



Étude de la réponse immunitaire cérébrale innée dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique et évaluation de stratégies immunomodulatrices

Thèse

Coraline Canivet

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Étude de la réponse immunitaire cérébrale innée dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique et évaluation de stratégies immunomodulatrices

Thèse

Coraline CANIVET

Sous la direction de :

Guy Boivin, directeur de recherche

Résumé

La pathogenèse de l'encéphalite herpétique (HSE) n'est pas totalement connue, mais la réplication du virus engendre une encéphalite aiguë nécrosante du lobe temporal/frontal et une inflammation cérébrale menant à l'infiltration des cellules immunitaires périphériques au sein du système nerveux central. Bien que la majorité des dommages cérébraux engendrés seraient causés par la réplication virale, de plus en plus de données indiquent une composante immunitaire dans la pathogenèse de l'HSE. La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense limitant la propagation virale. Nous savons que la réponse immunitaire est engendrée à la suite de la reconnaissance du VHS-1, notamment par les « *Toll-like receptors* » (TLRs). De plus, la synthèse d'interféron (IFN) de type I est primordiale dans la réponse antivirale. En effet, des études montrent qu'une déficience d'un composant impliqué dans les voies de signalisation menant à la production d'IFNs de type I est délétère chez la souris et chez l'humain au cours de l'HSE. Par ailleurs, la migration des cellules immunitaires au sein du SNC prend de plus en plus d'ampleur dans l'étude de la réponse immunitaire contre cette infection. Cependant, bien que différents modèles animaux permettent l'étude de la réponse immunitaire cérébrale, la complexité de cette pathologie, du SNC et de sa réponse inflammatoire en limite encore notre compréhension.

L'objectif principal de cette thèse a été de mieux comprendre la composante immunitaire de la pathogenèse de l'HSE, et plus spécifiquement, au niveau du recrutement des cellules immunitaires périphériques dans le SNC, de la participation des voies de signalisation passant par les facteurs de transcription régulateurs des IFNs (IRF) 3 et IRF7 et d'évaluer l'effet d'immunomodulateurs tels que l'artésunate et la rapamycine sur la sensibilité de différentes souches murines au cours de l'encéphalite herpétique expérimentale.

Les études menées ont permis de mettre en évidence qu'une réponse immunitaire cérébrale innée efficace participe à la résistance naturelle des souris C57BL/6 en comparaison aux souris BALB/c naturellement sensibles. En effet, la charge virale dans le SNC des souris C57BL/6 infectées par le VHS-1 par voie I.N est plus faible au pic de l'infection (i. e jour 6 post-infection [p. i]) comparativement aux souris BALB/c. Ce contrôle de la charge virale est associé à une infiltration rapide (avec au jour 4 post-infection, infiltration de monocytes inflammatoires, de cellules dendritiques conventionnelles [cDCs], de cellules dendritiques plasmacytoïdes [pDCs], de cellules « natural killers » [NK], de cellules « natural killers T » [NKT]) et coordonnée (suivie d'une infiltration de lymphocyte T au jour 8 p. i). Par ailleurs, les travaux réalisés ont permis de mettre en évidence un rôle clé d'IRF3 et plus particulièrement d'IRF7 dans la réponse interféron de type I. En ce sens, les souris déficientes pour IRF3 ou IRF7 sont plus sensibles à l'infection intranasale par le VHS-1 que les souris C57BL/6 sauvages. Chez les souris déficientes pour IRF7 et dans une moindre mesure pour IRF3, la perte de contrôle

