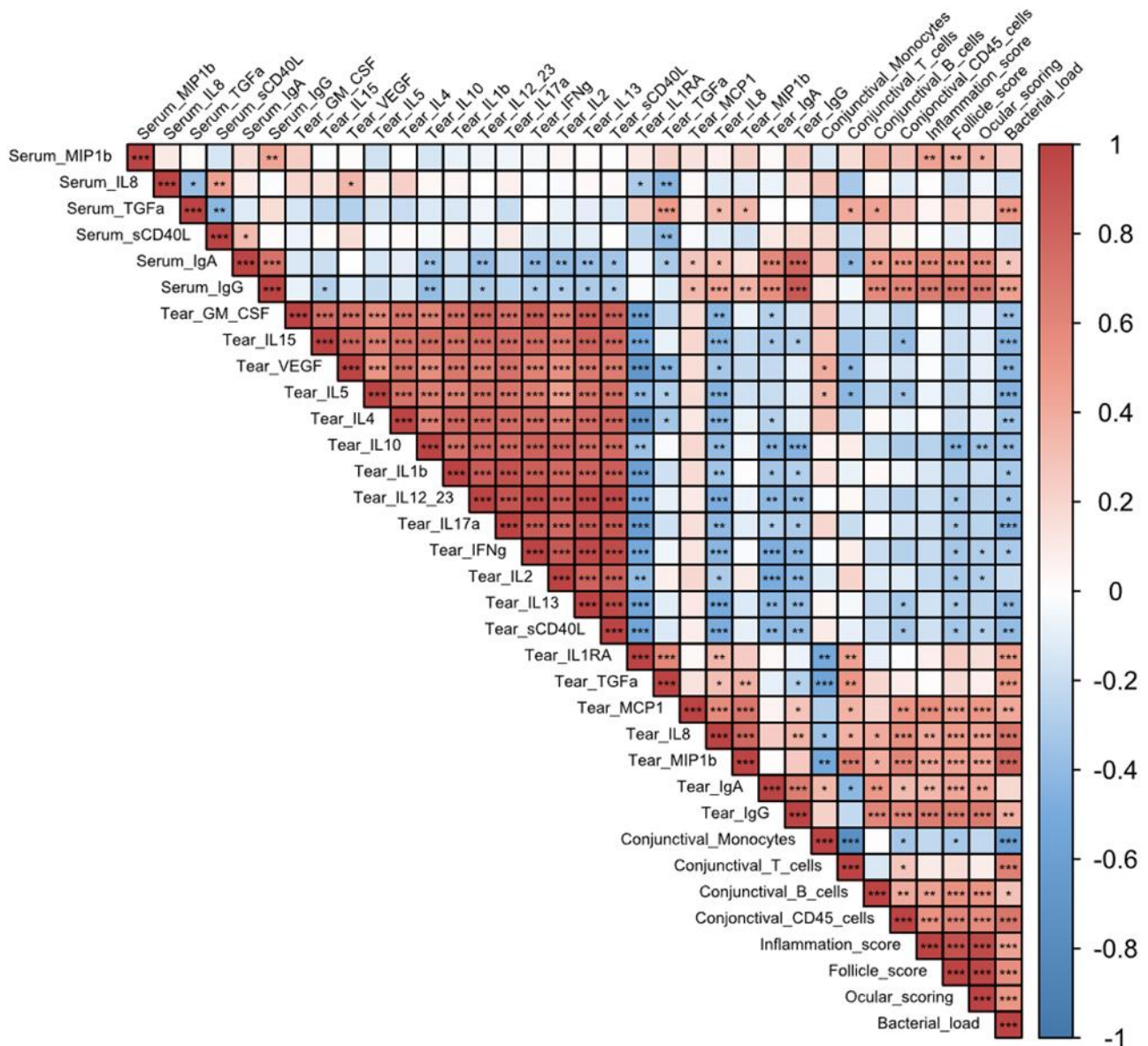


Figure 33 – Matrice de corrélation de tous les paramètres mesurés dans la phase primo-exposition de la cohorte « infection aiguë ».

La corrélation a été réalisée avec un test de corrélation non-paramétrique de Spearman avec R. La corrélation est représentée graphiquement par une échelle allant de -1 en bleu, la corrélation négative maximale, à 1 en rouge, la corrélation positive maximale. Les p-value de chaque corrélation sont représentées avec les étoiles suivantes \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$ .

## **6) Évolution du microbiote conjonctival**

L'analyse du microbiote a été réalisée sur des échantillons de fluides conjonctivaux provenant de la phase de primo-infection des groupes « réexposition sans vaccin » et « réexposition avec vaccin » ainsi que des prélèvements d'animaux infectés par le virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>.

### **a) L'exposition à un pathogène induit des modifications du microbiote dans le temps**

L'observation de l'évolution des dix assignations majoritaires a permis la visualisation des modifications de proportions chez les genres bactériens les plus abondants. Cette analyse ne comporte donc pas d'analyse statistique mais vise à donner les tendances générales de la diversité du microbiote au cours la cinétique.

- **Exposition à *C. trachomatis***

*C. trachomatis* a bien été mis en évidence au premier prélèvement (2 semaines après l'exposition), sa proportion a augmenté à la semaine 4, témoignant de la prolifération bactérienne puis diminué à la semaine 6. La bactérie est ensuite absente des deux derniers points de prélèvements (semaines 9 et 11). Les résultats des prélèvements des semaines 9 et 11 ont été modifiés par l'effet du traitement antibiotique (azithromycine) administré à la semaine 7. Notamment l'augmentation de la proportion de *Blautia* pourrait être attribués au traitement antibiotique (Figure 34 A), mais cette évolution des proportions ne se traduit pas par une différence significative de l'abondance relative (voir ci-dessous en page 129).

- **Exposition à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>**

Pour l'étude de l'exposition au virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, les animaux ont tout d'abord été prélevés 4 fois en amont de l'exposition pour obtenir un point de référence robuste. L'infection virale systémique s'accompagne de modifications du microbiote conjonctival, avec notamment une augmentation de la proportion du genre *Staphylococcus* aux jours 4, 7 et 14 p.e. Comparativement au prélèvement de référence, la proportion du genre *Alloprevotella* a augmenté à tous les points du suivi. A l'inverse, la proportion du genre *Moraxella* a, elle, diminuée tout au long de la cinétique.

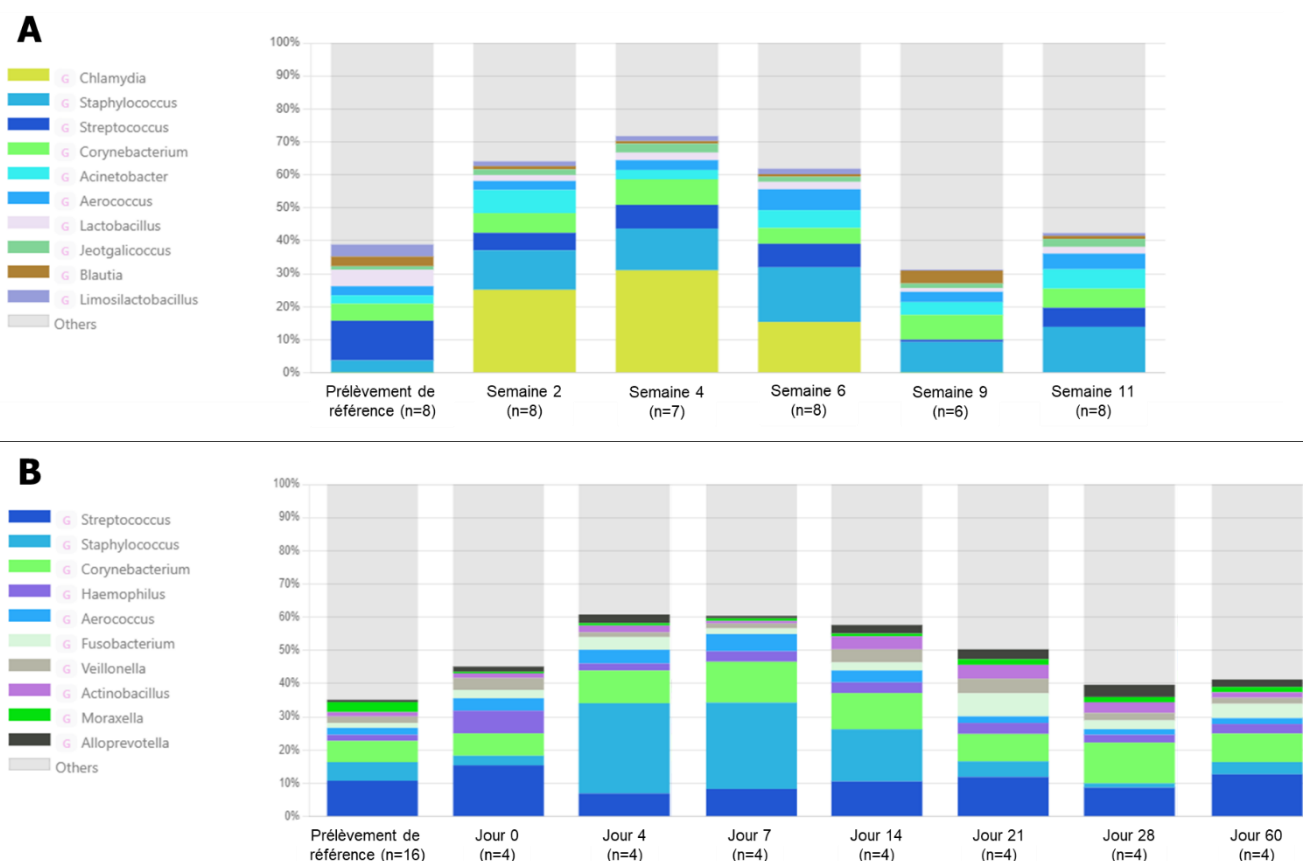


Figure 34 – Évolution dans le temps du microbiote oculaire. Résultats pour les 10 assignments les plus fréquentes lors d’une infection à *C. trachomatis* (A) et d’une infection à *H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>* (B) réalisé à l’aide du logiciel MicrobiomeLifepipe® développé par Life&Soft. Les bactéries sont désignées par leur genre.

**b) Influence des expositions pathogènes sur l’abondance relative des genres bactériens**

L’analyse statistique présentée ci-dessous a été réalisée en comparant tous les prélèvements réalisés avant l’exposition à un pathogène (quel que soit l’étude) avec tous les prélèvements réalisés après l’exposition à un pathogène défini. Cette analyse a mis en évidence des différences entre les abondances relatives. Pour rappel, les abondances relatives correspondent à la normalisation par échantillon des abondances qui elles-mêmes désignent le nombre de séquences par unité taxonomique (en l’occurrence : genre bactérien).

- **Exposition à *C. trachomatis***

L'analyse statistique a montré, dans le cas de l'exposition à *C. trachomatis*, 29 genres avec une abondance statistiquement plus élevée dans les prélèvements après exposition bactérienne, et 3 genres avec une abondance statistiquement plus élevée dans les prélèvements de références. Parmi ces dernières, deux ont été de la classe des *Clostridia* (phylum des Firmicutes) qui ont donc été en abondance plus faible après l'exposition bactérienne tout comme le genre des *Treponema* (classe des *Sprochaetia*).

Les 29 genres bactériens statistiquement plus abondants après exposition à la bactérie ont été répartis entre les phyla (Figure 35 A) :

- **Firmicutes** (13/29), le phylum avec le plus de genres affectés, notamment *Enterococcus*, *Lactococcus*, mais aussi 4 genres appartenant à la famille des *Aerococcaceae*, 2 genres appartenant à la classe des *Clostridia*, 2 genres appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*, et les 4 genres restants appartenant à la classe des *Bacilli*,
- **Proteobacteria** (11/29), avec le genre des *Paracoccus* (classe des *Alphaproteobacteria*), les 10 autres genres appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria* avec plus précisément les genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Oligella*, 2 genres de la famille des *Pasteurellaceae* ou encore *Eikenella* (famille des *Neisseriaceae*),
- **Actinobacteriota** (2/29), avec *Corynebacterium* et *Paeniglutamicibacter* (famille des *Micrococcaceae*),
- *Bacteroidota* (2/29), avec majoritairement une apparition de la famille **Flavobacteriaceae** (bactéries de l'environnement avec ici le genre *Myroides*, avec un important « *log2 fold change* » de - 6,8) et en quantité beaucoup plus faible la famille des *Porphyromonadaceae*,
- *Verrucomicrobiota* (1/29), le seul genre de ce phylum à avoir une abondance modifiée est **Chlamydia**, c'est de plus la modification la plus élevée avec un *log2* de fold change de -12,3, avec de plus la p-value la plus élevée à  $4,78 \times 10^{-17}$ .

- **Exposition à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>**

La même analyse statistique a été réalisée pour étudier l'effet de l'exposition au virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> et a montré 22 genres plus abondants dans les prélèvements de références (donc diminué après l'exposition) et 24 genres plus abondants dans les prélèvements après l'exposition virale. Les phyla affectées par des modifications d'abondances à la suite de l'exposition ont été (Figure 35 B) :

- **Firmicutes** (26/46), avec trois classes *Clostridia* (14/26) *Bacilli* (10/26) et *Negativicutes* (2/26) identifiées
  - La classe des *Negativicutes* (avec les genres *Centipeda* et *Veillonella*) ont une abondance augmentée par l'exposition.
  - Parmi les genres de la classe des *Bacilli* l'abondance de 6 d'entre eux est augmentée (dont *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Jeotgalibaca* et 3 genres de la famille des *Aerococcaceae*) et l'abondance des 4 genres restant est diminués (dont *Lactobacillus*, un genre non-identifié de la famille des *Aerococcaceae* et deux de la famille des *Planococcaceae*).
  - Enfin pour la classe des *Clostridia*, 11 des 14 genres ont une abondance diminuée (dont 5 genres de la famille des *Oscillospirales*). Les 3 genres dont l'abondance a augmenté sont *Catonella* (famille des *Lachnospirales*) et deux genres de la famille des *Peptostreptococcales-Tissierellales* (*Murdochiella* et *Parvimonas*),
- **Proteobacteria** (9/46), avec seulement une *Alphaproteobacteria* (genre *Brevundimonas*) dont l'abondance est augmentée, les 8 autres genres appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria*. Parmi ces 8 genres, 4 genres sont plus abondant (*Erwinia*, *Moraxella*, *Lonepinella* et *Haemophilus*) et 4 genres sont moins abondant (*Psychrobacter*, *Thiopseudomonas*, *Oligella*, et *Aliidiomarina*),
- **Actinobacteriota** (6/46), dont 2 sont diminués (*Coriobacteriaceae* UGC-003 et *Brachybacterium*), et 4 sont augmentés. Parmi ces dernières se trouve le genre *Rothia* (famille des *Micrococcaceae*), le genre des *Corynebacterium* ainsi que 2 genres faisant partis de la famille des *Actinomyceteaceae* (*Actinomyces* et *Mobiluncus*),
- **Patescibacteria** (2/46), les deux genres (appartenant aux classes *Saccharimonadia* et *Gracilibacteria*) sont tous les deux augmentés,
- **Bacteroidota** (2/46), dont le genre *Alloprevotella* est augmenté et le genre *Empedobacter* est diminués,
- **Fusobacteriota** (1/46), avec une augmentation de l'abondance du genre ***Fusobacterium***.

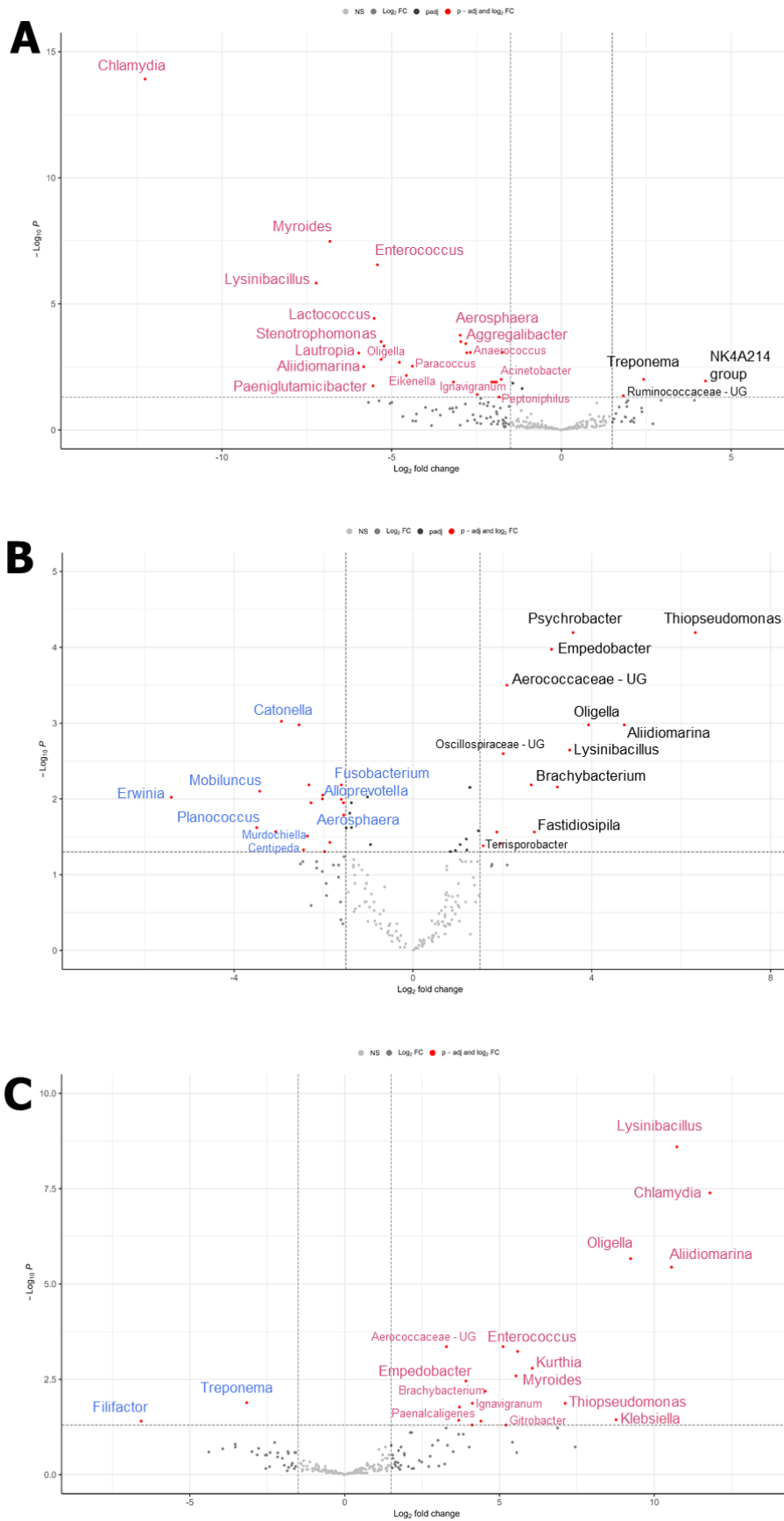


Figure 35 – Analyse statistique des abondances relatives des genres bactériens.



L'analyse compare l'infection à *Chlamydia* (représentées en rouge), l'infection à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (en bleu) et les prélèvements de référence des animaux (noir). Les dénominations de genre se terminant par « - UG » (pour « Unknown genus ») désigne les séquences pour lesquels la famille a été identifiée mais pas le genre et sont donc référés par la dénomination de la famille accompagnée de UG. L'analyse statistique a été réalisée avec un test DESeq2 et un seuil de significativité de 0,05.

- **Exposition bactérienne vs. exposition virale**

Enfin l'analyse statistique des microbiotes oculaires d'animaux exposés à *C. trachomatis* en comparaison des animaux exposés à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> a retrouvé des variations d'abondance pour 21 genres : 2 genres étaient plus abondants après l'infection systémique par H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, et 19 ont été plus abondants après l'exposition conjonctivale à *C. trachomatis* (Figure 35 C).

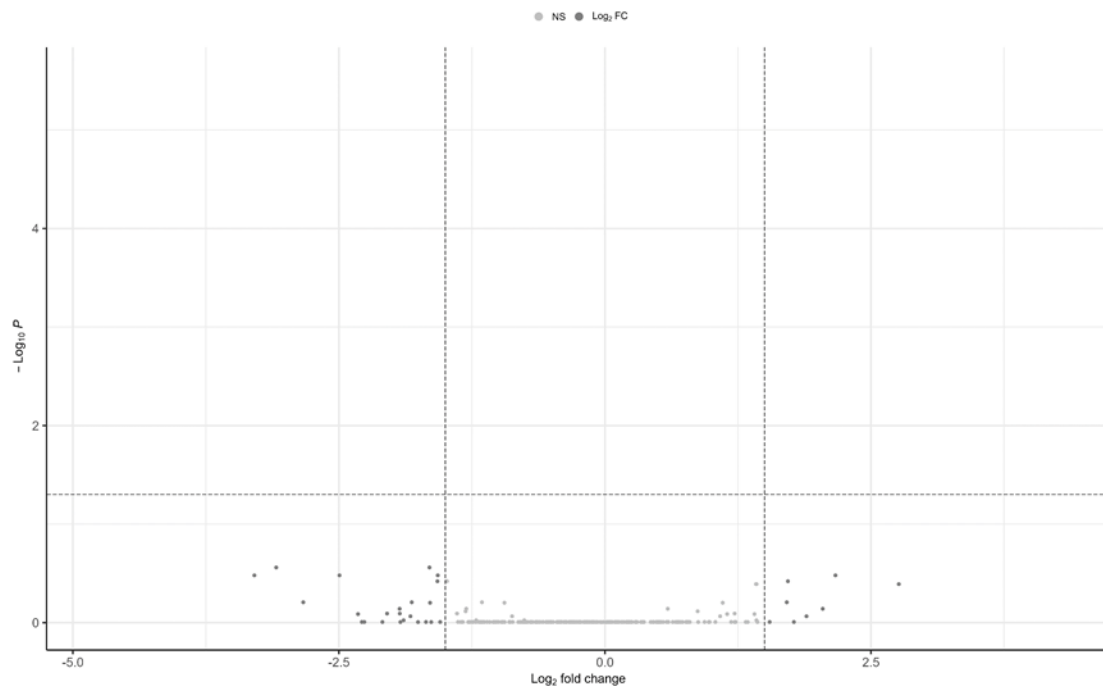
Les deux genres plus abondants chez les animaux exposés à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> sont *Treponema* (phylum des *Spirochaetota*) et *Filifactor* (phylum des *Firmicutes* et classe des *Clostridia*).

Les genres dont l'abondance relative a été augmentée dans le groupe des animaux exposés à *C. trachomatis* appartiennent aux phyla suivants :

- **Proteobacteria** (8/19), dont 100% de genres appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, avec *Oligella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Thiopseudomonas*, *Aliidiomarina*, *Psychrobacter*, *Paenalcalinenes* et *Stenotrophomonas*,
- **Firmicutes** (7/19), dont 100% de genres appartenant à la classe des *Bacilli*, avec *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, 2 genres de la famille des *Aerococcaceae*, et 2 genres de la famille des *Planococcaceae*,
- **Bacteroidota** (2/19), avec les genres *Myroides* (famille des *Flavobacteriaceae*) et *Empedobacter*,
- **Actinobacteriota** (1/19), avec le genre des *Brachybacterium* (phylum des *Actinobacteriota*),
- *Verrucomicrobiota* (1/19), avec le genre ***Chlamydia*** qui reste celui dont l'abondance est la plus augmentée.

### **c) Influence des empreintes conjonctivales sur l'abondance relative des genres bactériens**

Une analyse statistique a aussi été réalisée afin d'étudier l'effet des empreintes conjonctivales sur le microbiote conjonctival (Figure 36).



*Figure 36 – Analyse statistique des abondances relatives entre les animaux ayant subis ou non des empreintes conjonctivales.*

*L'analyse statistique a été réalisée avec un test DESeq2 et un seuil de significativité de 0,05.*

L'étude des animaux ayant reçu des empreintes conjonctivales par rapport à ceux n'en ayant pas reçu n'a pas retrouvé de différence d'abondance de genre statistiquement significative entre les deux groupes, confirmant l'absence d'impact des empreintes conjonctivales sur le microbiote conjonctival.

### **d) Influence du traitement antibiotique sur l'abondance relative des genres bactériens**

Enfin, l'effet du traitement antibiotique à l'azithromycine a été étudié en comparant les prélèvements de références des animaux de l'étude *Chlamydia* (n=8), aux prélèvements effectués sur les mêmes animaux aux deux temps de prélèvement réalisés après le traitement antibiotique (n=16) (Figure 37).

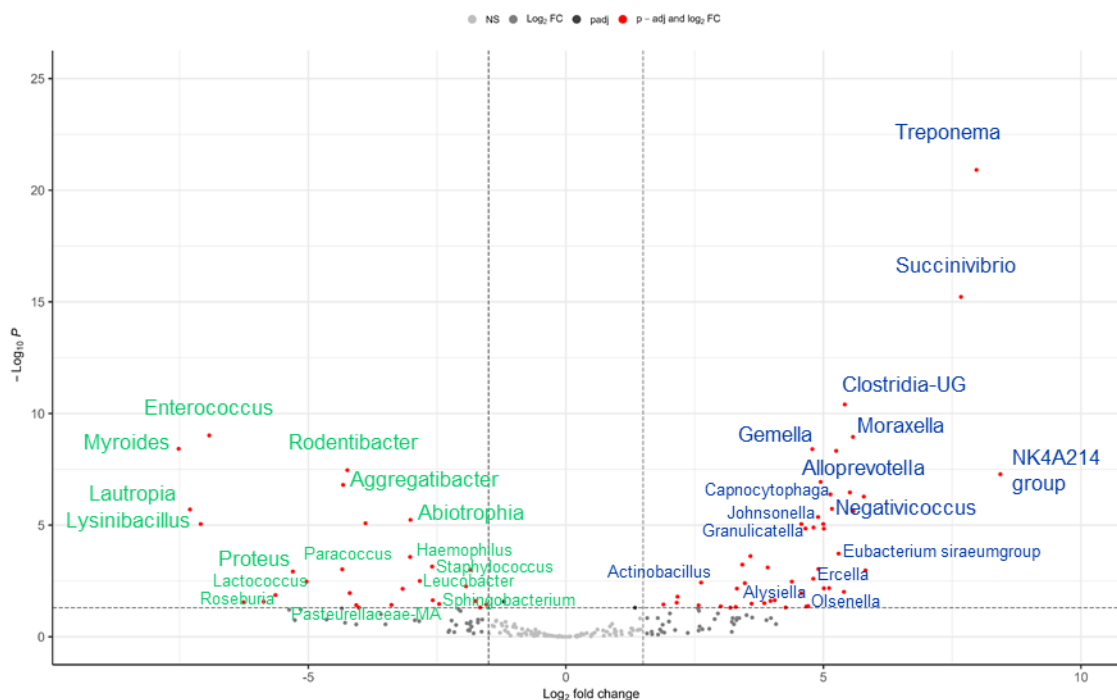


Figure 37 – Analyse statistique des abondances relatives du traitement antibiotique. Les points verts sont les genres plus abondants après le traitement antibiotique et les points bleus foncés sont les genres plus abondants au prélèvement de référence. L'analyse statistique a été réalisée avec un test DESeq2 et un seuil de significativité de 0,05.

Les résultats ont montré 79 genres différentiellement abondants avec 49 étant plus abondants dans les prélèvements de référence et 30 genres plus abondants une fois le traitement antibiotique réalisé. Les différents phyla affectés ont été :

- **Firmicutes** (42/79), dont les genres sont répartis comme suit :
  - 27 genres plus abondants dans les prélèvements de référence, avec 3 genres de la classe des *Bacilli* (dont *Gemella* et *Kurthia*), 7 genres de la classe des *Negativicutes* (dont *Acidaminococcus*, 3 genres de la famille des *Veillonellaceae* et 3 genres de la famille des *Selenomonadaceae* dont *Anaerovibrio*), et 17 genres de la classe des *Clostridia* (dont *Sarcina*, *Peptococcus*, *Ercella* et *Flavonifractor*),
  - 15 genres plus abondants après traitement antibiotique, avec 4 de la classe des *Clostridia* (les genres *Anaerococcus*, *Roseburia*, *Fingoldia* et *Ezakiella*) et 11 de la classe des *Bacilli* (dont les genres *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, 4 genres de la famille des *Aerococcaceae* et 2 genres de la famille des *Planococcaceae*),

- **Proteobacteria** (17/79), répartis avec :
  - 7 genres plus abondants dans les prélèvements de référence, partagé entre 1 genre inconnu de la classe des *Alphaproteobacteria*, et 6 genres de la classe des *Gammaproteobacteria* dont *Succinivibrio*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Actinobacillus*, *Alysiella* et *Sutterella*,
  - 10 genres plus abondants après traitement antibiotiques, partagé entre 1 genre de la classe des *Alphaproteobacteria* (*Paracoccus*), et 9 genres de la classe des *Gammaproteobacteria* dont 3 genre de la famille des *Pasteurellaceae*, *Lautropia*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Providencia*, *Neisseria* et *Haemophilus*,
- **Bacteroidota** (10/79), répartis avec 7 genres plus abondants dans les prélèvements de référence (dont *Alloprevotella*, *Lentimicrobium*), et 3 genres plus abondants après traitement antibiotique (*Prevotella*, *Sphingobacterium*, et *Myroides*),
- **Actinobacteriota** (6/79), répartis avec 4 plus abondants dans les prélèvements de référence (3 genres de la famille *Atopobiaceae* et le genre *Glutamicibacter*) et 2 genres plus abondants après traitement antibiotique (*Corynebacterium* et *Leucobacter*),
- **Verrucomicrobiota** (3/79), dont les trois genres sont uniquement présents dans les prélèvements de référence,
- **Spirochaetota** (1/79), seulement présent dans le prélèvement de référence avec le genre *Treponema*.

Les différences d'abondances ont suggéré que le traitement antibiotique n'a pas été accompagné pas d'un retour au microbiote initial.

## II/ Cinétique de l'infection et de la réponse immunitaire au cours de l'infection chronique

La cohorte « Infection chronique » comportait 3 groupes : « non-exposé » (n=2), « expositions itératives » (n=3), et « exposition unique » (n=2) (Figure 19). Le plan expérimental a consisté en une première phase de 11 semaines d'expositions itératives hebdomadaires à la bactérie pour le groupe « expositions itératives » et d'instillation de tampon SPG pour le groupe contrôle « non-exposé ». Ce dernier avait pour objectif d'étudier l'impact des manipulations oculaires hebdomadaires seules sans expositions bactériennes associées.

La seconde phase a consisté en une réexposition unique tardive des animaux du groupe « expositions itératives » 50 semaines après leur première exposition bactérienne. Une exposition unique a été réalisée sur 2 animaux naïfs (groupe « exposition unique ») de façon simultanée.

### 1) Evolution de la charge bactérienne

Les charges bactériennes ont été évaluées par qPCR réalisées sur écouvillons conjonctivaux. Les résultats nuls du groupe « non-exposé » ont confirmé la spécificité de la technique de PCR (Figure 38).

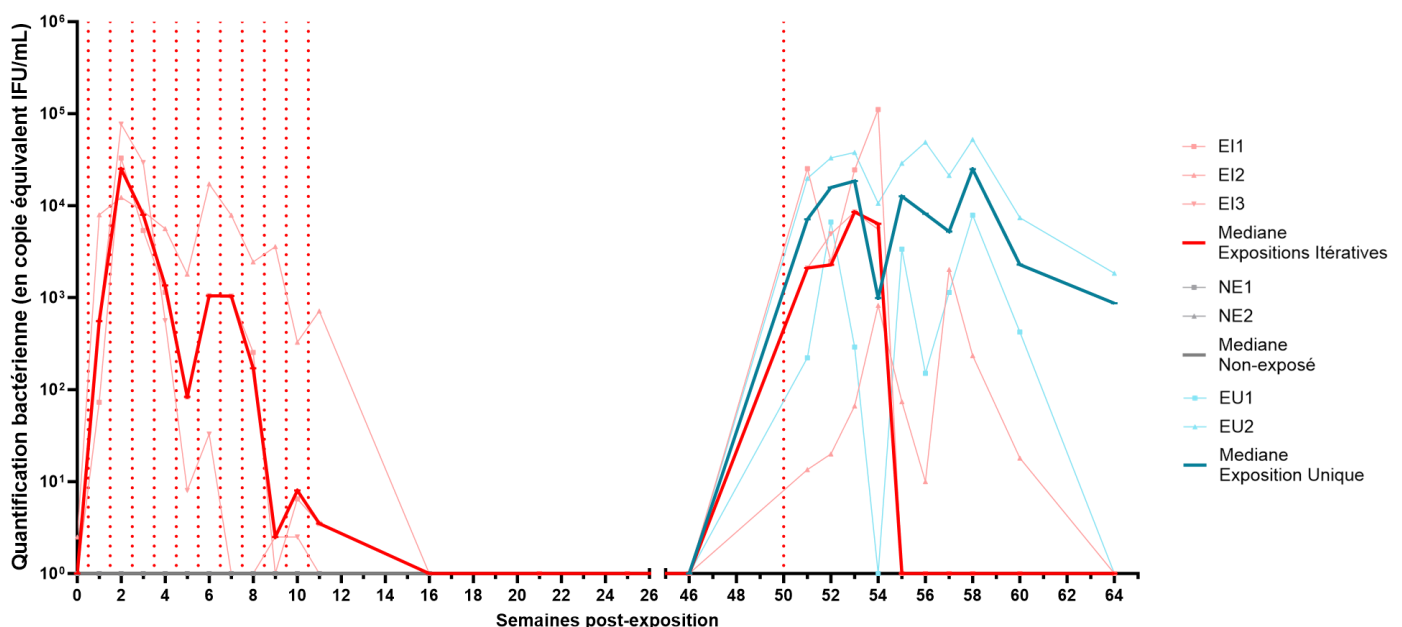


Figure 38 – Cinétique de la quantification bactérienne de la cohorte « infection chronique ».

Les lignes pointillées rouges représentent les expositions bactériennes oculaires.

### ***a) Cinétique de la charge bactérienne aux cours des expositions itératives***

Les qPCR de tous les animaux du groupe « expositions itératives » ont été positives à la suite de la première exposition. Le pic de charge bactérienne a été atteint après 2 expositions. La charge bactérienne médiane a ensuite décru malgré les réexpositions, avec une ré-ascension relative après 6 et 10 expositions. La charge bactérienne a été nulle dès la 11<sup>ème</sup> semaine pour un animal (EI3), et au prélèvement de la semaine 16 pour les 2 autres animaux.

### ***b) Cinétique de la charge bactérienne pendant la phase de réexposition***

Dans le groupe « expositions itératives » *C. trachomatis* a été détecté dans la semaine suivant la réexposition tardive (semaine 51). La charge bactérienne a culminé 3 semaines après cette dernière (Figure 38).

Pour le groupe « exposition unique », *C. trachomatis* a également été détecté dans la semaine suivant l'exposition, avec une charge bactérienne comparable, mais qui a semblé persister plus tardivement, avec un niveau à la semaine 8 encore équivalent à celui de la semaine 3 (Figure 38).

La charge bactérienne a donc été augmentée par l'exposition bactérienne initiale, mais cette augmentation n'a pas été maintenue par les expositions itératives. La réexposition a aussi augmenté la charge bactérienne avec une quantification toujours positive en fin de suivi pour un animal du groupe « non-exposé ».

## 2) Observations cliniques

### a) Apparition des signes cliniques avec les manipulations oculaires hebdomadaires

- **Sans exposition bactérienne**

Malgré l'absence de bactéries détectable en qPCR, le groupe « non-exposé » a développé des signes cliniques, certes modérés, avec des scores cliniques totaux inférieurs à 2 (Figure 39). Ces scores ont très majoritairement été liés à la composante « inflammation » du scoring, avec des scores de follicules maximaux de 1 (dans 13% des yeux observés, mais jamais sur les deux yeux du même animal). Ces signes cliniques pourraient être secondaires à l'inflammation causée par le traumatisme mécanique causé par les manipulations oculaires hebdomadaires.

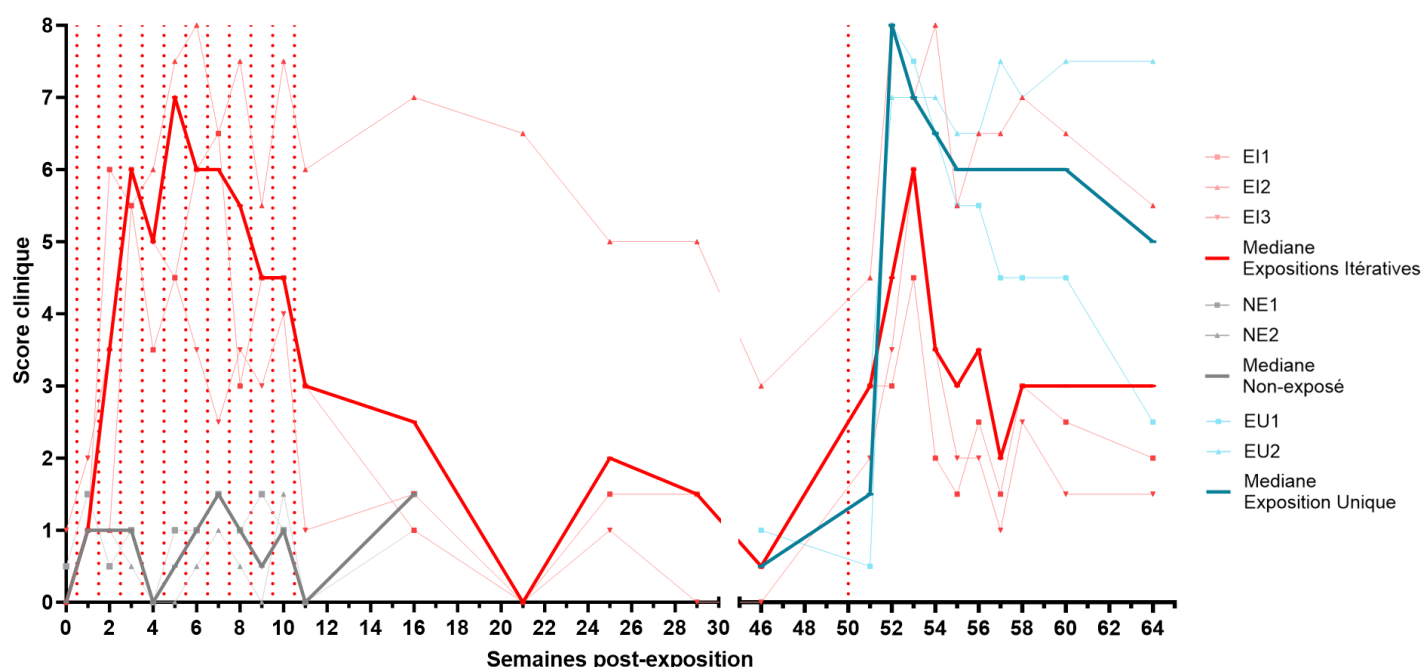


Figure 39 – Cinétique du score clinique de la cohorte « infection chronique ». Les lignes pointillées rouge représentent les expositions bactériennes oculaires.

- **Avec expositions itératives à *C. trachomatis***

Dans le groupe « expositions itératives », les signes cliniques sont apparus dès la 1<sup>ère</sup> semaine chez tous les animaux, avec un score qui a culminé après 5 expositions (score médian de 7). Le score clinique a ensuite diminué pour finalement revenir à un score nul (équivalent à celui obtenu avant la 1<sup>ère</sup> exposition) à la semaine 21, soit 10 semaines après la fin des réexpositions. Toutefois, un animal (EI2) a présenté un profil de guérison beaucoup plus lent, avec un score clinique minimal de 3, atteint seulement à la semaine 46, soit 35 semaines après la fin des expositions itératives.

### ***b) Evolution des signes cliniques pendant la phase de réexposition***

Lors de la cotation de référence avant la réexposition (semaine 46), les animaux EI1 et EI3 ont obtenu respectivement des scores cliniques totaux de 0,5 et 0, tandis, que comme vu précédemment, EI2 avait encore un score de 3. La réexposition (à la semaine 50 soit 39 semaines après la dernière exposition itérative) a entraîné une augmentation du score qui a culminé plus rapidement que lors de la première phase (3 semaines après la réexposition, score de 6). Le score le plus élevé (8) a été atteint 2 à 4 semaines après l'exposition par EI2. Lors du dernier point de suivi, 14 semaines après la réexposition (semaine 64 au total), aucun des animaux n'est revenu à un score nul avec une médiane du groupe de 3 et un score maximal de 5,5 pour EI2.

Les animaux du groupe contrôle « exposition unique » ont eu un score clinique total préexposition de 0,5 et 1. Le score a culminé à 7 et 8 (respectivement pour EU1 et EU2) dès la 2<sup>ème</sup> semaine p.e.. Les deux animaux de ce groupe ont eu des profils cliniques très différents :

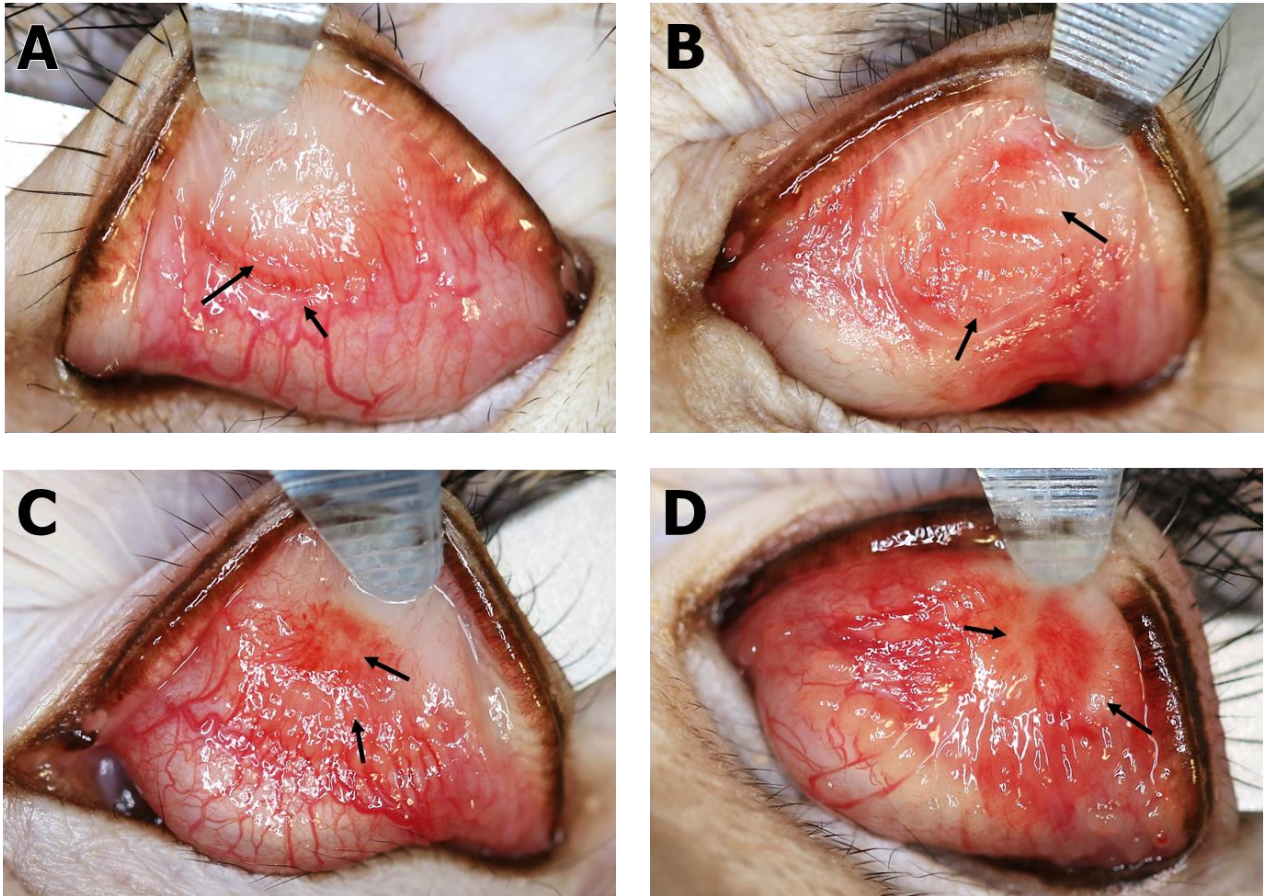
- Le score d'EU1 a diminué progressivement pour atteindre un score de 2,5 en fin du suivi (14 semaines p.e.),
- Le score d'EU2 est resté élevé pendant tout le suivi, avec un score de 7,5 à la fin du suivi.

### ***c) Apparition de signes de fibrose conjonctivale***

L'analyse des photos cliniques a permis d'observer des signes de fibrose conjonctivale chez 2 des 3 animaux de la cohorte « infection chronique ». En effet, les animaux EI2 et dans une moindre mesure EI1 (groupe « expositions itératives », Figure 40 A et B) mais aussi EU1 et EU2 (groupe « exposition unique », Figure 40 C et D) ont développé des lésions de fibrose conjonctivale.

Pour le groupe « expositions itératives », les signes de fibrose ont été observés chez EI2 dès la semaine 4 post-réexposition tardive ainsi que chez EI1 à partir de la semaine 5 post-réexposition tardive.





*Figure 40 – Photos cliniques de la cohorte « infection chronique » en fin de suivi  
 Les photos ont été prises à la semaine 10 post-réexposition tardive (semaine 60 post-  
 primo-exposition), pour EI1 œil droit (A), EI2 œil gauche (B), EU1 œil gauche (C) et  
 EU2 œil gauche (D). Les flèches noires montrent les zones de fibrose conjonctivale.*

De manière inattendue, des signes de fibrose conjonctivale intense ont aussi été observés dans le groupe « exposition unique » dès la semaine 2 p.e. pour EU2 et la semaine 3 p.e. pour EU1. Ces signes cliniques sévères ont été accompagnés de la formation d'une pseudo-membrane pour EU2, qui s'est spontanément décrochée et a pu être récupéré à la semaine 2 p.e. et a ensuite été inclus en paraffine pour analyse histologique.

En résumé, des signes cliniques d'inflammation conjonctivale (minime) ont été observés en l'absence d'exposition bactérienne. Les groupes exposés à la bactérie ont, eux, développé des signes cliniques sévères. Les expositions itératives ont conféré une protection partielle puisqu'une diminution des signes cliniques a été observée alors même que les expositions itératives étaient encore en cours. Enfin dans cette cohorte, le développement de signes de fibrose conjonctivale a été observé à la fois chez les animaux soumis à des expositions itératives mais également suite à une exposition unique à *C. trachomatis*.

### **3) Caractérisation de la réponse immunitaire locale**

#### **a) Evolution des populations immunitaires majeures**

- **Suivi du groupe « non-exposé »**

Pour le groupe « non-exposé », la quantité normalisée de leucocytes (cellules CD45<sup>+</sup>) recueillis sur les empreintes conjonctivales a augmenté au cours du suivi, et culminé à la semaine 10, avec une multiplication par 7,1 par rapport au prélèvement de référence (321 leucocytes à la semaine 0, versus 2 281 leucocytes pour 50 000 cellules enregistrées à la semaine 10).

Au prélèvement de référence, les neutrophiles ont été majoritaires (25% de l'infiltrat immunitaire), suivi par les monocytes (13%) puis les lymphocytes T (11%). Les monocytes sont devenus majoritaires (24%) après la première exposition, et le sont resté au cours de l'ensemble du suivi de ce groupe. Les monocytes ont représenté plus de 50% des populations immunitaires détectées aux semaines 5 (54%), 8 (53%), 9 (53%), et 10 (57%). La proportion de neutrophiles a fluctué au cours du suivi entre 2% (aux semaines 4, 6 et 9) et 6% (à la semaine 8) (Figure 41 A).

- **Suivi du groupe « expositions itératives »**

##### *Phase d'expositions itératives*

La quantité de leucocytes du groupe « expositions itératives » a doublé dès la première exposition puis a été multipliée par 2,7 entre la seconde et la troisième. La quantité s'est stabilisé autour de 1 200 leucocytes pour 50 000 cellules entre les semaines 2 et 8, variant de 1 100 leucocytes après la 2<sup>ème</sup> exposition à 1 770 leucocytes après la 8<sup>ème</sup>. Le nombre médian de leucocytes est resté globalement assez stable au cours de la suite du suivi.

L'infiltrat immunitaire du prélèvement de référence a majoritairement été composé de leucocytes de nature indéterminée, avec par ailleurs 6% de lymphocytes T et 1% de monocytes. Les deux premières expositions bactériennes ont été suivies d'une augmentation de la proportion de monocytes atteignant respectivement 17% et 13% après la première et la deuxième exposition. Les monocytes sont restés détectables pendant toute la durée du suivi (4% au plus bas à la semaine 21) avec une augmentation de leur proportion aux semaines 25 (32%) et 29 (29%).

Une population de lymphocytes B a été détectée après la deuxième exposition, (7% des leucocytes), qui est ensuite restée présente jusqu'à la semaine 10 avec un pic de de lymphocytes B à la semaine 8 (9%).

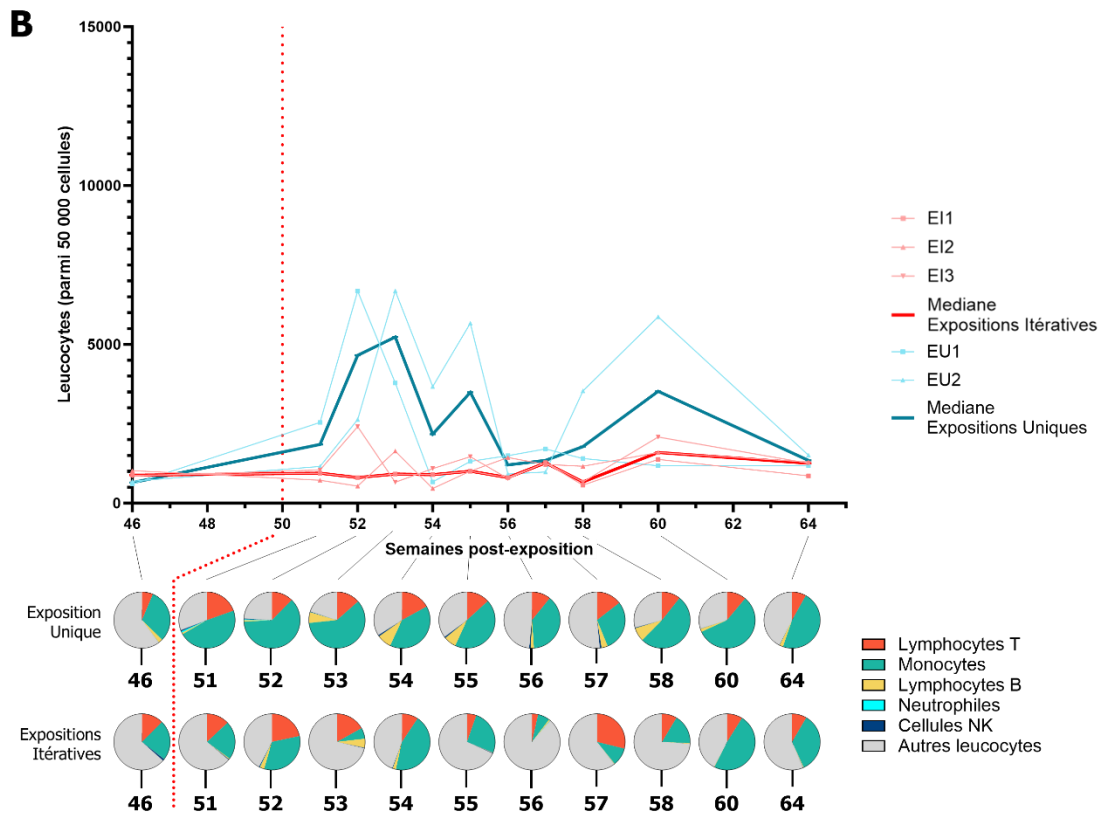
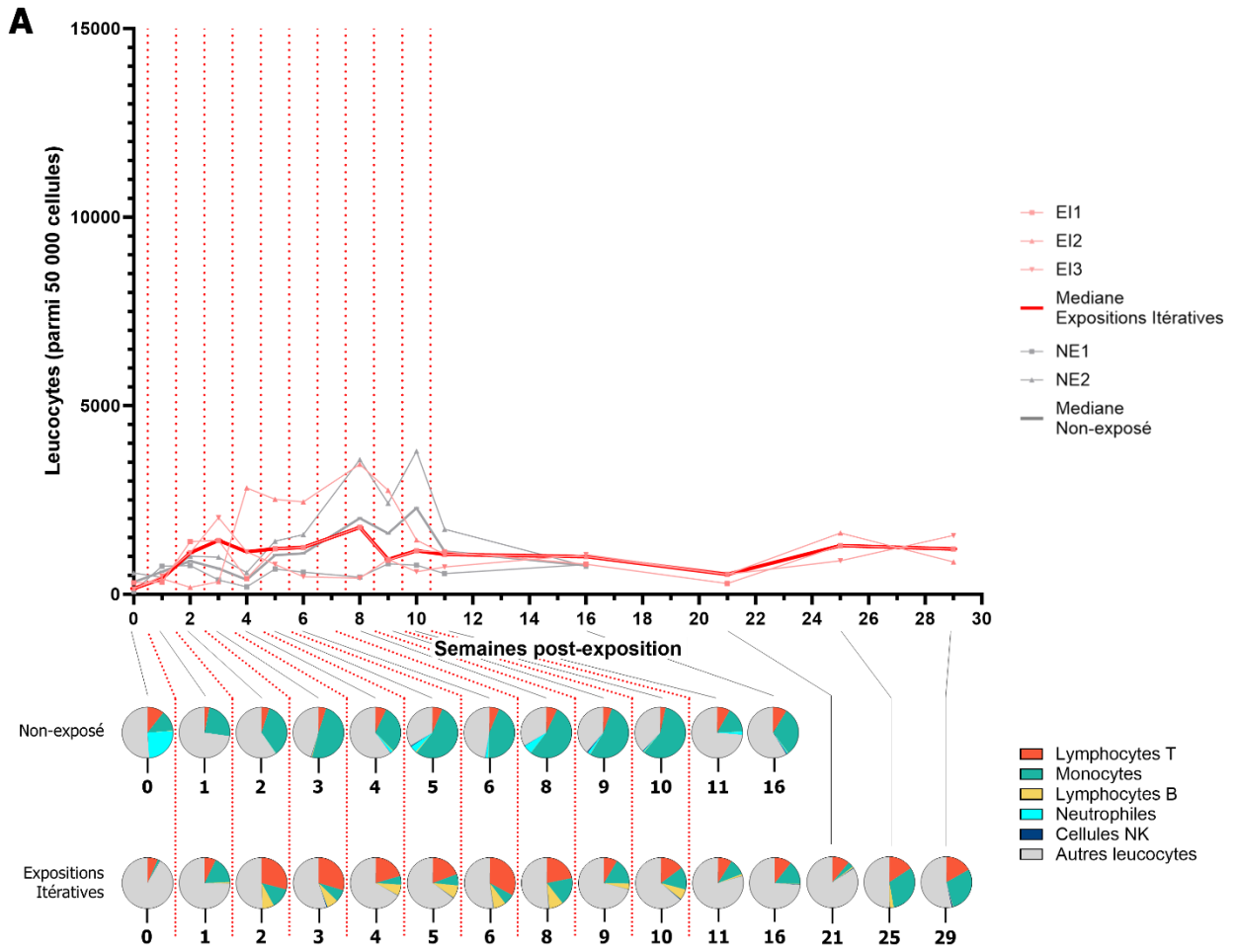


Figure 41 – Évolution des principales populations immunitaires locales dans la cohorte « infection chronique ».

*L'analyse est scindée en deux : la phase des expositions itératives suivant les groupes « non-exposé » et « exposition itératives » (A) et la phase de réexposition tardive suivant les groupes « expositions itératives » et « exposition unique » (B). Les lignes pointillées rouges représentent les expositions bactériennes oculaires. La quantité de leucocyte est normalisé sur 50 000 cellules détectées. La représentation en diagramme circulaire représente, pour chaque point de prélèvement, la médiane de répartition des populations immunitaires identifiées de chaque groupe pour 100 leucocytes.*

Enfin la proportion des lymphocytes T a augmenté initialement pour atteindre 29% après la 2<sup>nd</sup>e exposition, culminé après la 6<sup>ème</sup> (33%), puis ensuite décré (22% à la 8<sup>ème</sup> et 9% à la 9<sup>ème</sup>), et s'est stabilisé autour de 20%, jusqu'à la semaine 29 (17%) (Figure 41 A).

### *Phase de réexposition*

La réexposition n'a pas modifié la quantité de leucocytes détectés. Même après une nouvelle exposition à *C. trachomatis*, la quantité est restée stable autour de 1 000 leucocytes pour 50 000 cellules détectées.

Le prélèvement de référence pour la réexposition tardive (semaine 46 post-primos-exposition) du groupe « expositions itératives » a retrouvé des populations similaires au dernier point de suivi de la première phase (semaine 29) avec 23% de monocytes et 12% de lymphocytes T. Ce prélèvement a retrouvé en outre 1% de cellules NK. La réexposition bactérienne a entraîné l'apparition d'un infiltrat de lymphocytes B aux semaines 2, 3 et 4 post-réexposition (respectivement 3%, 5% et 2%). La proportion des lymphocytes T a également ré-augmenté aux semaines 2 (22%) et 7 (29%). Enfin la proportion des monocytes a aussi augmenté, atteignant 33% à la semaine 2, 44% à la semaine 4, 48% à la semaine 10 et 35% à la semaine 14 (Figure 41 B).

- **Suivi du groupe « exposition unique »**

Pour le groupe « exposition unique », l'augmentation des leucocytes à la suite de l'exposition bactérienne a été nettement plus marquée avec une multiplication d'un facteur 2,9 dès la première semaine, puis d'un facteur 2,5 entre les semaines 1 et 2. La quantité de leucocytes a culminé à la semaine 3 p.e. avec 5 232 leucocytes pour 50 000 cellules enregistrées (soit un facteur 8 par rapport au prélèvement de référence). La quantité de leucocytes détectés est restée élevée jusqu'à la fin du suivi des animaux (toujours 1345 leucocytes pour 50 000 cellules enregistrées au dernier point de suivi contre 647 dans le prélèvement de référence).

Les populations immunitaires présentes au prélèvement de référence ont été réparties entre monocytes (31%), lymphocytes T (6%) et lymphocytes B (2%). La proportion de lymphocytes B a tout d'abord décru en dessous de 1% pendant les 2 premières semaines p.e. avant de remonter à 6% à la semaine 3, puis à 8% aux semaines 4 et 8 et s'est ensuite stabilisé autour de 2% jusqu'à la fin du suivi.

Les proportions de monocytes et de lymphocytes T ont augmenté toutes les deux à la suite de l'exposition bactérienne avec respectivement 47% et 20% à la semaine 1 p.e.. La population de monocytes est restée très présente tout au long de la cinétique avec notamment une proportion supérieure à 50% aux semaines 2 (62%), 3 (60%), 8 (52%) et 10 (57%). Enfin les lymphocytes sont aussi restés stable dans le temps et ne sont pas redescendu en dessous des 10% qu'au tout dernier point de prélèvement à la semaine 14 (8%). Le maximum de lymphocytes T quantifié a été atteint dès la semaine 1 (20%) suivi de la semaine 4 (17%) (Figure 41 B).

Les manipulations oculaires sans exposition bactérienne ont occasionné un influx lymphocytaire tardif et majoritairement monocyttaire. Les expositions itératives ont, elles, déclenché une légère hausse des leucocytes mais surtout un influx lymphocytaire (majoritairement T mais aussi B) ; tandis que la réexposition n'a affecté que les proportions des populations immunitaires avec une augmentation des monocytes. Enfin l'exposition unique a induit un influx de leucocytes composé majoritairement de monocytes, mais aussi de lymphocytes T et B.

### ***b) Suivi des cytokines lacrymales***

- **Cinétique des cytokines lacrymal au cours des expositions itératives**

#### *Groupe « non-exposé »*

Les concentrations de TGF $\alpha$  et IL-1RA ont augmenté au cours du suivi (respectivement une augmentation d'un facteur 11 et 7 entre les semaines 0 et 16). La concentration d'IL-8 a augmenté initialement (d'un facteur 5 à la semaine 2) puis s'est maintenue dans le temps avec au dernier point de suivi une diminution de moitié (à la semaine 16) par rapport à la semaine 2. Une tendance à la diminution à la semaine 2 suivie de fluctuations pendant le suivi et un retour à la valeur initiale a été observée pour les cytokines G-CSF, IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12/23, IL-13, et sCD40L.

Les concentrations des cytokines VEGF, TNF $\alpha$  et IL-4, ont diminué dès la semaine 2 (respectivement d'un facteur 0,4 ; 0,9 et 1 entre les semaines 0 et 2). L'IL-16 a augmenté au cours du suivi malgré une diminution aux semaines 4, 6, 8 et 10.

Enfin l'IL-6 et MIP1 $\beta$  ont également augmenté avec des pics aux semaines 2 et 4, respectivement.

Les concentrations des autres cytokines lacrymales ont globalement été faibles dans le groupe « non-exposé ». L'IL-10 n'a pas été quantifiable au cours du suivi tandis que les concentrations de GM-CSF, IL-1 $\beta$  et IL-17 $\alpha$  ont été inférieures à 2pg/mL. Peu d'évolutions ont été observées dans les concentrations lacrymales de MCP1, IL-2 et IL-18.

#### *Groupe « expositions itératives »*

Dans les 16 premières semaines de suivi, les tendances observées dans le groupe « expositions itératives » ont été très similaires à celles du groupe « non-exposé » excepté pour les cytokines MCP1, IL-1RA, IL-8, IL-10, et IL-16.

L'IL-10 n'a été détectée qu'à partir de la semaine 10 avec des pics aux semaines 16 et 25. MCP1 a augmenté légèrement et culminé à la semaine 4. Les concentrations de l'IL-8 sont restées inférieures à celles mesurées dans le groupe « non-exposé ».

La concentration de l'IL-16 a fluctué au cours du suivi. Enfin pour la cytokine IL-1RA, 2 pics ont été observés aux semaines 2 et 10 suivis d'une stabilisation autour d'une valeur haute (augmentation d'un facteur de 6,5 par rapport au prélèvement de référence).

Les profils évolutifs des concentrations lacrymales des cytokines du groupe « expositions itératives » ont été plus hétérogènes que ceux du groupe « non-exposé » avec par exemple des concentrations d'IL-17 $\alpha$ , de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  plus élevées pour EI1, un pic d'IL-4 à la semaine 4 pour EI2 ou encore un pic de TGF $\alpha$  à la semaine 4 pour EI3.

Sur les points de suivi entre les expositions itératives et la réexposition tardive, les concentrations d'une majorité des cytokines ont augmenté. Seules les cytokines IL-4, IL-6, IL-8, MIP1 $\beta$  et VEGF sont restées stable. L'IL-1RA a aussi été une exception à cette augmentation générale puisqu'elle a diminué pendant le temps de suivi inter-expositions, surtout à la semaine 25.

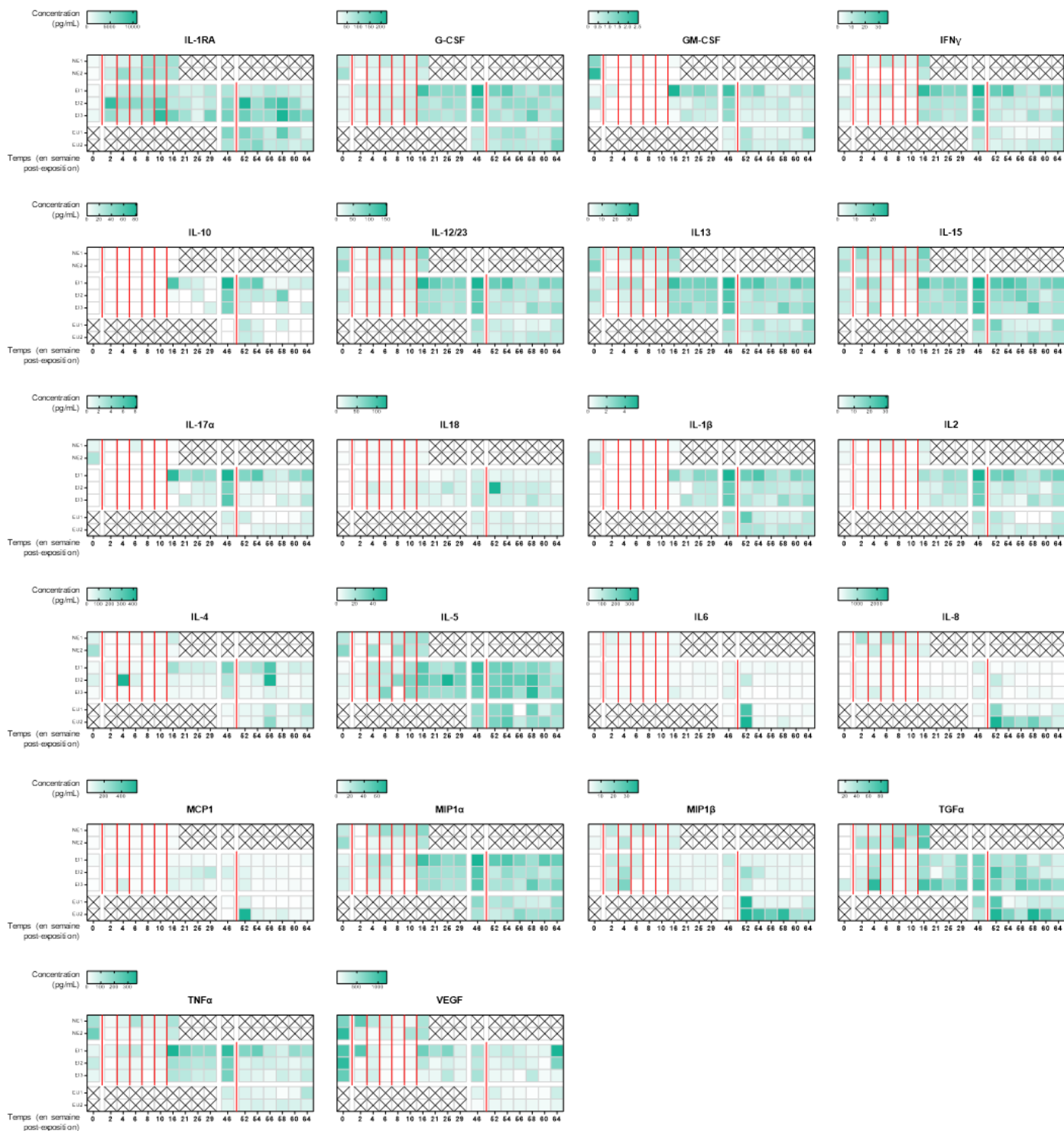


Figure 42 – Quantification des cytokines de la cohorte « Infection chronique ». Les barres rouges représentent les expositions bactériennes. Les quantités mesurées sont exprimées en pg/mL.

- **Cinétique des cytokines lacrymales pendant la phase de réexposition**

*Groupe « expositions itératives »*

La réexposition tardive du groupe « expositions itératives » a engendré une augmentation de l'IL-4 (avec notamment un pic à la semaine 56 post-primo-exposition, soit la semaine 6 post-réexposition), ainsi que de l'IL-1RA.

Pour une majorité des cytokines mesurées, la tendance observée a été à la baisse. La concentration de l'IL-17a a baissé de façon immédiate (facteur de 0,8 à la semaine 1 post-réexposition), puis est restée stable pendant la suite du suivi. Le même profil a été observé pour l'IL-8 bien que la diminution eut été moins importante (facteur de 0,1). Ces tendances générales doivent être nuancées par l'hétérogénéité du groupe. Par exemple, un pic d'IL-18 a été observé à la semaine 2 post-réexposition pour EI2 ainsi qu'un pic d'IL-4 à la semaine 6 p.e. pour EI1 et EI2. Enfin les cytokines MCP1 et IL-6 sont globalement restées stable.

*Groupe « exposition unique »*

Pour le groupe « exposition unique », les cytokines dont les concentrations lacrymales ont augmenté ont été plus nombreuses. MIP1 $\beta$ , MCP1, IL-6, IL-8 et IL1 $\beta$  ont toutes décrit un pic à la semaine 2 p.e. qui ne s'est maintenu dans le temps que pour MIP1 $\beta$ , l'IL-8 et l'IL-1 $\beta$ . Pour l'IL-10 ainsi que TGF $\alpha$  un premier pic a aussi été observé 2 semaines après l'exposition, suivi d'un deuxième, plus faible, à la semaine 8. Enfin l'augmentation de l'IL-4 a été observée 6 semaines après l'exposition bactérienne.

Seules deux cytokines ont diminué après l'exposition bactérienne : l'IL-2 (qui diminuait à partir de la semaine 4 avec un retour aux valeurs initiales en fin de suivi) et l'IL-15 (qui diminuait après avoir très légèrement augmenté à la semaine 2).

Toutes les autres cytokines quantifiées (sCD40L, VEGF, TNF $\alpha$ , MIP1 $\alpha$ , IL-18, IL-17 $\alpha$ , IL-13, IL-12/23 et IFN $\gamma$ ) ont eu un profil globalement stable dans le temps.

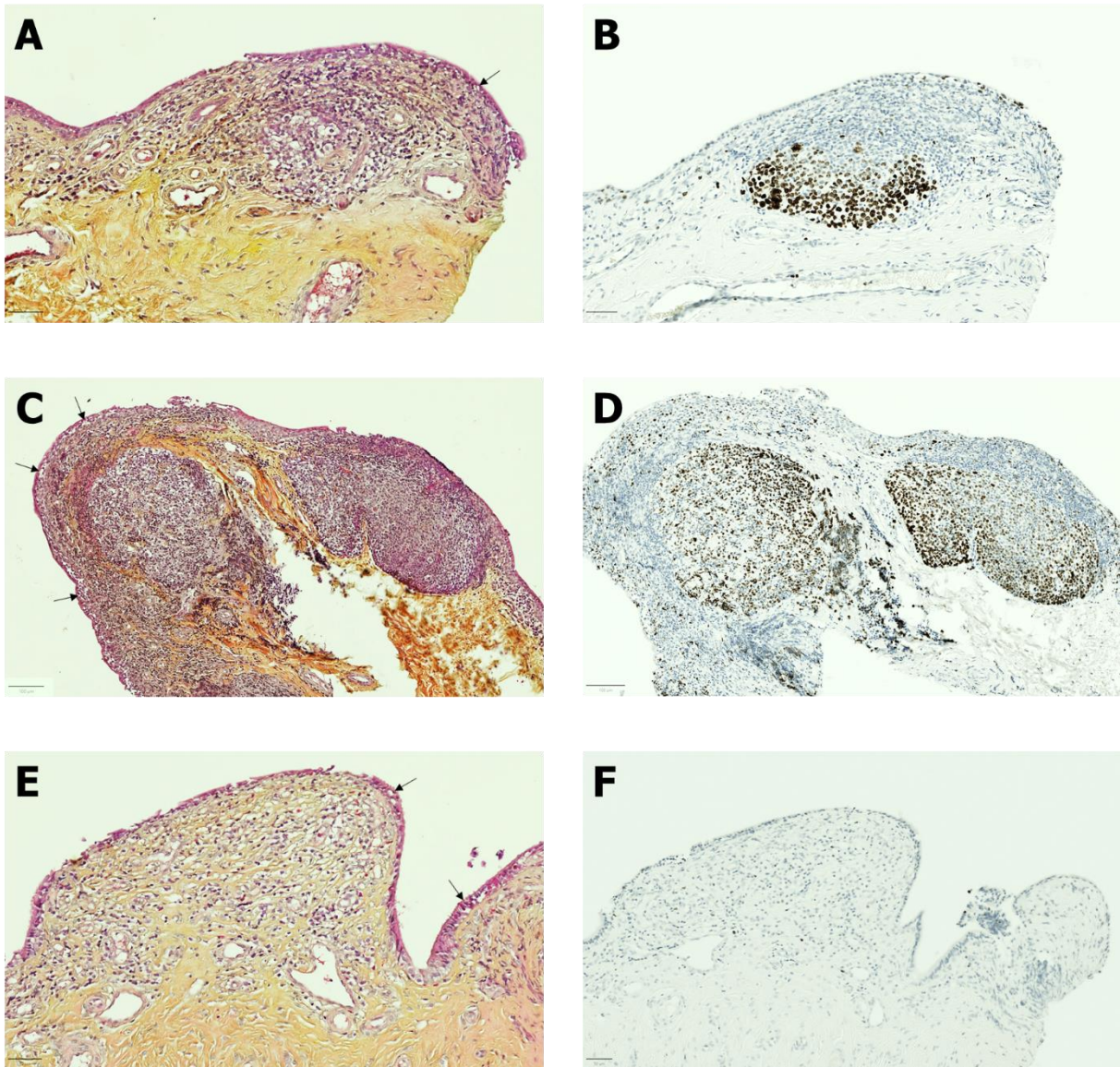
### ***c) Histologie***

Les biopsies conjonctivales de la cohorte « infection chronique » ont été réalisées en fin de suivi, donc uniquement sur les groupes « expositions itératives » et « exposition unique ».



- **Analyse de la morphologie de la conjonctive**

La coloration HES (Figure 43 A, C, E) ont permis de déceler des signes d'œdème sous-conjonctival sur les coupes des trois animaux. L'épithélium conjonctival était très aminci sur les coupes réalisées sur le prélèvement d'EI2 (Figure 43 E). En outre, une quantité importante de collagène sous-conjonctival a été détectée par la coloration au safran.



*Figure 43 – Coupes tissulaires de biopsies de conjonctives tarsales d'EU1 (A, B), EU2 (C, D) et EI2 (E, F). Les coupes ont été coloré en HES (A, C, E) et marqué pour l'antigène Ki-67 en marron foncé (B, D, F). Les flèches noires pointent les zones d'œdème conjonctival.*

- **Analyse de la prolifération cellulaire**

Des zones de marquages Ki-67 ont été observées dans les zones folliculaires des coupes des deux animaux du groupe « exposition unique » (Figure 43 B, D). A contrario, pour la coupe issue d'EI2 (groupe « expositions itératives »), les zones de follicules n'ont pas présenté de marquage (Figure 43 F).

- **Analyse des populations cellulaires**

L'analyse des populations cellulaires a aussi été réalisée sur une pseudo-membrane spontanément détachée de la conjonctive à la semaine 3 p.e. chez l'animal EU2. L'analyse des marquages IF des coupes tissulaires a permis d'étudier les populations immunitaires (lymphocytes T, B, macrophages et neutrophiles) ainsi que les myofibroblastes ( $\alpha$ -SMA) et les cellules à mucus (MUC5AC). Les zones des coupes analysées ont été séparées en « conjonctive » (qui désignent les zones identifiées comme épithéliums conjonctifs) et « follicule » (qui désignent les zones identifiées comme folliculaires), les deux étant des structures histologiques trop différentes pour être combinées.

Les lymphocytes B ont été très majoritairement retrouvés dans les follicules (excepté chez EI3 chez qui très peu de lymphocytes B étaient retrouvés). Les lymphocytes T ont été, eux aussi, majoritairement retrouvés dans les follicules mais avec une différence moins grande entre zone conjonctivale et follicules, la conjonctive contenant aussi des lymphocytes T en dehors des follicules. La même tendance a été observée avec les macrophages qui ont été plus nombreux dans les follicules mais aussi présents dans la conjonctive. Une plus grande proportion de macrophage a été observée dans la pseudo-membrane d'EU2 (Figure 44 A). L' $\alpha$ -SMA est le marqueur qui a été le plus détecté proportionnellement. Ce marqueur a été plus détecté dans les follicules que dans la conjonctive (excepté chez EU2). A l'inverse, MUC5AC a été plus détecté dans la conjonctive, notamment d'EI2 (Figure 44 B).

Pour ce qui est des différences entre les deux groupes, la plupart des marqueurs analysés en IF ont eu une distribution similaire. Les lymphocytes T ont semblé toutefois plus nombreux dans les animaux du groupe « expositions itératives » tout comme la proportion de MUC5AC (de manière inattendue pour cette dernière).

Enfin les proportions (notamment de neutrophiles et de macrophages) détectées dans la pseudo-membrane ont été assez divergentes de celles détectées dans la conjonctive et les follicules d'EU2. La quantité faible des marquages MUC5AC et  $\alpha$ -SMA combiné avec la proportion plus grande des marqueurs immunitaires ont confirmé la nature d'exsudat fibrineux et inflammatoire de la pseudo-membrane.

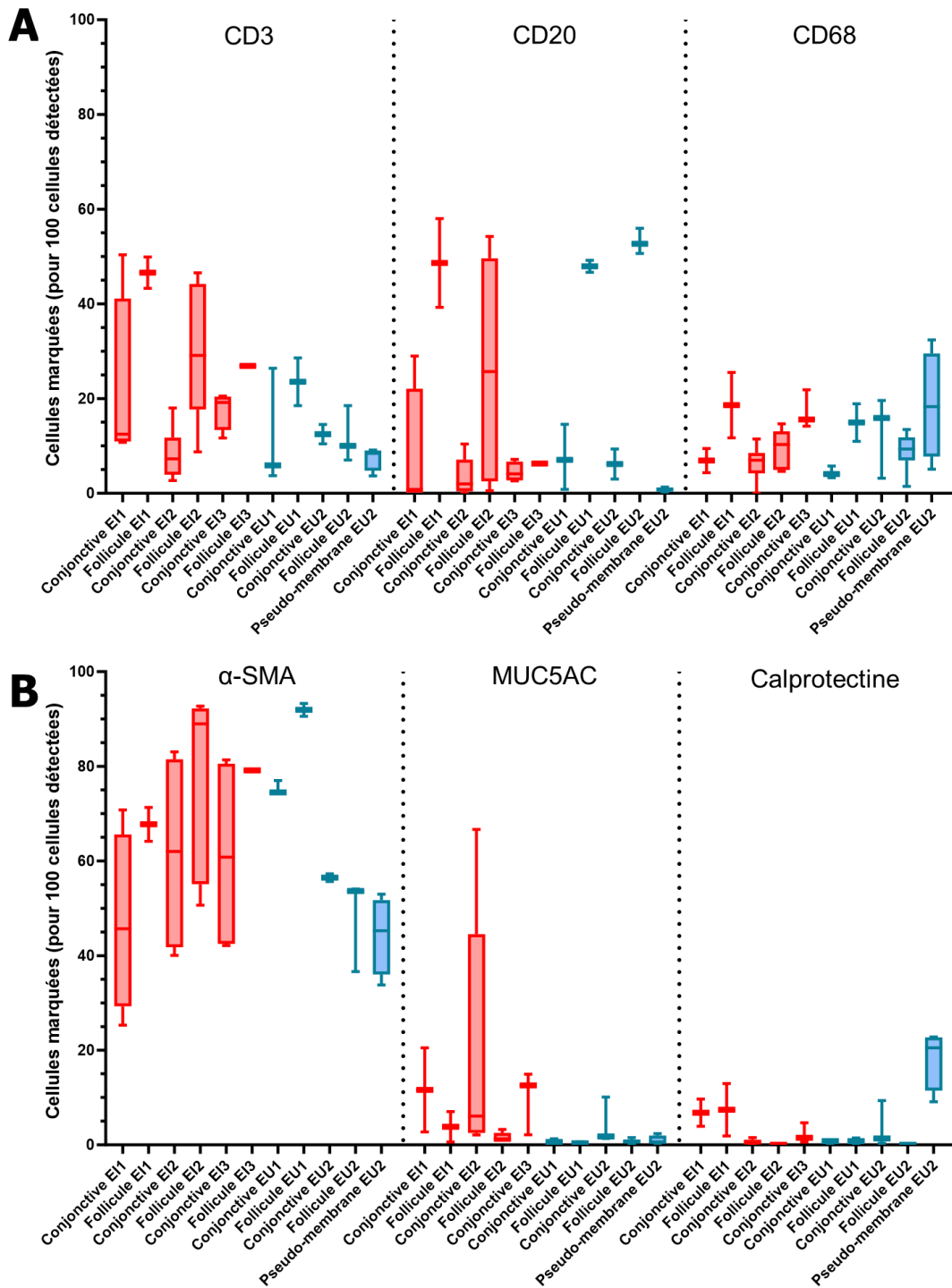


Figure 44 – Détection des cellules marquées pour les antigènes CD3 (lymphocytes T), CD20 (lymphocytes B), CD68 (macrophages)(A),  $\alpha$ -SMA (myo-fibroblastes), MUC5AC (cellules à mucus), et calprotectine (neutrophiles)(B). Le nombre de cellules positives pour chaque marqueur a été normalisé pour 100 cellules. La détection a été réalisé avec le logiciel d'analyse d'image QuPath.

#### ***4) Mise en évidence des corrélations entre l'infection et la réponse immunitaire***

Les corrélations de tous les paramètres mesurés à tous les temps de prélèvement ont été réalisées dans chaque groupe avec un test de corrélation non-paramétrique de Spearman à l'aide du logiciel d'analyse statistique R (Figure 45, Figure 46, Figure 47).

##### ***a) Groupe « non-exposé »***

L'analyse de corrélation pour le groupe « non-exposé » n'a pu être réalisée pour la quantification de la charge bactérienne et la concentration d'IL-10 lacrymale, les valeurs de ces deux paramètres étant restées nulles au cours du suivi. Les signes cliniques n'ont été corrélés significativement qu'entre eux.

Les leucocytes ont été positivement corrélés avec les populations de monocytes et de cellules NK et négativement avec la population de lymphocytes T. Les lymphocytes T ont été pour leur part positivement corrélés avec un cluster de cytokines lacrymales (comprenant G-CSF, GM-CSF, IL-12/23, IL-13, IL-17 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, MIP1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , et sCD40L, toutes corrélées positivement entre elles).

Ces cytokines lacrymales ont été négativement corrélées à l'infiltrat conjonctival de monocytes. Enfin IL-1RA a été positivement corrélée avec TGF $\alpha$ , deux cytokines pour lesquelles une tendance de corrélation négative avec le cluster de cytokines lacrymales mentionné ci-dessus a été observée (Figure 45). Ces corrélations ont suggéré que l'influx de cellules immunitaires a été lié aux monocytes et cellules NK, tandis que les lymphocytes T ont été associés à la sécrétion des cytokines lacrymales corrélées entre elles.