de la réplication virale dans le cerveau est associée à un défaut de production d'IFN - β à un temps précoce après l'infection suivi par une surproduction des IFNs de type I. La sensibilité accrue au cours de l'HSE, aussi bien chez les souris BALB/c naturellement sensibles que chez les souris déficientes pour IRF7 ou IRF3, est combinée à une forte production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines à des temps tardifs post-infection. Nous avons donc évalué l'effet de l'ajout d'immunomodulateurs au traitement antiviral : l'artésunate (ART), agissant sur les voies de signalisation passant par TLR2 et 9 et la rapamycine (RAPA), agissant sur les voies de signalisation passant par TLR3 et 9 et ainsi mis en évidence que l'ajout d'un composé immunomodulateur au traitement antiviral permettait d'améliorer la survie des souris sensibles à l'infection sans action directe sur la charge virale au niveau du cerveau, mais en diminuant significativement les taux de cytokines pro-inflammatoire et de chimiokines dans le SNC. À l'aide de ces différents modèles expérimentaux, j'ai également démontré une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN - γ) et de chimiokine (CCL2), dont les taux sont diminués par l'ajout d'un traitement immunomodulateur à la thérapie antivirale dans un modèle murin sensible à l'HSE.

Ces données apportent donc de nouvelles preuves d'une composante immunitaire dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Abstract

Pathogenesis of herpes simplex encephalitis is not completely understood, but viral replication results in acute necrotizing encephalitis of the temporal/frontal lobes and cerebral inflammation leading to the infiltration of the peripheral immune cells to the central nervous system (CNS). Although most brain damage is caused by viral replication, a lot of data suggest that the immune response could also contribute to the pathogenesis of HSE. The innate immune response is the first line of host defense that limits viral spread. Numerous studies showed that the immune response is induced by the recognition of HSV-1, in particular by the toll-like receptors (TLRs). Likewise, type I interferon (IFN) is essential to the antiviral response. Indeed, studies showed that impairment of a component involved in signaling pathways inducing the type I IFN synthesis is deleterious in mice and humans during HSE. For several years, a series of studies have suggested that the immune response participated in this CNS pathology resulting in a fatal course and that hyperinflammatory responses initiated by early infiltrating innate cells play a key role in the development of this pathology. In addition, the complexity of the CNS inflammatory response constitutes a challenge for our understanding of the pathogenesis of herpetic encephalitis.

The main objective of this thesis was to better understand the immune response as a contributor to the pathogenesis of HSE, and more specifically, the recruitment of peripheral immune cells in the CNS, the involvement of signaling pathway mediated by the interferon regulatory transcription factors (IRF) 3 and IRF7 and the evaluation of the effects of immunomodulators such as artesunate and rapamycin on the susceptibility of different murine strains during experimental HSE.

An effective innate cerebral immune response contributes to the natural resistance of C57BL/6 mice compared to naturally sensitive BALB/c mice. In fact, the viral load in the CNS of C57BL/6 mice infected with HSV-1 by the I.N. route is lower at the peak of infection (day 6 post-infection (p.i)) compared to BALB/c mice. This control of the viral load is associated with rapid and coordinated infiltration of cells in the CNS (infiltration of inflammatory monocytes, conventional dendritic cells (cDCs), plasmacytoid dendritic cells (pDCs), natural killer cells (NK), natural killer cells T (NKT) on day 4 p.i) followed by T lymphocyte infiltration on day 8 p.i. Moreover, the control of viral replication is orchestrated by the activation of transcription factors IRF3 and particularly IRF7. In this regard, mice deficient for IRF3 or IRF7 are more susceptible to intranasal infection by HSV-1 than wild type C57BL/6 mice. In mice deficient for IRF7 and to a lesser extent for IRF3, the loss of control of viral replication in the brain is associated with a defect in IFN- β production at an early time after infection followed by overproduction of type I IFNs. Increased susceptibility of BALB/c mice, IRF3- or IRF7-deficient mice is associated with higher levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines levels in the CNS compared to C57BL/6 mice at later times post-infection. We therefore evaluated the effect of the addition of immunomodulators to antiviral

treatment: artesunate (ART), acting on signaling pathways mediated by TLR2 and 9 and rapamycin (RAPA), acting on signaling pathways mediated by TLR3 and 9. We show that the administration of ART or RAPA to the antiviral therapy was beneficial and improve the outcome of HSE in mice, without a direct effect on the viral load. Instead they act by decreasing significantly pro-inflammatory cytokine and chemokine levels in the CNS. Using these different experimental models, we also demonstrated overexpression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN $-\gamma$) and chemokine (CC2) during experimental HSE. In this regard, adding of immunomodulatory compound to antiviral therapy allowed to decrease levels of these inflammatory proteins.