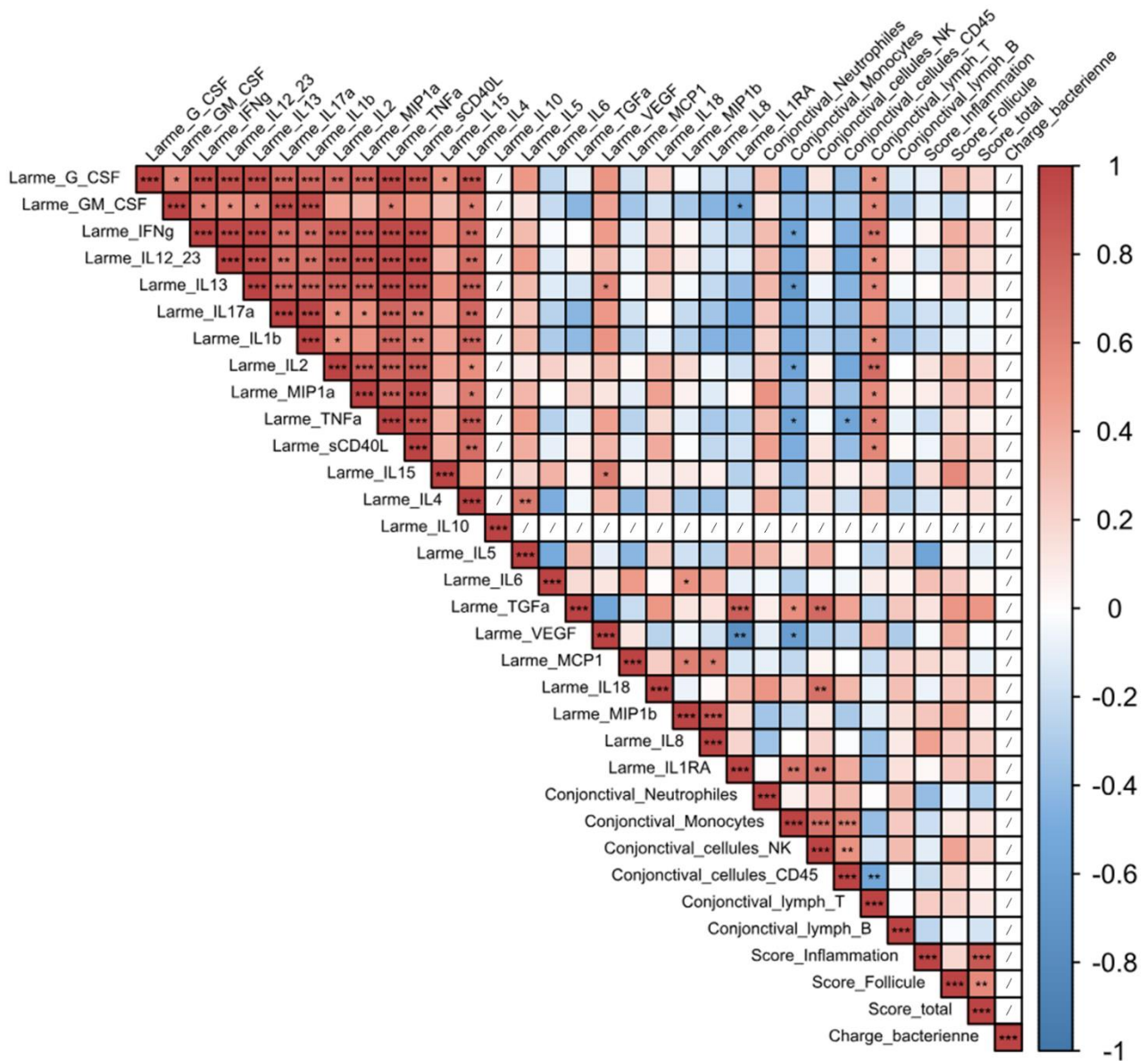


Figure 45 – Matrice de corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « non-exposé ».

Cette matrice été réalisée avec un test de corrélation non-paramétrique de Spearman avec R. Les colonnes et lignes marquées d'une barre correspondent aux corrélations n'ayant pas pu être calculées en raison de valeurs nulles. La corrélation est représentée graphiquement par une échelle allant de -1 en bleu, la corrélation négative maximale, à 1 en rouge, la corrélation positive maximale. Les p-value de chaque corrélation sont représentées avec les étoiles suivantes \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$ ; \*  $0,01 < p < 0,05$ .

### ***b) Groupe « expositions itératives »***

Les corrélations des paramètres du groupe « expositions itératives » ont montré tout d'abord une corrélation positive entre la charge bactérienne et les signes cliniques. Ces derniers ont été positivement corrélés avec les populations conjonctivales de lymphocytes T et B (ainsi que de leucocytes totaux pour les signes cliniques).

Les lymphocytes T et B ainsi que les scores cliniques ont, eux, été négativement corrélés avec les populations de monocytes (et de neutrophiles uniquement pour les lymphocytes T). Tandis que pour les populations conjonctivales de monocytes et neutrophiles, une corrélation positive a été observée avec le cluster de cytokines lacrymales (toutes exceptées MIP1 $\beta$ , IL-8 et IL-1RA).

Ce cluster de cytokines lacrymales fortement corrélées positivement entre elles a été négativement corrélé avec la charge bactérienne, les signes cliniques mais aussi les populations conjonctivales de lymphocytes T et B (Figure 46).

Parmi toutes les cytokines corrélées positivement entre elles, il est à noter qu'un cluster en particulier a été plus fortement corrélé entre elles avec un score  $r$  supérieur à 0,8. Ce cluster comprenait G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-12/23, IL-13, IL-17 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-2. Les cytokines MIP1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , sCD40L et IL-15 ont aussi été très corrélé positivement au cluster avec des scores  $r$  strictement supérieur à 0,7. Ces corrélations ont toutes été associées à une  $p$ -value inférieure à 0,0001 (Figure 46).

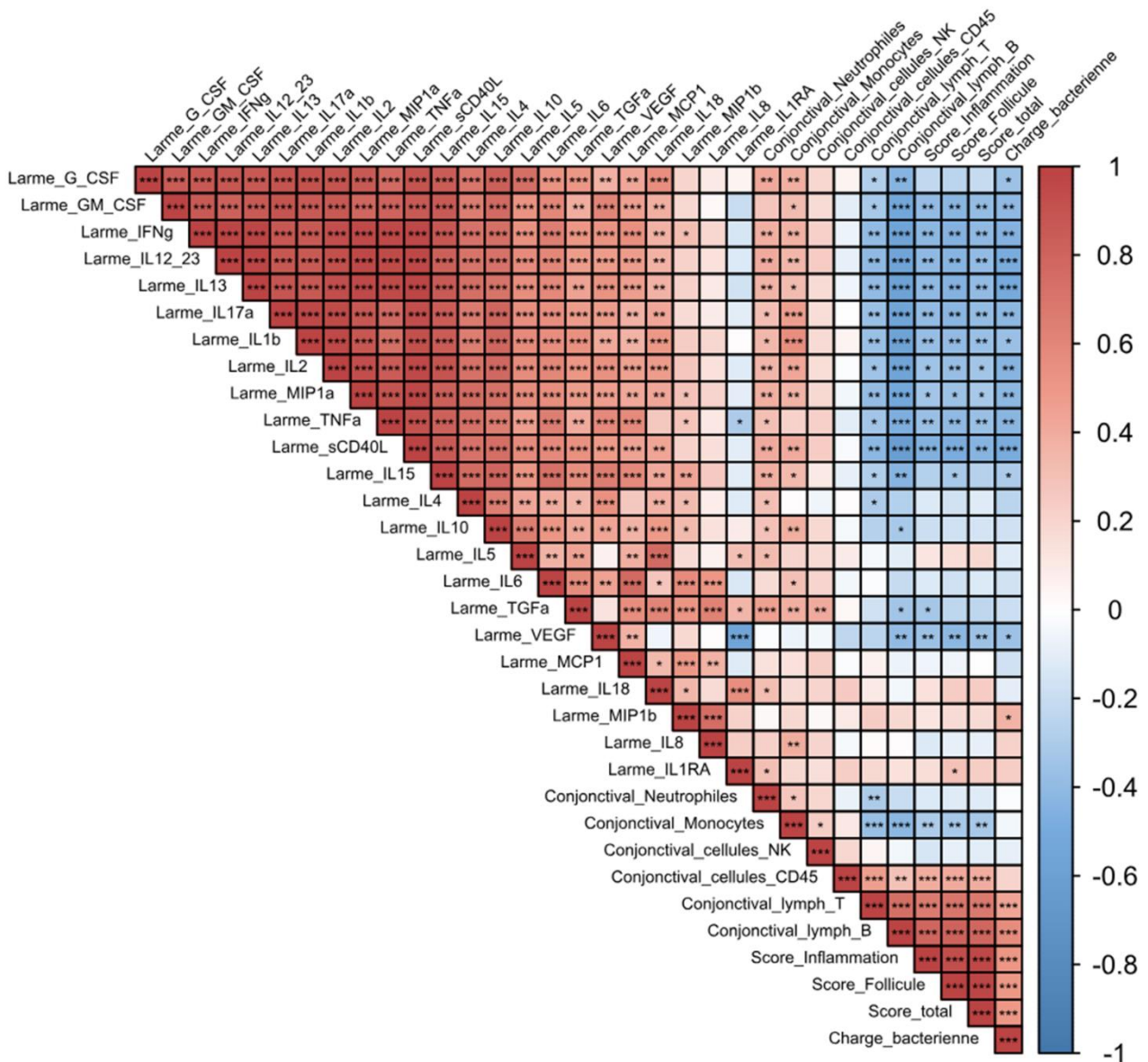


Figure 46 – Corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « expositions itératives ».

Cette matrice a été réalisée avec un test de corrélation non-paramétrique de Spearman avec R. La corrélation est représentée graphiquement par une échelle allant de -1 en bleu, la corrélation négative maximale, à 1 en rouge, la corrélation positive maximale. Les p-value de chaque corrélation sont représentées avec les étoiles suivantes \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$ .

### ***c) Groupe « exposition unique »***

Enfin l'analyse de la corrélation des différents paramètres mesuré dans le groupe « exposition unique » a montré moins de corrélations que dans les deux groupes précédents.

Comme précédemment, la charge bactérienne a été positivement corrélée avec les signes cliniques. Une corrélation positive, bien que légère, a également été observée entre ces derniers et les populations immunitaires conjonctivales (leucocytes totaux, monocytes, cellules NK, et lymphocytes T).

Le cluster des cytokines qui a semblé positivement corrélées entre elles a été plus restreint que pour le groupe « expositions itératives » et avec des corrélations moins fortes. Ce cluster a été composé de IFN $\gamma$ , IL-12/23, IL-17 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, MIP1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , sCD40L, et IL-15, avec des scores de corrélations allant de 0,2 à 0,9, avec certaines de ces corrélations qui n'ont pas été statistiquement significatives. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-15 ainsi que GM-CSF ont été positivement corrélées avec les cytokines IL-6, TGF $\alpha$ , VEGF, MCP1, MIP1 $\beta$  et IL-8. Ces dernières (MCP1, MIP1 $\beta$  et IL-8) ont partagé une signature particulière puisqu'elles ont toutes été positivement corrélées avec les différents scores cliniques oculaires ainsi que la quantification de la charge bactérienne (score  $r$  supérieur à 0,7).



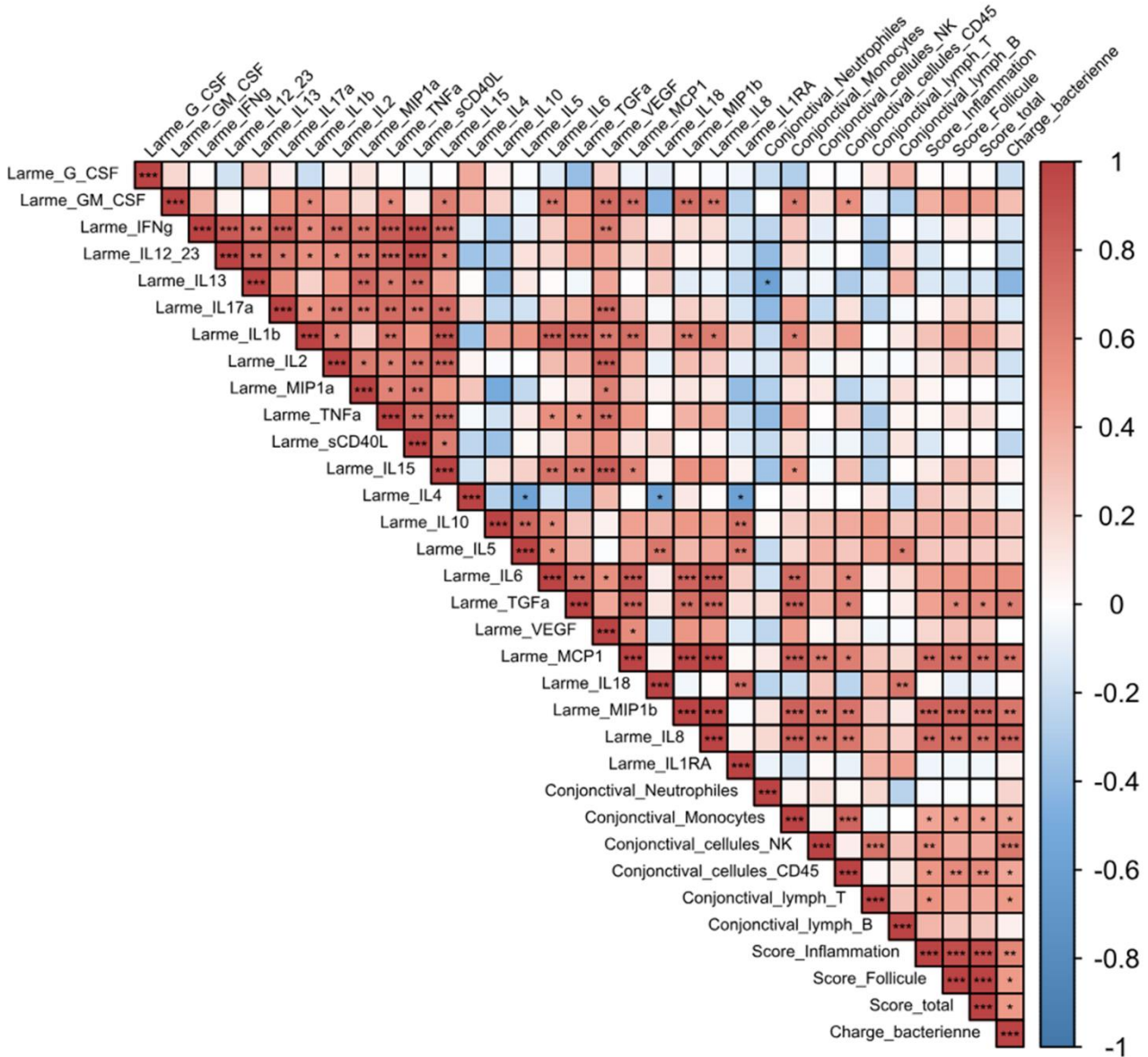


Figure 47 – Corrélation de tous les paramètres mesurés dans le groupe « exposition unique ».

Cette matrice a été réalisée avec un test de corrélation non-paramétrique de Spearman avec R. La corrélation est représentée graphiquement par une échelle allant de -1 en bleu, la corrélation négative maximale, à 1 en rouge, la corrélation positive maximale. Les p-value de chaque corrélation sont représentées avec les étoiles suivantes \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$ .

Ces corrélations ont permis d’entrevoir l’implication des différents paramètres les uns avec les autres et de formuler des hypothèses concernant les mécanismes mis en jeu lors des infections aiguës et chroniques causé par *C. trachomatis*.

## Chapitre 4 – Discussion

### I/ Cohorte « Infection aiguë »

#### Une reproduction fidèle des phases précoces du trachome

La cohorte « Infection aiguë » avait pour objectif la reproduction du stade TF du trachome, soit une conjonctivite folliculaire à *C. trachomatis*, qui se développe chez l'homme généralement entre 1 à 2 semaines après l'exposition bactérienne [98]. L'analyse statistique des deux groupes de cette cohorte n'a pas montré de différences significatives entre eux, les résultats seront donc discutés comme un seul groupe.

Après la primo-exposition, le suivi de la charge bactérienne a tout d'abord confirmé la bonne infection de la conjonctive (Figure 23) ; puis le suivi des signes cliniques oculaires a confirmé que l'infection conjonctivale déclenchait une conjonctivite similaire à celle observée chez l'homme, dans des délais comparables (Figure 25) [98]. Ces observations témoignaient également des similarités entre notre modèle et les précédents modèles animaux PNH sur lesquels nos expériences sont basées [214,299,304].

Le traitement antibiotique à la semaine 7 a permis l'élimination de la bactérie (avec une charge bactérienne nulle) pour 8 des 12 animaux ; ce qui avait eu lieu spontanément à la semaine 6 post-exposition pour les 4 autres (Figure 23). La guérison « microbiologique » coïncide aussi avec la diminution du score d'inflammation conjonctivale. Les follicules conjonctivaux ont, quant à eux persisté plus longtemps, une dissociation qui correspond bien aux observations cliniques réalisées chez l'homme (Annexe 3) [305].

La seconde exposition a quant à elle entraîné des signes cliniques globalement moins intenses, suggérant la mise en place d'une immunité protectrice suite à la primo-infection. Dans cette cohorte, aucun signe de fibrose conjonctivale n'a pu être observé, y compris après la deuxième exposition ; ce qui semblait aller dans le sens des observations de Taylor *et al.* du caractère indispensable des multiples réinfections pour atteindre ce stade de la maladie [290,301].

Les modifications morphologiques et histologiques induites par l'infection aiguë ont été observées sur un animal qui présentait au début de l'étude un œil sain et un œil comportant déjà des signes discrets de fibrose conjonctivale. L'épithélium observé sur les deux biopsies conjonctivales que nous avons réalisé en fin de suivi était très altéré, indépendamment de l'œil observé. L'œil gauche ne présentait pourtant pas de signes cliniques de fibrose, confirmant que les modifications histologiques précèdent les signes cliniques. L'atrophie de l'épithélium a aussi été observée chez l'humain dans une étude histologique qui s'intéressait aux patients ayant été opéré pour un entropion

dû au trachome. Les auteurs retrouvaient également un épithélium irrégulier avec une seule couche cellulaire [306].

La comparaison des marquages histologiques des deux yeux montrait une plus grande proportion de neutrophiles du côté où des lésions cliniques de fibroses étaient présentes alors que les macrophages prédominaient dans l'œil indemne de fibrose. Quant à la biopsie de l'animal contrôle, elle retrouvait des proportions de lymphocytes T et B plus importantes dans les zones de follicule. Un influx immunitaire majoritairement composé de lymphocytes T, mais aussi de lymphocytes B a aussi été retrouvé dans une étude histologique d'un modèle cynomolgus d'exposition à *C. trachomatis* [292]. L'absence de marquage Ki-67 (en dehors de la couche basale de l'épithélium) suggérait que les tissus observés n'étaient plus en phase active de remodelage tissulaire au moment des biopsies, réalisées tardivement.

### **Réponse immunitaire à l'infection aiguë**

Dans l'étude de la cohorte deux types de réponses immunitaires sont observées : une réponse immunitaire concomitante du pic des signes cliniques et de la charge bactérienne ; puis une réponse immunitaire « associée à la convalescence », concomitante du traitement (et donc le passage en-dessous du seuil de détection de la charge bactérienne) et de l'atténuation des signes cliniques.

#### *Réponse immunitaire lors de la phase infectieuse aiguë*

Le pic de la réponse immunitaire était atteint entre 2 et 4 semaines après l'exposition à *C. trachomatis*. La majorité des leucocytes observés étaient des lymphocytes T, dénotant une grande implication de la réponse immunitaire adaptative (Figure 26). Nos résultats sont cohérents avec ceux observés dans les études chez l'homme ; où le rôle majeur des lymphocytes T (et plus particulièrement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) dans l'élimination de *C. trachomatis* a été démontré [98]. L'infiltrat de lymphocytes T allait de pair avec la détection de plusieurs cytokines pro-inflammatoires de la famille des Th1 (lymphocytes T « *helper* » 1) telles qu'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  [307], dont les concentrations n'évoluaient pas significativement au cours du suivi dans notre étude. En revanche, les augmentations des cytokines IL-8 et MCP-1 observées chez l'homme au cours de l'infection aiguë par *C. trachomatis* [307] étaient retrouvées dans notre modèle, ainsi que les augmentations d'IL-1RA et MIP-1 $\beta$  (Figure 27).

La phase infectieuse aiguë de l'infection conjonctivale à *C. trachomatis* a été associée à la population immunitaire innée des polynucléaires neutrophiles [165]. Une étude sur modèle cobaye de déplétion des neutrophiles au cours de l'infection à

*C. trachomatis* a d'ailleurs démontré leur rôle dans le recrutement des lymphocytes T et la diminution de la charge bactérienne [267]. Cette même étude a aussi montré que la présence des neutrophiles dans la conjonctive était responsable d'une exacerbation des signes cliniques conjonctivaux mais aussi d'une diminution de la sécrétion d'IgA locales [267,308].

A l'inverse, dans notre étude, l'analyse en cytométrie en flux des empreintes conjonctivales ne mettait en évidence qu'une très faible quantité de neutrophiles (inférieure à 1% des leucocytes). Cette faible proportion pourrait être due à un problème technique. En effet, la viabilité et l'intégrité des populations les plus fragiles, telles que les neutrophiles [309], a pu être compromise par le procédé d'élution des empreintes (« flushage » des membranes pour en décoller les cellules).

La cinétique des IgA lacrymales spécifiques dans notre modèle est conforme aux observations de la littérature avec une augmentation tardive et décalée dans le temps des IgA à la semaine 6 p.e., de manière concomitante avec une diminution des signes cliniques (Figure 28, Figure 32) [290,310].

Taylor *et al.* retrouvaient également une apparition décalée dans le temps des IgA spécifiques lacrymales et une persistance des IgG sériques [290]. Sen *et al.* retrouvaient des concentrations d'IgA lacrymales spécifiques plus élevées chez les patients trachomateux comparativement à des contrôles sains, mais ne mettaient pas en évidence de différences de concentrations en fonction des stades du trachome [310].

Les populations immunitaires recrutées par les neutrophiles, les lymphocytes T et B sont deux populations qui ont été observées en augmentation entre les semaines 2 et 6 p.e. dans nos expériences (Figure 26) comme dans la littérature [214,308].

### *Réponse immunitaire lors de la phase de convalescence*

A partir du traitement antibiotique à la semaine 7 p.e., la réponse immunitaire effectue une transition vers une réponse « de convalescence » concomitante de l'élimination de *C. trachomatis* de la conjonctive. La quantité de leucocytes diminue et évolue vers une réponse innée avec une augmentation des macrophages et une diminution des lymphocytes T et B (Figure 26). La quantité élevée d'IL-1RA (une cytokine principalement sécrétée par les macrophages [311]), retrouvée au pic de l'infection (semaine 4 p.e. à la fois pour les signes cliniques et la charge bactérienne) pourrait être à l'origine de la diminution des leucocytes du fait de son effet anti-inflammatoire. En effet, une étude de transcriptomique des différents stades de trachome chez l'homme montrait une corrélation négative entre l'IL-1RA et le TS, et au contraire, trouvait une diminution de la destruction de l'épithélium avec l'ajout d'IL-1RA [307].

La signature cytokinique de cette nouvelle phase se traduit par l'augmentation de multiples cytokines à la semaine 11 p.e. (dont IL-17 $\alpha$ , IL-4, IL-5, et GM-CSF). Les cytokines ayant augmenté pendant la phase infectieuse aiguë décrivent toutes un pic à la semaine 11 p.e. L'étude des différentes phases de trachome d'une cohorte humaine montrait un lien entre la phase chronique et l'augmentation des marqueurs de la réponse Th2 (IL-4 aussi augmenté dans notre modèle et IL-13) [307]. L'augmentation d'IL-17 $\alpha$  (et plus largement de la réponse Th17) dans les phases chroniques du trachome a été retrouvée sur plusieurs cohortes de Tanzanie [171,312]. Parmi les cytokines augmentées dans notre modèle, se trouvent des cytokines pro-inflammatoires (VEGF, IL-1 $\beta$ , IL-15 ou encore GM-CSF) mais aussi anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 et IL-5) (Figure 27). La réponse immunitaire associée à cette phase de convalescence est donc associée à une action de l'immunité innée (via les macrophages) pro-inflammatoire (bien que la tendance ne soit pas aussi marquée que ce qui a été observé chez l'homme).

#### *Réponse immunitaire lors de la réexposition*

La seconde exposition bactérienne entraînait une réponse immunitaire qui peut être rapprochée de la réponse « de convalescence » maintenue entre le traitement et la réexposition. La quantité de leucocytes totaux ainsi que le ratio monocyte/lymphocyte à la faveur des monocytes restaient similaires. Ces résultats semblent indiquer que la réponse immunitaire innée jouerait un rôle majeur dans cette phase, une tendance déjà montrée dans la littérature. Une étude chez l'humain montrait une signature cytokinique pro-inflammatoire associée à l'immunité innée (avec par exemple IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) [173]. Ces tendances pourraient être confirmées par la suite des expériences de quantifications des Ig qui ne devraient pas montrer de fortes augmentations même après la réexposition.

### **Modifications du microbiote oculaire : impact de l'infection bactérienne**

L'étude du microbiote oculaire à la suite de l'exposition bactérienne a permis d'observer une dysbiose. L'ajout de l'analyse du microbiote à la suite de l'infection à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> permet de mettre en évidence des différences de réponses entre cette dernière et l'infection conjonctivale à *C. trachomatis*. Ces premiers résultats préliminaires suggèrent qu'il pourrait être possible de différencier une dysbiose causée par une infection conjonctivale d'une dysbiose causée par une infection aspécifique.

Dans une étude sur des patients trachomateux, Zhou *et al.* ont constaté une dysbiose qui consistait en une diminution de la diversité ainsi qu'une augmentation des

proportions de *Corynebacterium* et *Streptococcus*. [27]. Dans leur étude, les auteurs ne pouvaient pas déterminer le lien de causalité entre trachome et dysbiose, à savoir, si cette dysbiose avait favorisé l'infection à *C. trachomatis* ou si cette dernière était à l'origine de la dysbiose.

Une autre étude réalisée sur une cohorte de patients a également observé une augmentation de l'abondance relative de *Corynebacterium* chez les personnes atteintes de trachome et plus spécifiquement de TS [62]. Nous avons également retrouvé une augmentation de *Corynebacterium* à la fois lors de l'exposition bactérienne et au cours de l'infection virale par H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. L'augmentation de l'abondance de *Corynebacterium* pourrait donc être indépendante du pathogène et du type d'infection. En revanche nous n'avons pas démontré d'évolution statistiquement significative dans l'abondance de *Streptococcus*, malgré la présence de ce genre bactérien dans le top 10 des assignations, autant dans le groupe exposé à *C. trachomatis* que dans celui exposé à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>.

L'étude de Pickering *et al.* du microbiote conjonctival aux différents stades du trachome dans une cohorte humaine en Gambie a également retrouvé une association entre la réponse antimicrobienne et l'enrichissement du genre *Haemophilus* [62], que nous avons observé aussi bien lors des infections par H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> que par *C. trachomatis*, évoquant là encore une conséquence non-spécifique du pathogène.

La comparaison statistique des genres avec une abondance relative différente dans les expositions bactériennes et virales semble montrer une signature spécifique de l'infection à *C. trachomatis* plus marquée que la signature spécifique de l'infection à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. En effet la comparaison de ces deux groupes retrouvait 19 genres significativement plus abondants après l'exposition bactérienne contre seulement 2 genres significativement plus abondants après l'exposition virale. Cette différence peut s'expliquer par le caractère local de l'infection à *C. trachomatis*, plus à même de modifier le microbiote conjonctival que l'infection à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, dont le tropisme est habituellement plutôt respiratoire [313]. Toutefois, des cas de conjunctivites ont été rapportés chez des patients infectés par H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> [314], suggérant un éventuel impact sur le microbiote conjonctival. Un impact sur le microbiote extra-respiratoire a de plus déjà été retrouvé après une exposition virale à H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> sur modèle murin [315], où des modifications du microbiote intestinal étaient mises en évidence. Il semble d'autant plus plausible que l'infection par le virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> ait un impact sur le microbiote conjonctival, que le tropisme de ce virus pour l'épithélium conjonctival a déjà été démontré [316].

Pour les deux types d'expositions, les genres les plus affectées par des différences d'abondances appartiennent au phylum des *Firmicutes* puis à celui des *Proteobacteria* et enfin aux *Actinobacteriota*. Cette augmentation majoritaire des *Firmicutes* modifie

les proportions physiologiques du microbiote conjonctival où les *Actinobacteriota* sont majoritaires suivi des phyla *Proteobacteria* et en 3<sup>ème</sup> seulement *Firmicutes* [24].

Le traitement par azithromycine des macaques exposés à *C. trachomatis* a sans surprise été accompagné de modifications du microbiote conjonctival. Plus encore que les expositions bactériennes et virales, le traitement antibiotique modifiait en profondeur l'abondance des genres bactériens. En outre, le microbiote conjonctival des animaux traités ne retrouvait pas sa composition d'origine en fin de suivi (semaine 11 p.e.). Les études sur des cohortes de patients traités lors des campagnes de distribution massive d'antibiotique en zone endémique ont mis en évidence un impact de ces traitements à la fois sur le microbiote intestinal [192] et conjonctival [193]. En particulier, les bactéries identifiées sur les prélèvements réalisés après traitement antibiotique montraient un taux plus élevé de résistance aux macrolides à la fois dans le microbiote oculaire et intestinal [192,193]. Bien que la résistance aux antibiotiques n'ait pas été mesurée dans notre étude, une augmentation des genres pathogènes (opportunistes ou non) était présente dans nos résultats.

Les genres identifiés dans le microbiote conjonctival des animaux de notre étude étaient partagés entre commensaux et pathogènes opportunistes, avec une faible minorité de genres pathogènes obligatoires. Après les expositions bactériennes et virales, les pathogènes retrouvés étaient respectivement *Chlamydia* et *Haemophilus* d'une part, et *Haemophilus* et *Fusobacterium* d'autre part. La proportion de genres pathogènes était augmentée par le traitement antibiotique, avec une abondance plus importante des genres *Flavonifractor*, *Anaerococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, et *Haemophilus*. Les genres *Neisseria* et *Prevotella*, dont certaines espèces peuvent être considérées comme pathogènes, devenaient également plus abondants. L'identification spécifique de la pathogénicité des genres identifiés reste complexe car dépend spécifiquement des espèces, une dualité qui peut par exemple être vu chez le genre *Neisseria* dont les espèces *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont pathogènes mais qui contient aussi d'autres espèces commensales du système respiratoire haut non-pathogènes [317]. Cependant avec le séquençage des régions V3-V4 de l'ARN 16S, une identification des taxons à un niveau plus précis que le genre n'est que très rarement possible : quasiment aucune espèce n'est identifiable sans un séquençage complet de l'ARN 16S. Cette contrainte technique est notamment liée à la difficulté de prélèvement de la surface oculaire, liée à la pauvreté de la flore commensale et au faible volume des échantillons recueillis [34]. Toutefois, les progrès réalisés dans les techniques de séquençage de nouvelle génération facilitent et améliorent la précisions des séquençages y compris pour les échantillons de faibles volume et concentration comme les échantillons oculaires [32]. L'identification sur de plus grands effectifs d'un microbiote conjonctival de référence du cynomolgus, au niveau taxonomique du genre ou de l'espèce, permettrait de confirmer les pistes d'analyse que nous pouvons

actuellement proposer. D'autres analyses complémentaires doivent aussi être ajoutée pour venir compléter ces résultats préliminaires : majoritairement l'analyse des diversités, mais aussi une analyse des évolutions individuelles.

## **II/ Cohorte « Infection chronique »**

### **Une reproduction des signes cliniques des phases avancées de la maladie**

La cohorte « Infection chronique » avait pour objectif de modéliser les stades plus avancés du trachome (TI et TS) et notamment de provoquer l'apparition de lésions de fibrose conjonctivale. Bien que le suivi de la charge bactérienne ait confirmé une infection efficace de la conjonctive par *C. trachomatis* (Figure 38), les lésions de fibrose conjonctivale ne sont pas apparues chez tous les animaux du groupe « expositions itératives » (toujours absentes au dernier point de suivi chez EI3).

Les expositions itératives ne permettaient pas de maintenir une charge bactérienne élevée : une diminution progressive était observée malgré les expositions hebdomadaires. Ce phénomène avait déjà été observé par Taylor *et al.* qui n'arrivait à retrouver *C. trachomatis* que rarement après 8 semaines de réexpositions bactériennes hebdomadaires (quantifié par culture depuis des écouvillons conjonctivaux)[290].

L'augmentation de charge bactérienne observée après réexposition à distance semblait de plus courte durée (EI1 et EI3 sont revenus en dessous du seuil de détection 5 semaines après cette réexposition tardive, mais la charge bactérienne d'EI2 ne passait en dessous du seuil de détection qu'au dernier point de suivi, à la 64<sup>ème</sup> semaine (14<sup>ème</sup> semaine post-réexposition tardive). Pour les animaux n'ayant reçu qu'une seule exposition bactérienne, une charge bactérienne était toujours mesurée au dernier point de suivi. Lors d'une infection conjonctivale aiguë par *C. trachomatis* chez l'homme, les prélèvements microbiologiques sont généralement positifs pendant une durée de 3 à 8 semaines [98]. Toutefois, les études de terrain sur une cohorte Gambienne ont montré que l'infection bactérienne conjonctivale pouvait durer entre 12 et 24 semaines (avec une persistance des signes cliniques de la maladie pendant 3 à 8 semaines supplémentaires), vraisemblablement en raison de réinoculations itératives, qui peuvent aussi arriver chez le macaque [158].

Les signes cliniques du groupe « expositions itératives » suivaient la même cinétique que la charge bactérienne avec notamment un retour à un score de 0 pour EI1 et EI3 à la semaine 21 post-primo-exposition. La réexposition tardive induisait une augmentation des signes cliniques chez tous les animaux bien que le score médian restât plus faible qu'au pic de la phase des expositions itératives. L'absence de retour



à un score clinique nul pour les animaux est en phase avec les délais de résolution des signes cliniques de la maladie observés chez l'homme [158] et dans le modèle PNH de Taylor *et al.* dans lequel le retour à la normale survenait 2 à 3 mois après l'arrêt des expositions itératives [290].

Les signes cliniques du groupes « exposition unique » atteignaient un score maximal deux semaines après l'exposition. Le maintien d'un score élevé en fin de suivi était observé pour les deux animaux du groupe, soit 14 semaines après l'exposition, restant encore une fois dans la fourchette des 12 à 24 semaines retrouvée dans la littérature [98,158].

Le suivi du groupe « non-exposé » permettait de confirmer que l'inflammation mécanique engendrée par les manipulations hebdomadaires peut être distinguée des signes cliniques induits par l'exposition à *C. trachomatis*.

L'apparition de signes de fibrose conjonctivale chez les animaux du groupe « exposition unique » a constitué l'un des résultats inattendus de cette étude. Cette réaction sévère n'avait pas été observée dans la cohorte « infection aiguë » (qui avait pourtant été exposé à *C. trachomatis* selon les mêmes modalités). Ce résultat vient aussi à l'encontre des connaissances issues du modèle d'expositions itératives de Taylor *et al.* [288,290], selon lequel de multiples expositions conjonctivales à *C. trachomatis* sont requises pour atteindre le stade de fibrose.

L'impact du nombre de réexposition pose donc question, puisqu'à la fois les animaux du groupe « exposition unique » ainsi qu'EI2, animal du groupe « expositions itératives », développaient des signes sévères, alors que les animaux EI1 et surtout EI3 montraient des signes respectivement modérée et faible.

Une des hypothèses pour expliquer ces différences majeures de phénotypes cliniques est la différence des microbiotes conjonctivaux initiaux. Dans la littérature, les différences de microbiote ont été associées au développement de TS dans une cohorte humaine en zone endémique [27,62].

Toujours lié au microbiote oculaire, l'animal (EU2) ayant montré les signes sévères les plus précoces, dont la formation d'une pseudo-membrane, pourrait avoir contracté une infection fongique concomitante. Des vérifications histologiques par coloration de Grocott-Gomori sont actuellement en cours pour confirmer ou infirmer la présence de sporocystes qui expliquerait cette réaction particulièrement exacerbée. Les infections secondaires au trachome, qu'elles soient bactériennes ou fongiques sont notamment mentionnées comme un facteur contribuant à l'opacification cornéenne, et donc à la sévérité du trachome, dans plusieurs études [318–320]

Une autre hypothèse pourrait être les différences interindividuelles constitutives du système immunitaire. L'analyse des typage HLA a permis d'associer un des typage avec

une protection contre l'apparition du trichiasis dans une étude réalisée chez l'homme dans un village de zone endémique en 2009 [321]. L'application de cette analyse sur les animaux de cette étude pourrait mettre en évidence un typage commun entre les animaux présentant une réponse modérée, ou au contraire entre ceux présentant une réponse sévère.

Concernant les résultats des analyses histologiques, le marquage Ki-67 positif observé pour EU1 et EU2, à la fois dans les follicules mais aussi dans l'épithélium, dénotait un remodelage actif du tissu conjonctif de tous les animaux du groupe « exposition unique ». En comparaison, seuls quelques rares cellules Ki-67 positives étaient observées dans l'œil droit d'EI2 qui a pourtant développé des signes de fibrose conjonctivale, et présentait toujours des follicules au dernier point de suivi. De plus, aucun marquage Ki-67 n'était détecté dans les yeux de EI1 et EI3. Ces résultats indiquent que les remaniements tissulaires des animaux du groupe « expositions itératives » n'étaient plus actifs au moment de la biopsie (soit 64 semaines après la première exposition bactérienne et après au total 12 expositions).

La présence élevée des neutrophiles et macrophages dans la pseudo-membrane, signe clinique de sévérité, suggérait le rôle important de l'immunité innée dans l'exacerbation des signes cliniques [267,308]. Enfin la présence d'œdème dans de multiples échantillons des deux groupes pourrait être causé par l'effet délétère de *C. trachomatis* sur l'intégrité des jonctions serrées intercellulaires [240].

La grande diversité des réponses observées dans cette cohorte traduit la complexité des mécanismes impliqués dans la phase chronique du trachome et la variabilité phénotypique observée chez l'humain. Bien que ces résultats ne nous aient pas permis pour le moment une caractérisation précise du modèle itératif, ils ouvrent néanmoins des pistes à explorer, notamment sur l'effet des cofacteurs tels que le microbiote conjonctival ou des différences dans le système immunitaire préexposition.

### **Réponse immunitaire à l'infection chronique**

L'augmentation des leucocytes conjonctivaux suite aux expositions itératives restait modérée pour le groupe « expositions itératives ». Paradoxalement, une augmentation plus importante était observée avec la procédure « *mock* » avec manipulations avec le tampon seul dans le groupe « non-exposé ». La réponse immunitaire cellulaire conjonctivale de ce dernier était de type innée, caractérisée par des infiltrats composés majoritairement de neutrophiles et de monocytes. L'absence d'un influx de lymphocytes, et donc de réponse adaptative est en cohérence avec le caractère inflammatoire non-infectieux de l'inflammation observée dans ce groupe contrôle [322]. L'étude des infiltrats immunitaires dans la sécheresse oculaire (inflammation

conjonctivale non-infectieuse) montrait aussi une augmentation monocyttaire (cellules CD14<sup>+</sup>) et aucune différence significative entre patient et contrôle sain pour la proportion de lymphocytes [323].

Dans le groupe « expositions itératives », en revanche, les influx de lymphocytes T et B étaient observés, témoignant d'une réponse adaptative présente pendant toute la phase d'expositions itératives. La balance immunité adaptative/innée s'inversait au cours du suivi entre les expositions itératives et la réexposition tardive. Un nouvel influx de lymphocytes T et B était tout de même observé après la réexposition tardive. Ces résultats suggèrent une implication de l'immunité adaptative lorsque l'infection bactérienne est active (charge bactérienne détectable signe de la présence intracellulaire du pathogène) tandis que l'immunité innée serait impliquée dans les mécanismes pro-inflammatoires mis en jeu dans l'apparition de la fibrose conjonctivale et des stades avancés du trachome ; des mécanismes retrouvés dans l'étude d'une cohorte humaine [324].

En revanche, dans le groupe « exposition unique », la quantité de leucocytes augmentait à la suite de l'exposition bactérienne. Contrairement à tous les autres groupes, l'équilibre monocytes/lymphocytes T était dès le départ en faveur des monocytes, une tendance renforcée après l'exposition à *C. trachomatis*, une tendance qui chez l'humain était plutôt associée à la phase TS. Cette différence de réponse immunitaire à une unique exposition entre le groupe « exposition unique » de la cohorte « infection chronique » et les deux groupes de la cohorte « infection aiguë » pourrait être corrélée à la différence de signes cliniques observée [173,325].

La signature cytokinique de l'inflammation non-infectieuse du groupe « non-exposé » consistait principalement en une augmentation de TGF- $\alpha$  (impliqué dans la croissance, la prolifération et la migration cellulaire [326]), d'IL-1RA (aux propriétés anti-inflammatoires [327]) et d'IL-8 (cytokine pro-inflammatoire [328]). Ces différentes cytokines, toutes sécrétées par, entre autres, les cellules épithéliales [329,330], traduisaient l'inflammation induite par les manipulations oculaires répétées, et la nécessité de prendre en compte cette dernière (notamment pour améliorer nos procédures) lors de la mise en place d'un modèle d'infection conjonctivale.

Pour le groupe « expositions itératives », la première phase entraînait peu de changements en termes de cytokines : principalement une augmentation de l'IL-1RA (pics aux semaines 2 et 10). Toutefois, il était difficile de distinguer une tendance en raison de la grande hétérogénéité du groupe. La réexposition tardive entraînait quant à elle une augmentation d'IL-1RA et IL-4, 2 cytokines aux propriétés anti-inflammatoires. Ces résultats semblent différents de ceux retrouvés dans les études cliniques réalisées sur les patients trachomateux, au cours desquelles les cytokines

lacrymales anti-inflammatoires, et notamment IL-1RA, étaient surtout retrouvées au cours de la phase aiguë de la maladie [307].

La signature cytokinique du groupe « exposition unique » dénotait une réponse pro-inflammatoire cohérente avec l'exacerbation des signes cliniques et l'apparition de lésions de fibrose conjonctivale. Les cytokines pro-inflammatoires MIP-1 $\beta$ , IL-8 et IL-1 $\beta$  étaient toutes les trois en constante augmentation au cours du suivi. Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et IL-6 était aussi observée. Le lien entre les cytokines pro-inflammatoires (notamment MCP-1, IL-8 ou encore CCL11) et le stade TS du trachome (donc l'apparition de fibrose conjonctivale) a été montré chez l'homme [307]. Ces signatures cytokiniques pro-inflammatoires ont été associées avec le processus fibrosant du trachome [98]. L'absence paradoxale de ces augmentations dans le groupe « expositions itératives » était relativement cohérente avec les résultats cliniques (paradoxalement peu sévères) obtenus pour ce groupe.

### **III/ Mise en perspective des différents modèles**

Les signatures mises en évidence par les matrices de corrélation permettaient de rapprocher les deux groupes de la cohorte « infection aiguë » du groupe « expositions itératives » de la cohorte « infection chronique » avec les mêmes corrélations :

- Positives parmi le cluster de cytokines lacrymales pro-inflammatoire (qui comprends G-CSF, GM-CSF, IL-12/23, IL-17 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, MIP1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , et sCD40L),
- Négatives entre le cluster de cytokines pro-inflammatoires d'un côté, et la charge bactérienne et les populations immunitaires (leucocytes, lymphocytes T) de l'autre côté,
- Négatives entre la population de monocytes d'une part, et les autres populations immunitaires et la charge bactérienne d'autre part.

La matrice de corrélation du groupe « non-exposé » permettait d'observer que le cluster de cytokines lacrymales pro-inflammatoire restait corrélé positivement les unes aux autres même sans l'exposition bactérienne.

Des résultats similaires étaient attendus entre la phase de primo-exposition de la cohorte « infection aiguë » et le groupe « exposition unique ». La différence majeure entre les deux matrices se trouve au niveau des monocytes qui corrélaient négativement avec toutes les autres populations immunitaires locales pour le groupe « expositions itératives » tandis qu'ils corrélaient positivement avec les autres populations pour le groupe « exposition unique ».

Notre modèle d'infection chronique se distingue du modèle primate sur lequel l'étude a été mise au point. En effet, les travaux de Taylor *et al.* ont montré des signes de fibrose conjonctivale (avec l'apparition de cicatrices) après 3 à 6 semaines [288], temps au bout duquel aucun des animaux du groupe « exposition itératives » n'a développé de fibrose. Ces différences pourraient être dues à la différence de sérovar, l'étude de Taylor *et al.* utilisant le sérovar E, connu pour causer des infections urogénitales. L'obtention de fibrose conjonctivale reste néanmoins un atout majeur de ce nouveau modèle, la quasi-totalité des modèles *in vivo* se limitant à des conjonctivites non-cicatrisantes (Tableau 3).

Enfin pour ce qui est de la réponse immunitaire, les résultats obtenus avec nos modèles sont similaires aux précédentes études *in vivo* notamment pour ce qui est de l'implication des lymphocytes T [275,296], des modifications histologiques [282,285], ou encore de la réponse IgA [270,297].

## **IV/ Limites et perspectives**

Tous les résultats discutés ci-dessus permettent la formulation d'hypothèses et de perspectives de poursuite de l'étude, mais soulève aussi les limitations et problèmes qui ont été rencontrés.

### **Limites**

La caractérisation des deux modèles présentés ici pourrait être améliorée par l'ajout de résultats complémentaires. Pour la cohorte « infection aiguë », les quantifications des Ig ainsi que des cytokines pendant la phase d'immunisation et de réexposition permettrait d'affiner la compréhension de la réponse immunitaire et notamment les rôles respectifs des immunités innées et adaptatives. Pour la cohorte « infection chronique », les résultats présentés ici font partie de la mise au point du modèle itératif et ont été réalisées sur une cohorte trop petite pour permettre une analyse statistique. La cohorte est de plus trop hétérogène pour permettre des conclusions et une caractérisation définitive. La caractérisation de ce modèle encore en développement pourrait aussi bénéficier de l'ajout du suivi systémique des Ig et des cytokines. Ces résultats supplémentaires permettraient d'affiner la comparaison avec la cohorte « infection aiguë ».

La description de la réponse immunitaire pourrait aussi gagner en précision avec des expériences de caractérisation de la réponse T, particulièrement l'influx important de lymphocytes T observé lors de la phase de primo-exposition de la cohorte « infection aiguë ». La caractérisation plus précise des mécanismes pourrait également bénéficier

du suivi de marqueurs plus spécifiques des phases chroniques du trachome et de la fibrose tels que les métalloprotéinases, dont le rôle crucial dans l'apparition de la fibrose a été démontré à la fois dans la trachome [172,173,325], mais aussi dans d'autres pathologies induisant une fibrose conjonctivale tels que l'atteinte oculaire de la maladie du greffon contre l'hôte [331,332].

L'ajout d'une analyse plus approfondie des différences intra-individuelles (entre les deux yeux d'un même animal) et inter-individuelles (notamment pour ce qui est de l'évolution du microbiote conjonctival) pourrait aussi amener des pistes de réponses supplémentaires.

La caractérisation précise des mécanismes mis en jeu dans la physiopathologie de notre modèle a aussi été limitée par des facteurs techniques, comme probable sous-estimation des neutrophiles dans les empreintes conjonctivales.

L'utilisation d'une étude longitudinale ainsi que les contraintes du modèle PNH imposait l'échelle temporelle utilisée des prélèvements hebdomadaires. Cependant l'espacement de chacun de ces prélèvements laisse hors d'atteinte les mécanismes se déroulant sur des temporalités courtes. Les mécanismes déjà décrits dans l'infection vaginale à *C. trachomatis* décrivent un processus immunitaire passant d'abord par l'intervention de l'immunité innée puis de l'immunité adaptative [333]. Notre observation d'une réponse tout d'abord adaptative interroge la présence d'autres mécanismes « rapides » qui se dérouleraient sur une échelle temporelle inférieure à une semaine. Des fluctuations non-détectées sont une possibilité qui ne peut être exclue avec nos observations hebdomadaires. Ces temporalités plus rapides pourraient être étudiées, en complément des études *in vivo* présentées ici, avec un modèle *in vitro* simplifié permettant de tester des hypothèses formulées d'après nos résultats *in vivo*. Par exemple une infection de cultures de cellules épithéliales conjonctivales en présence ou non d'une co-culture de lymphocytes T permettrait d'étudier plus précisément le rôle des lymphocytes T dans l'inflammation de l'épithélium conjonctival, des mécanismes qui ont déjà été étudié pour les souches vaginales de *C. trachomatis* [322]. L'infection *in vitro* de cultures primaires de cellules épithéliales conjonctivales a d'ailleurs déjà été utilisée pour décrire l'effet inhibiteur de la croissance de *C. trachomatis* par l'IFN $\gamma$  [246].

### **Poursuite de l'étude : le projet TracVac**

L'étude menée dans le cadre de cette thèse a été associée au projet européen TracVac et a donc été réalisée en parallèle d'essais de stratégies vaccinales. Trois stratégies différentes ont été étudiées avec une vaccination protéique (avec le même vaccin que celui utilisé dans la cohorte « infection aiguë » présenté ci-dessus), une vaccination

ADN et enfin une vaccination avec une bactérie UV-atténuée (Figure 48). L'efficacité de ces différentes stratégies vaccinales ont été testées sur le modèle PNH d'infection aiguë. Les groupes d'animaux de cette cohorte d'étude vaccinale ont bénéficié du même suivi clinique et des mêmes analyses bactériologiques et immunologiques multimodales que celles présentées ici.

L'analyse des résultats de cette cohorte (en cours) ouvre de nouvelles pistes d'exploration et des hypothèses supplémentaires quant à la physiopathologie du trachome. En effet, la comparaison des quantifications de charge bactérienne sur les groupes « vaccin protéine » et « réexposition vaccin protéine » montrent que la vaccination seule entraînait une protection moins forte que lorsqu'elle était combinée à une exposition bactérienne préalable. Comme dans le groupe « exposition unique » de la cohorte « infection chronique », le groupe contrôle « sans vaccin » de la cohorte « essai de vaccin » comprend des animaux qui ont eu des réactions oculaires plus sévères malgré un inoculum et des manipulations identiques. L'étude individuelle des cas particulièrement sévères pourrait s'avérer utile.

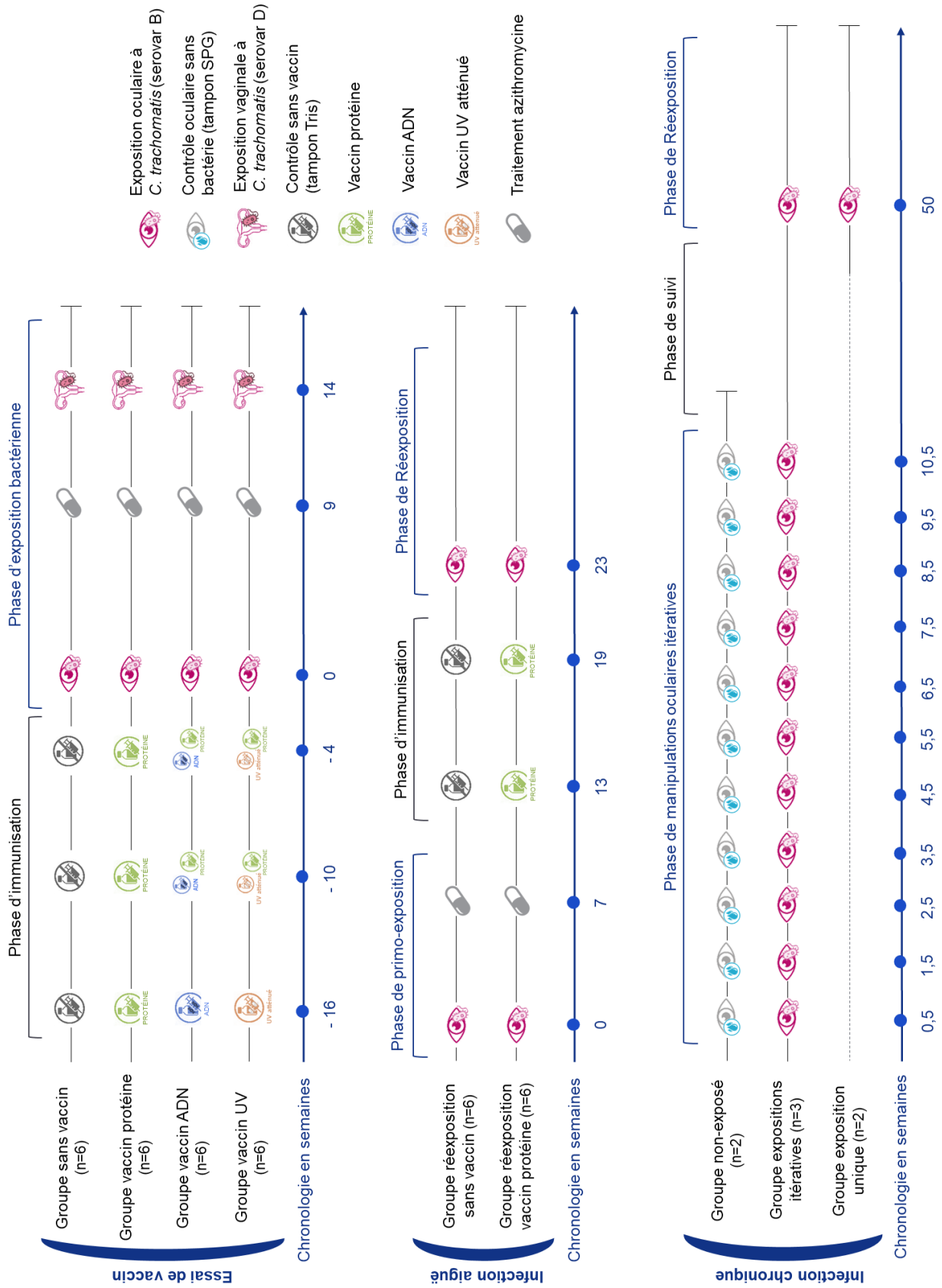


Figure 48 – Présentation des différents groupes et du déroulé du projet TracVac dans son intégralité



Les résultats de ces deux cohortes sont aussi à mettre en perspective avec ceux obtenus sur cette cohorte « essai de vaccin » (non-présentées dans ce manuscrit) qui pourraient apporter des éléments de réponse notamment avec l'analyse des résultats pour le vaccin « bactérie UV-atténuée » mais aussi l'ajout d'animaux supplémentaires qui ont été simplement exposés à *C. trachomatis* dans le groupe contrôle.

### **Poursuite de l'analyse du microbiote conjonctival**

Une des pistes qui serait aussi particulièrement intéressante de poursuivre est l'analyse du microbiote. En effet, les résultats obtenus et présentés ici se sont focalisés sur la description des changements de microbiote engendrés par une infection conjonctivale standard à *C. trachomatis*. L'étape suivante serait de poursuivre ces analyses par l'étude des animaux de la cohorte « infection chronique » mais aussi des animaux des cohortes « infection aiguë » et « essai de vaccin » qui ont montré des réactions sévères à l'infection. Les différences de microbiotes constituant en effet une des hypothèses qui pourrait expliquer les différences de phénotype clinique observés [27,62,63].

## **V/ Conclusion**

En conclusion, ces deux modèles PNH reproduisent fidèlement la phase aiguë du trachome et nous a aussi permis d'étudier les premiers stades du développement d'une fibrose conjonctivale. Nos analyses montraient une réponse immunitaire adaptative et anti-inflammatoire lié à l'infection aiguë tandis que l'infection chronique était corrélée à une réponse immunitaire innée et pro-inflammatoire. Nos travaux ont permis une caractérisation de la réponse locale (immunitaire, morphologique, histologique et clinique) au cours des différentes phases du trachome (TF, TI, TS), mais suscite également des interrogations quant aux facteurs associés à l'apparition des formes sévères qui devront faire l'objet d'études supplémentaires.

# Annexes

## Annexe 1 – Grille de score clinique général.

Les critères en jaune sont spécifiques aux signes cliniques de sévérité oculaire et ont été ajoutés pour les expositions bactériennes itératives

	Catégorie	Description	Score
Observation animal vigile	Stéréotypie	Absence	0
		Présence (mouvements répétés et frénétiques causés par le stress et/ou l'ennui)	1
		Automutilation	2
	Aspect du poil	Normal (lisse et brillant)	0
		Dépilation	1
		Absence de toilette/ Hérisssé / Teme	2
	Posture corporelle / Activité (sans contention)	Normale (animal alerte et vif, contact visuel)	0
		Animal apathique, immobile OU Hyperactivité	1
		Prostration, tête baissée ou position antalgique, vocalisation OU Agressivité marquée	2
		Pas de réaction au stimulus, Animal moribond	8
	Prise alimentaire	Pas de changement	0
		Diminution de la prise alimentaire	1
		Ne s'alimente pas	2
	Boisson / Hydratation	Normal	0
		Déshydratation sévère OU polydipsie	2
	Interaction vis-à-vis de l'observateur	Animal curieux / s'approche de l'observateur / vient chercher des friandises	0
		Animal peureux / reste au fond de sa cage / ne vient pas chercher les friandises	1
		Signes visibles de stress (défécation, prolapsus, vocalise, tremblements), l'animal se cache, regard fuyant / Agressivité, intimidation	2
	Observation cage	RAS	0
		Diarrhée	1
		Vomissement	2
		Pupille dilatée (Mydriase)	2
	Frottement oculaire	Absent	0
Frottement excessif des yeux		1	
Mobilité des paupières	Yeux ouverts	0	
	1 œil fermé	1	
	2 yeux fermés	2	
Réaction à la lumière	Normal	0	
	Evitement de la lumière	2	

	Catégorie	Description	Score
Anesthésié	Body score	Bon : body score > ou = 2,5 poil brillant, non dépilé, peau saine	0
		Body score < 2,5	1
		Body score < 1 (Cachectique)	2
	Saignement conjonctival	Absent	0
		Faible saignement / après la manipulation / localisé	1
		Saignement abondant / visible avant la manipulation / nappe	2

### Score et actions à suivre :

0 = animal en bonne santé

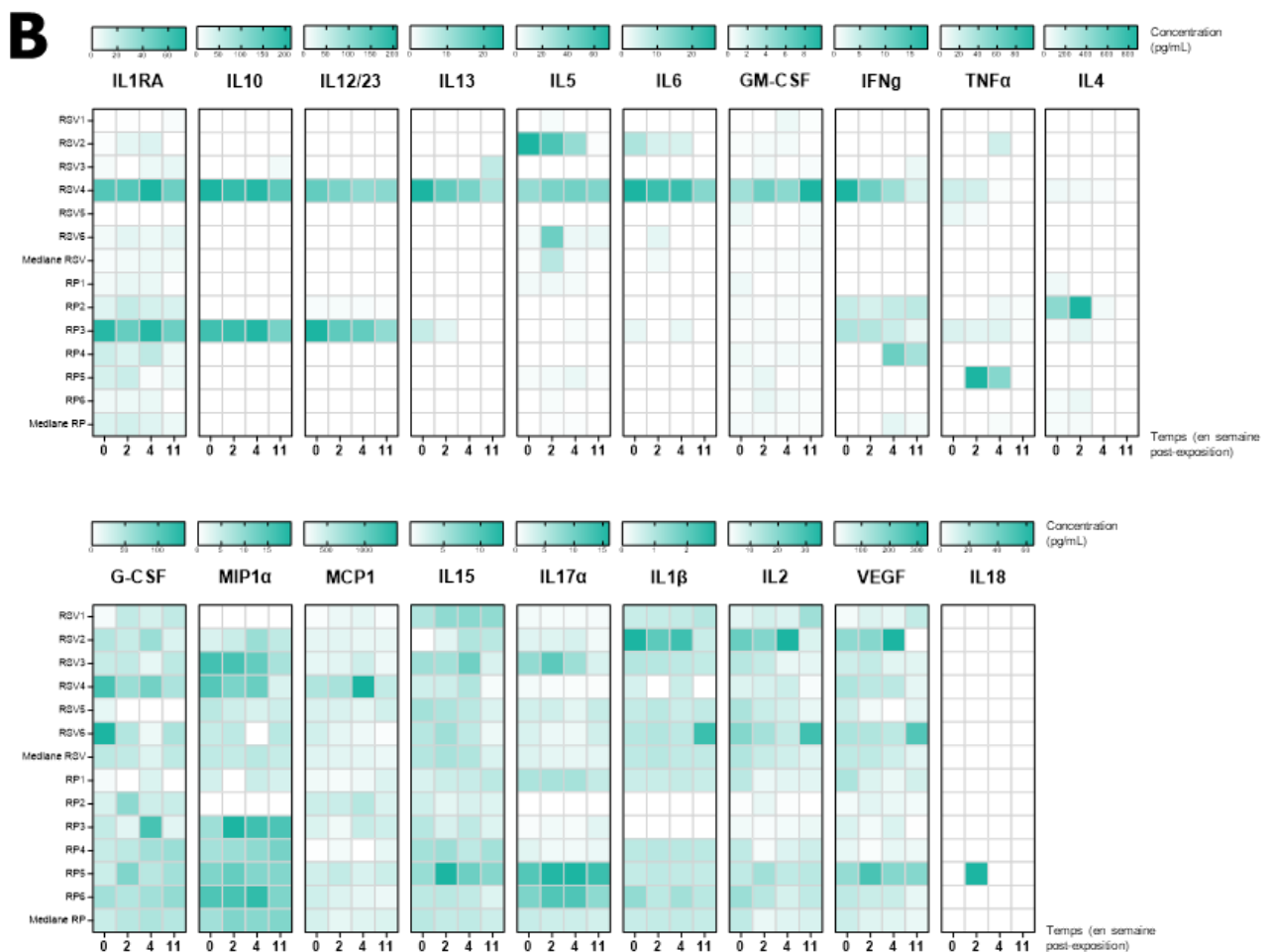
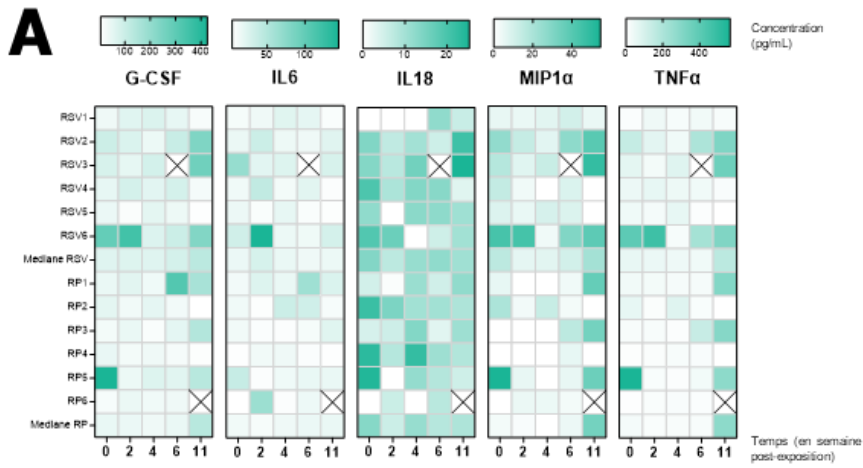
1-7 → animal en bonne santé présentant des altérations comportementales modérées

8-12 → animal présentant des altérations marquées : augmentation de la surveillance (2-3 fois par jour), apport de complément alimentaire

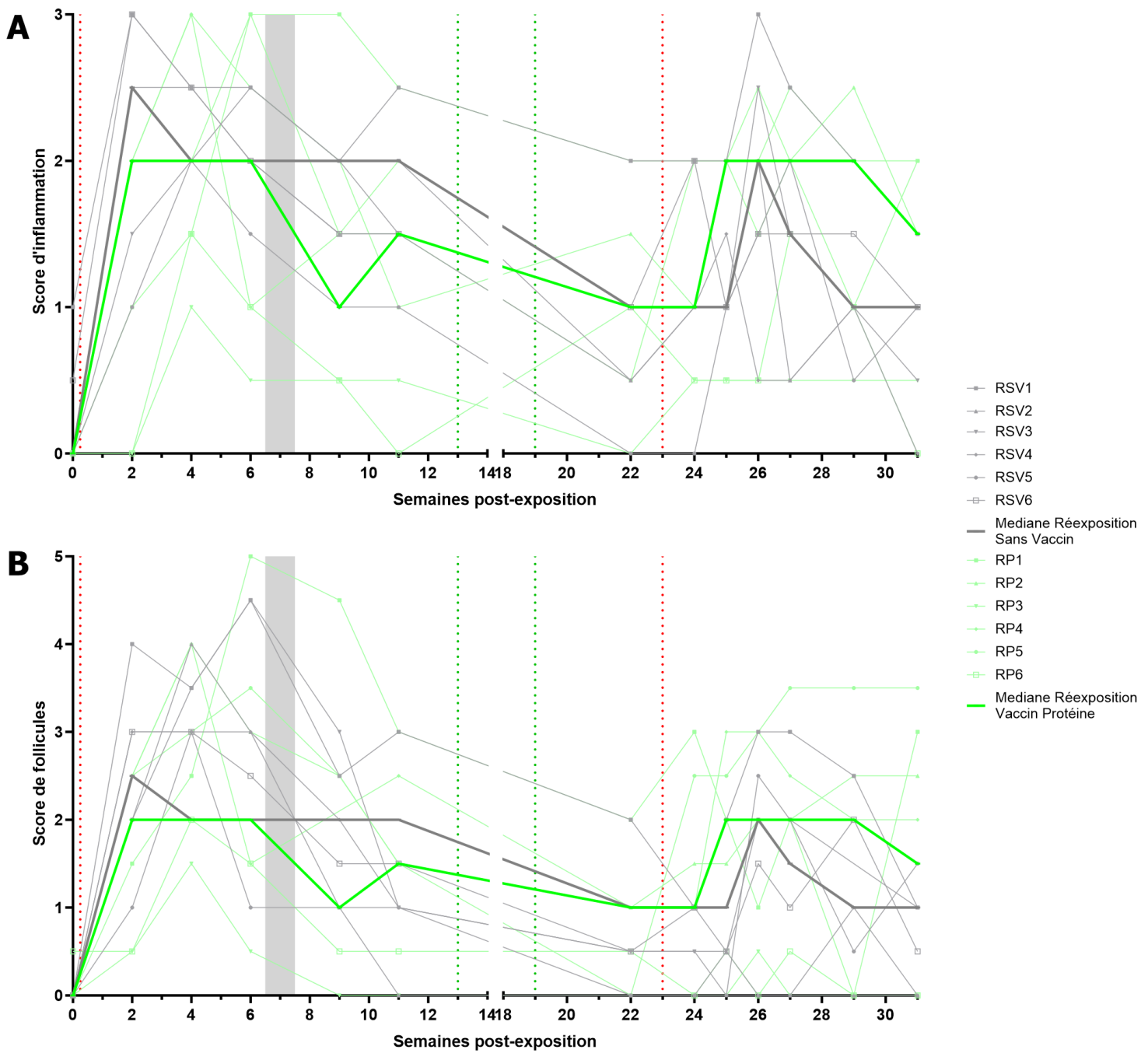
13-20 → animal en souffrance : traitement analgésique, nursing, augmentation de la surveillance

21-32 → détresse sévère, envisager l'euthanasie

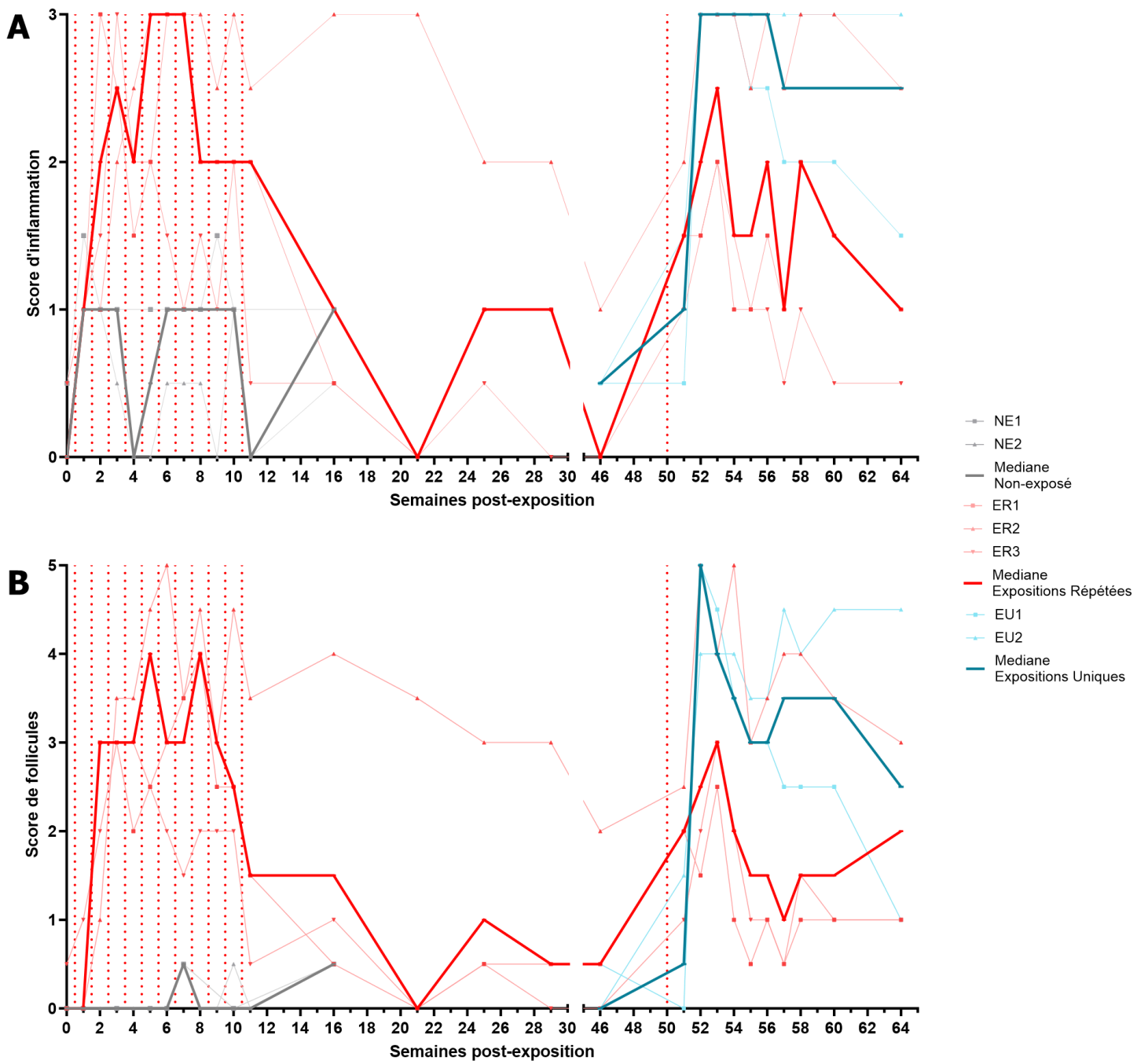
Annexe 2 – Cinétiques des cytokines lacrymales (A) et sériques (B) de la cohorte « Infection aiguë » sans changements statistiquement significatifs



Annexe 3 – Score d'inflammation (A) et de follicules (B) pour la cohorte « infection aiguë ».



Annexe 4 – Score d'inflammation (A) et de follicules (B) pour la cohorte « infection chronique ».



2

3 **Full Title:** Multimodal mucosal and systemic immune characterization of a novel non-  
4 human primate trachoma model highlights the critical role of local immunity during  
5 acute phase disease

6

7 **Short Title:** Multimodal immune characterization of acute trachoma

8

9 **Authors :** Elodie PAULET<sup>1</sup>, Vanessa CONTRERAS<sup>1#</sup>, Mathilde GALHAUT<sup>1#</sup>, Ida  
10 ROSENKRANDS<sup>2</sup>, Martin HOLLAND<sup>3</sup>, Matthew BURTON<sup>4</sup>, Jes DIETRICH<sup>2</sup>, Anne-  
11 Sophie GALLOUET<sup>1</sup>, Nathalie BOSQUET<sup>1</sup>, Francis RELOUZAT<sup>1</sup>, Sébastien  
12 LANGLOIS<sup>1</sup>, Frank FOLLMANN<sup>2</sup>, Roger LE GRAND<sup>1</sup>, Marc LABETOULLE<sup>1,5</sup>, Antoine  
13 ROUSSEAU<sup>1,5\*</sup>

14

15 **Affiliations :**

16 <sup>1</sup> Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune,  
17 Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses & Le  
18 Kremlin-Bicêtre, France

19 <sup>2</sup> Center for Vaccine Research, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.

20 <sup>3</sup> Clinical Research Department, London School of Hygiene and Tropical Medicine,  
21 London, UK

22 <sup>4</sup> International Centre for Eye Health, London School of Hygiene and Tropical  
23 Medicine, London, London, UK

24 <sup>5</sup> Service d'Ophtalmologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le  
25 Kremlin Bicêtre, France.

26

27 **#** Co-second authors as they equally contributed to this work.

28 **\*** Corresponding author, e-mail: antoine.rousseau@cea.fr

29

30 **Conflict of interest:** NA

31 **Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, trachoma, Cynomolgus monkey, Non-human  
32 primate, follicular conjunctivitis, Clinical grading score

33 **Abstract (250-300 words)**

34 **Background:** Trachoma -the leading cause of blindness worldwide as a result of  
35 infection- is caused by repeated *Chlamydia trachomatis* (Ct) conjunctival infections.  
36 Disease develops in two phases: i) active (acute trachoma, characterized by follicular  
37 conjunctivitis), then long-term ii) scarring (chronic trachoma, characterized by  
38 conjunctival fibrosis, corneal opacification and eyelid malposition). Scarring trachoma  
39 is driven by the number and the severity of reinfections. The immune system is a pivotal  
40 aspect of disease, involved in disease aggravation, but also key for exploitation in  
41 development of a trachoma vaccine. Therefore, we characterized clinical and local  
42 immune response kinetics in a non-human primate model of acute conjunctival Ct  
43 infection and disease.

44 **Methodology/Principal Findings:** The conjunctiva of non-human primate (NHP,  
45 *Cynomolgus* monkeys -*Macaca fascicularis*-) were inoculated with Ct (B/Tunis-864  
46 strain, B serovar). Clinical ocular monitoring was performed using a standardized  
47 photographic grading system, and local immune responses were assessed using multi-  
48 parameter flow cytometry of conjunctival cells, tear fluid cytokines, immunoglobulins,  
49 and Ct quantification. Clinical findings were similar to those observed during acute  
50 trachoma in humans, with the development of typical follicular conjunctivitis from the  
51 4<sup>th</sup> week post-exposure to the 11<sup>th</sup> week. Immunologic analysis revealed an early  
52 phase influx of T cells in the conjunctiva and elevated interleukins 4, 8, and 5, before  
53 a later phase monocytic influx accompanied by a decrease in other immune cells, and  
54 tear fluid cytokines returning to initial levels.

55 **Conclusion/Significance:** Our NHP model accurately reproduces acute trachoma  
56 clinical signs, allowing for the precise assessment of the local immune responses in  
57 infected eyes. A progressing immune response occurred for weeks after exposure to

58 Ct, which subsided into persistence of innate immune responses. Understanding these  
59 local responses is the first step towards using the model to assess new vaccine and  
60 therapeutic strategies to prevent disease.

61

62

63 **Author Summary (150-200 word non-technical summary)**

64 *Chlamydia trachomatis* is the leading infectious cause of blindness worldwide. The  
65 pathogenesis of trachoma is more complicated than other types of bacterial  
66 conjunctivitis: clinical signs of trachoma are rooted in repeated *Chlamydia trachomatis*  
67 infections of the inner eyelid surfaces, which roughens the skin. This lead to eyelid  
68 deformation and lashes rubbing on the cornea, which across multiple years of  
69 abrasion, ends with corneal opacification. The immune system is a pivotal aspect of  
70 disease, involved in disease aggravation, but also key for exploitation in development  
71 of a trachoma vaccine. Here we describe a non-human primate model of trachoma that  
72 accurately reproduces acute human eye disease, allowing for the precise assessment  
73 of the local immune responses in infected eyes. A progressing immune response  
74 occurred 4 weeks after exposure to Ct, which subsided into persistence of innate  
75 immune responses. Understanding these local responses is the first step towards  
76 using the model to assess new vaccine and therapeutic strategies to prevent disease.



## 77 **Introduction**

78 Trachoma is currently the leading infectious cause of blindness worldwide. In 2022,  
79 trachoma was endemic in 42 countries (mainly in Africa), with 125 million people at  
80 risk, and 1.9 million visually-impaired [1,2]. The infection is caused by *Chlamydia*  
81 *trachomatis* (Ct), a Gram-negative obligate intracellular bacteria. The natural history of  
82 disease is divided into two successive phases: i) acute (or active) phase characterized  
83 by follicular conjunctivitis, and ii) scarring (or chronic phase) characterized by  
84 conjunctival fibrosis, eyelid malposition, and trichiasis ultimately causing corneal  
85 opacification [3,4]. Scarring or chronic trachoma develops over multiple years and after  
86 repeated Ct infections [5].

87 The *World Health Organization* (WHO)'s SAFE (*Surgery, Antibiotic, Facial cleanliness,*  
88 *and Environmental changes*) strategy, implemented in endemic zones by local  
89 ministries of health, efficiently reduced trachoma prevalence [6]. However, there are  
90 major drawbacks limiting long term efficacy of mass drug administration (MDA)  
91 preventive campaigns to combat trachoma. They include: i) off target antimicrobial  
92 resistance [7], ii) possible skewing of gut microbiome [8], iii) requirement of multiple  
93 rounds of treatment in some populations [5,9], iv) long term commitment of donor  
94 organizations to the control programs, v) a need for (and sometimes lack of) continued  
95 surveillance, and vi) absence of improvement in environmental and socio-economic  
96 conditions alongside control by MDA [10]. Altogether, a goal of eradication (rather than  
97 elimination) would only be achieved with a vaccine. Therefore, development of a  
98 vaccine strategy seems necessary to address these pitfalls in endemic areas [9,11].  
99 Previous vaccine strategies have passed through different preclinical models and into  
100 human trials, but with mixed results [12–15]. A more precise understanding of  
101 trachoma pathogenesis and host-pathogen interactions are crucial for the identification

102 of correlates of protection and the development of preventative strategies. While the  
103 extrinsic etiological agent of trachoma is Ct conjunctival infection, pathogenesis likely  
104 involves a substantial level of immune-mediated inflammation [3,4,16–18]. The  
105 crosstalk between Ct infection and the immune response during trachoma  
106 pathogenesis, is complex and undeciphered. However, in recent years significant  
107 advances have been made in understanding the immune response during trachoma  
108 pathogenesis [16]; with the role of non-specific and specific T cell responses being  
109 identified as essential for Ct clearance but concomitantly causing tissue damage [18];  
110 neutrophil-mediated hyperinflammation has been shown in model infections to have  
111 negative consequences on ocular tissue damage and destruction [17,19]; and  
112 including changes in disease biomarkers, such as local cytokines during different  
113 trachoma stages [20]. However, studies are mostly cross-sectional, and published  
114 longitudinal data remains scarce, leaving open opportunities to improve  
115 comprehension of trachoma pathogenesis, which will be needed in the evaluation of a  
116 Ct vaccine. Improving our understanding of the precise mechanisms by which Ct  
117 triggers trachoma clinical and biological features requires longitudinal data in a relevant  
118 animal model. In this regard, NHP models are especially interesting due to their  
119 similarities with human immune responses and clinical manifestations [21,22].

120 We developed a NHP trachoma model that involved Ct ocular infection in macaques,  
121 which elicited follicular conjunctivitis that reproduced human features of acute  
122 trachoma [3,13,23]. We then characterized dynamics of local immune responses over  
123 time using a combination of multiparameter flow cytometry performed on conjunctival  
124 cells, tear and serum cytokine analysis, and Ct-specific immunoglobulin quantification.

## 125 **Methods**

### 126 **Animals & Ethics statements**

127 Six males (Group 1) and 12 females (Group 2) of *Cynomolgus* monkeys  
128 (*Macaca fascicularis*), aged 57 to 97 months for Group 1, and aged 36 to 38 months  
129 for Group 2, were used in this study. All animals were derived from Mauritius Island  
130 AAALAC-certified primate breeding facilities, and were housed in IDMIT's animal  
131 facility (CEA, Fontenay-aux-roses, France, authorization #D92-032-02, Préfecture des  
132 Hauts de Seine, France) in individual cages during acute infectious phase, under BSL-  
133 2 containment.

134 General observations were conducted daily to assess well-being. Additionally, body  
135 weight and rectal temperature were monitored at each sampling time-point, along with  
136 a complete blood cell count (see Study Design). All experimental procedures were  
137 conducted according to European guidelines for animal care ("Journal Officiel de  
138 l'Union Européenne", directive 2010/63/UE, September 22, 2010), and according to  
139 CEA institutional guidelines. The animals were anesthetized using intramuscular  
140 tiletamine (Zoletil 100®, 5mg/kg). Experimental protocols were approved by the  
141 institutional ethical committee (#17\_072 (Group 1) and #21\_008 (Group 2)), and were  
142 authorized by the "Research, Innovation, and Education Ministry" under registration  
143 number APAFIS#720-201505281237660 (Group 1), and APAFIS#31037-  
144 2021041418019968v1 (Group 2).

145

### 146 **Bacterial strain, exposure and treatment**

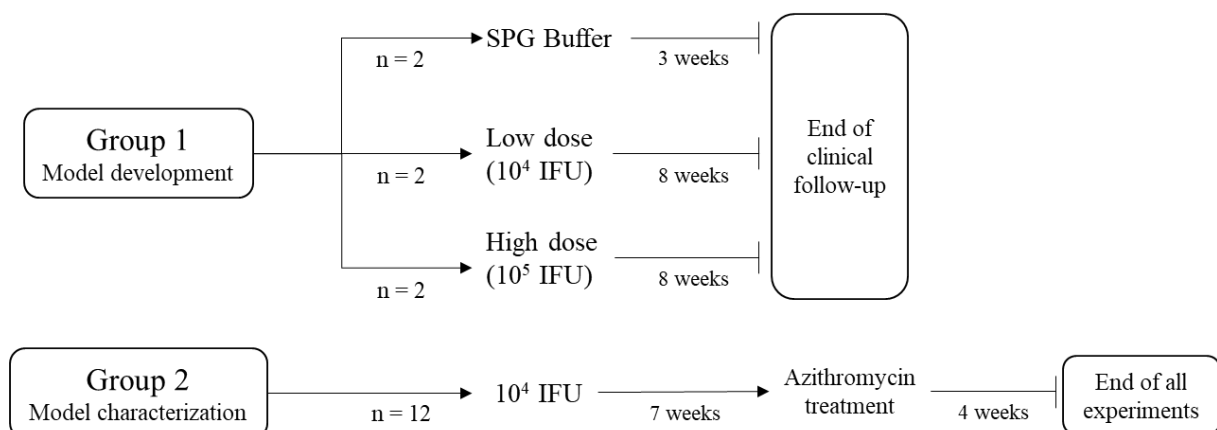
147 B/Tunis-864 strain (B serovar) of *Chlamydia trachomatis* (Ct) was provided by the  
148 Statens Serum Institut (SSI, Copenhagen, Denmark). Bacteria were titrated and stored  
149 at -80°C at a concentration of  $8 \times 10^5$  infection forming units (IFU)/ $\mu\text{L}$ , then diluted in

150 SPG buffer (sucrose 0.2M, sodium phosphate 20mM, and glutamic acid 5mM, pH 7.4)  
 151 before administration at a final concentration of  $2 \times 10^4$  IFU/ $\mu$ L. Animals were inoculated  
 152 with 20  $\mu$ L of diluted bacteria using a micropipette, in both the inferior and superior  
 153 conjunctival fornices of both eyes. Mock inoculated controls received only SPG buffer.  
 154 At 7 weeks post-exposure (p.e.), animals in Group 2 received oral azithromycin  
 155 (40 mg/kg, then 20 mg/kg daily, for 4 days).

156

### 157 Study design

158 In a pilot study (Group 1), exposed animals to  $10^4$  (Low dose, n = 2) or  $10^5$  (High dose,  
 159 n = 2) IFU/eye, or SPG buffer alone (SPG Buffer, n = 2), were followed with a  
 160 standardized clinical follow-up throughout the study period, to define an appropriate  
 161 challenge dose, and to determine a clinical grading scale. The exposure dose of  
 162  $10^4$  IFU/eye was then selected for further characterization of immune responses,  
 163 clinical symptoms, and bacterial load profiles in the Group 2 (n = 12) (**Fig 1**). All animals  
 164 underwent identical standardized clinical follow-up throughout the study period.