In conclusion, these data provide new evidence for the contribution of the immune response in the pathogenesis of herpetic encephalitis, as well as the development of potential new therapeutic targets.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
ABRÉVIATIONS	XIV
REMERCIEMENTS	XXI
AVANT-PROPOS	XXIII
INTRODUCTION	1
I HISTORIQUE	1
II LES VIRUS HERPÉTIQUES	1
II.1 LES VIRUS HERPÉTIQUES INFECTANT L'HUMAIN	2
II.2 LES VIRUS ALPHA-HERPÉTIQUES – VIRUS HERPÈS SIMPLEX	3
II.2.1 La particule virale du virus herpès simplex 1	3
II.2.2 La réplication virale	4
II.2.3 Caractéristiques biologiques spécifiques	8
II.2.3.1 Latence	8
II.2.3.2 Neurovirulence	9
II.2.4 Transmission et pathogenèse des virus herpès simplex	10
II.2.5 Épidémiologie et manifestations cliniques.	11
II.2.5.1 Épidémiologie	11

II.2.5.2	Manifestations cliniques distinctes du système nerveux central	11
II.2.5.3	Infections du système nerveux central	13
II.2.5.4	Diagnostic de l'encéphalite herpétique	15
II.2.6	Les traitements antiviraux	16
II.2.6.1	Traitement de l'encéphalite herpétique	17
II.2.7	La résistance aux antiviraux	18
III	LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	18
III.1	MISE EN PLACE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CÉRÉBRALE CONTRE LE VIRUS HERPÈS SIMPLEX 1	18
III.1.1	Les barrières anatomiques	18
III.1.2	Les cellules immunitaires résidentes du cerveau	20
III.2	LA RECONNAISSANCE DU VIRUS	23
III.2.1	Les récepteurs	23
III.2.1.1	Les récepteurs « Toll-Like »	23
III.2.1.1.1	Le récepteur « Toll-Like » 2	25
III.2.1.1.2	Le récepteur « Toll-Like » 3	26
III.2.1.1.3	Le récepteur « Toll-Like » 9	28
III.2.1.2	Les récepteurs « retinoic-acid-inducible gene-1-like »	29
III.2.1.2.1	Les récepteurs « retinoic-acid-inducible gene 1 » et « melanoma differentiation-associated protein 5 »	30
III.2.1.2.2	Le récepteur « Laboratory of Genetics and Physiology 2 »	31
III.2.1.3	Les senseurs cytosoliques	31
III.2.2	Les facteurs de transcription	35
III.2.2.1	Les facteurs de transcription « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell » et « activator protein 1 »	35
III.2.2.2	Les facteurs de transcription « interferon regulatory factors » 3 et 7	35