165

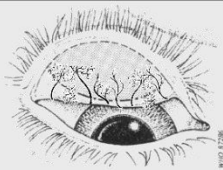

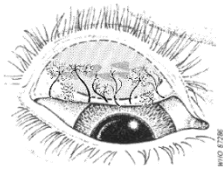

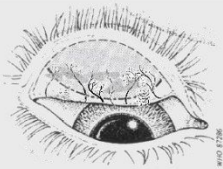

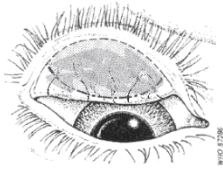

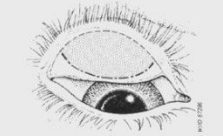

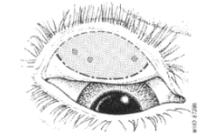

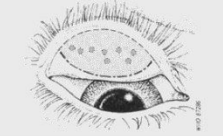

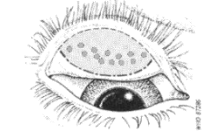

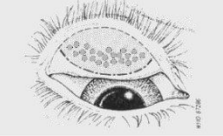

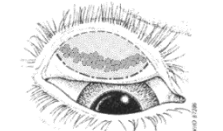

166 **Fig 1.** Study design. Group 1 was used to select an exposure dose while group 2 was  
 167 used to characterize clinical manifestation, local and systemic immune response, and  
 168 bacterial load.

169

## 170 **Conjunctival clinical scoring**

171 Conjunctival clinical scoring was carried out using a customized clinical score  
172 assessed on ocular surface photographs (**Fig 2**). This score derived from the *WHO*  
173 *trachoma enhanced (FPC) grading scale* [24] and modified for compatibility with  
174 specific requirements of our model (**Fig 2**). Final score was calculated by adding the  
175 two components of the score: inflammation (graded on a scale of 0 to 3) and follicle  
176 (graded on a scale of 0 to 5), resulting in a maximum score of 8. Inflammation grading  
177 evaluates conjunctival edema, thickening, and the extent of hidden blood vessels.  
178 Follicle grading involves counting follicles in a predefined crescent-shaped zone of the  
179 upper tarsal conjunctiva (**Fig S1**).

180 Ocular surface photographs were captured following a standardized protocol, in brief:  
181 under general anesthesia, animal lying in supine position, upper eyelids were gently  
182 everted using a spatula, then held in place using blunt forceps (Dutscher, 956507).

	Diagram	Grading	Characteristics	Clinical pictures
I N F L A M M A T I O N		<b>0</b>	No inflammation	
		<b>1</b>	Minimal inflammation Papillae, no obscured vessels	
		<b>2</b>	Moderate inflammation Inflammatory thickening, hazy vessels on less than half of the surface	
		<b>3</b>	Pronounced inflammation Thick and opaque conjunctiva, hidden vessels on more than half of the surface	
F O L L I C L E S		<b>0</b>	No follicles	
		<b>1</b>	1 – 5 follicles	
		<b>2</b>	6 – 10 follicles	
		<b>3</b>	11 – 20 follicles	
		<b>4</b>	21 – 30 follicles	
		<b>5</b>	> 30 follicles	

183

184 **Fig 2.** Conjunctival clinical scoring. Final score is calculated by adding the two  
 185 components of the score: inflammation (graded on a scale of 0 to 3) and follicle (graded

186 on a scale of 0 to 5), resulting in a maximum score of 8. Inflammation grading evaluates  
187 conjunctival edema, thickening, and the extent of hidden blood vessels. Follicle grading  
188 involves counting follicles in the central region of the upper tarsal conjunctiva. To obtain  
189 clear visibility, the upper eyelid was everted using a metal spatula and held in place  
190 with blunt forceps. Clinical photographs were captured while the animals were under  
191 general anesthesia. The schematic diagram of the upper tarsal conjunctiva was  
192 adapted from the World Health Organization© with permission.

193

194 An EOS 80D camera (Canon), equipped with a Macro 100mm Image stabilizer  
195 ultrasonic lens (Canon), and a Macro ring lite MR-14EXII circular flash (Canon), was  
196 mounted to a generic stand, facing down and positioned approximately 20cm above  
197 the eye of interest. Focus was set on the upper tarsal conjunctiva. Photographs were  
198 anonymized before scoring for inflammation grading and follicle counting by three  
199 independent observers masked to experimental group (A.R., E.P., M.G.), including one  
200 ophthalmologist trained and sub-specialized in human ocular surface infections (A.R.).  
201 Both eyes were scored independently by each observer. For each photograph, the  
202 scoring process involved the following criteria: i) if all three observers reached a  
203 consensus, the score was validated; ii) if two out of the three observers agreed, with  
204 the third observer differing by only 1 point on the clinical grading scale, the agreed-  
205 upon score was retained; and iii) if all three observers disagreed or if one observer had  
206 a score differing by more than 1 point with the two others, a second round of masked  
207 grading, involving all three observers, was conducted and the same criteria reapplied.  
208 As both eyes were inoculated with the same protocol, the average score of both eyes  
209 was used as the final score for each animal.

210

## 211 **Bacterial load quantification**

212 Conjunctival swabbing was performed at the inferior conjunctival fornices instead of  
213 superior as to not influence clinical scoring and conjunctival imprinting. They were then  
214 placed in 1mL of room temperature Amies medium, from which DNA was extracted  
215 with QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed to assess the  
216 bacterial load using the Presto combined qualitative real-time CT/NG assay (Goffin  
217 Molecular Technologies, CG160100, and primer set previously described [25] CtPI+  
218 5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3' and CtP2 5'-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3')  
219 and using a CFX96TM real-time thermocycler (Bio-Rad)). The bacterial load,  
220 expressed in IFU-equivalent copies, was calculated by the thermocycler software, from  
221 a standard curve (obtained from  $4 \times 10^5$  to  $4 \times 10^0$  IFU/mL of bacterial stock strain  
222 B/Tunis-864 diluted in dPBS 1X). The limit of detection was fixed as 4 equivalent  
223 IFU/mL and limit of quantification at 40 equivalent IFU/mL.

224

## 225 **Cytokines quantification**

226 Tears were collected with Dina strip Schirmer-Plus<sup>®</sup> tear test kits (Coveto, France),  
227 with the test strip placed on the inferior conjunctival fornices until no more impregnation  
228 is observed (generally 2-3 minutes). 50 $\mu$ L of NaCl were then added to the strip before  
229 being centrifuged (19,000 x g for 20 minutes, Sigma 3-16PK) to extract the tears. Bead-  
230 based Luminex<sup>®</sup> multiplex assay protocol (Milliplex Map, PRCYTOMAG-40K) was  
231 performed on 25 $\mu$ L of diluted tears (completed with PBS to obtain a total of 70 $\mu$ L) to  
232 quantify cytokine concentrations (G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-  
233 5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23(p40), IL-13, IL-15, IL-17 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ ,  
234 sCD40L, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, and IL-18). The same panel and protocol were applied  
235 to 25 $\mu$ L of undiluted serum samples for cytokine quantification.



236

### 237 **Conjunctival imprinting and flow cytometry**

238 Local cellular immune infiltrates were evaluated through flow cytometric analysis of  
239 fluorescent antibody-labelled superficial conjunctival cell samples. Upper tarsal  
240 conjunctiva were gently dried with compresses. Imprints were harvested using 1.6 cm  
241 x 0.6 cm semi-oval pieces of nitrocellulose membrane (Supor® PES Membrane disc  
242 filters, 0.2 µm 47 mm, ref-66234, Pall, Ann Arbor, Michigan, USA), which were applied  
243 to the upper tarsal conjunctiva with gentle pressure. The membrane was then carefully  
244 removed and placed into phosphate buffer saline (PBS). After 1 hour of gentle agitation  
245 at RT, cells adsorbed onto the membrane were eluted using a flushing technique, as  
246 described previously [26]. Eluted cells were blocked with 10% rat serum before  
247 labelling with a panel of fluorescently-conjugated antibodies: CD326 (EpCam)-PE  
248 (clone 1B7, Thermo Fischer 12-9326-42), HLA-DR-AF700 (clone L243 G46-6, BD  
249 560743), CD45-BV786 (clone D058-1283, Becton Dickinson 563861), CD66-FITC  
250 (clone TET2, Miltenyi 130-116-663), CD14-BUV737 (clone M5E2, Becton Dickinson  
251 612764), CD3-BUV395 (clone SP34-2, Becton Dickinson 564117), CD8-BUV805  
252 (clone SK1, Becton Dickinson 612890), CD4-BV421 (clone L200, Becton Dickinson  
253 562842), CD20-PE-Cy7 (clone 2H7, Becton Dickinson 560735), CD159a(NKG2A)-  
254 APC (clone Z199, Beckman Coulter A60797). The samples were then fixed with BD  
255 Cellfix (Becton Dickinson 340181), and acquisition was performed using a 5-laser 27-  
256 filter ZE5 flow cytometer (Bio-Rad). Data were analyzed using FlowJo software  
257 (v10.8.1, Becton Dickinson). The gating strategy was designed to quantify immune  
258 subsets: neutrophils, monocytes, T lymphocytes, B lymphocytes, and natural killer  
259 (NK) cells (**Fig S2**). Leucocyte counts (CD45+ cells) were normalized for 50,000

260 observed cells, and all other immune populations were normalized for 100 leucocytes  
261 (to obtain proportions of immune cell populations expressed as percentage).

262

### 263 **Serum and tear IgG and IgA quantification**

264 An indirect quantitative ELISA was used to measure specific anti-Ct IgG and IgA  
265 antibodies in serum and tears. Positive IgG and IgA references were arbitrarily  
266 assigned a value of 5 ELISA-Units/ml (AEU/ml). MaxiSorp plates (NUNC, Denmark)  
267 were coated overnight at 4°C with 4 µg/ml UV-inactivated B/Tunis-864 Ct elementary  
268 bodies in carbonate buffer pH 9.6. Plates were washed with PBS containing 0.05%  
269 Tween 20 and blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Serum and tear  
270 samples were tested in duplicate, by 2-fold serial dilution in PBS with 1% BSA. IgA and  
271 IgG were detected by goat α-Human Fc IgA-Biotin conjugate and goat α-Human Fc  
272 IgG-Biotin conjugate (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) diluted 1:20,000 in  
273 PBS with 1% BSA and incubated for 1 hour at 37°C. This was followed by incubation  
274 for 40 minutes in a dark room with Poly-HRP40 (Fitzgerald, Acton, MA, USA) diluted  
275 1:20,000 in PBS with 1% BSA. Detection substrate was TMB-PLUS (Kem-En-TEC,  
276 Denmark), the reaction was stopped with 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance was recorded  
277 at 450 nm (after subtraction of the background absorbance value measured at 620  
278 nm). The IgG and IgA references were then used to establish a standard curve for the  
279 determination of titers in arbitrary ELISA Units/ml (AEU/ml) based on a five-parameter  
280 logistic curve using the package 'drc' in R (version 4.3.1) [27].

281 For determination of total IgG and IgA in tears, the same ELISA protocol (MaxiSorp,  
282 Nunc) was used except that plates were coated with anti-human kappa and lambda  
283 light chain specific mouse antibodies (Southern Biotech) at 1:1 ratio diluted to 1 µg/ml  
284 in PBS overnight. Purified human IgG and IgA were used as standards (Sigma, St.

285 Louis, MO, USA). Tear samples were tested by 4-fold serial dilution, and serial 2-fold  
286 dilutions of IgG and IgA standards were applied. Total IgG and IgA were calculated  
287 from the IgG and IgA standard curves based on a five-parameter logistic standard  
288 curve.

289

## 290 **Statistical analysis**

291 Correlation between multiple parameters was assessed using the non-parametric  
292 Spearman correlation test, with a two-tailed p-value, performed using R software  
293 (version 4.3.1) [27]. For each combination of two parameters, this analysis assigned a  
294 correlation factor ( $r$ ) from -1, a maximum negative correlation to 1, a maximum positive  
295 correlation, and the p-value. For all other statistical analyses, particularly to confirm  
296 significant differences during longitudinal observation, the Wilcoxon test as well as the  
297 Friedman test (with a two-stage linear procedure correction) were conducted using  
298 Prism (GraphPad version 9.5.1).

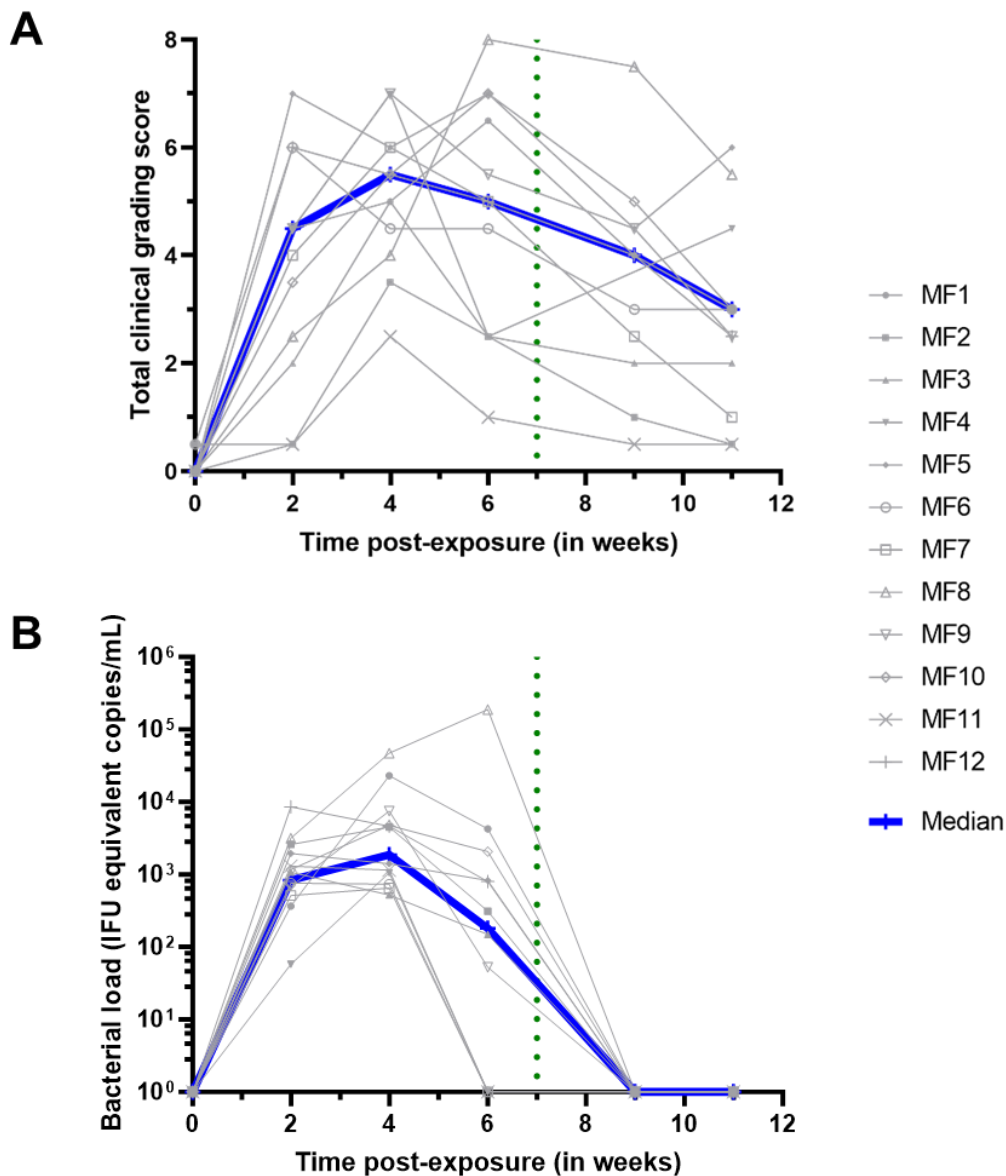
## 299 **Results**

### 300 **Clinical manifestations of the conjunctival infection**

301 Two doses of inoculum were initially tested in a pilot study (**Fig 1**) to determine the  
302 lowest dose of Ct that gave disease in 100% of animals. From week 1 post infection,  
303 both animals in both groups exhibited clinically-defined acute trachoma, characterized  
304 by the presence of combined conjunctival follicles and inflammation (**Fig S3**). SPG  
305 Buffer mock-inoculated controls maintained a conjunctival clinical score  $\leq 2$  for the  
306 follow-up period (**Fig S3**). Subsequent experiments were conducted using the lower  
307 dose inoculum ( $10^4$  IFU) as it could elicit measurable disease in both animals.

308 Clinical conjunctival scoring and bacterial load quantification were performed for up to  
309 11 weeks in monkeys (n = 12, MF1-12) infected with  $10^4$  IFU of Ct (Group 2). At  
310 baseline, follicles (11/12, **Fig S4A**) and inflammation (10/12, **Fig S4B**) were almost  
311 completely absent. The outliers for follicles or inflammation were mild (scoring 1 and  
312 0.5, for inflammation by MF5 and MF6, respectively, and a 0.5 follicle score for MF2).  
313 Follicular conjunctivitis was observed in all animals from 2 weeks post-exposure (p.e.)  
314 (12/12,  $p < 0.0001$ ), with 8/12 also demonstrating inflammation (median score = 2)  
315 (**Fig S4A and B**). Clinical scores peaked at 4 weeks p.e. and then steadily decreased  
316 (**Fig 3A**). Although at 6 weeks p.e., higher than the average clinical scores were  
317 recorded for almost half of the group (n=5 animals) until the end of the study. At week  
318 6, inflammation score decreased for 5/12 animals. However, median clinical scoring  
319 decreased *post* azithromycin treatment (p.t.), as 10/12 animals demonstrated  
320 decreases in inflammation (**Fig S4B**).

321



322

323 **Fig 3.** Ocular manifestations and bacterial load follow-up. The baseline was adjusted  
 324 to week 0. All animals were infected with *C. trachomatis* (Ct) at week 0. The green  
 325 dotted line represents the azithromycin treatment. (A) Ocular clinical grading scores  
 326 were assessed using the *Clinical Grading Scale* (**Fig 2**) by three masked observers.  
 327 The scores represent the average of both eyes and the three observers. The total  
 328 clinical grading score for group 2 was determined by combining the inflammation and  
 329 follicular scores (individual scores can be found in **Fig S4**). The Friedman test, with a  
 330 two-stage linear step-up procedure correction by Benjamini, Krieger, and Yekutieli,

331 confirmed significant changes over the course of the study. (B) Bacterial load  
332 quantification is expressed in IFU equivalent copies/mL. Experiments were performed  
333 for group 2 by conducting qPCR on DNA extracted from ocular fluids.

334

335

336 All other clinical parameters, including weight, temperature, and complete blood count,  
337 remained stable throughout the study, except for blood neutrophils, which increased  
338 following exposure to Ct (**Fig S5**).

339

#### 340 **A robust conjunctival Ct infection**

341 Conjunctival infection was monitored by changes in bacterial load, characterized by  
342 Ct-specific genomic qPCR (**Fig 3B**). All animals harbored Ct infection, which was  
343 detected at the first time-point of testing (2 weeks p.e.). Peak bacterial load was  
344 measured mainly 4 weeks p.e., and decreased in all animals except in one (MF8),  
345 which kept rising until after p.t.. In 4/12 animals, the bacterial load dropped to  
346 undetectable levels at 6 weeks p.e. In the 8/12 remaining animals with detectable load  
347 at week 6, bacterial load in all eyes dropped to undetectable levels by week 9, which  
348 was 2 weeks p.t. (**Fig 3B**).

349 These data demonstrate robust conjunctival Ct infection of all monkeys to produce  
350 scorable clinical disease.

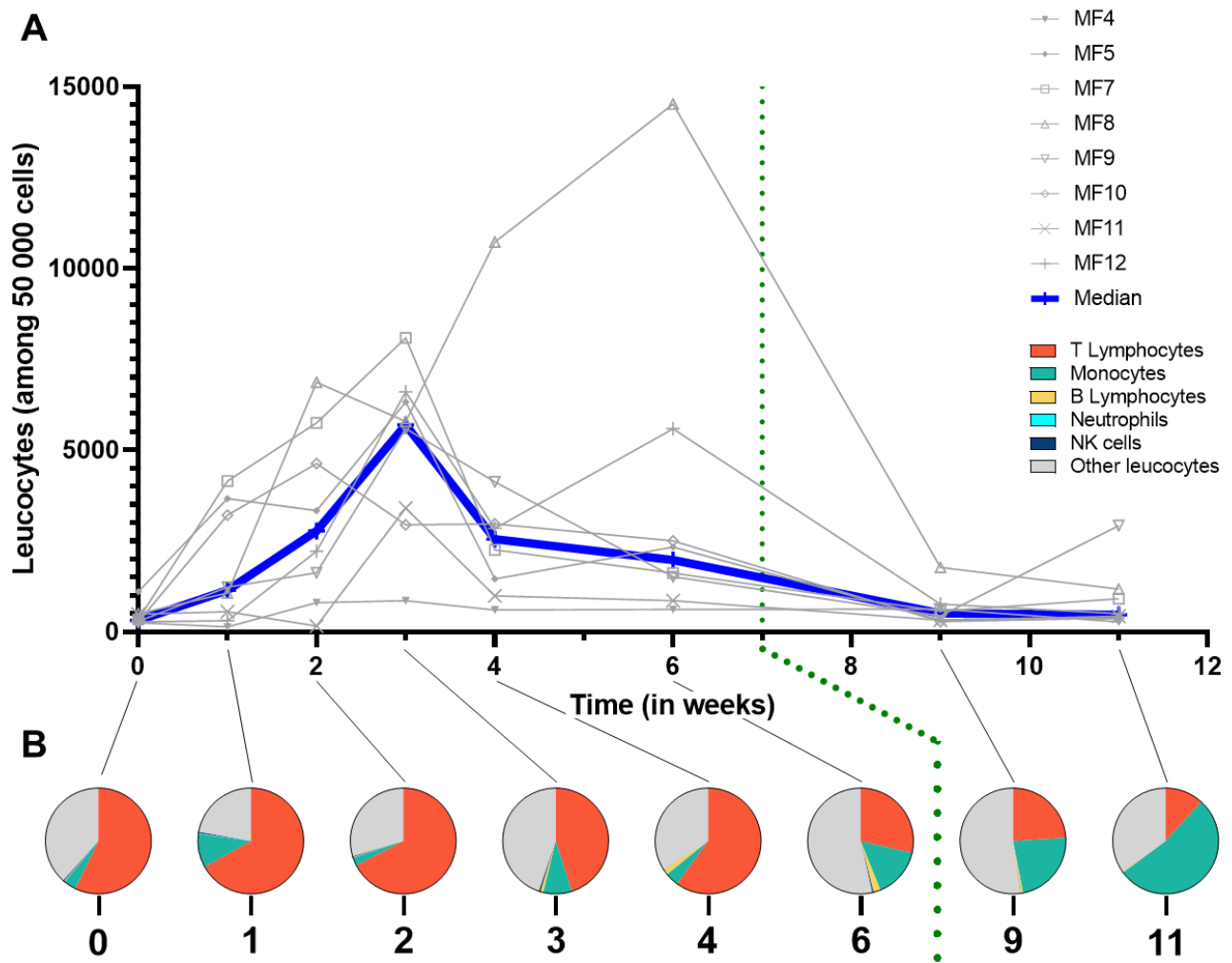
351

#### 352 **Assessment of conjunctival immune responses**

##### 353 **Immune cell populations at the ocular surface**

354 Flow cytometry was performed on conjunctival cells sampled during the course of  
355 infection, to assess the major constituents of the local immune response. Leucocyte

356 numbers (CD45<sup>+</sup> cells normalized to 50,000 observed cells) had increased at 1 week  
357 p.e., and peaked mainly at 3 weeks p.e. ( $p = 0.0078$  baseline vs week 3 p.e. (**Fig 4A**)).  
358 The most common leucocytes detected by sampling were T cells, monocytes, and  
359 “other leucocytes”, defined as CD45<sup>+</sup> cells negative for all other immune markers  
360 (**Fig S2**). During the first 2 weeks p.e., the proportion of T cells increased slightly from  
361 baseline ( $57 \pm 8\%$  to  $67 \pm 9\%$ ,  $p = 0.1210$ ), and remained stable (**Fig 4B**). Between  
362 weeks 3 and 4, T cells proportions fluctuated and by week 6 this compartment had  
363 contracted. Interestingly, between weeks 3 and 6 p.e., B cells (CD20<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup>-double  
364 positive CD45<sup>+</sup> cells) were detected in significant proportions, with the highest  
365 proportion at 6 weeks p.e. ( $2.14 \pm 0.57\%$ ,  $p = 0.0156$  week 6 vs week 1 p.e.) (**Fig 4B**).  
366 The frequencies of monocytes fluctuated from week 1 to week 4 p.e. without significant  
367 differences from baseline ( $p = 0.8750$ ), then their proportion among leucocytes steadily  
368 increased from 6 weeks p.e., with the highest proportion observed at 11 weeks p.e.  
369 ( $53 \pm 9\%$  of all immune cells,  $p = 0.0078$  week 11 (final time tested) vs week 1 p.e.).  
370 Negligible proportions of neutrophils (CD66<sup>+</sup> cells) and natural killer (NK, CD159a-  
371 NKG2A<sup>+</sup> cells) cells were observed throughout the study period (less than 1% of  
372 immune cells).  
373 These data demonstrate local fluctuations of key immune subsets responding to acute  
374 Ct infection and its treatment.



375 **Fig 4.** Multiparametric flow cytometry of superficial conjunctival cells. (A) Leucocytes  
 376 count normalized for 50,000 cells. (B) Specific immune population proportion  
 377 normalized for 100 leucocytes. The baseline was adjusted to week 0. All animals were  
 378 infected with *C. trachomatis* at week 0. The green dotted line represents azithromycin  
 379 treatment. Other leucocytes category represents non-identified immune cells. The  
 380 Friedman test, with a two-stage linear step-up procedure correction by Benjamini,  
 381 Krieger, and Yekutieli, confirmed significant changes over the course of the study.

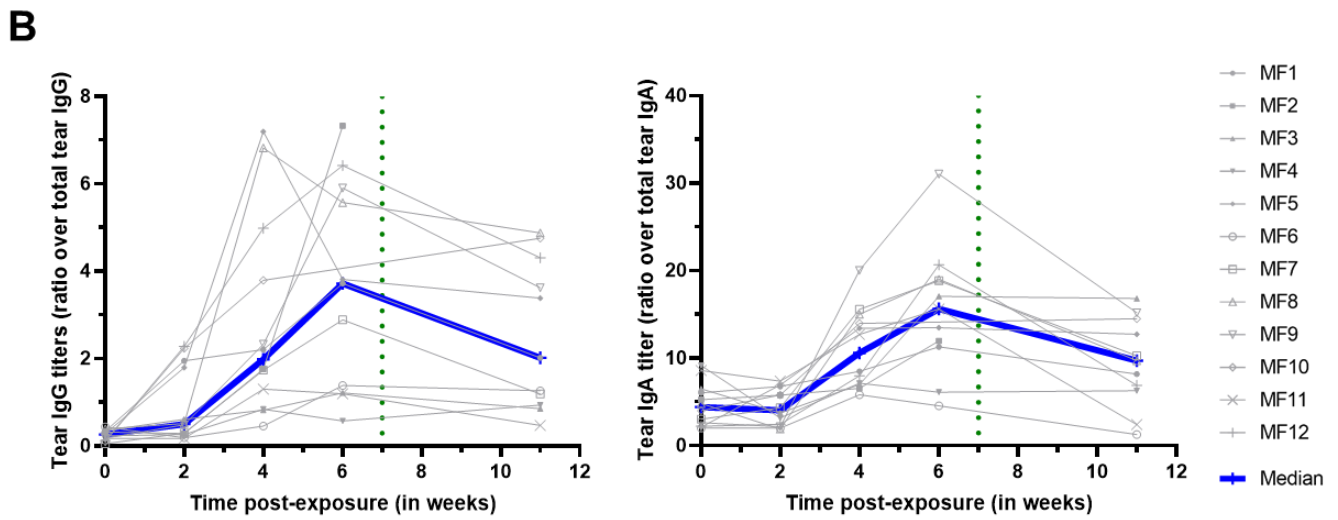
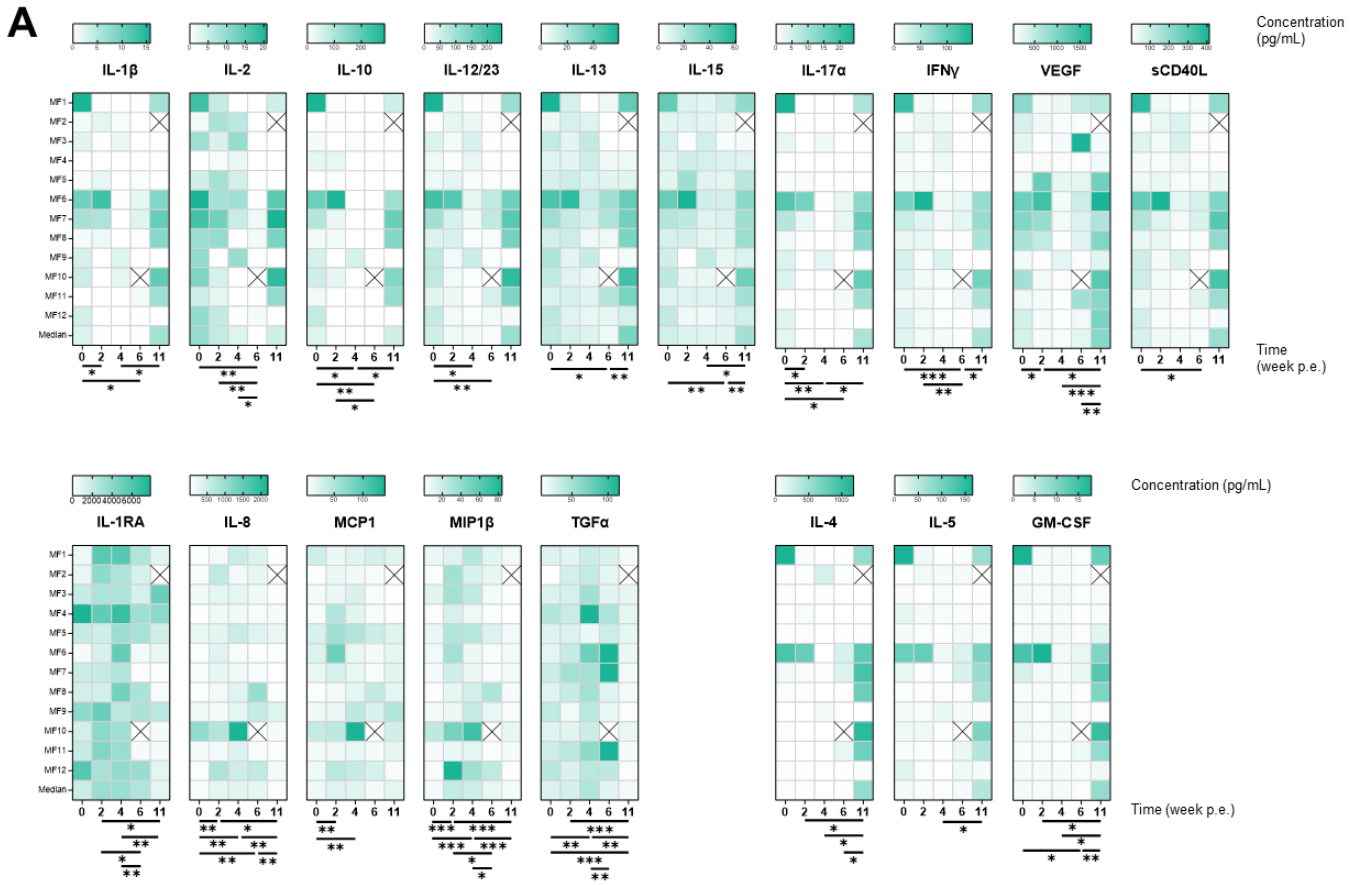
382

### 383 **Dynamics of cytokine secretion in response to Ct at the conjunctiva**

384 To explore local immune responses further, ocular surface cytokines were quantified  
 385 using Luminex (**Fig 5A**). Most cytokines were consistently detected from the



386 conjunctiva of animals before infection, at baseline. Some cytokines (TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ,  
387 IL-6, IL-18, and G-CSF) concentration did not significantly change after exposure to Ct  
388 (**Fig S6**). Cytokines VEGF, IL-12/23, IL-13, IL-17 $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-15, sCD40L  
389 and IL-1 $\beta$  decreased between weeks 4 or 6, or during both, but rebounded at week 11  
390 p.e., to higher levels than original baselines, and in more animals. Meanwhile, the  
391 pattern of detection was different for TGF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, and IL-1RA, which  
392 increased at some point between weeks 2 to 6 p.e. ( $p=0.0239$ ,  $0.0003$ ,  $0.0068$ ,  $0.0239$ ,  
393 and  $0.0049$  at peak respectively), but then subsided by week 11. Finally, a fourth  
394 pattern was observed with cytokines IL-4, IL-5 and GM-CSF remaining low through the  
395 course of the experimental period, then increasing drastically only at week 11. These  
396 results demonstrated 4 different conjunctival cytokine response patterns to Ct, which  
397 either did not change significantly, increased or decreased in correlation to bacterial  
398 load, or increased following treatment when bacterial load was abolished.



399 **Fig 5.** Cytokines and Ig secretion in tears. The baseline was adjusted to week 0. (A)  
 400 Cytokines quantification performed by Luminex on tears. The Friedman test, with a  
 401 two-stage linear step-up procedure correction by Benjamini, Krieger, and Yekutieli, was  
 402 utilized to confirm significant changes over the course of the study. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  
 403 \*\*\*  $0.0001 < p < 0.001$ , \*\*  $0.001 < p < 0.01$ , \*  $0.01 < p < 0.1$ . (B) IgG and IgA quantification

404 performed by specific ELISA assay on tears. Results are shown as a ratio of Ct-specific  
405 tear Ig over total tear Ig.

406

#### 407 **Increased local IgA and IgG in response to Ct exposure at the conjunctiva**

408 IgA and IgG specific to Ct elementary bodies were quantified from tears to determine  
409 the local adaptive humoral response to conjunctival Ct exposure. IgG increased  
410 comparably at 2 weeks p.e. ( $p=0.021$ ), then both IgG and IgA peaked between 4 and  
411 6 weeks p.e. ( $p=0.001$  and  $0.002$  between weeks 0 and 6 for IgG and IgA respectively),  
412 and then decreased at 11 weeks p.e. ( $p=0.0098$  and  $0.0039$  for IgG and IgA  
413 respectively) (**Fig 5B**). These data demonstrated that local adaptive humoral  
414 responses developed over the first 6 weeks p.e.

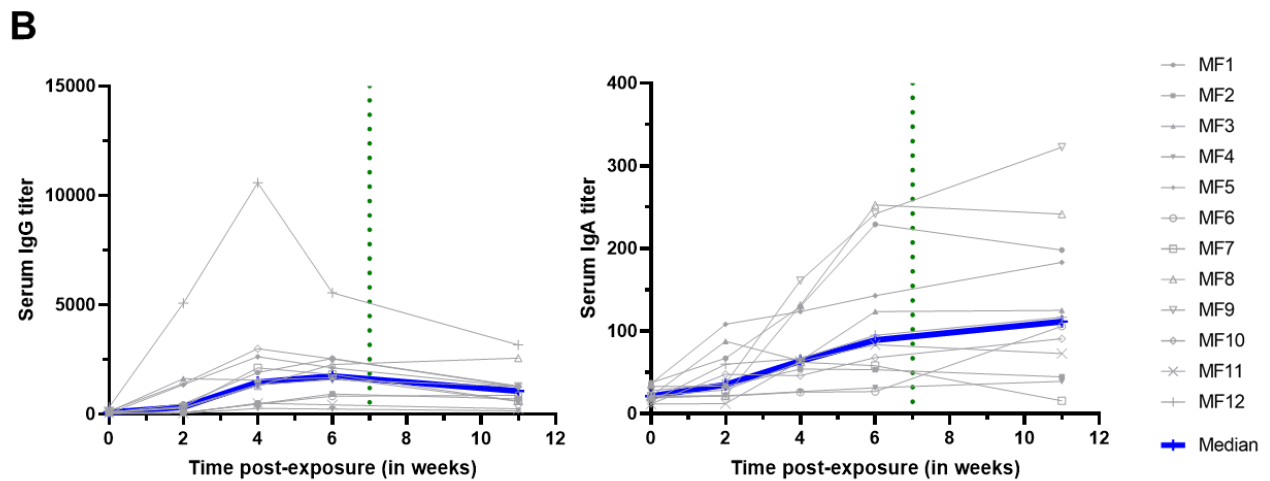
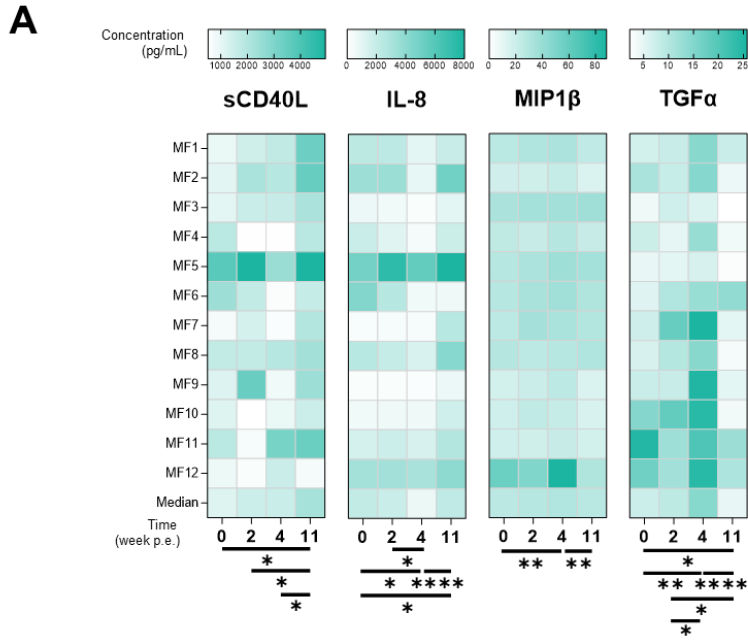
415

#### 416 **Systemic response to conjunctival Ct exposure**

417 Serum cytokines and specific IgG and IgA were measured also from sampled serum.  
418 Interestingly, the pattern of TGF- $\alpha$  detection in serum matched the fluctuations  
419 observed in tears, increasing to peak at 4 weeks p.e., then subsiding by week 11  
420 (**Fig 6A**). In contrast, sCD40L continued to increase in serum at each time-point  
421 tested, to peak at week 11 p.e.. IL-8 in serum decreased by 4 weeks p.e., only to  
422 rebound to higher levels than initial baseline levels at week 11 (the inverse to detection  
423 pattern in tears). MIP-1 $\beta$  detection pattern in serum mimicked that of tears, increasing  
424 by week 4 and subsiding by week 11 (**Fig 6A**). Those results suggest that, while  
425 limited, sCD40L, TGF- $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$  secreted by different immune cells may play a  
426 role in early systemic response to Ct exposure, while IL-8 could be implicated in the  
427 later phase of infection

428 Additionally, circulating Ct-specific IgA and IgG quantification was performed on serum  
429 samples (**Fig 6B**). Increases in IgG were detected in 7/12 animals p.e., peaking  
430 between weeks 4 and 6 and declining subtly by week 11. Ct-specific IgA increased in  
431 10/12 animals from 2 weeks p.e., but unlike IgG, continued to rise between week 6 to  
432 week 11. These results demonstrate that Ct exposure at the conjunctiva elicits  
433 systemic circulation of Ct-specific IgA and IgG, which remain elevated at the latest  
434 time-point tested.

435



436 **Fig 6.** Cytokines and Ig secretion in serum. The baseline was adjusted to week 0. (A)  
 437 Cytokines quantification performed by Luminex on serum. The Friedman test, with a  
 438 two-stage linear step-up procedure correction by Benjamini, Krieger, and Yekutieli was  
 439 utilized to confirm significant changes over the course of the study. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  
 440 \*\*\*  $0.0001 < p < 0.001$ , \*\*  $0.001 < p < 0.01$ , \*  $0.01 < p < 0.1$ . (B) IgG and IgA quantification  
 441 performed by specific ELISA assay on serum.

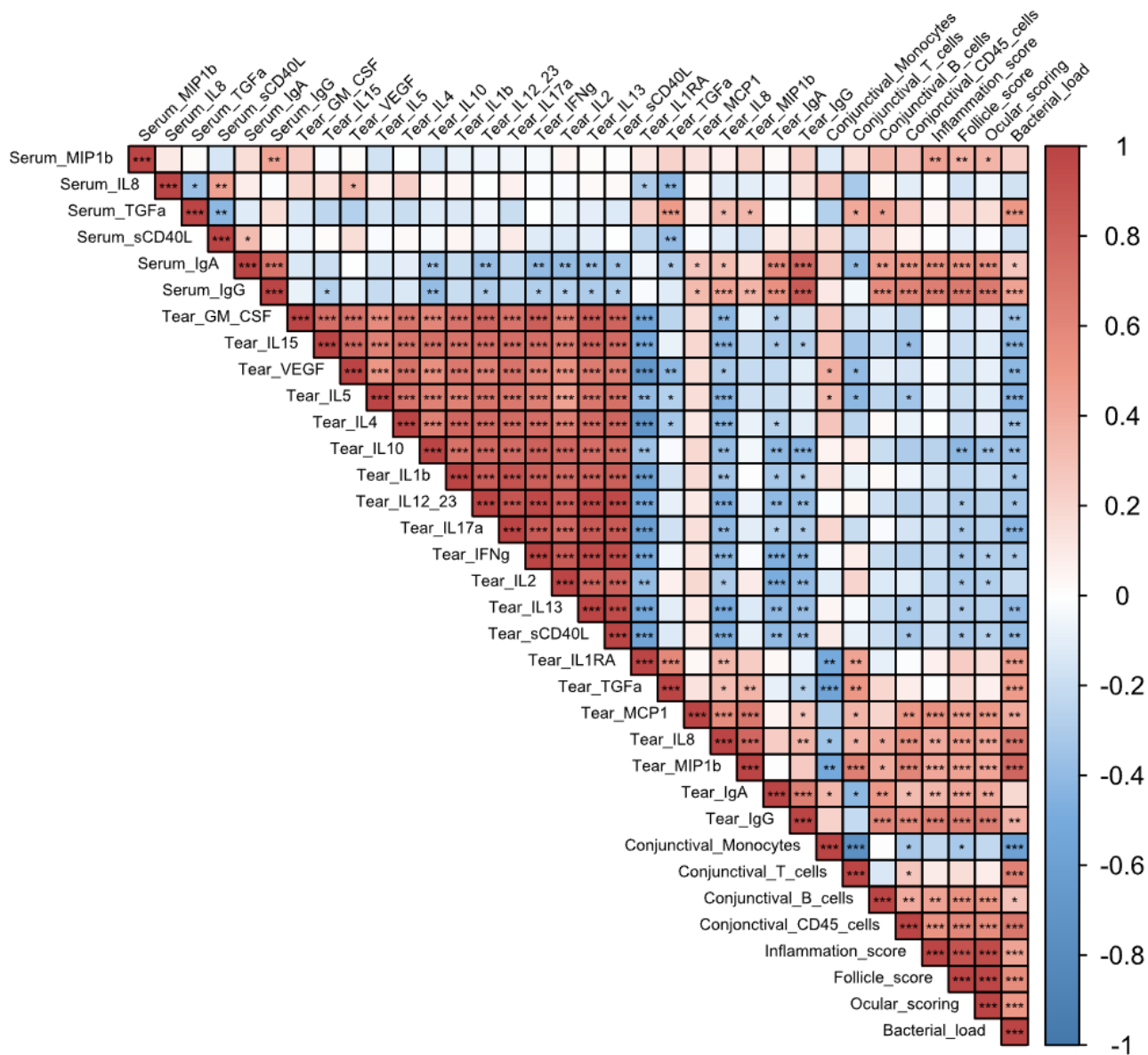
442

443

444 **Biomarker signature associated with clinical scoring and bacterial load**

445 All of the parameters analyzed above, at all time-points, were assessed for correlations  
446 using the Spearman correlation test (**Fig 7**). This combined analysis uncovered 2  
447 distinct signatures: a positive or a negative correlation with bacterial load.

448 Increases in clinical signs (inflammation, follicles and total clinical signs) correlated with  
449 each other, as well as with bacterial load ( $p < 0.0001$ , for each condition vs bacterial  
450 load). Total conjunctival leucocyte increases (CD45<sup>+</sup> cells immune infiltrate) also  
451 correlated with increases in clinical signs and bacterial loads ( $p < 0.0001$ , vs both clinical  
452 signs and bacterial load). B cell increases correlated with bacterial load changes  
453 ( $p = 0.048$ ), and both tear and serum IgG increases ( $p = 0.004$  and  $p = 0.0003$ , for tear  
454 and serum respectively). Serum IgA and IgG increases also correlated with increased  
455 bacterial loads, while in the tears, only IgG increases were significantly correlated to  
456 bacterial load ( $p = 0.034$ ), tear IgA positive correlation was not significant ( $p = 0.1685$ ).  
457 At the cytokine level, tear MIP1 $\beta$ , MCP-1, IL-8, TGF $\alpha$ , and IL-1RA positively correlated  
458 with bacterial load ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0011$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0001$ , and  $p = 0.0002$ ,  
459 respectively). In contrast, tear cytokines GM-CSF, to sCD40L (GM-CSF, IL-15, VEGF,  
460 IL-5, IL-4, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12/23, IL-17 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-13, and sCD40L) all correlated with  
461 each other, but were all negatively correlated with bacterial load and clinical signs.  
462 Altogether, this combined analysis identified a biomarker signature that was indicative  
463 of Ct bacterial load and Ct-associated clinical signs, while a separate signature was  
464 associated with reductions in bacterial loads and clinical signs.



465

466 **Fig 7.** Correlation matrix of all the different parameters measured in group 2 for all  
 467 time-points. Correlation was done using a non-parametric Spearman correlation test  
 468 (performed with R software) from -1, maximum negative correlation, to 1, maximum  
 469 positive correlation. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $0.001 < p < 0.01$ , \*  $0.01 < p < 0.05$ .

## 470 **Discussion**

### 471 **A faithful NHP model of trachoma mimicking clinical features of human disease**

472 Similar to previously reported trachoma NHP models [3,12,13], our model faithfully  
473 reproduces the clinical features of acute trachoma observed in human patients in  
474 endemic populations. In humans, infection of the conjunctiva by Ct is followed by  
475 follicular conjunctivitis and conjunctival inflammation, which develop 1-2 weeks p.e. [5].  
476 In our study, Ct inoculation elicited clinical signs in all animals within the same time  
477 frame (**Fig 3B**), and their increasing severity was accompanied by increases in  
478 conjunctival bacterial loads [4]. In humans, Chlamydial infections are typically cleared  
479 within 3 to 8 weeks, but clinical signs of inflammation can persist for 6 to 18 weeks  
480 [28], which aligns with experimental findings in our model, since persistence of follicles  
481 was observed 11 weeks after bacterial exposure, i.e. 2 to 5 weeks after bacterial  
482 clearance.

483 Given the ongoing burden of trachoma as a public health issue [1,2], it is crucial to  
484 have an accurate model for studying the disease [9,11]. Previous studies have used  
485 cynomolgus monkeys to reproduce trachoma in NHP. Taylor *et al.* successfully  
486 induced conjunctival fibrosis, replicating the full spectrum of the disease [3]. The  
487 monkeys were infected on a weekly basis for 52 weeks, highlighting the importance of  
488 chronic exposure to Ct for advanced stage disease. Kari *et al.* performed dual Ct  
489 exposure, also in cynomolgus monkeys, to test a candidate trachoma vaccine. The  
490 second exposure was administered three months after spontaneous clearance of the  
491 first inoculation. However, late fibrotic stages of disease were not observed [29].

492 In our model, a single Ct exposure was employed to characterize clinical and immune  
493 makers of acute infection, with the ultimate goal of assessing the efficacy of new  
494 vaccine candidates in the future. The novelty of our model is in the development of an



495 optimized clinical grading score (**Fig 2**) [24,30,31], allowing a precise assessment of  
496 the kinetics of the clinical disease (**Fig 2**), combined with multimodal exploration of  
497 local and systemic immune responses. Optimization of the dose, to observed clinical  
498 signs, allowed for precise assessment of clinical disease development kinetics. Clinical  
499 signs developed similarly to those seen in humans. Incorporating non-invasive  
500 sampling techniques, like conjunctival imprints, proved to be highly valuable in  
501 obtaining consistent measurements and establishing novel tools to study kinetics of  
502 local immune populations. Furthermore, the analysis of tears encompassed a deeper  
503 understanding of the local inflammatory immune landscape in our model. Indeed, our  
504 longitudinal *in vivo* data showed similar results to one-time sampling from different  
505 trachoma stages in endemic area human cohorts, validating this experimental  
506 procedure to faithfully mimic clinical features of human disease [32].

507

## 508 **Two phase immune response: before and after treatment**

### 509 **Infectious phase response**

510 Immune infiltrates peaked from weeks 2 to 4 p.e., with a major proportion consisting of  
511 T cells. The bacterial load-associated immune response observed in the first 7 weeks  
512 was also associated with conjunctival T lymphocytes ( $r = 0.63$ ,  $p < 0.0001$ ) and T cell  
513 survival factors (IL-2 and IL-15) were detected frequently during this period. In humans,  
514 T cells seem to play a major role in disease pathogenesis but also are associated with  
515 clearance of Ct infection, driven by CD4 T cell-derived IFN- $\gamma$  [5]. Interestingly in our  
516 model, conjunctival T cell numbers did not correlate with T-cell associated cytokines  
517 and instead IL-10, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  all peaked at week 11 p.e.. The  
518 early conjunctival T cell spike was instead associated with cytokines excreted by  
519 epithelial cells (IL-1RA, IL-8) and macrophages (MCP-1, MIP1 $\beta$ ). In conjunctival swabs

520 from patients, Th1 pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) reveal a strong  
521 correlation between acute trachoma and with Ct bacterial load [33]. In contrast, Th1  
522 cytokines evaluated in our panel (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF) did not significantly  
523 increased p.e. [32].

524 Additional cytokines that increase in trachoma patients include IL-10 (associated with  
525 anti-inflammatory response), CXCL8 (IL-8, involved in recruiting granulocytes and  
526 facilitating phagocytosis), and CCL2 (MCP-1, involved in attracting monocytes,  
527 lymphocytes, and basophils, as well as promoting macrophage differentiation) [33].  
528 These findings align with our results where IL-8 and MCP-1 significantly increased after  
529 Ct exposure.

530 In animal models, neutrophils have also been shown to have a central role in acute  
531 trachoma response. Indeed, Lacy *et al.* showed their involvement in T cell recruitment  
532 (both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) by using neutrophil depletion in a guinea pig model of  
533 *Chlamydia cavia* infection. The recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by the influx of  
534 neutrophils was a beneficial immune phenomenon that helped to clear the infection  
535 [17]. But while this T cell recruitment reduces the bacterial burden, it simultaneously  
536 may have an exacerbating effect on ocular symptoms (follicles and inflammation), a  
537 tendency also found in a murine model of Ct vaginal infection with concomitant  
538 neutrophil depletion [19]. Finally, Lacy *et al.* showed a link between neutrophil  
539 depletion and increased IgA titers. This observation could mean that in the absence of  
540 neutrophils, while clinical signs are reduced, local IgA increases can occur due to a  
541 local increase in B lymphocytes [17]. Similarly, we observed a tendency toward  
542 decreased ocular signs around 6 weeks p.e. corresponding to a peak in specific anti-  
543 Ct IgA in tears, concomitant with a higher proportion of B cells. Transcriptome studies  
544 in humans with active trachoma inferred a prominent role of the innate immune

545 response, notably neutrophils. Natividad *et al.* identified immune infiltrates with  
546 immune populations such as T cells, B cells, and a predominance of innate immunity  
547 (both NK cells and neutrophils) [34].

548 In our study, while we did not detect significant neutrophil infiltrates (due to technical  
549 limitations), neutrophils in blood increased at the peak of infection (between 2 and  
550 4 weeks p.e.). However, we found a significant T and B cell conjunctival infiltrate  
551 (**Fig 4**), that corresponded to follicular lesions, as detected in both humans [20,34] and  
552 other animal models [12,17]. In our results, a positive correlation was observed  
553 between clinical signs and B lymphocytes infiltrate ( $r$  coefficient = 0.52,  $p$  = 0.00032).

554 A 1977 study on immunoglobulins in trachoma patients' tears observed a lower  
555 quantity of IgA in trachoma cases than in healthy patients (without significant  
556 differences between trachoma phases) [35]. However, Taylor *et al.*, in a *Cynomolgus*  
557 model of trachoma, although using another Ct strain (E/Bour), found a delayed  
558 increase in tear IgA after conjunctival Ct exposure, and persistence of systemic IgG  
559 [23], consistent with our findings.

#### 560 **Convalescent phase response**

561 The convalescent phase defined as after treatment from 7 weeks p.e., was  
562 characterized by an absence of Ct due to either spontaneous clearance (for 4/12  
563 animals) or the effect of azithromycin treatment. The clearance of bacteria coincided  
564 with a reduction in conjunctival inflammation, although the presence of follicles  
565 persisted, a dissociated pattern that has also been observed in humans [36]. Studies  
566 conducted on human cohorts at different stages of trachoma revealed an association  
567 between chronic trachoma and the local presence (in mucosal sponges) of IL-1RA (an  
568 antagonist of the pro-inflammatory IL-1), as well as IL-4 and IL-13 (associated with Th2  
569 response) [33].

570 The reduced local leucocytes population at 9 and 11 weeks p.e. could be a result of  
571 the higher quantity of IL-1RA at earlier time-points, that may have had an anti-  
572 inflammatory effect. In those later time-points, while we observed a reduction in local  
573 leucocyte populations, we also saw a higher proportion of monocytes, the cell type  
574 mainly responsible for IL-1RA secretion.

575 In another study involving 470 Tanzanian children, analysis of ocular fluid samples  
576 using transcriptome revealed a correlation between acute trachoma and elevated  
577 expression of IL-17A. The authors concluded that IL-17A and Th17 responses play a  
578 central pro-inflammatory role in trachoma [20]. A transcriptomic study on an Ethiopian  
579 cohort of trachomatous patients also suggested a central role of other pro-inflammatory  
580 cytokines (including IL-1B, CXCL5 or S100A7) in chronic trachoma [37]. In the present  
581 study, the increase in IL-17A was delayed, (week 11 p.e.), along with elevated levels  
582 of other pro-inflammatory (VEGF, IL-1B, IL-15, and GM-CSF). Some anti-inflammatory  
583 cytokines (IL-10, IL-4, and IL-5) were also elevated but with a delay, suggesting that a  
584 balance between both anti- and pro-inflammatory cytokines is needed to achieve  
585 disease resolution.

586 A longitudinal study of a Tanzanian cohort of children identified an association between  
587 progressive trachomatous scarring and elevated levels of IL-23, inferred the  
588 importance of a Th17 response (through the analysis of IL-23A and PDGFB) [38]. Our  
589 observations of the late increase in both IL-12/23 and IL-17A align with those findings.  
590 From week 3 p.e., and most drastically weeks 4 and 6, a sharp decrease in total  
591 leucocyte counts was observed. During this contraction, the proportion of monocytes  
592 increased significantly then subsided p.t.. These observations suggest that local  
593 monocytes are characteristic of the continuance of clinical signs of inflammation once  
594 bacterial infection resolves. Diminution of the proportion of T cells in the model infection

595 is also consistent with observations in the active stages of trachoma in humans. It has  
596 been shown that T cells, particularly CD4<sup>+</sup> T cells, and the Th2 response correlate with  
597 scarring trachoma both locally [33,39] and systemically [40].

### 598 **Limitations**

599 The use of conjunctival imprints offers several advantages, such as being non-invasive  
600 and allowing for repeated sampling over a short period. However, this technique for  
601 harvesting cells can affect their viability. Certain sensitive cells, like neutrophils, may  
602 lose their viability during the elution step of the protocol [41]. Therefore, the lack of  
603 observed neutrophils by conjunctival imprint cytometry is likely attributed to the  
604 technical process rather than their absence. Additionally, imprints will likely capture  
605 only the cells present on the surface of the conjunctiva, or those exposed to this  
606 sampling site in the context of a lesion; those in dermal conjunctival layers are likely  
607 not picked up by this method. Sampling of the conjunctival surface may induce a bias  
608 in the type of cells sampled by imprints (bias that would be in favor of immune  
609 component of follicles and desquamating cells).

610 The non-identification of a significant proportion of leucocytes (labeled as “other  
611 leucocytes”) could be due to missing markers in our panel (such as markers for  
612 dendritic cells or granulocytes populations), technical difficulties (dead cells, non-  
613 leucocytes expressing CD45 antigen), or could imply non-specific binding of antibodies  
614 [42].

615 Our current model has laid the groundwork for the characterization of the local immune  
616 response, however in order to understand the specific adaptive immune response to  
617 ocular infection a deeper analysis of specific T cell response is required.

618 To summarize, our NHP model of acute trachoma adequately reproduces hallmarks of  
619 acute human disease. Most of the changes in immune effectors were observed at the

620 local level, with an influx of T lymphocytes at the peak of infection and the persistence  
621 of monocytes with clinical signs in the absence of infection. This acute model could be  
622 further developed to investigate chronic trachoma model by repeated Ct inoculations  
623 to induce conjunctival fibrosis, for pre-clinical assessment of therapeutic strategies and  
624 characterization of immune responses. This model infection may also be of importance  
625 in studies of treatment immune-modulation and in the identification of non-invasive  
626 correlates of protection for use in human vaccine trials.

627

628

## 629 **Acknowledgment**

630 This study was supported by the European Commission through the TracVac  
631 consortium contract (Grant agreement ID: 733373) and The Innovation Fund Denmark  
632 (069-2011-1). The Infectious Disease Models and Innovative Therapies research  
633 infrastructure (IDMIT) is supported by the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) "One Health"  
634 program, and the "Programme Investissements d'Avenir" (PIA), managed by the ANR  
635 under references ANR-11-INBS-0008 and ANR-10-EQPX-02-01. We thank the Thea  
636 foundation and Didier Renault for their financial support. We also thank Quentin  
637 Sconosciuti, Victor Magneron, Maxime Potier, and Jean-Marie Robert for the NHP  
638 experiments ; Laetitia Bossevot, Laura Junges, Laurine Moenne-Loccoz and Loïc  
639 Pintore for the RT-qPCR assays ; Mario Gomez-Pacheco and Jérôme van  
640 Wassenhove for the flow cytometry helps ; Yann Gorin for the logistics and safety  
641 management ; Isabelle Mangeot and Camille Morice for help with resources  
642 management ; Brice Targat and Karl-Stefan Baczowski who contributed to data  
643 management and Oscar Haigh for help during manuscript proofreading.

644

645 **Authors contributions**

	EP	VC	MG	IR	MH	MB	JD	ASG	NB	FR	SL	FF	RLG	ML	AR
Funding Acquisition															
Supervision															
Conceptualization															
Project Administration															
Methodology															
Resources															
Investigation															
Formal Analysis															
Validation															
Visualization															
Writing - Original Draft Preparation															
Writing - Review & Editing															

646

647 **References**

- 648 1. World Health Organization, others. WHO Alliance for the Global Elimination of  
649 Trachoma by 2020: progress report on elimination of trachoma, 2018. *Weekly*  
650 *Epidemiological Record*. 2019;94: 317–328.
- 651 2. World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable  
652 Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030.  
653 2020.
- 654 3. Taylor HR, Johnson SL, Schachter J, Caldwell HD, Prendergast RA.  
655 Pathogenesis of trachoma: the stimulus for inflammation. *J Immunol*. 1987;138:  
656 3023–3027.
- 657 4. Taylor HR, Burton MJ, Haddad D, West S, Wright H. Trachoma. *Lancet*. 2014;384:  
658 2142–2152. doi:10.1016/S0140-6736(13)62182-0
- 659 5. Solomon AW, Burton MJ, Gower EW, Harding-Esch EM, Oldenburg CE, Taylor  
660 HR, et al. Trachoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2022;8: 32. doi:10.1038/s41572-022-  
661 00359-5
- 662 6. Xiong T, Yue Y, Li W-X, Choonara I, Qazi S, Chen H-J, et al. Effectiveness of  
663 azithromycin mass drug administration on trachoma: a systematic review.  
664 *Chinese Medical Journal*. 2021;134: 2944–2953.  
665 doi:10.1097/CM9.0000000000001717
- 666 7. Mack I, Sharland M, Berkley JA, Klein N, Malhotra-Kumar S, Bielicki J.  
667 Antimicrobial Resistance Following Azithromycin Mass Drug Administration:  
668 Potential Surveillance Strategies to Assess Public Health Impact. *Clin Infect Dis*.  
669 2020;70: 1501–1508. doi:10.1093/cid/ciz893

- 670 8. Pickering H, Hart JD, Burr S, Stabler R, Maleta K, Kalua K, et al. Impact of  
671 azithromycin mass drug administration on the antibiotic-resistant gut microbiome  
672 in children: a randomized, controlled trial. *Gut Pathog.* 2022;14: 5.  
673 doi:10.1186/s13099-021-00478-6
- 674 9. Renneker KK, Emerson PM, Hooper PJ, Ngondi JM. Forecasting the elimination  
675 of active trachoma: An empirical model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16: e0010563.  
676 doi:10.1371/journal.pntd.0010563
- 677 10. Nash SD, Astale T, Nute AW, Bethea D, Chernet A, Sata E, et al. Population-  
678 Based Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Infection and Antibodies in Four  
679 Districts with Varying Levels of Trachoma Endemicity in Amhara, Ethiopia. *Am J*  
680 *Trop Med Hyg.* 2021;104: 207–215. doi:10.4269/ajtmh.20-0777
- 681 11. Adamu MD, Mohammed Jabo A, Orji P, Zhang Y, Isiyaku S, Olobio N, et al.  
682 Baseline Prevalence of Trachoma in 21 Local Government Areas of Adamawa  
683 State, North East Nigeria. *Ophthalmic Epidemiol.* 2021; 1–9.  
684 doi:10.1080/09286586.2021.2013899
- 685 12. Olivares-Zavaleta N, Whitmire WM, Kari L, Sturdevant GL, Caldwell HD. CD8+ T  
686 cells define an unexpected role in live-attenuated vaccine protective immunity  
687 against *Chlamydia trachomatis* infection in macaques. *J Immunol.* 2014;192:  
688 4648–4654. doi:10.4049/jimmunol.1400120
- 689 13. Kari L, Whitmire WM, Olivares-Zavaleta N, Goheen MM, Taylor LD, Carlson JH,  
690 et al. A live-attenuated chlamydial vaccine protects against trachoma in  
691 nonhuman primates. *J Exp Med.* 2011;208: 2217–2223.  
692 doi:10.1084/jem.20111266
- 693 14. Poston TB, Gottlieb SL, Darville T. Status of vaccine research and development  
694 of vaccines for *Chlamydia trachomatis* infection. *Vaccine.* 2019;37: 7289–7294.  
695 doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.023
- 696 15. Woolridge RL, Grayston JT, Chang IH, Yang CY, Cheng KH. Long-term follow-up  
697 of the initial (1959-1960) trachoma vaccine field trial on Taiwan. *Am J Ophthalmol.*  
698 1967;63: Suppl:1650-1655. doi:10.1016/0002-9394(67)94159-1
- 699 16. Hu VH, Holland MJ, Burton MJ. Trachoma: Protective and Pathogenic Ocular  
700 Immune Responses to *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:  
701 e2020. doi:10.1371/journal.pntd.0002020
- 702 17. Lacy HM, Bowlin AK, Hennings L, Scurlock AM, Nagarajan UM, Rank RG.  
703 Essential role for neutrophils in pathogenesis and adaptive immunity in *Chlamydia*  
704 *caviae* ocular infections. *Infect Immun.* 2011;79: 1889–1897.  
705 doi:10.1128/IAI.01257-10
- 706 18. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in*  
707 *Microbiology.* 2003;11: 44–51. doi:10.1016/S0966-842X(02)00011-2
- 708 19. Frazer LC, O’Connell CM, Andrews CW, Zurenski MA, Darville T. Enhanced  
709 neutrophil longevity and recruitment contribute to the severity of oviduct pathology



- 710 during *Chlamydia muridarum* infection. *Infect Immun*. 2011;79: 4029–4041.  
711 doi:10.1128/IAI.05535-11
- 712 20. Burton MJ, Ramadhani A, Weiss HA, Hu V, Massae P, Burr SE, et al. Active  
713 trachoma is associated with increased conjunctival expression of IL17A and  
714 profibrotic cytokines. *Infect Immun*. 2011;79: 4977–4983. doi:10.1128/IAI.05718-  
715 11
- 716 21. Nichols BA. *Conjunctiva*. *Microsc Res Tech*. 1996;33: 296–319.  
717 doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<296::AID-JEMT2>3.0.CO;2-O
- 718 22. Estes JD, Wong SW, Brenchley JM. Nonhuman primate models of human viral  
719 infections. *Nat Rev Immunol*. 2018;18: 390–404. doi:10.1038/s41577-018-0005-  
720 7
- 721 23. Taylor HR, Johnson SL, Prendergast RA, Schachter J, Dawson CR, Silverstein  
722 AM. An animal model of trachoma II. The importance of repeated reinfection.  
723 *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982;23: 507–515.
- 724 24. Thylefors B, Dawson CR, Jones BR, West SK, Taylor HR. A simple system for  
725 the assessment of trachoma and its complications. *Bull World Health Organ*.  
726 1987;65: 477–483.
- 727 25. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP, et  
728 al. Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by  
729 the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol*. 1993;38: 426–433.  
730 doi:10.1099/00222615-38-6-426
- 731 26. Brignole-Baudouin F, Ott A-C, Warnet J-M, Baudouin C. Flow cytometry in  
732 conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface  
733 pathologies. *Exp Eye Res*. 2004;78: 473–481. doi:10.1016/j.exer.2003.08.005
- 734 27. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna,  
735 Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2023. Available: [https://www.R-](https://www.R-project.org)  
736 [project.org](https://www.R-project.org)
- 737 28. Grassly NC, Ward ME, Ferris S, Mabey DC, Bailey RL. The natural history of  
738 trachoma infection and disease in a Gambian cohort with frequent follow-up. *PLoS*  
739 *Negl Trop Dis*. 2008;2: e341. doi:10.1371/journal.pntd.0000341
- 740 29. Kari L, Bakios LE, Goheen MM, Bess LN, Watkins HS, Southern TR, et al.  
741 Antibody signature of spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* ocular  
742 infection and partial resistance against re-challenge in a nonhuman primate  
743 trachoma model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2248.  
744 doi:10.1371/journal.pntd.0002248
- 745 30. Ong HS, Dart JK, Mehta JS. A Review of Clinical Disease Scoring Systems for  
746 Cicatricial Diseases of the Conjunctiva. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8: 664572.  
747 doi:10.3389/fmed.2021.664572

- 748 31. Solomon AW, Kello AB, Bangert M, West SK, Taylor HR, Tekeraoi R, et al. The  
749 simplified trachoma grading system, amended. *Bull World Health Organ.* 2020;98:  
750 698–705. doi:10.2471/BLT.19.248708
- 751 32. Barton A, Faal N, Ramadhani A, Derrick T, Mafuru E, Mtuy T, et al. Longitudinal  
752 changes in tear cytokines and antimicrobial proteins in trachomatous disease.  
753 *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17: e0011689. doi:10.1371/journal.pntd.0011689
- 754 33. Skwor TA, Atik B, Kandel RP, Adhikari HK, Sharma B, Dean D. Role of secreted  
755 conjunctival mucosal cytokine and chemokine proteins in different stages of  
756 trachomatous disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2: e264.  
757 doi:10.1371/journal.pntd.0000264
- 758 34. Natividad A, Freeman TC, Jeffries D, Burton MJ, Mabey DCW, Bailey RL, et al.  
759 Human conjunctival transcriptome analysis reveals the prominence of innate  
760 defense in *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun.* 2010;78: 4895–4911.  
761 doi:10.1128/IAI.00844-10
- 762 35. Sen DK, Sarin GS, Saha K. Immunoglobulins in tear in trachoma patients. *Br J*  
763 *Ophthalmol.* 1977;61: 218–220. doi:10.1136/bjo.61.3.218
- 764 36. Butcher R, Sokana O, Jack K, Sui L, Russell C, Last A, et al. Clinical signs of  
765 trachoma are prevalent among Solomon Islanders who have no persistent  
766 markers of prior infection with *Chlamydia trachomatis*. *Wellcome Open Res.*  
767 2018;3: 14. doi:10.12688/wellcomeopenres.13423.2
- 768 37. Burton MJ, Rajak SN, Bauer J, Weiss HA, Tolbert SB, Shoo A, et al. Conjunctival  
769 transcriptome in scarring trachoma. *Infect Immun.* 2011;79: 499–511.  
770 doi:10.1128/IAI.00888-10
- 771 38. Derrick T, Ramadhani AM, Macleod D, Massae P, Mafuru E, Aiweda M, et al.  
772 Immunopathogenesis of Progressive Scarring Trachoma: Results of a 4-Year  
773 Longitudinal Study in Tanzanian Children. *Infect Immun.* 2020;88: e00629-19.  
774 doi:10.1128/IAI.00629-19
- 775 39. Reacher MH, Pe'er J, Rapoza PA, Whittum-Hudson JA, Taylor HR. T cells and  
776 trachoma. Their role in cicatricial disease. *Ophthalmology.* 1991;98: 334–341.  
777 doi:10.1016/s0161-6420(91)32290-5
- 778 40. Holland MJ, Bailey RL, Conway DJ, Culley F, Miranpuri G, Byrne GI, et al. T helper  
779 type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC);  
780 responses to antigens of *Chlamydia trachomatis* in subjects with severe  
781 trachomatous scarring. *Clin Exp Immunol.* 1996;105: 429–435.  
782 doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-792.x
- 783 41. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age  
784 again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of*  
785 *Leukocyte Biology.* 2013;94: 595–601. doi:10.1189/jlb.1112571
- 786 42. Andersen MN, Al-Karradi SNH, Kragstrup TW, Hokland M. Elimination of  
787 erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors

788 on human monocytes and macrophages. Cytometry A. 2016;89: 1001–1009.  
789 doi:10.1002/cyto.a.22995

790

791

792

### 793 **Supplementary data**

794 **Fig S1** – Follicles counting area in the superior tarsal conjunctiva

795 **Fig S2** – Gating strategy of pseudo-color plots windows performed using FlowJo  
796 software and applied to cells eluted from conjunctival imprints

797 **Fig S3** – Total Conjunctival clinical scores of Group 1

798 **Fig S4** – Conjunctival clinical scoring results for follicle score (A) and inflammation  
799 (B) in Group 2

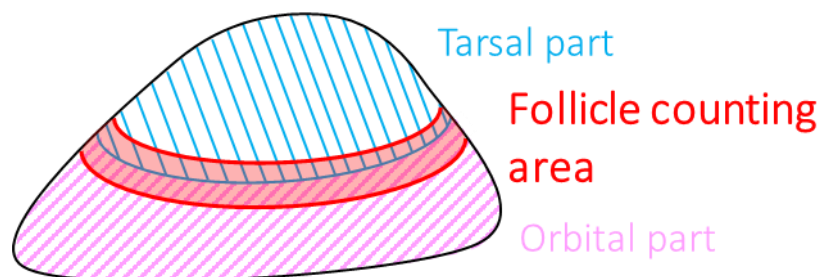
800 **Fig S5** – Blood neutrophil count in group 2

801 **Fig S6** – Cytokines quantification without statistically significant changes

802

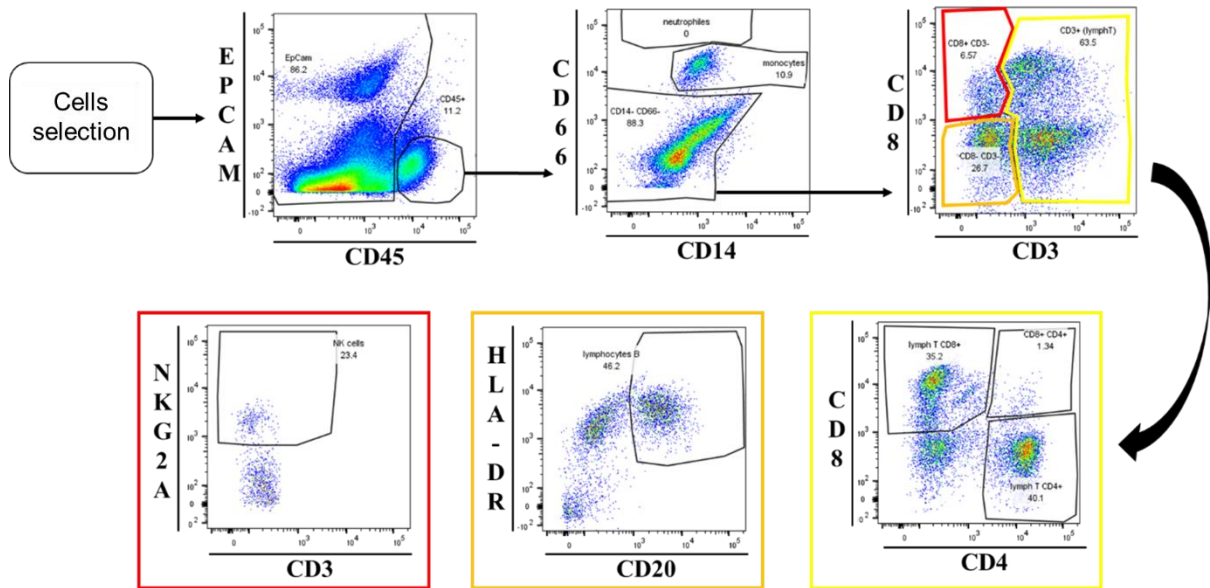
803

804



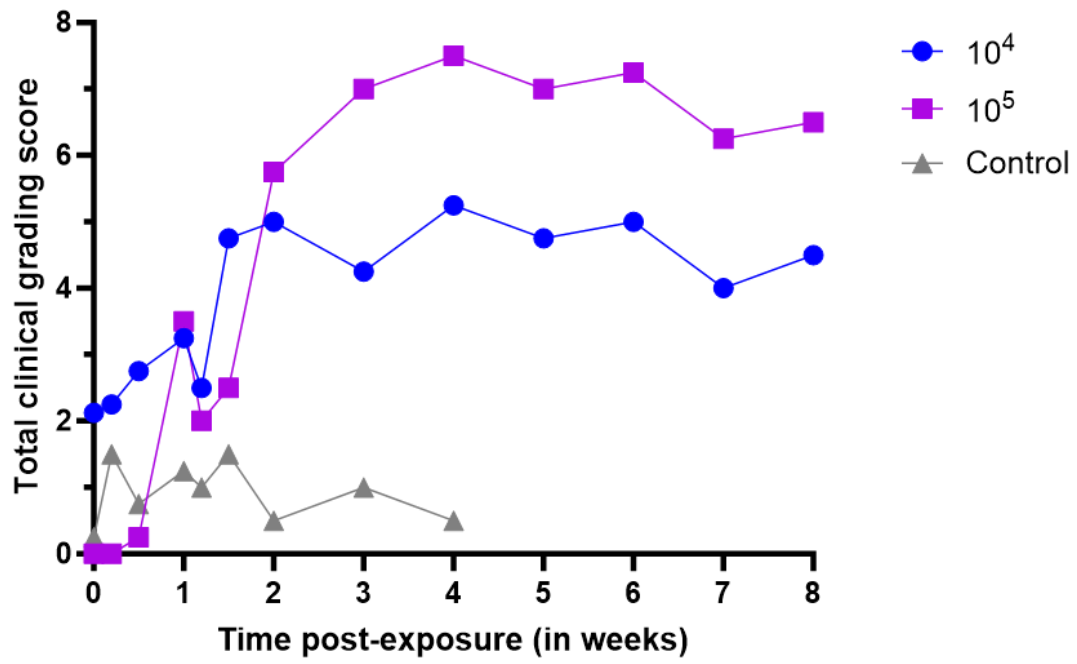
805

806 **Fig S1** – Follicles counting area in the superior tarsal conjunctiva. Follicle counting  
807 area is shown in red at the interface of the tarsal part (blue) and the orbital part (pink)  
808 of the palpebral conjunctiva.



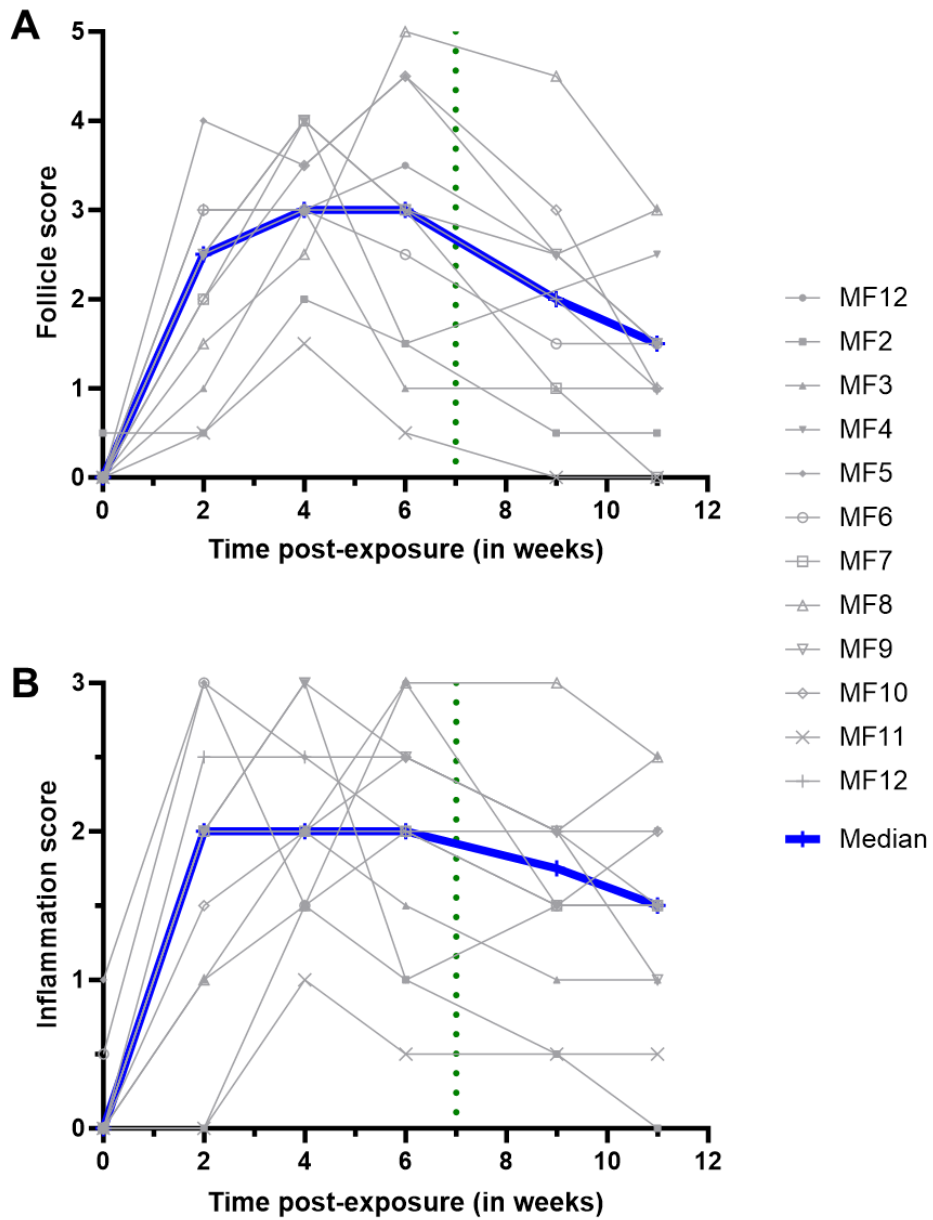
809

810 **Fig S2.** Gating strategy of pseudo-color plots windows performed using FlowJo  
 811 software and applied to cells eluted from conjunctival imprints. This strategy was used  
 812 to assess the following ocular surface cell immune populations: leukocytes (CD45<sup>+</sup>),  
 813 neutrophils (CD66<sup>+</sup>), monocytes (CD14<sup>+</sup>), T cells (CD3<sup>+</sup>), CD4 T cells (CD3<sup>+</sup>, then  
 814 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>), CD8 T cells (CD3<sup>+</sup>, then CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>), natural killer cells (CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>, then  
 815 NKG2A<sup>+</sup>), B cells (CD20<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>). This strategy is applied to conjunctival  
 816 imprints' cells' flow cytometry data.



817

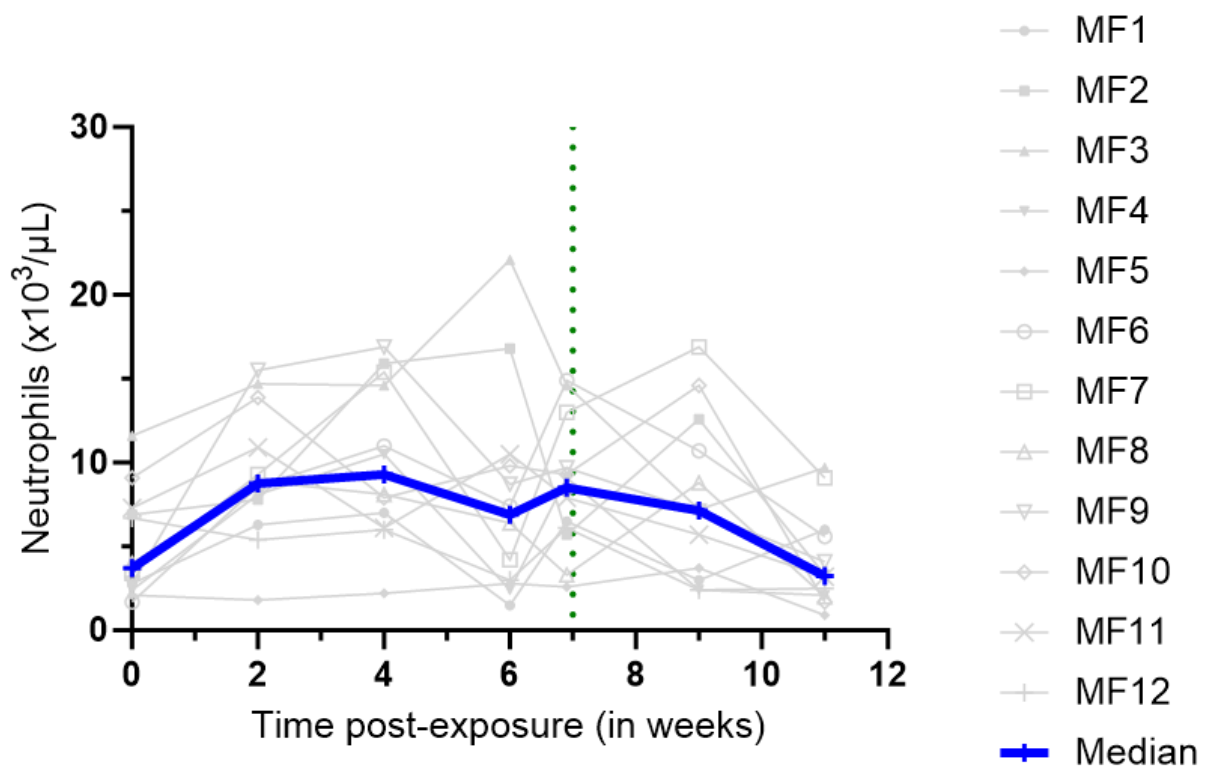
818 **Fig S3.** Total Conjunctival clinical scores of Group 1.