III.3	LA RÉPONSE INTERFÉRON DE TYPE I	38
III.4	LES CELLULES IMMUNITAIRES PÉRIPHÉRIQUES INFILTRANT LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	43
III.5	LA NEUROINFLAMMATION	55
IV	NOUVELLES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES	57
IV.1	LES VACCINS PRÉVENTIFS ET THÉRAPEUTIQUES	57
IV.2	LES NOUVEAUX COMPOSÉS AYANT UNE ACTIVITÉ ANTIVIRALE	59
IV.2.1	Les nouveaux composés antiviraux	60
IV.2.2	Les molécules dérivées de plantes	60
IV.3	LES STRATÉGIES IMMUNOMODULATRICES	61
IV.3.1	Les dérivés de l'artémisinine	62
IV.3.2	La rapamycine	62
V	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	65
V.1	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	65
V.2	APERÇU DES RÉSULTATS ET CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE.	67
<u>CHAPITRE I : LA CINÉTIQUE D'INFILTRATION DE CELLULES IMMUNITAIRES PÉRIPHÉRIQUES ET LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ENGENDRÉE AU NIVEAU DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL PARTICIPENT À LA DIFFÉRENCE DE PRONOSTIC DE L'ENCÉPHALITE HERPÉTIQUE ENTRE LES SOURIS RÉSISTANTES C57BL/6 ET LES SOURIS SENSIBLES BALB/C.</u>		69
I	AVANT-PROPOS	69
II	RÉSUMÉ	69
III	ARTICLE SCIENTIFIQUE	71
<u>CHAPITRE II : LA RÉSISTANCE NATURELLE DES SOURIS C57BL/6, PAR LA RÉPONSE INTERFÉRON DE TYPE I, DÉPEND DE LA VOIE DE SIGNALISATION EN AVAL DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION IRF3 ET SURTOUT IRF7.</u>		95
I	AVANT-PROPOS	95
II	RÉSUMÉ	95

III	ARTICLE SCIENTIFIQUE	96
<u>CHAPITRE III : LA MODULATION DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ASSOCIÉE À UN TRAITEMENT ANTIVIRAL PERMET UNE AMÉLIORATION DU PRONOSTIC DE L'ENCÉPHALITE HERPÉTIQUE, CHEZ LES SOURIS SENSIBLES BALB/C.</u>		110
I	AVANT-PROPOS	110
II	RÉSUMÉ	110
III	ARTICLE SCIENTIFIQUE	112
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>		133
<u>CONCLUSION</u>		147
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		149

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : TAXONOMIE DES *HERPESVIRIDAE* INFECTANT L'HUMAIN.....2

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE ET IMAGE DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA PARTICULE VIRALE DU VHS.....	3
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA RÉPLICATION VIRALE DU VHS.....	5
FIGURE 3 : RÉPLICATION DU GÉNOME DU VHS.....	7
FIGURE 4 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LATENCE ET DE LA RÉACTIVATION DU VHS.....	9
FIGURE 5 : LES PRINCIPALES MOLÉCULES ANTIVIRALES ET LEURS MÉCANISMES D’ACTIONS.	16
FIGURE 6 : LES ASSOCIATIONS DES CELLULES DE LA BHE	19
FIGURE 7 : ACTIVATION DE LA MICROGLIE	22
FIGURE 8 : APERÇU DES VOIES DE SIGNALISATION PASSANT PAR LES TLRs MEMBRANAIRES.....	24
FIGURE 9 : UN APERÇU DES VOIES DE SIGNALISATION PASSANT PAR LES TLRs ENDOSOMAUX.	25
FIGURE 10 : UN APERÇU DES VOIES DE SIGNALISATION PASSANT PAR LES RLRs.	29
FIGURE 11 : UN APERÇU DES VOIES DE SIGNALISATION PASSANT PAR LES SENSEURS CYTOSOLIQUES.....	32
FIGURE 12 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR LES IFN DE TYPE I	40
FIGURE 13 : DIFFÉRENTES FONCTIONS DES PRINCIPAUX ISGS	41
FIGURE 14 : EFFETS DES IFNS DE TYPE I SUR LES DIFFÉRENTES POPULATIONS DE CELLULES IMMUNITAIRES.	42
FIGURE 15 : MODES D’ACTION DES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES AU COURS DE LA RÉPONSE ANTIVIRALE.	44
FIGURE 16 : DIFFÉRENTES SOUS-POPULATIONS DE MONOCYTES.....	46
FIGURE 17 : RÉGULATION DE LA RÉPONSE DES CELLULES NKS PAR DES RÉCEPTEURS ACTIVATEURS ET INHIBITEURS.....	48
FIGURE 18 : LES DIFFÉRENTS MÉCANISMES CYTOTOXIQUES DES CELLULES NKS.....	49