819

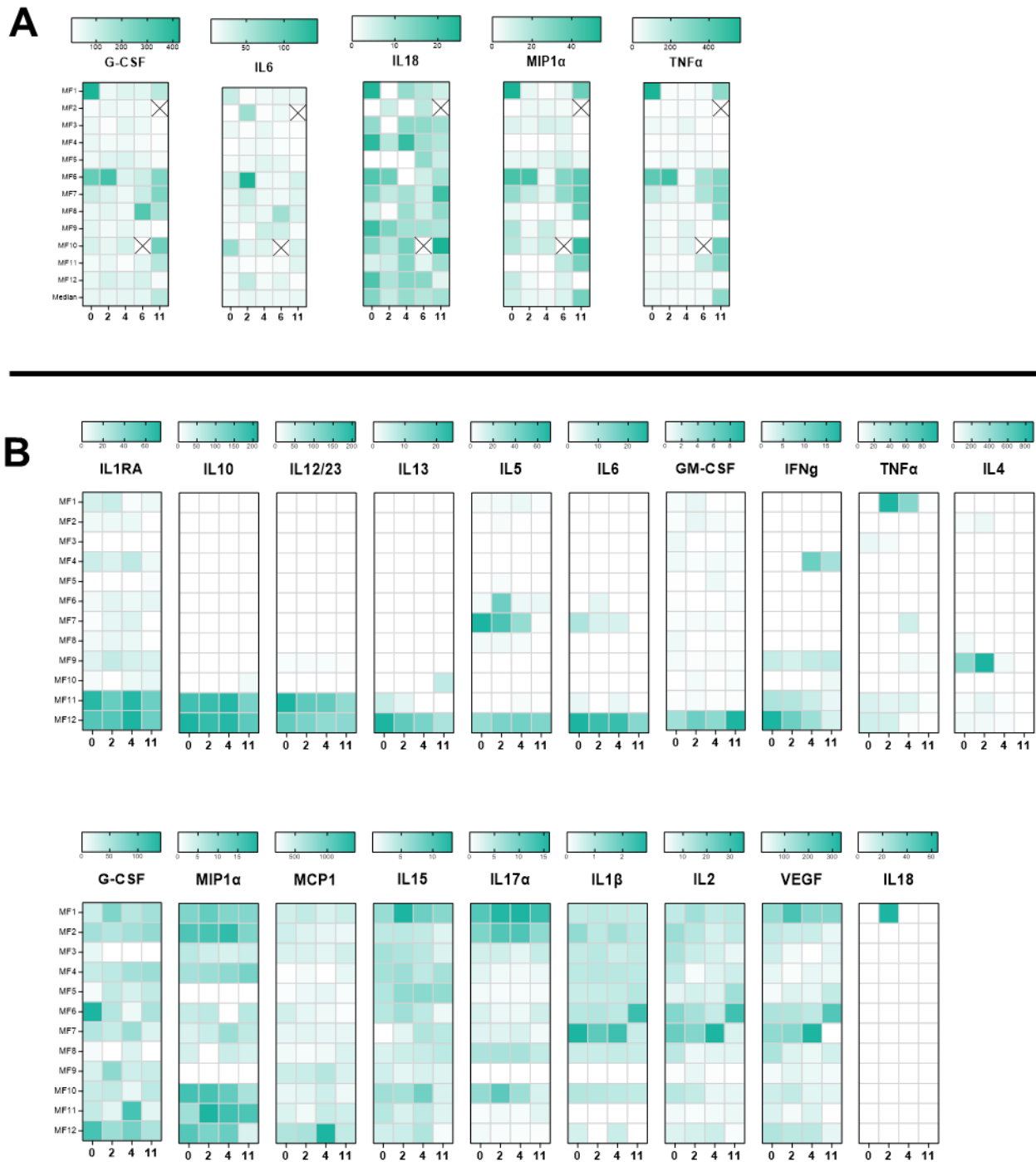
820 **Fig S4.** Conjunctival clinical scoring results for follicle score (A) and inflammation (B)

821 in Group 2.



822 **Fig S5.** Blood neutrophil count in group 2. (performed at each timepoint as part of a  
 823 complete blood count.

824



825 **Fig S6.** Cytokines quantification without statistically significant changes quantified on  
 826 tears (A) and serum (B).

827



## Références

1. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48: 4390; 4391–4398. doi:10.1167/iovs.07-0770
2. Nichols BA. Conjunctiva. *Microsc Res Tech.* 1996;33: 296–319. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<296::AID-JEMT2>3.0.CO;2-O
3. Kantelip B, Frouin E. Chapitre 1 - Le concept de surface oculaire, I - Histologie et anatomie de la surface oculaire. *Surface oculaire, Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie 2015.* 2015. pp. 3–12.
4. Baudouin C, Rolando M, Benitez Del Castillo JM, Messmer EM, Figueiredo FC, Irkec M, et al. Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2019;71: 68–87. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.11.007
5. Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W. Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40: 2220–2224.
6. Jirsova K, Dudakova L, Kalasova S, Vesela V, Merjava S. The OV-TL 12/30 clone of anti-cytokeratin 7 antibody as a new marker of corneal conjunctivalization in patients with limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52: 5892–5898. doi:10.1167/iovs.10-6748
7. Saikia P, Medeiros CS, Thangavadivel S, Wilson SE. Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2018;374: 439–453. doi:10.1007/s00441-018-2934-7
8. Arnous R, Arshad S, Sandgren K, Cunningham AL, Carnt N, White A. Tissue resident memory T cells inhabit the deep human conjunctiva. *Sci Rep.* 2022;12: 6077. doi:10.1038/s41598-022-09886-3
9. File:Eyelid glands.png - WikEM. [cited 2 Sep 2023]. Available: [https://wikem.org/wiki/File:Eyelid\\_glands.png#filelinks](https://wikem.org/wiki/File:Eyelid_glands.png#filelinks)
10. Aurell G, Kornerup T. On Glandular Structures at the Corneo-Scleral Junction in Man and Swine; the so-Called «Manz' Glands». *Acta Ophthalmologica.* 1949;27: 19–45. doi:10.1111/j.1755-3768.1949.tb03199.x
11. Stoeckelhuber M, Stoeckelhuber BM, Welsch U. Apocrine glands in the eyelid of primates contribute to the ocular host defense. *Cells Tissues Organs.* 2004;176: 187–194. doi:10.1159/000077035
12. Stephens LC, Schultheiss TE, Vargas KJ, Cromeens DM, Gray KN, Ang KK. Glands of the eyelids of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol.* 1989;18: 383–396.

13. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41: 1270–1279.
14. Cain C, Phillips TE. Developmental Changes in Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue of the Rabbit. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2008;49: 644–649. doi:10.1167/iovs.07-0856
15. Rodrigues MM, Rowden G, Hackett J, Bakos I. Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21: 759–765.
16. Kugadas A, Gadjeva M. Impact of Microbiome on Ocular Health. *The Ocular Surface.* 2016;14: 342–349. doi:10.1016/j.jtos.2016.04.004
17. Godha K, Tucker KM, Biehl C, Archer DF, Mirkin S. Human vaginal pH and microbiota: an update. *Gynecological Endocrinology.* 2018;34: 451–455. doi:10.1080/09513590.2017.1407753
18. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20: 461–472. doi:10.1007/s11154-019-09512-0
19. Forsythe P, Bienestock J. Probiotics in Neurology and Psychiatry. *Therapeutic Microbiology.* John Wiley & Sons, Ltd; 2008. pp. 285–298. doi:10.1128/9781555815462.ch22
20. Eder M, Fariña N, Sanabria RR, Ta CN, Koss M, Samudio M, et al. Normal ocular flora in newborns delivered in two hospital centers in Argentina and Paraguay. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243: 1098–1107. doi:10.1007/s00417-004-1096-3
21. Lee PW, Jun AK, Cho BC. A study of microbial flora of conjunctival sac in newborns. *Korean Journal of Ophthalmology.* 1989;3: 38–41.
22. Ozkan J, Willcox MD. The Ocular Microbiome: Molecular Characterisation of a Unique and Low Microbial Environment. *Current Eye Research.* 2019;44: 685–694. doi:10.1080/02713683.2019.1570526
23. Dong K, Pu J, Yang J, Zhou G, Ji X, Kang Z, et al. The species-level microbiota of healthy eyes revealed by the integration of metataxonomics with culturomics and genome analysis. *Front Microbiol.* 2022;13: 950591. doi:10.3389/fmicb.2022.950591
24. Zhang X, Dong K, Kang Z, Ji X, Ning X, Ma Q, et al. Characteristics and associations of microbial community in the eye, anterior nares, and oropharynx of healthy adults: eye-nose microbiota transmission. *Am J Transl Res.* 2023;15: 2241–2255.
25. Aragona P, Baudouin C, Benitez Del Castillo JM, Messmer E, Barabino S, Merayo-Llves J, et al. The ocular microbiome and microbiota and their effects on ocular surface pathophysiology and disorders. *Surv Ophthalmol.* 2021;66: 907–925. doi:10.1016/j.survophthal.2021.03.010

26. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52: 5408–5413. doi:10.1167/iovs.10-6939
27. Zhou Y, Holland MJ, Makalo P, Joof H, Roberts C h., Mabey DC, et al. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: a case control study. *Genome Medicine*. 2014;6: 99. doi:10.1186/s13073-014-0099-x
28. Doan T, Akileswaran L, Andersen D, Johnson B, Ko N, Shrestha A, et al. Paucibacterial Microbiome and Resident DNA Virome of the Healthy Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016;57: 5116–5126. doi:10.1167/iovs.16-19803
29. Ozkan J, Nielsen S, Diez-Vives C, Coroneo M, Thomas T, Willcox M. Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome. *Sci Rep*. 2017;7: 9880. doi:10.1038/s41598-017-10494-9
30. Wen X, Miao L, Deng Y, Bible PW, Hu X, Zou Y, et al. The Influence of Age and Sex on Ocular Surface Microbiota in Healthy Adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58: 6030–6037. doi:10.1167/iovs.17-22957
31. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2013;117: 99–105. doi:10.1016/j.exer.2013.06.003
32. Eguchi H, Ozkan J, Holland MJ. Editorial: Next-generation sequencing in ophthalmology: The microbiome in ocular health and disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12: 1080932. doi:10.3389/fcimb.2022.1080932
33. Deng Y, Wen X, Hu X, Zou Y, Zhao C, Chen X, et al. Geographic Difference Shaped Human Ocular Surface Metagenome of Young Han Chinese From Beijing, Wenzhou, and Guangzhou Cities. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2020;61: 47. doi:10.1167/iovs.61.2.47
34. Katzka W, Dong TS, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Arias-Jayo N, et al. The Ocular Microbiome Is Altered by Sampling Modality and Age. *Transl Vis Sci Technol*. 2021;10: 24. doi:10.1167/tvst.10.12.24
35. Sankaridurg PR, Markoulli M, de la Jara PL, Harmis N, Varghese T, Willcox MDP, et al. Lid and Conjunctival Micro Biota During Contact Lens Wear in Children. *Optometry and Vision Science*. 2009;86: 312. doi:10.1097/OPX.0b013e318199d20c
36. Callender MG, Tse LSY, Charles MA, Lutzi D. Bacterial Flora of the Eye and Contact Lens Cases during Hydrogel Lens Wear. *Optometry and Vision Science*. 1986;63: 177.
37. Inada N, Shoji J, Harata G, Miyazawa K, He F, Tomioka A, et al. Dysbiosis of Ocular Surface Microbiota in Patients With Refractive Allergic Conjunctival Diseases. *Cornea*. 2021. doi:10.1097/ICO.0000000000002940

38. Libório AM, Nishiwaki-Dantas MC, Mimica LMJ, Dantas PEC, Lima ALH. Microbiota conjuntival em pacientes com alergia ocular. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68: 824–827. doi:10.1590/S0004-27492005000600020
39. Lee SH, Oh DH, Jung JY, Kim JC, Jeon CO. Comparative Ocular Microbial Communities in Humans with and without Blepharitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012;53: 5585–5593. doi:10.1167/iovs.12-9922
40. Fu Y, Wu J, Wang D, Li T, Shi X, Li L, et al. Metagenomic profiling of ocular surface microbiome changes in Demodex blepharitis patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12: 922753. doi:10.3389/fcimb.2022.922753
41. Aragona P, Giuffrida S, Di Stefano G, Ferreri F, Di Benedetto A, Bucolo C, et al. Ocular Surface Changes in Type 1 Diabetic Patients. In: Sullivan DA, Stern ME, Tsubota K, Dartt DA, Sullivan RM, Bromberg BB, editors. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3: Basic Science and Clinical Relevance Part A and B.* Boston, MA: Springer US; 2002. pp. 667–672. doi:10.1007/978-1-4615-0717-8\_93
42. Martins EN, Alvarenga LS, Höfling-Lima AL, Freitas D, Zorat-Yu MC, Farah ME, et al. Aerobic Bacterial Conjunctival Flora in Diabetic Patients. *Cornea.* 2004;23: 136.
43. Bilen H, Ates O, Astam N, Uslu H, Akcay G, Baykal O. Conjunctival flora in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *Adv Therapy.* 2007;24: 1028–1035. doi:10.1007/BF02877708
44. Li S, Yi G, Peng H, Li Z, Chen S, Zhong H, et al. How Ocular Surface Microbiota Debuts in Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2019;9. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00202>
45. Suwajanakorn O, Puangsrucharern V, Kittipibul T, Chatsuwana T. Ocular surface microbiome in diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2022;12: 21527. doi:10.1038/s41598-022-25722-0
46. Watters GA, Turnbull PR, Swift S, Petty A, Craig JP. Ocular surface microbiome in meibomian gland dysfunction. *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2017;45: 105–111. doi:10.1111/ceo.12810
47. Dong X, Wang Y, Wang W, Lin P, Huang Y. Composition and Diversity of Bacterial Community on the Ocular Surface of Patients With Meibomian Gland Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2019;60: 4774–4783. doi:10.1167/iovs.19-27719
48. Zhang SD, He JN, Niu TT, Chan CY, Ren CY, Liu SS, et al. Bacteriological profile of ocular surface flora in meibomian gland dysfunction. *The Ocular Surface.* 2017;15: 242–247. doi:10.1016/j.jtos.2016.12.003

49. Li Z, Gong Y, Chen S, Li S, Zhang Y, Zhong H, et al. Comparative portrayal of ocular surface microbe with and without dry eye. *J Microbiol.* 2019;57: 1025–1032. doi:10.1007/s12275-019-9127-2
50. Vishwakarma P, Mitra S, Beuria T, Barik MR, Sahu SK. Comparative profile of ocular surface microbiome in vernal keratoconjunctivitis patients and healthy subjects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021;259: 1925–1933. doi:10.1007/s00417-021-05109-z
51. Asao K, Hashida N, Ando S, Motooka D, Kurakami H, Nakamura S, et al. Conjunctival dysbiosis in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Sci Rep.* 2019;9: 8424. doi:10.1038/s41598-019-44861-5
52. Li J, Liang Q, Huang F, Liao Y, Zhao W, Yang J, et al. Metagenomic Profiling of the Ocular Surface Microbiome in Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Am J Ophthalmol.* 2022;242: 144–155. doi:10.1016/j.ajo.2022.04.026
53. Ozkan J, Willcox M, Wemheuer B, Wilcsek G, Coroneo M, Thomas T. Biogeography of the human ocular microbiota. *The Ocular Surface.* 2019;17: 111–118. doi:10.1016/j.jtos.2018.11.005
54. Liang Q, Li J, Zou Y, Hu X, Deng X, Zou B, et al. Metagenomic Analysis Reveals the Heterogeneity of Conjunctival Microbiota Dysbiosis in Dry Eye Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9: 731867. doi:10.3389/fcell.2021.731867
55. Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JSG, et al. Ocular Pathogen or Commensal: A PCR-Based Study of Surface Bacterial Flora in Normal and Dry Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2007;48: 5616–5623. doi:10.1167/iovs.07-0588
56. Zhang Y, Liu Z-R, Chen H, Dong W-J, Fan Y-C, Yu H, et al. Comparative study of bacterial status from conjunctival sac of the elder Qiang minority and Han people with dry eye in Sichuan, China. *International Journal of Ophthalmology.* 5: 343–347.
57. Terzulli M, Contreras-Ruiz L, Kugadas A, Masli S, Gadjeva M. TSP-1 Deficiency Alters Ocular Microbiota: Implications for Sjögren’s Syndrome Pathogenesis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 2015;31: 413–418. doi:10.1089/jop.2015.0017
58. Zhang X, M VJ, Qu Y, He X, Ou S, Bu J, et al. Dry Eye Management: Targeting the Ocular Surface Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18: 1398. doi:10.3390/ijms18071398
59. Watane A, Raolji S, Cavuoto K, Galor A. Microbiome and immune-mediated dry eye: a review. *BMJ Open Ophthalmol.* 2022;7: e000956. doi:10.1136/bmjophth-2021-000956

60. Hernández-Zulueta J, Navarro-Partida J, Sánchez-Aguilar OE, Cruz-Pavlovich HDS, Castro-Castañeda CR, González-De la Rosa A. An insight on the eye bacterial microbiota and its role on dry eye disease. *APMIS*. 2023;131: 103–111. doi:10.1111/apm.13285
61. Kittipibul T, Puangsricharern V. The Ocular Microbiome in Stevens-Johnson Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8: 645053. doi:10.3389/fmed.2021.645053
62. Pickering H, Palmer CD, Houghton J, Makalo P, Joof H, Derrick T, et al. Conjunctival Microbiome-Host Responses Are Associated With Impaired Epithelial Cell Health in Both Early and Late Stages of Trachoma. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9: 297. doi:10.3389/fcimb.2019.00297
63. Hu VH, Massae P, Weiss HA, Chevallier C, Onyango JJ, Afwamba IA, et al. Bacterial Infection in Scarring Trachoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52: 2181–2186. doi:10.1167/iovs.10-5829
64. Liu Q, Xu Z-Y, Wang X-L, Huang X-M, Zheng W-L, Li M-J, et al. Changes in Conjunctival Microbiota Associated With HIV Infection and Antiretroviral Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62: 1. doi:10.1167/iovs.62.12.1
65. Petrillo F, Petrillo A, Marrapodi M, Capristo C, Gicchino MF, Montaldo P, et al. Characterization and Comparison of Ocular Surface Microbiome in Newborns. *Microorganisms*. 2022;10: 1390. doi:10.3390/microorganisms10071390
66. Pickering H, Ramadhani AM, Massae P, Mafuru E, Malisa A, Mbuya K, et al. The conjunctival microbiome before and after azithromycin mass drug administration for trachoma control in a cohort of Tanzanian children. *Front Public Health*. 2022;10: 1015714. doi:10.3389/fpubh.2022.1015714
67. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 2003;76: 521–542. doi:10.1016/s0014-4835(03)00050-2
68. Chen Y, Wang S, Alemi H, Dohlman T, Dana R. Immune regulation of the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2022;218: 109007. doi:10.1016/j.exer.2022.109007
69. Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR. Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43: 639–646.
70. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017;15: 366–403. doi:10.1016/j.jtos.2017.03.006
71. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf*. 2017;15: 438–510. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.011

72. M'Garrech M, Rousseau A, Barreau E, Labetoulle M. Chapitre 1 - Le concept de surface oculaire, II - Méthodes d'exploration clinique de la surface oculaire. Surface oculaire, Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie 2015. 2015. pp. 3–12.
73. Nättinen J, Aapola U, Nukareddy P, Uusitalo H. Looking deeper into ocular surface health: an introduction to clinical tear proteomics analysis. *Acta Ophthalmol.* 2022;100: 486–498. doi:10.1111/aos.15059
74. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J.* 2016;7: 15. doi:10.1186/s13167-016-0065-3
75. Chen Z, Xiang Z, Cui L, Qin X, Chen S, Jin H, et al. Significantly different results in the ocular surface microbiome detected by tear paper and conjunctival swab. *BMC Microbiol.* 2023;23: 31. doi:10.1186/s12866-023-02775-3
76. Thatcher RW, Darougar S, Jones BR. Conjunctival impression cytology. *Arch Ophthalmol.* 1977;95: 678–681. doi:10.1001/archopht.1977.04450040144022
77. Yafawi R, Ko M, Sace FP, John-Baptiste A. Limitations of an ocular surface inflammatory biomarker in impression cytology specimens. *Cutan Ocul Toxicol.* 2013;32: 46–53. doi:10.3109/15569527.2012.705405
78. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, Enríquez de Salamanca A, García-Vázquez C, Corrales RM, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res.* 2004;78: 457–472. doi:10.1016/j.exer.2003.09.009
79. Bjerrum KB. Snake-like chromatin in conjunctival cells of normal elderly persons and of patients with primary Sjögren's syndrome and other connective tissue diseases. *Acta Ophthalmol Scand.* 1995;73: 33–36. doi:10.1111/j.1600-0420.1995.tb00009.x
80. Li G, Lu P, Song H, Zheng Q, Nan K. Expression of mucins MUC5AC and MUC19 on the ocular surface in dry eye syndrome model of ovariectomized female rabbits. *Adv Clin Exp Med.* 2019;28: 165–169. doi:10.17219/acem/78021
81. Aguilar X, Hallberg D, Sundelin K, Hanson C, Stenberg K, Brune M, et al. Myofibroblasts in the normal conjunctival surface. *Acta Ophthalmol.* 2010;88: 407–412. doi:10.1111/j.1755-3768.2009.01608.x
82. Micera A, Di Zazzo A, De Piano M, Sharma S, Mori T, De Gregorio C, et al. Tissue remodeling in adult vernal keratoconjunctivitis. *Exp Eye Res.* 2022;225: 109301. doi:10.1016/j.exer.2022.109301
83. Di Zazzo A, De Piano M, Coassin M, Mori T, Balzamino BO, Micera A. Ocular surface toll like receptors in ageing. *BMC Ophthalmol.* 2022;22: 185. doi:10.1186/s12886-022-02398-8

84. Brignole-Baudouin F, Ott A-C, Warnet J-M, Baudouin C. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Exp Eye Res.* 2004;78: 473–481. doi:10.1016/j.exer.2003.08.005
85. Baudouin C, Brignole F, Becquet F, Pisella PJ, Goguel A. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38: 1458–1464.
86. Brignole-Baudouin F, Riancho L, Ismail D, Deniaud M, Amrane M, Baudouin C. Correlation Between the Inflammatory Marker HLA-DR and Signs and Symptoms in Moderate to Severe Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58: 2438–2448. doi:10.1167/iovs.15-16555
87. Leonardi A, Messmer EM, Labetoulle M, Amrane M, Garrigue J-S, Ismail D, et al. Efficacy and safety of 0.1% ciclosporin A cationic emulsion in dry eye disease: a pooled analysis of two double-masked, randomised, vehicle-controlled phase III clinical studies. *Br J Ophthalmol.* 2019;103: 125–131. doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311801
88. Brignole F, De Saint-Jean M, Goldschild M, Becquet F, Goguel A, Baudouin C. Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders. *Exp Eye Res.* 1998;67: 687–697. doi:10.1006/exer.1998.0566
89. Kessal K, Liang H, Rabut G, Daull P, Garrigue J-S, Docquier M, et al. Conjunctival Inflammatory Gene Expression Profiling in Dry Eye Disease: Correlations With HLA-DRA and HLA-DRB1. *Front Immunol.* 2018;9: 2271. doi:10.3389/fimmu.2018.02271
90. Wilhelmus KR, Robinson NM, Tredici LL, Jones DB. Conjunctival cytology of adult chlamydial conjunctivitis. *Arch Ophthalmol.* 1986;104: 691–693. doi:10.1001/archopht.1986.01050170081027
91. Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA.* 2013;310: 1721–1729. doi:10.1001/jama.2013.280318
92. Hashmi MF, Gurnani B, Benson S. Conjunctivitis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541034/>
93. Alfonso SA, Fawley JD, Alexa Lu X. Conjunctivitis. *Prim Care.* 2015;42: 325–345. doi:10.1016/j.pop.2015.05.001
94. Gueudry J, Vera L, Muraine M. Les conjonctivites fibrosantes. *Journal Français d’Ophtalmologie.* 2010;33: 577–585. doi:10.1016/j.jfo.2010.07.004
95. Hakim F, Phelps PO. Entropion and ectropion. *Dis Mon.* 2020;66: 101039. doi:10.1016/j.disamonth.2020.101039



96. Ferreira IS, Bernardes TF, Bonfioli AA. Trichiasis. *Semin Ophthalmol.* 2010;25: 66–71. doi:10.3109/08820538.2010.488580
97. Medical Oculoplastics Procedures. In: *Ophthalmic Surgeons and Consultants of Ohio* [Internet]. [cited 3 Sep 2023]. Available: <https://www.ohioeyesurgeons.com/oculoplastics/medical-oculoplastics-procedures/>
98. Solomon AW, Burton MJ, Gower EW, Harding-Esch EM, Oldenburg CE, Taylor HR, et al. Trachoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8: 32. doi:10.1038/s41572-022-00359-5
99. Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology. *Trends Microbiol.* 2014;22: 464–472. doi:10.1016/j.tim.2014.04.013
100. Dharamshi JE, Köstlbacher S, Schön ME, Collingro A, Ettema TJG, Horn M. Gene gain facilitated endosymbiotic evolution of Chlamydiae. *Nat Microbiol.* 2023;8: 40–54. doi:10.1038/s41564-022-01284-9
101. Turin L, Surini S, Wheelhouse N, Rocchi MS. Recent advances and public health implications for environmental exposure to *Chlamydia abortus*: from enzootic to zoonotic disease. *Vet Res.* 2022;53: 37. doi:10.1186/s13567-022-01052-x
102. Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, et al. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2014;37: 79–88. doi:10.1016/j.syapm.2013.12.004
103. Laroucau K, Vorimore F, Aaziz R, Solmonson L, Hsia RC, Bavoil PM, et al. *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk. *Syst Appl Microbiol.* 2019;42: 125997. doi:10.1016/j.syapm.2019.06.002
104. Ciuria S, Brouwer MSM, de Gier MM, van Zeeland Y, Bossers A, Prähauser B, et al. *Chlamydia caviae* in Swiss and Dutch Guinea Pigs—Occurrence and Genetic Diversity. *Pathogens.* 2021;10: 1230. doi:10.3390/pathogens10101230
105. Gonsales FF, Brandão PE, Melville PA, Zuniga E, Benites NR. *Chlamydia felis*: Lack of association between clinical signs and the presence of the cryptic plasmid. *Microb Pathog.* 2016;97: 14–18. doi:10.1016/j.micpath.2016.05.009
106. Mishkin N, Ricart Arbona RJ, Carrasco SE, Lawton S, Henderson KS, Momtsios P, et al. Reemergence of the Murine Bacterial Pathogen *Chlamydia muridarum* in Research Mouse Colonies. *Comp Med.* 2022;72: 230–242. doi:10.30802/AALAS-CM-22-000045
107. Reinhold P, Sachse K, Kaltenboeck B. Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J.* 2011;189: 257–267. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.003

108. Roulis E, Polkinghorne A, Timms P. Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen. *Trends Microbiol.* 2013;21: 120–128. doi:10.1016/j.tim.2012.10.009
109. Carossino M, Nevarez JG, Sakaguchi K, Paulsen DB, Langohr IM, Strother K, et al. An outbreak of systemic chlamydiosis in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Vet Pathol.* 2022;59: 860–868. doi:10.1177/03009858221095269
110. Kaleta EF, Taday EMA. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 2003;32: 435–461. doi:10.1080/03079450310001593613
111. Unterweger C, Inic-Kanada A, Setudeh S, Knecht C, Duerlinger S, Stas M, et al. Characteristics of *Chlamydia suis* Ocular Infection in Pigs. *Pathogens.* 2021;10: 1103. doi:10.3390/pathogens10091103
112. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol.* 1987;169: 3879–3885.
113. Brunelle BW, Sensabaugh GF. The ompA Gene in *Chlamydia trachomatis* Differs in Phylogeny and Rate of Evolution from Other Regions of the Genome. *Infect Immun.* 2006;74: 578–585. doi:10.1128/IAI.74.1.578-585.2006
114. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect.* 2002;78: 90–92. doi:10.1136/sti.78.2.90
115. Murray SM, McKay PF. *Chlamydia trachomatis*: Cell biology, immunology and vaccination. *Vaccine.* 2021;39: 2965–2975. doi:10.1016/j.vaccine.2021.03.043
116. Brockett MR, Liechti GW. Persistence Alters the Interaction between *Chlamydia trachomatis* and Its Host Cell. *Infection and Immunity.* 2021;89. doi:10.1128/iai.00685-20
117. Detels R, Green AM, Klausner JD, Katzenstein D, Gaydos C, Handsfield HH, et al. The Incidence and Correlates of Symptomatic and Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Selected Populations in Five Countries. *Sexually Transmitted Diseases.* 2011;38: 503. doi:10.1097/OLQ.0b013e318206c288
118. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. *Chlamydia*, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2019;97: 548-562P. doi:10.2471/BLT.18.228486
119. Eckbo EJ, Hedgcock M, Grennan T. Lymphogranulomatose vénérienne. *CMAJ.* 2022;194: E228–E229. doi:10.1503/cmaj.210853-f

120. Schémann J-F. Le trachome : Une maladie de la pauvreté. Le trachome : Une maladie de la pauvreté. Marseille: IRD Éditions; 2013. doi:10.4000/books.irdeditions.2420
121. Taylor HR. Doyne Lecture: trachoma, is it history? *Eye*. 2009;23: 2007–2022. doi:10.1038/eye.2008.432
122. Duke-Elder S. System of Ophthalmology: The anatomy of the visual system. H. Kimpton; 1961.
123. Hirschberg J, von Haugwitz T, Blodi FC. The history of ophthalmology. Wayenborgh Bonn; 1982.
124. AF M. Trachoma, Ch. 9. London: butterworth and Co; 1936.
125. Stephens R. Chlamydial evolution: a billion years and counting. Chlamydial Infections Proeedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections. Antalya Turkey; 2002.
126. Hippocrate, Littré É (trad ). Oeuvres complètes / Littré vol. 9. Paris : J.-B. Baillière; 1861. Available: [http://archive.org/details/BIUSante\\_34859x09](http://archive.org/details/BIUSante_34859x09)
127. Boldt J. Trachoma. Hodder and Stoughton; 1904.
128. Maccallan AF. THE EPIDEMIOLOGY OF TRACHOMA. *Br J Ophthalmol*. 1931;15: 369–411. doi:10.1136/bjo.15.7.369
129. Jones BR. Changing concepts of trachoma and its control. *Trans Ophthalmol Soc U K* (1962). 1980;100: 25–29.
130. Friederich R. Eye disease in the Navajo indians. *Ann Ophthalmol*. 1982;14: 38–40.
131. Halberstaedter L. Ueber Zelleinschlusse parasitärer Natur Beim Trachom. *Arb K Gesundh Amt*. 1907;26: 44–47.
132. Fourth W, others. Fourth WHO Scientific Group on Trachoma Research. Report. Geneva, 9-14 August 1965. Fourth WHO Scientific Group on Trachoma Research Report Geneva, 9-14 August 1965. 1966.
133. Thylefors B, Dawson CR, Jones BR, West SK, Taylor HR. A simple system for the assessment of trachoma and its complications. *Bull World Health Organ*. 1987;65: 477–483.
134. Rousseau A, Paulet E, Labetoulle M, Resnikoff S. Infections à Chlamydia. Les Infections Oculaires, Rapport de la Société Française d’Ophtalmologie 2024. Masson; 2024.
135. Forsey T, Darougar S. Transmission of chlamydiae by the housefly. *Br J Ophthalmol*. 1981;65: 147–150. doi:10.1136/bjo.65.2.147

136. Resnikoff S. Trachome. *Ophtalmologie*. 2017. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0246-0343\(17\)71282-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0246-0343(17)71282-8)
137. Flueckiger RM, Stelmach R, Burgert-Brucker CR, Courtright P, Kabona G, Mosher AW, et al. Evaluating Precision of a Trachomatous Trichiasis (TT) Super Survey with Modulating Sample Sizes in Tanzania. *Ophthalmic Epidemiol*. 2022;29: 394–400. doi:10.1080/09286586.2021.1950775
138. Solomon AW, Organization WH, Initiative IT, others. *Trachoma control: a guide for programme managers*. World Health Organization; 2006.
139. World Health Organization = Organisation mondiale de la Santé. *Weekly Epidemiological Record*, 2022, vol. 97, 31 [full issue]. *Weekly Epidemiological Record - WHO Alliance for the Global Elimination of Trachoma: progress report on elimination of trachoma, 2021*. 2022;97: 353–364.
140. World Health Organization, others. *WHO Alliance for the Global Elimination of Trachoma by 2020: progress report on elimination of trachoma, 2018*. *Weekly Epidemiological Record*. 2019;94: 317–328.
141. Map | Trachoma Atlas. [cited 22 Jul 2023]. Available: <https://atlas.trachomadata.org/>
142. Organisation mondiale de la Santé. *Validation de l'élimination du trachome en tant que problème de santé publique*. Organisation mondiale de la Santé; 2016.
143. Burr SE, Sillah A, Sanou AS, Wadagni AC, Hart J, Harding-Esch EM, et al. Cross-Sectional Surveys of the Prevalence of Follicular Trachoma and Trichiasis in The Gambia: Has Elimination Been Reached? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10: e0004906. doi:10.1371/journal.pntd.0004906
144. Aboe A, Joof BM, Kanyi SK, Hydera A, Downs P, Bush S, et al. The Gambia has eliminated trachoma as a public health problem: Challenges and successes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16: e0010282. doi:10.1371/journal.pntd.0010282
145. Adams J, Kim SH, Solomon AW. Where should we offer mass drug administration for trachoma? *Med J Aust*. 2022;217: 522–523. doi:10.5694/mja2.51752
146. Global Health Observatory data repository | Trachoma. In: WHO [Internet]. World Health Organization; [cited 22 Jul 2023]. Available: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.A1644?lang=en>
147. World Health Organization. *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. 2020.
148. Bilchut AH, Burroughs HR, Oldenburg CE, Lietman TM. Trachoma Control: A Glass Half Full? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2023;1. doi:10.4269/ajtmh.22-0760

149. Abdulhussein D, Abdul Hussein M. WHO Vision 2020: Have We Done It? *Ophthalmic Epidemiol.* 2022; 1–9. doi:10.1080/09286586.2022.2127784
150. Pinsent A, Blake IM, Basáñez MG, Gambhir M. Mathematical Modelling of Trachoma Transmission, Control and Elimination. *Adv Parasitol.* 2016;94: 1–48. doi:10.1016/bs.apar.2016.06.002
151. Gambhir M, Basáñez M-G, Burton MJ, Solomon AW, Bailey RL, Holland MJ, et al. The development of an age-structured model for trachoma transmission dynamics, pathogenesis and control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3: e462. doi:10.1371/journal.pntd.0000462
152. Gambhir M, Pinsent A. Possible changes in the transmissibility of trachoma following MDA and transmission reduction: implications for the GET2020 goals. *Parasit Vectors.* 2015;8: 530. doi:10.1186/s13071-015-1133-6
153. Rahman SA, West SK, Mkocha H, Munoz B, Porco TC, Keenan JD, et al. The distribution of ocular Chlamydia prevalence across Tanzanian communities where trachoma is declining. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0003682. doi:10.1371/journal.pntd.0003682
154. Kashaf MS, Muñoz BE, Mkocha H, Wolle MA, Naufal F, West SK. Incidence and progression of trachomatous scarring in a cohort of children in a formerly hyper-endemic district of Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14: e0008708. doi:10.1371/journal.pntd.0008708
155. Lucena A, Akaishi PMS, Rodrigues M de LV, Cruz AAV e. Upper eyelid entropion and dry eye in cicatricial trachoma without trichiasis. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75: 420–422. doi:10.1590/s0004-27492012000600010
156. Tabbara KF, Bobb AA. Lacrimal System Complications In Trachoma. *Ophthalmology.* 1980;87: 298–301. doi:10.1016/S0161-6420(80)35234-2
157. World Health Organization = Organisation mondiale de la Santé. Trachome Diagnosis - WHO simplified grading card. [cited 3 Sep 2023]. Available: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/trachoma/diagnosis>
158. Grassly NC, Ward ME, Ferris S, Mabey DC, Bailey RL. The natural history of trachoma infection and disease in a Gambian cohort with frequent follow-up. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2: e341. doi:10.1371/journal.pntd.0000341
159. Francis V, Turner V, Blindness WP for the P of. L' appui communautaire en faveur de la lutte contre le trachome: guide de l' action sanitaire de district. Organisation mondiale de la Santé; 1993. Report No.: WHO/PBL/93.36. Unpublished. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/59377>
160. Hu VH, Holland MJ, Cree IA, Pullin J, Weiss HA, Massae P, et al. In vivo confocal microscopy and histopathology of the conjunctiva in trachomatous scarring and

- normal tissue: a systematic comparison. *Br J Ophthalmol*. 2013;97: 1333–1337. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303126
161. Abu el-Asrar AM, Geboes K, Missotten L. Immunology of trachomatous conjunctivitis. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 2001; 73–96.
  162. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99: 77–87.
  163. Burton MJ, Bailey RL, Jeffries D, Mabey DCW, Holland MJ. Cytokine and Fibrogenic Gene Expression in the Conjunctivas of Subjects from a Gambian Community Where Trachoma Is Endemic. *Infect Immun*. 2004;72: 7352–7356. doi:10.1128/IAI.72.12.7352-7356.2004
  164. Ramadhani AM, Derrick T, Macleod D, Massae P, Mtuy T, Jeffries D, et al. Immunofibrogenic Gene Expression Patterns in Tanzanian Children with Ocular Chlamydia trachomatis Infection, Active Trachoma and Scarring: Baseline Results of a 4-Year Longitudinal Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7: 406. doi:10.3389/fcimb.2017.00406
  165. Natividad A, Freeman TC, Jeffries D, Burton MJ, Mabey DCW, Bailey RL, et al. Human conjunctival transcriptome analysis reveals the prominence of innate defense in Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun*. 2010;78: 4895–4911. doi:10.1128/IAI.00844-10
  166. Hu VH, Luthert PJ, Derrick T, Pullin J, Weiss HA, Massae P, et al. Immunohistochemical Analysis of Scarring Trachoma Indicates Infiltration by Natural Killer and Undefined CD45 Negative Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10: e0004734. doi:10.1371/journal.pntd.0004734
  167. Miguel RDV, Calla NEQ, Pavelko SD, Cherpes TL. Intravaginal Chlamydia trachomatis Challenge Infection Elicits TH1 and TH17 Immune Responses in Mice That Promote Pathogen Clearance and Genital Tract Damage. *PLOS ONE*. 2016;11: e0162445. doi:10.1371/journal.pone.0162445
  168. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 2003;11: 44–51. doi:10.1016/S0966-842X(02)00011-2
  169. Grayston JT, Wang SP, Yeh LJ, Kuo CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. *Rev Infect Dis*. 1985;7: 717–725. doi:10.1093/clinids/7.6.717
  170. Derrick T, Luthert PJ, Jama H, Hu VH, Massae P, Essex D, et al. Increased Epithelial Expression of CTGF and S100A7 with Elevated Subepithelial Expression of IL-1 $\beta$  in Trachomatous Trichiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10: e0004752. doi:10.1371/journal.pntd.0004752

171. Derrick T, Ramadhani AM, Macleod D, Massae P, Mafuru E, Aiweda M, et al. Immunopathogenesis of Progressive Scarring Trachoma: Results of a 4-Year Longitudinal Study in Tanzanian Children. *Infect Immun*. 2020;88: e00629-19. doi:10.1128/IAI.00629-19
172. Burton MJ, Rajak SN, Hu VH, Ramadhani A, Habtamu E, Massae P, et al. Pathogenesis of progressive scarring trachoma in Ethiopia and Tanzania and its implications for disease control: two cohort studies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003763. doi:10.1371/journal.pntd.0003763
173. Hu VH, Weiss HA, Ramadhani AM, Tolbert SB, Massae P, Mabey DCW, et al. Innate Immune Responses and Modified Extracellular Matrix Regulation Characterize Bacterial Infection and Cellular/Connective Tissue Changes in Scarring Trachoma. *Infect Immun*. 2012;80: 121–130. doi:10.1128/IAI.05965-11
174. Kechagia JZ, Ezra DG, Burton MJ, Bailly M. Fibroblasts profiling in scarring trachoma identifies IL-6 as a functional component of a fibroblast-macrophage pro-fibrotic and pro-inflammatory feedback loop. *Sci Rep*. 2016;6: 28261. doi:10.1038/srep28261
175. Resnikoff S. Chapitre 12 - Pathologies spécifiques, V - Pathologies tropicales et surface oculaire. *Surface oculaire, Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie 2015*. 2015.
176. Taravati P, Lam D, Van Gelder RN. Role of Molecular Diagnostics in Ocular Microbiology. *Curr Ophthalmol Rep*. 2013;1: 181–189. doi:10.1007/s40135-013-0025-1
177. Mustafa O, Daoud YJ. Herbert Pits in Trachoma Infection. *Mayo Clin Proc*. 2020;95: 134–135. doi:10.1016/j.mayocp.2019.10.027
178. Gupta N, Yadav S, Solomon AW, Jain S, Kashyap S, Vanathi M, et al. Atypical Corneal Phenotype in Patients With Trachoma and Secondary Amyloidosis. *Cornea*. 2022;41: 609–615. doi:10.1097/ICO.0000000000002791
179. Burton MJ, Frick KD, Bailey RL, Bowman RJC. Azithromycin for the treatment and control of trachoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3: 113–120. doi:10.1517/14656566.3.2.113
180. Diab MM, Allen RC, Gawdat TI, Saif AS. Trachoma elimination, approaching 2020. *Curr Opin Ophthalmol*. 2018;29: 451–457. doi:10.1097/ICU.0000000000000504
181. Francis V, Turner V, others. Achieving community support for trachoma control. *Achieving community support for trachoma control*. 1995.
182. Negrel A-D, Mariotti SP. Trachoma Rapid Assessment: Rationale and Basic Principles. *Community Eye Health*. 1999;12: 51–53.

183. Negrel A, Taylor HR, West S, Initiative IT, others. Guidelines for rapid assessment for blinding trachoma. World Health Organization; 2000.
184. Limburg H, Bah M, Johnson GJ. Trial of the Trachoma Rapid Assessment methodology in The Gambia. *Ophthalmic Epidemiology*. 2001;8: 73–85. doi:10.1076/oep.8.2.73.4157
185. Stocks ME, Ogden S, Haddad D, Addiss DG, McGuire C, Freeman MC. Effect of Water, Sanitation, and Hygiene on the Prevention of Trachoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Medicine*. 2014;11: e1001605. doi:10.1371/journal.pmed.1001605
186. Wu TJ, Reynolds MM. Trachoma, the world’s leading infectious cause of blindness: The remaining gap in care and access to basic handwashing facilities. *Eur J Ophthalmol*. 2023; 11206721231154295. doi:10.1177/11206721231154295
187. Olamiju F, Isiyaku S, Olobio N, Mogaji H, Achu I, Muhammad N, et al. Prevalence of Trachoma following Implementation of the SAFE Strategy in Three Local Government Areas of Taraba State, North Eastern Nigeria. *Ophthalmic Epidemiol*. 2022; 1–9. doi:10.1080/09286586.2022.2045025
188. Xiong T, Yue Y, Li W-X, Choonara I, Qazi S, Chen H-J, et al. Effectiveness of azithromycin mass drug administration on trachoma: a systematic review. *Chinese Medical Journal*. 2021;134: 2944–2953. doi:10.1097/CM9.0000000000001717
189. West SK, Munoz B, Mkocha H, Gaydos C, Quinn TC. Number of years of annual mass treatment with azithromycin needed to control trachoma in hyper-endemic communities in Tanzania. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204. doi:10.1093/infdis/jir257
190. Mosenia A, Haile BA, Shiferaw A, Gebresillasie S, Gebre T, Zerihun M, et al. When the Neighboring Village is Not Treated: Role of Geographic Proximity to Communities Not Receiving Mass Antibiotics for Trachoma. *Clin Infect Dis*. 2022; ciac866. doi:10.1093/cid/ciac866
191. Blake IM, Burton MJ, Bailey RL, Solomon AW, West S, Muñoz B, et al. Estimating household and community transmission of ocular *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3: e401. doi:10.1371/journal.pntd.0000401
192. Pickering H, Hart JD, Burr S, Stabler R, Maleta K, Kalua K, et al. Impact of azithromycin mass drug administration on the antibiotic-resistant gut microbiome in children: a randomized, controlled trial. *Gut Pathog*. 2022;14: 5. doi:10.1186/s13099-021-00478-6
193. Doan T, Gebre T, Ayele B, Zerihun M, Hinterwirth A, Zhong L, et al. Effect of Azithromycin on the Ocular Surface Microbiome of Children in a High Prevalence Trachoma Area. *Cornea*. 2021. doi:10.1097/ICO.0000000000002863
194. Greenland K, Czerniewska A, Guye M, Legesse D, Ahmed Mume A, Shafi Abdurahman O, et al. Seasonal variation in water use for hygiene in Oromia,



- Ethiopia, and its implications for trachoma control: An intensive observational study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16: e0010424. doi:10.1371/journal.pntd.0010424
195. Seyum D, Fetene N, Kifle T, Negash H, Kabeto T, Gebre M, et al. Prevalence of Trachoma from 66 Impact Surveys in 52 Woredas of Southern Nations, Nationalities and Peoples' and Sidama Regions of Ethiopia, 2017-2019. *Ophthalmic Epidemiol.* 2022; 1–10. doi:10.1080/09286586.2022.2065313
  196. Sullivan KM, Harding-Esch EM, Keil AP, Freeman MC, Batcho WE, Bio Issifou AA, et al. Exploring water, sanitation, and hygiene coverage targets for reaching and sustaining trachoma elimination: G-computation analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17: e0011103. doi:10.1371/journal.pntd.0011103
  197. Abebe TA, Tucho GT. The impact of access to water supply and sanitation on the prevalence of active trachoma in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15: e0009644. doi:10.1371/journal.pntd.0009644
  198. Aragie S, Wittberg DM, Tadesse W, Dagne A, Hailu D, Chernet A, et al. Water, sanitation, and hygiene for control of trachoma in Ethiopia (WUHA): a two-arm, parallel-group, cluster-randomised trial. *Lancet Glob Health.* 2022;10: e87–e95. doi:10.1016/S2214-109X(21)00409-5
  199. Martin DL, Bid R, Sandi F, Goodhew EB, Massae PA, Lasway A, et al. Serology for trachoma surveillance after cessation of mass drug administration. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0003555. doi:10.1371/journal.pntd.0003555
  200. Adimassu NF, Assem AS, Fekadu SA. Postoperative trachomatous trichiasis: a systematic review and meta-analysis study. *Int Health.* 2023; ihad014. doi:10.1093/inthealth/ihad014
  201. Merbs SL, Talero SL, Tadesse D, Sisay A, Bayissasse B, Weaver JU, et al. A New Surgical Technique for Post-Operative Trachomatous Trichiasis. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2021;37: 595–598. doi:10.1097/IOP.0000000000002055
  202. Renneker KK, Emerson PM, Hooper PJ, Ngondi JM. Forecasting the elimination of active trachoma: An empirical model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16: e0010563. doi:10.1371/journal.pntd.0010563
  203. Adamu MD, Mohammed Jabo A, Orji P, Zhang Y, Isiyaku S, Olobio N, et al. Baseline Prevalence of Trachoma in 21 Local Government Areas of Adamawa State, North East Nigeria. *Ophthalmic Epidemiol.* 2021; 1–9. doi:10.1080/09286586.2021.2013899
  204. LaVerda D, Kalayoglu MV, Byrne GI. Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems? *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7: 64–71. doi:10.1155/S1064744999000137

205. Su H, Watkins NG, Zhang YX, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infection and Immunity*. 1990;58: 1017–1025. doi:10.1128/iai.58.4.1017-1025.1990
206. Nunes A, Gomes JP, Mead S, Florindo C, Correia H, Borrego MJ, et al. Comparative Expression Profiling of the Chlamydia trachomatis pmp Gene Family for Clinical and Reference Strains. *PLOS ONE*. 2007;2: e878. doi:10.1371/journal.pone.0000878
207. Kari L, Bakios LE, Goheen MM, Bess LN, Watkins HS, Southern TR, et al. Antibody signature of spontaneous clearance of Chlamydia trachomatis ocular infection and partial resistance against re-challenge in a nonhuman primate trachoma model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2248. doi:10.1371/journal.pntd.0002248
208. Pal S, Favaroni A, Tifrea DF, Hanisch PT, Luczak SET, Hegemann JH, et al. Comparison of the nine polymorphic membrane proteins of Chlamydia trachomatis for their ability to induce protective immune responses in mice against a C. muridarum challenge. *Vaccine*. 2017;35: 2543–2549. doi:10.1016/j.vaccine.2017.03.070
209. Nunes A, Gomes JP, Karunakaran KP, Brunham RC. Bioinformatic Analysis of Chlamydia trachomatis Polymorphic Membrane Proteins PmpE, PmpF, PmpG and PmpH as Potential Vaccine Antigens. *PLoS One*. 2015;10: e0131695. doi:10.1371/journal.pone.0131695
210. Poston TB, Gottlieb SL, Darville T. Status of vaccine research and development of vaccines for Chlamydia trachomatis infection. *Vaccine*. 2019;37: 7289–7294. doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.023
211. Whittum-Hudson JA, An LL, Saltzman WM, Prendergast RA, MacDonald AB. Oral immunization with an anti-idiotypic antibody to the exoglycolipid antigen protects against experimental Chlamydia trachomatis infection. *Nat Med*. 1996;2: 1116–1121. doi:10.1038/nm1096-1116
212. Rank RG, Dascher C, Bowlin AK, Bavoil PM. Systemic immunization with Hsp60 alters the development of chlamydial ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36: 1344–1351.
213. Meoni E, Faenzi E, Frigimelica E, Zedda L, Skibinski D, Giovinazzi S, et al. CT043, a protective antigen that induces a CD4+ Th1 response during Chlamydia trachomatis infection in mice and humans. *Infect Immun*. 2009;77: 4168–4176. doi:10.1128/IAI.00344-09
214. Olivares-Zavaleta N, Whitmire WM, Kari L, Sturdevant GL, Caldwell HD. CD8+ T cells define an unexpected role in live-attenuated vaccine protective immunity against Chlamydia trachomatis infection in macaques. *J Immunol*. 2014;192: 4648–4654. doi:10.4049/jimmunol.1400120

215. Davidson HJ, Byrnes SA, Montgomery PC. The effect of immunization route on rat serum and tear antibody responses to *Chlamydia trachomatis*. *Reg Immunol*. 1993;5: 114–119.
216. Inic-Kanada A, Stojanovic M, Schlacher S, Stein E, Belij-Rammerstorfer S, Marinkovic E, et al. Delivery of a Chlamydial Adhesin N-PmpC Subunit Vaccine to the Ocular Mucosa Using Particulate Carriers. *PLoS One*. 2015;10: e0144380. doi:10.1371/journal.pone.0144380
217. Grayston JT, Woolridge RL, Wang S-P, Yen C-H, Yang C-Y, Cheng K-H, et al. Field Studies of Protection from Infection by Experimental Trachoma Virus Vaccine in Preschool-Aged Children on Taiwan. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1963;112: 589–595. doi:10.3181/00379727-112-28112
218. Woolridge RL, Grayston JT, Chang IH, Yang CY, Cheng KH. Long-term follow-up of the initial (1959-1960) trachoma vaccine field trial on Taiwan. *Am J Ophthalmol*. 1967;63: Suppl:1650-1655. doi:10.1016/0002-9394(67)94159-1
219. Woolridge RL, Grayston JT, Chang IH, Cheng KH, Yang CY, Neave C. Field trial of a monovalent and of a bivalent mineral oil adjuvant trachoma vaccine in Taiwan school children. *Am J Ophthalmol*. 1967;63: Suppl:1645-1650. doi:10.1016/0002-9394(67)94158-x
220. Sowa S, Sowa J, Collier LH, Blyth WA. Trachoma vaccine field trials in The Gambia. *J Hyg (Lond)*. 1969;67: 699–717. doi:10.1017/s0022172400042157
221. Snyder J, Nichols R, Bell S, Haddad N, Murray E, McComb D. Vaccination against trachoma in Saudi Arabia: Design of field trials and initial results. *Industry trop Hlth*. 1964;5: 65.
222. Bietti GB, Guerra P, Felici A, Voza R. RESULTS OF ANTITRACHOMA VACCINATION TRIALS IN EAST AFRICA. *J All India Ophthalmol Soc*. 1964;12: 59–64.
223. Collier LH. The present status of trachoma vaccination studies. *Bull World Health Organ*. 1966;34: 233–241.
224. Snyder JC, Bell SD, Murray ES, Thygeson P, Haddad N. Attempt to immunize a volunteer (with formalin-inactivated virus) against experimental trachoma induced by Saudi Arabian strain 2. *Ann N Y Acad Sci*. 1962;98: 368–378. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb30559.x
225. Bell SD, Murray ES, Carroll TJ, Snyder JC. STUDIES ON TRACHOMA. III. COMPARISON OF VIRUS INFECTIVITY FOR MAN AND CHICK EMBRYOS. *Am J Trop Med Hyg*. 1963;12: 902–908.
226. Grayston JT, Wang SP, Yang YF, Woolridge RL. The effect of trachoma virus vaccine on the course of experimental trachoma infection in blind human volunteers. *J Exp Med*. 1962;115: 1009–1022. doi:10.1084/jem.115.5.1009

227. Khaw O, Lin H, Wang S, Woolridge R, Grayston J. Trachoma vaccine studies in volunteer students of the National Defense Medical Center. III. Oil adjuvant vaccine: antibody response study and eye challenge inoculation with egg grown and purified trachoma virus. *Chin med J free China Edn.* 1963;10: 97.
228. Scott JG. Experience with live trachoma vaccine. *Trans Ophthalmol Soc U K* (1962). 1964;84: 615–624.
229. Hanna L, Jawetz E, Dawson CR, Thygeson P. Long-term clinical, microbiological, and immunological observations of a volunteer repeatedly infected with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 1982;16: 895–900. doi:10.1128/jcm.16.5.895-900.1982
230. Bøje S, Olsen AW, Erneholm K, Agerholm JS, Jungersen G, Andersen P, et al. A multi-subunit *Chlamydia* vaccine inducing neutralizing antibodies and strong IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CMI responses protects against a genital infection in minipigs. *Immunol Cell Biol.* 2016;94: 185–195. doi:10.1038/icb.2015.79
231. Abraham S, Juel HB, Bang P, Cheeseman HM, Dohn RB, Cole T, et al. Safety and immunogenicity of the chlamydia vaccine candidate CTH522 adjuvanted with CAF01 liposomes or aluminium hydroxide: a first-in-human, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis.* 2019;19: 1091–1100. doi:10.1016/S1473-3099(19)30279-8
232. Renneker KK, Abdala M, Addy J, Al-Khatib T, Amer K, Badiane MD, et al. Global progress toward the elimination of active trachoma: an analysis of 38 countries. *Lancet Glob Health.* 2022;10: e491–e500. doi:10.1016/S2214-109X(22)00050-X
233. Developing a *Chlamydia Trachomatis* vaccine | TracVac Project | Fact Sheet | H2020. In: CORDIS | European Commission [Internet]. [cited 25 Jul 2023]. Available: <https://cordis.europa.eu/project/id/733373/fr>
234. Olsen AW, Rosenkrands I, Holland MJ, Andersen P, Follmann F. A *Chlamydia trachomatis* VD1-MOMP vaccine elicits cross-neutralizing and protective antibodies against C/C-related complex serovars. *npj Vaccines.* 2021;6: 1–11. doi:10.1038/s41541-021-00312-9
235. Filardo S, Di Pietro M, Sessa R. Better In Vitro Tools for Exploring *Chlamydia trachomatis* Pathogenesis. *Life (Basel).* 2022;12: 1065. doi:10.3390/life12071065
236. Lei L, Yang C, Patton MJ, Smelkinson M, Dorward D, Ma L, et al. A Chlamydial Plasmid-Dependent Secretion System for the Delivery of Virulence Factors to the Host Cytosol. *mBio.* 2021;12: e0117921. doi:10.1128/mBio.01179-21
237. Inic-Kanada A, Stein E, Stojanovic M, Schuerer N, Ghasemian E, Filipovic A, et al. Effects of iota-carrageenan on ocular *Chlamydia trachomatis* infection in vitro and in vivo. *J Appl Phycol.* 2018;30: 2601–2610. doi:10.1007/s10811-018-1435-0

238. Rahn C, Marti H, Frohns A, Frohns F, Blenn C, Leonard CA, et al. Water-filtered infrared A reduces chlamydial infectivity in vitro without causing ex vivo eye damage in pig and mouse models. *J Photochem Photobiol B*. 2016;165: 340–350. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.11.001
239. Entrocassi AC, Catalano AV, Ouviaña AG, Wilson EG, López PG, Rodríguez Fermepin M. In vitro inhibitory effect of *Hydrocotyle bonariensis* Lam. extracts over *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* on different stages of the chlamydial life cycle. *Heliyon*. 2021;7: e06947. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06947
240. Dolat L, Carpenter VK, Chen Y-S, Suzuki M, Smith EP, Kuddar O, et al. *Chlamydia* repurposes the actin-binding protein EPS8 to disassemble epithelial tight junctions and promote infection. *Cell Host Microbe*. 2022;30: 1685-1700.e10. doi:10.1016/j.chom.2022.10.013
241. Cheong HC, Cheok YY, Chan YT, Tang TF, Sulaiman S, Looi CY, et al. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoding Pgp3 protein induces secretion of distinct inflammatory signatures from HeLa cervical epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2023;23: 58. doi:10.1186/s12866-023-02802-3
242. Dudiak BM, Nguyen TM, Needham D, Outlaw TC, McCafferty DG. Inhibition of the futasol pathway for menaquinone biosynthesis suppresses *Chlamydia trachomatis* infection. *FEBS Lett*. 2021;595: 2995–3005. doi:10.1002/1873-3468.14223
243. Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015;305: 815–827. doi:10.1016/j.ijmm.2015.07.005
244. Amaral AF, McQueen BE, Bellingham-Johnstun K, Poston TB, Darville T, Nagarajan UM, et al. Host-Pathogen Interactions of *Chlamydia trachomatis* in Porcine Oviduct Epithelial Cells. *Pathogens*. 2021;10: 1270. doi:10.3390/pathogens10101270
245. Nagarajan UM, Cho C, Gyorke CE, Nagarajan S, Ezzell JA, Brochu H, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-1 Alpha Synthesis and Cell Death Is Increased in Mouse Epithelial Cells Infected With *Chlamydia muridarum*. *J Infect Dis*. 2021;224: S47–S55. doi:10.1093/infdis/jiab168
246. Rapoza PA, Tahija SG, Carlin JP, Miller SL, Padilla ML, Byrne GI. Effect of interferon on a primary conjunctival epithelial cell model of trachoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32: 2919–2923.
247. Poleff L. CULTURE IN VITRO OF THE CORPUSCLES OF TRACHOMA. *Br J Ophthalmol*. 1939;23: 738–740. doi:10.1136/bjo.23.11.738

248. Kim DS, Ko MK, Kang KT. Co-cultivation of conjunctival epithelial cells and *Chlamydia trachomatis*: electron microscopic findings. *Korean J Ophthalmol.* 1998;12: 1–5. doi:10.3341/kjo.1998.12.1.1
249. Tang C, Liu C, Maffei B, Niragire B, Cohen H, Kane A, et al. Primary ectocervical epithelial cells display lower permissivity to *Chlamydia trachomatis* than HeLa cells and a globally higher pro-inflammatory profile. *Sci Rep.* 2021;11: 5848. doi:10.1038/s41598-021-85123-7
250. Lorenzen E, Contreras V, Olsen AW, Andersen P, Desjardins D, Rosenkrands I, et al. Multi-component prime-boost *Chlamydia trachomatis* vaccination regimes induce antibody and T cell responses and accelerate clearance of infection in a non-human primate model. *Front Immunol.* 2022;13: 1057375. doi:10.3389/fimmu.2022.1057375
251. Stojanovic M, Lukic I, Marinkovic E, Kovacevic A, Miljkovic R, Tobias J, et al. Cross-Reactive Effects of Vaccines: Heterologous Immunity between Tetanus and *Chlamydia*. *Vaccines (Basel).* 2020;8: 719. doi:10.3390/vaccines8040719
252. Nogueira AT, Braun KM, Carabeo RA. Characterization of the Growth of *Chlamydia trachomatis* in In Vitro-Generated Stratified Epithelium. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7: 438. doi:10.3389/fcimb.2017.00438
253. Whittum-Hudson JA, O'Brien TP, Prendergast RA. Murine model of ocular infection by a human biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36: 1976–1987.
254. Badamchi-Zadeh A, McKay PF, Holland MJ, Paes W, Brzozowski A, Lacey C, et al. Intramuscular Immunisation with Chlamydial Proteins Induces *Chlamydia trachomatis* Specific Ocular Antibodies. *PLoS One.* 2015;10: e0141209. doi:10.1371/journal.pone.0141209
255. Su H, Morrison RP, Watkins NG, Caldwell HD. Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med.* 1990;172: 203–212. doi:10.1084/jem.172.1.203
256. Su H, Caldwell HD. Immunogenicity of a chimeric peptide corresponding to T helper and B cell epitopes of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *J Exp Med.* 1992;175: 227–235. doi:10.1084/jem.175.1.227
257. Lanfermann C, Wintgens S, Ebensen T, Kohn M, Laudeley R, Schulze K, et al. Prophylactic Multi-Subunit Vaccine against *Chlamydia trachomatis*: In Vivo Evaluation in Mice. *Vaccines (Basel).* 2021;9: 609. doi:10.3390/vaccines9060609
258. Westbay TD, Dascher CC, Hsia RC, Bavoil PM, Zauderer M. Dissociation of immune determinants of outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Infect Immun.* 1994;62: 5614–5623. doi:10.1128/iai.62.12.5614-5623.1994

259. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 2: 415–440. doi:10.1099/00207713-49-2-415
260. Murray ES. Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis Virus. I. Isolation And Identification As A Member Of The Psittacosis-Lymphogranuloma-Trachoma Group. *J Infect Dis.* 1964;114: 1–12. doi:10.1093/infdis/114.1.1
261. Rodolakis A. [Experimental models in chlamydiosis]. *Ann Rech Vet.* 1987;18: 345–354.
262. Ahmad A, Dawson CR, Yoneda C, Togni B, Schachter J. Resistance to reinfection with a chlamydial agent (guinea pig inclusion conjunctivitis agent). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16: 549–553.
263. Watkins NG, Hadlow WJ, Moos AB, Caldwell HD. Ocular delayed hypersensitivity: a pathogenetic mechanism of chlamydial-conjunctivitis in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83: 7480–7484. doi:10.1073/pnas.83.19.7480
264. Morrison RP, Lyng K, Caldwell HD. Chlamydial disease pathogenesis. Ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein. *J Exp Med.* 1989;169: 663–675. doi:10.1084/jem.169.3.663
265. Morrison RP, Belland RJ, Lyng K, Caldwell HD. Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *J Exp Med.* 1989;170: 1271–1283. doi:10.1084/jem.170.4.1271
266. Monnickendam MA, Darougar S, Tilbury AM. Ocular and dermal delayed hypersensitivity reactions in guinea-pigs following infection with guinea-pig inclusion conjunctivitis agent (*Chlamydia psittaci*). *Clin Exp Immunol.* 1981;44: 57–62.
267. Lacy HM, Bowlin AK, Hennings L, Scurlock AM, Nagarajan UM, Rank RG. Essential role for neutrophils in pathogenesis and adaptive immunity in *Chlamydia caviae* ocular infections. *Infect Immun.* 2011;79: 1889–1897. doi:10.1128/IAI.01257-10
268. Wilson DP, Bowlin AK, Bavoil PM, Rank RG. Ocular pathologic response elicited by *Chlamydia* organisms and the predictive value of quantitative modeling. *J Infect Dis.* 2009;199: 1780–1789. doi:10.1086/599093
269. Rank RG, Whittimore J, Bowlin AK, Dessus-Babus S, Wyrick PB. Chlamydiae and polymorphonuclear leukocytes: unlikely allies in the spread of chlamydial infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54: 104–113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00459.x

270. Filipovic A, Ghasemian E, Inic-Kanada A, Lukic I, Stein E, Marinkovic E, et al. The effect of infectious dose on humoral and cellular immune responses in *Chlamydomydia caviae* primary ocular infection. *PLoS One*. 2017;12: e0180551. doi:10.1371/journal.pone.0180551
271. Belij-Rammerstorfer S, Inic-Kanada A, Stojanovic M, Marinkovic E, Lukic I, Stein E, et al. Infectious dose and repeated infections are key factors influencing immune response characteristics in guinea pig ocular chlamydial infection. *Microbes Infect*. 2016;18: 254–262. doi:10.1016/j.micinf.2015.12.001
272. Monnickendam MA, Darougar S, Treharne JD, Tilbury AM. Guinea-pig inclusion conjunctivitis as a model for the study of trachoma: clinical, microbiological, serological, and cytological studies of primary infection. *Br J Ophthalmol*. 1980;64: 279–283. doi:10.1136/bjo.64.4.279
273. Monnickendam MA, Darougar S, Treharne JD, Tilbury AM. Development of chronic conjunctivitis with scarring and pannus, resembling trachoma, in guinea-pigs. *Br J Ophthalmol*. 1980;64: 284–290. doi:10.1136/bjo.64.4.284
274. Malaty R, Dawson CR, Wong I, Lyon C, Schachter J. Serum and tear antibodies to *Chlamydia* after reinfection with guinea pig inclusion conjunctivitis agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21: 833–841.
275. Inic-Kanada A, Stojanovic M, Marinkovic E, Becker E, Stein E, Lukic I, et al. A Probiotic Adjuvant *Lactobacillus rhamnosus* Enhances Specific Immune Responses after Ocular Mucosal Immunization with Chlamydial Polymorphic Membrane Protein C. *PLoS One*. 2016;11: e0157875. doi:10.1371/journal.pone.0157875
276. Inic-Kanada A, Stojanovic M, Miljkovic R, Stein E, Filipovic A, Frohns A, et al. Water-filtered Infrared A and visible light (wIRA/VIS) treatment reduces *Chlamydia caviae*-induced ocular inflammation and infectious load in a Guinea pig model of inclusion conjunctivitis. *J Photochem Photobiol B*. 2020;209: 111953. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111953
277. Pham RT, Sung M, Dawson CR, Schachter J. Chlamydial infection of subcutaneous conjunctival transplants in guinea pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31: 1367–1373.
278. Oh JO, Tarizzo ML. Ocular lesions induced by the trachoma agent in rabbits. *J Bacteriol*. 1969;97: 1042–1047. doi:10.1128/jb.97.3.1042-1047.1969
279. Abu el-Asrar AM, Maudgal PC, Emarah MH, Missotten L. Experimental chlamydial keratitis in rabbits. Correlation with chlamydia infected McCoy tissue culture cells. *Doc Ophthalmol*. 1988;69: 353–369. doi:10.1007/BF00162749
280. Grayston JT, Wang S. New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause. *J Infect Dis*. 1975;132: 87–105. doi:10.1093/infdis/132.1.87



281. Taylor HR, Kolarczyk RA, Johnson SL, Schachter J, Prendergast RA. Effect of bacterial secondary infection in an animal model of trachoma. *Infect Immun.* 1984;44: 614–616. doi:10.1128/iai.44.3.614-616.1984
282. Patton DL, Cosgrove PA, Grutzmacher RD, Kuo CC, Wang SP. Experimental trachoma in subcutaneous conjunctival autografts in macaques. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28: 1575–1582.
283. Patton DL, Kuo CC, Brenner RM. Chlamydia trachomatis oculogenital infection in the subcutaneous autotransplant model of conjunctiva, salpinx and endometrium. *Br J Exp Pathol.* 1989;70: 357–367.
284. Patton DL, Kuo CC. Histopathology of Chlamydia trachomatis salpingitis after primary and repeated reinfections in the monkey subcutaneous pocket model. *J Reprod Fertil.* 1989;85: 647–656. doi:10.1530/jrf.0.0850647
285. Cosgrove PA, Patton DL, Kuo CC, Wang SP, Lindquist TD. Experimentally induced ocular chlamydial infection in infant pig-tailed macaques. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30: 995–1003.
286. Sacks DL, Todd WJ, Macdonald AB. Cell-mediated immune responses in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) with trachoma to soluble antigens of Chlamydia trachomatis. *Clin Exp Immunol.* 1978;33: 57–64.
287. Murray E, Fraser C, Peters J, McComb D, Nichols R. The owl monkey as an experimental primate model for conjunctival trachoma infection. *Trachoma and Related Disorders Caused by Chlamydial Agents*, Nichols RL, editor Amsterdam. 1971; 386.
288. Taylor HR, Prendergast RA, Dawson CR, Schachter J, Silverstein AM. An animal model for cicatrizing trachoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21: 422–433.
289. Dawson CR, Mordhorst CH, Thygeson P. Infection of rhesus and cynomolgus monkeys with egg-grown viruses of trachoma and inclusion conjunctivitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;98: 167–176. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb30541.x
290. Taylor HR, Johnson SL, Prendergast RA, Schachter J, Dawson CR, Silverstein AM. An animal model of trachoma II. The importance of repeated reinfection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;23: 507–515.
291. Taylor HR, Agarwala N, Johnson SL. Detection of experimental Chlamydia trachomatis eye infection in conjunctival smears and in tissue culture by use of fluorescein-conjugated monoclonal antibody. *J Clin Microbiol.* 1984;20: 391–395. doi:10.1128/jcm.20.3.391-395.1984
292. Whittum-Hudson JA, Taylor HR, Farazdaghi M, Prendergast RA. Immunohistochemical study of the local inflammatory response to chlamydial ocular infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27: 64–69.

293. Hudson AP, McEntee CM, Reacher M, Whittum-Hudson JA, Taylor HR. Inapparent ocular infection by *Chlamydia trachomatis* in experimental and human trachoma. *Curr Eye Res.* 1992;11: 279–283. doi:10.3109/02713689209001780
294. Holland SM, Hudson AP, Bobo L, Whittum-Hudson JA, Viscidi RP, Quinn TC, et al. Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state. *Infect Immun.* 1992;60: 2040–2047. doi:10.1128/iai.60.5.2040-2047.1992
295. Cheema MA, Schumacher HR, Hudson AP. RNA-directed molecular hybridization screening: evidence for inapparent chlamydial infection. *Am J Med Sci.* 1991;302: 261–268. doi:10.1097/00000441-199111000-00001
296. Pal S, Pu Z, Huneke RB, Taylor HR, Whittum-Hudson JA. Chlamydia-specific lymphocytes in conjunctiva during ocular infection: limiting dilution analysis. *Reg Immunol.* 1990;3: 171–176.
297. Campos M, Pal S, O'Brien TP, Taylor HR, Prendergast RA, Whittum-Hudson JA. A chlamydial major outer membrane protein extract as a trachoma vaccine candidate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36: 1477–1491.
298. Kari L, Whitmire WM, Carlson JH, Crane DD, Reveneau N, Nelson DE, et al. Pathogenic diversity among *Chlamydia trachomatis* ocular strains in nonhuman primates is affected by subtle genomic variations. *J Infect Dis.* 2008;197: 449–456. doi:10.1086/525285
299. Kari L, Whitmire WM, Olivares-Zavaleta N, Goheen MM, Taylor LD, Carlson JH, et al. A live-attenuated chlamydial vaccine protects against trachoma in nonhuman primates. *J Exp Med.* 2011;208: 2217–2223. doi:10.1084/jem.20111266
300. Kari L, Whitmire WM, Crane DD, Reveneau N, Carlson JH, Goheen MM, et al. *Chlamydia trachomatis* native major outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine. *J Immunol.* 2009;182: 8063–8070. doi:10.4049/jimmunol.0804375
301. Taylor HR, Johnson SL, Schachter J, Caldwell HD, Prendergast RA. Pathogenesis of trachoma: the stimulus for inflammation. *J Immunol.* 1987;138: 3023–3027.
302. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP, et al. Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol.* 1993;38: 426–433. doi:10.1099/00222615-38-6-426
303. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2023. Available: <https://www.R-project.org>
304. Taylor HR, Burton MJ, Haddad D, West S, Wright H. Trachoma. *Lancet.* 2014;384: 2142–2152. doi:10.1016/S0140-6736(13)62182-0

305. Butcher R, Sokana O, Jack K, Sui L, Russell C, Last A, et al. Clinical signs of trachoma are prevalent among Solomon Islanders who have no persistent markers of prior infection with *Chlamydia trachomatis*. *Wellcome Open Res.* 2018;3: 14. doi:10.12688/wellcomeopenres.13423.2
306. Al-Rajhi AA, Hidayat A, Nasr A, Al-Faran M. The Histopathology and the Mechanism of Entropion in Patients with Trachoma. *Ophthalmology.* 1993;100: 1293–1296. doi:10.1016/S0161-6420(93)31485-5
307. Skwor TA, Atik B, Kandel RP, Adhikari HK, Sharma B, Dean D. Role of secreted conjunctival mucosal cytokine and chemokine proteins in different stages of trachomatous disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2: e264. doi:10.1371/journal.pntd.0000264
308. Frazer LC, O'Connell CM, Andrews CW, Zurenski MA, Darville T. Enhanced neutrophil longevity and recruitment contribute to the severity of oviduct pathology during *Chlamydia muridarum* infection. *Infect Immun.* 2011;79: 4029–4041. doi:10.1128/IAI.05535-11
309. Fung YL, Minchinton RM, Fraser JF. Neutrophil antibody diagnostics and screening: review of the classical versus the emerging\*. *Vox Sanguinis.* 2011;101: 282–290. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01511.x
310. Sen DK, Sarin GS, Saha K. Immunoglobulins in tear in trachoma patients. *Br J Ophthalmol.* 1977;61: 218–220. doi:10.1136/bjo.61.3.218
311. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol.* 1998;16: 27–55. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.27
312. Burton MJ, Ramadhani A, Weiss HA, Hu V, Massae P, Burr SE, et al. Active trachoma is associated with increased conjunctival expression of IL17A and profibrotic cytokines. *Infect Immun.* 2011;79: 4977–4983. doi:10.1128/IAI.05718-11
313. Reperant LA, Kuiken T, Grenfell BT, Osterhaus ADME, Dobson AP. Linking influenza virus tissue tropism to population-level reproductive fitness. *PLoS One.* 2012;7: e43115. doi:10.1371/journal.pone.0043115
314. Venkatesh A, Patel R, Goyal S, Rajaratnam T, Sharma A, Hossain P. Ocular manifestations of emerging viral diseases. *Eye (Lond).* 2021;35: 1117–1139. doi:10.1038/s41433-020-01376-y
315. Hao Y-Z, Cen L-F, Wang T, Yi T, Shi X-L, Duan H-J, et al. The protective effect of 999 XiaoErGanMao granules on the lungs and intestines of influenza A virus-infected mice. *Pharm Biol.* 2023;61: 630–638. doi:10.1080/13880209.2023.2195884

316. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses*. 2008;2: 147–154. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x
317. Baerentsen R, Tang CM, Exley RM. Et tu, Neisseria? Conflicts of Interest Between Neisseria Species. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12: 913292. doi:10.3389/fcimb.2022.913292
318. Mabey DC, Solomon AW, Foster A. Trachoma. *The Lancet*. 2003;362: 223–229. doi:10.1016/S0140-6736(03)13914-1
319. Hu VH, Harding-Esch EM, Burton MJ, Bailey RL, Kadimpeul J, Mabey DCW. Epidemiology and control of trachoma: systematic review. *Tropical Medicine & International Health*. 2010;15: 673–691. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02521.x
320. Solomon AW, Peeling RW, Foster A, Mabey DCW. Diagnosis and Assessment of Trachoma. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17: 982–1011. doi:10.1128/cmr.17.4.982-1011.2004
321. Abbas M, Bobo LD, Hsieh Y-H, Berka N, Dunston G, Bonney GE, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-B, DRB1, and DQB1 allotypes associated with disease and protection of trachoma endemic villagers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50: 1734–1738. doi:10.1167/iovs.08-2053
322. D. Helble J, N. Starnbach M. T cell responses to Chlamydia. *Pathog Dis*. 2021;79: ftab014. doi:10.1093/femspd/ftab014
323. Barabino S, Montaldo E, Solignani F, Valente C, Mingari MC, Rolando M. Immune response in the conjunctival epithelium of patients with dry eye. *Experimental Eye Research*. 2010;91: 524–529. doi:10.1016/j.exer.2010.07.008
324. Gall A, Horowitz A, Joof H, Natividad A, Tetteh K, Riley E, et al. Systemic effector and regulatory immune responses to chlamydial antigens in trachomatous trichiasis. *Front Microbiol*. 2011;2: 10. doi:10.3389/fmicb.2011.00010
325. Hu VH, Holland MJ, Burton MJ. Trachoma: Protective and Pathogenic Ocular Immune Responses to Chlamydia trachomatis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2020. doi:10.1371/journal.pntd.0002020
326. Waheed S, D'Angio CT, Wagner CL, Madtes DK, Finkelstein JN, Paxhia A, et al. Transforming growth factor alpha (TGF(alpha)) is increased during hyperoxia and fibrosis. *Exp Lung Res*. 2002;28: 361–372. doi:10.1080/01902140290091994
327. Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis*. 2000;59 Suppl 1: i60–64. doi:10.1136/ard.59.suppl\_1.i60
328. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10: 593–619. doi:10.1586/1744666X.2014.894886

329. Daig R, Rogler G, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Gross V, et al. Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut*. 2000;46: 350–358. doi:10.1136/gut.46.3.350
330. Elder MJ. The Role of Cytokines in Chronic Progressive Conjunctival Cicatrization. *Developments in Ophthalmology*. 1997;28: 159–175.
331. Berchicci L, Aragona E, Arrigo A, Marchese A, Miserocchi E, Bandello F, et al. Conjunctival Matrix Metalloproteinase-9 Clinical Assessment in Early Ocular Graft versus Host Disease. *J Ophthalmol*. 2021;2021: 9958713. doi:10.1155/2021/9958713
332. Luo L, Li D-Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45: 4293–4301. doi:10.1167/iovs.03-1145
333. Redgrove KA, McLaughlin EA. The Role of the Immune Response in Chlamydia trachomatis Infection of the Male Genital Tract: A Double-Edged Sword. *Front Immunol*. 2014;5: 534. doi:10.3389/fimmu.2014.00534

**Titre :** Caractérisation de la réponse locale à l'infection conjonctivale à *Chlamydia trachomatis* aiguë et chronique

**Mots clés :** Conjonctivite, Trachome, *Chlamydia trachomatis*, Inflammation muqueuse, Réponse immunitaire

**Résumé :** Le trachome est une kératoconjonctivite bactérienne due à *Chlamydia trachomatis*. Malgré de vastes campagnes d'éradication le trachome reste l'une des principales causes de cécité d'origine infectieuse dans les pays en développement, et aucun vaccin efficace n'a encore été développé. Cette maladie évolue en deux phases : une phase aiguë causée par des infections bactériennes récurrentes, suivie d'une phase chronique qui entraîne des lésions de fibrose conjonctivale responsables de déformations palpébrales (entropion-trichiasis) et d'opacifications cornéennes. Cette étude vise à caractériser la cinétique de l'infection (immunitaire, clinique et histologique) dans deux modèles primates (macaques cynomolgus) reproduisant les phases aiguë et chronique du trachome. Les expositions conjonctivales à la souche B/Tunis-864 de *Chlamydia trachomatis* ont été réalisées de manière unique (modèle d'infection aiguë) ou itérative hebdomadaire pendant 11 semaines (modèle d'infection chronique). Dans les deux cas, les animaux ont été soumis à une réexposition tardive et un suivi longitudinal. Les signes cliniques ont été évalués par 3 observateurs masqués sur des photos standardisées en utilisant une échelle de cotation spécifique de l'inflammation et des follicules conjonctivaux. La charge bactérienne a été monitorée par qPCR. La réaction

immunitaire locale a été étudiée par cytométrie multiparamétrique des cellules recueillies sur les empreintes conjonctivales, ainsi que le suivi des cytokines lacrymales et des immunoglobulines lacrymales spécifiques. L'évolution du microbiote oculaire a été évaluée par séquençage des régions V3-V4 de l'ARN 16S extrait d'écouvillons conjonctivaux. Enfin une analyse histologique a été réalisée sur des biopsies conjonctivales en fin d'étude.

Le suivi longitudinal de ces modèles a mis en évidence une reproduction fidèle de l'histoire naturelle chez l'homme (conjonctivite folliculaire mais également fibrose conjonctivale). La caractérisation multiparamétrique de ces deux modèles a retrouvé un influx de lymphocytes T conjonctivaux avec des cytokines anti-inflammatoires lors de la phase aiguë et une majorité de monocytes et de cytokines pro-inflammatoires lors de la phase chronique associées à l'apparition de fibrose conjonctivale. L'exposition bactérienne ainsi que le traitement antibiotique ont causé une dysbiose conjonctivale pérenne.

L'amélioration de nos connaissances de la physiopathologie du trachome, via la caractérisation de ces modèles, est un pas en avant vers la mise au point d'une stratégie vaccinale ou thérapeutique visant à éradiquer définitivement la cécité trachomateuse.

**Title:** Characterization of local response to *Chlamydia trachomatis* acute and chronic conjunctival infection

**Keywords:** Conjunctivitis, Trachoma, *Chlamydia trachomatis*, Mucosal inflammation, Immune response

**Abstract:** Trachoma, a bacterial keratoconjunctivitis caused by *Chlamydia trachomatis*, continues to be a prominent cause of blindness resulting from infectious diseases in developing nations, despite extensive treatment initiatives. Currently, there is no efficient vaccine available for this condition. The disease progresses in two phases: an acute phase resulting from recurrent bacterial infections, and a chronic phase, which leads to conjunctival scarring, lid malposition, and corneal opacification. This study aims to characterize the kinetics of infection (immune, clinical, and histological) in two primate models of *Chlamydia trachomatis* infection: acute and chronic. Cynomolgus macaque models were exposed to the B/Tunis-864 strain of *Chlamydia trachomatis* either with a single exposure or weekly exposures for 11 weeks. Both models were then re-exposed and followed longitudinally. Clinical signs were assessed using standardized images by three masked observers who employed a specific scoring system for evaluating conjunctival inflammation and follicles. Bacterial load was tracked using qPCR. Local immune responses were examined through multiparametric flow

cytometry on cells eluted from conjunctival imprints, as well as monitoring of lacrimal cytokine and immunoglobulins quantifications. Changes in conjunctival microbiota were analyzed by sequencing the 16S rRNA V3-V4 regions extracted from conjunctival swabs. Lastly, histological analysis was conducted on conjunctival biopsies at the end of the study.

Clinical follow-up demonstrated a faithful replication of the clinical history observed in humans, including follicular conjunctivitis and conjunctival fibrosis. Multi-parametric immunological assays revealed an early influx of T lymphocytes associated with anti-inflammatory cytokines during the acute phase, followed by a predominance of monocytes and pro-inflammatory cytokines during the chronic phase, which was associated with conjunctival fibrosis.

Enhancing our understanding of trachoma's pathophysiology through the characterization of these models is a promising step towards the development of vaccine and effective therapeutic strategies aimed at eliminating the burden of blinding trachoma.