FIGURE 19 : DIFFÉRENTS MODES D’ACTION DES CELLULES NKS AU COURS DE LA RÉPONSE ANTIVIRALE	50
FIGURE 20 : ACTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES AU COURS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.	52
FIGURE 21 : LES DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DE CELLULES DENDRITIQUES	53
FIGURE 22 : ACTIVATION DE LA MICROGLIE DANS LA NEUROINFLAMMATION ET LA NEURODÉGÉNÉRESCENCE.....	55
FIGURE 23 : PROCESSUS NEUROINFLAMMATOIRES.....	57
FIGURE 24 : LA RÉGULATION DE LA VOIE MTOR ACTIVÉE PAR TLR3	63
FIGURE 25 : EFFET DE LA RAPAMYCINE SUR LES LYMPHOCYTES T ET LES PDCS	64

Abréviations

4E-BP : de l'anglais « *4E-binding proteins* »

AA : acide arachidonique

ACV : acyclovir

AD: autosomal dominant

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN pol : ADN polymérase

Akt/PKB : de l'anglais « *protein kinase B* »

AMP : de l'anglais « *adénosine monophosphate* »

AP-1 : de l'anglais « *activator protein 1* »

AR : autosomal récessif

ARN : acide ribonucléique

ARN pol : ARN polymérase

ARNm : ARN messenger

ART : artésunate

ATF : de l'anglais « *activating transcription factor* »

ATP : adénosine triphosphate

BSCFB : barrière hématoencéphalorachidienne, de l'anglais « *blood-cerebrospinal fluid barrier* »

BHE : barrière hématoencéphalique, de l'anglais « *blood brain barrier* »

BLMB : barrière hématoencéphalique, de l'anglais « *blood-leptomeningeal barrier* »

C+G : cytosine + guanosine

CARD: de l'anglais « *caspase recruitment domain* »

CBP : de l'anglais « *C-AMP Response Element-binding protein (CREB) binding protein* »

CCL : de l'anglais « *CC chemokine ligand* »

CCR: de l'anglais « *CC chemokine receptor* »

CD : de l'anglais « *cluster of differentiation* »

cDCs : cellules dendritiques conventionnelles, de l'anglais « *conventional dendritic cells* »

CDV : cidofovir

cGAS : de l'anglais « *cyclic GMP-AMP synthase* »

CMH : complexe d'histocompatibilité

CMV : cytomegalovirus

CNS : de l'anglais « *central nervous system* »

COX- : cyclo-oxygénase

CPAs : cellules présentatrices de l'antigène, de l'anglais « *antigen presenting cells* »

CpG: Cytosine-phosphate-Guanosine

CSF1R : de l'anglais « *colony-stimulating factor 1 receptor 1* »

CTD : domaine C terminal, de l'anglais « *C terminal domain* »

CTLs : lymphocytes T cytotoxiques, de l'anglais « *cytotoxic lymphocytes T* »

CX3CR1 : de l'anglais « *CX3C chemokine receptor 1* »

CXCL- : de l'anglais « *C-X-C chemokien ligand* »

DAI : de l'anglais « *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors* »

db : double brin

DBD : domaine de liaison à l'ADN, de l'anglais « *DNA-binding domain* »

DCs: cellules dendritiques, de l'anglais « *dendritic cells* »

DNA: de l'anglais « *deoxyribonucleic acid* »

EEG: électroencéphalogramme

ELISA : de l'anglais « *enzyme-linked immunosorbent assay* »

ERK: de l'anglais « *extracellular signal-regulated kinases* »

et coll. : et collaborateurs

FACS : cytométrie en flux, de l'anglais « *fluorescence-activated cell sorting* »

FCV : famaciclovir

FDA: de l'anglais « *food and drug administration* »

FOS : foscarnet

FRAP: de l'anglais « *FKBP12-rapamycin associated protein* »

g : glycoprotéine

GFP : de l'anglais « *green fluorescent protein* »

GTP: guanosine triphosphate

HHV : virus herpétiques humains, de l'anglais « *human herpesvirus* »

HSE : encéphalite herpétique, de l'anglais « *herpes simplex encephalitis* »

HSV : de l'anglais « *herpes simplex virus* »

I κ B : de l'anglais « *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* »

I κ K : de l'anglais « *inhibitor κ kinases* »

IAD : domaine associé à l'IRF, de l'anglais « *IRF-associated domain* »

Iba-1 : de l'anglais « *ionized calcium binding adaptor molecule 1* »

ICP : de l'anglais « *infected cell protein* »

IFI16 : de l'anglais « *interferon gamma-inducible protein 16* »

IFNAR : récepteurs des IFN- α / β , de l'anglais « *interferon-alpha/beta receptors* »

IFNs : interférons

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine, de l'anglais « *interleukin* »

iNKT : cellules NKT invariantes, de l'anglais « *invariant natural killer T* »

iNOS : synthase oxyde nitrique inductible, de l'anglais « *inducible nitric oxide synthases* »

IPS-1: de l'anglais « *interferon- β promoter stimulator* »

IRF : facteur régulateur des IFNs, de l'anglais « *interferon regulatory factors* »

IRF-E : de l'anglais « *IRF-element* »

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISGs : gènes stimulés par l'IFN, de l'anglais « *interferon stimulated genes* »

ISRE : de l'anglais « *interferon-stimulated response elements* »

JNK : de l'anglais « *c-Jun N-terminal kinases* »

KC : de l'anglais « *keratinocyte chemoattractant* »

LATs : transcrits associés à la latence, de l'anglais « *latency-associated transcripts* »

LCR : liquide céphalorachidien

LD₅₀ : dose létale 50 %, de l'anglais « *lethal dose, 50%* »

LGP2 : de l'anglais « *laboratory of genetics and physiology 2* »

LPS: lipopolysaccharide

LT : leucotriène

Ly6C : de l'anglais « *lymphocyte antigen 6 complex locus C1* »

Ly6G : de l'anglais « *lymphocyte antigen 6 complex locus G6D* »

MAPK : de l'anglais « *mitogen-activated protein kinases* »

MDA5 : de l'anglais « *melanoma differentiation-associated protein 5* »

miRNA : de l'anglais « *micro RNA* »

MMP : métalloprotéinases matricielles, de l'anglais « *matrix metalloproteinases* »

mTOR : de l'anglais « *mammalian TOR* »

mTORC : de l'anglais « *mammalian target of rapamycin complex* »

MyD88 : de l'anglais « *myeloid differentiation primary response 88* »

NES : signal d'export nucléaire, de l'anglais « *nuclear export signals* »

NETs : de l'anglais « *neutrophil extracellular traps* »

NF-κB : de l'anglais « *nuclear factor κ-B* »

NK : de l'anglais « *natural killer* »

NKT : de l'anglais « *natural killer T* »

NLS : signal de localisation nucléaire, de l'anglais « *nuclear localization signal* »

NO : oxyde nitrique, de l'anglais « *nitric oxide* »

Ori : origine de réplication

PAMPs : de l'anglais « *pathogen-associated molecular pattern* »

PCR : réaction en chaîne par polymérase, de l'anglais « *polymerase chain reaction* »

PCV : penciclovir

pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes, de l'anglais « *plasmacytoid dendritic cells* »

PFUs : de l'anglais « *plaque-forming units* »

PG : prostaglandines

PI3K : de l'anglais « *phosphoinositide 3-kinase* »

PKR : de l'anglais « *protein kinase R* »

poly (I : C) : de l'anglais « *polyriboinosinic : polyribocytidylic acid* »

PRD : domaines de régulation positive, de l'anglais « *positive regulation domains* »

PRRs : de l'anglais « *pathogen recognition receptors* »

PTV : pritélivir

RAPA : rapamycine, de l'anglais « *rapamycin* »

Raptor: de l'anglais « *regulatory associated protein of TOR* »

RIG-I: de l'anglais « *retinoic-acid-inducible gene 1* »

RLRs : de l'anglais « *retinoic-acid-inducible gene-1-like receptors* »

RNA : de l'anglais « *ribonucleic acid* »

ROS : espèces réactives de l'oxygène, de l'anglais « *reactive oxygen species* »

sb : simple brin

Ser : sérine

SNC : système nerveux central

STAT: de l'anglais « *signal transducers and activators of transcription* »

STING: de l'anglais « *stimulator of interferon genes* »

TBK1 : de l'anglais « *TANK-binding kinase 1* »

TCR : récepteurs des cellules T, de l'anglais « *T-cell receptor* »

TF : théaflavine

Th : T auxiliaire, de l'anglais « *T helper* »

TIR : de l'anglais « *Toll/IL-1 receptor* »

TK : thymidine kinase

TLRs : de l'anglais « *Toll-like receptors* »

TNF : de l'anglais « *tumor necrosis factor* »

TOR: de l'anglais « *target of rapamycin* »

TRAF : de l'anglais « *TNF receptor-associated factor* »

TRIF : de l'anglais « *Toll/Interleukin (IL)-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor-inducing IFN- β* »

UFP : unité formatrice de plaque

U_L: de l'anglais « *unique long* »

U_s: de l'anglais « *unique short* »

VACV : valacyclovir

vhs : de l'anglais « *virus host shutoff* »

VHS : virus herpès simplex

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLP : de l'anglais « *virus like particle* »

VP: de l'anglais « *virion protein* »

VVZ : virus varicelle-zona

WB : de l'anglais « *western blot* »

WT : de l'anglais « *wild-type* »

*À mes aïeux si merveilleux,
À ce bébé qui l'aurait été*

Remerciements

Le chemin vers ce doctorat n'aura pas été de tout repos. Un parcours différent, non universitaire, qui tend à s'achever. Celui-ci n'aurait jamais pu aboutir sans le soutien, de près ou de loin, de nombreuses personnes.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Guy Boivin tout d'abord pour m'avoir donné la chance de réaliser celle-ci et de pouvoir vivre, de ce fait, une expérience internationale très enrichissante. Merci pour votre formation, votre encadrement et votre soutien reçus au cours des quasi sept dernières années, ainsi que pour les opportunités que vous m'avez données de participer à des congrès. Je tiens également à remercier la Dre Jocelyne Piret, qui m'a encadrée dans les différents projets de recherche que j'ai pu, ou non, menés à terme. Je souhaite également la remercier de m'avoir donné la chance de rédiger des budgets, des rapports ainsi que des dossiers, au cours de mon doctorat. Merci pour ces belles opportunités, qui ont enrichi un peu plus mon expérience.

Je souhaite également remercier les Drs. Nicolas Boivin et Rafik Manasria. Nicolas, pour m'avoir passé le flambeau à mon arrivée. Merci pour tes conseils précieux, d'avoir partagé tes connaissances théoriques, pratiques et techniques primordiales à l'amorçage de ma thèse. Je remercie également Rafik, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions au cours de mon doctorat et qui a été d'un soutien précieux lors des moments de doute.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour le temps qu'ils m'ont accordé et le soutien qu'ils m'ont procuré. Enfin, je souhaite remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon doctorat : Dre. Pearson, Dr Tessier et Dr Vallières.

Une équipe de recherche, ne saurait tenir debout sans des piliers forts, et je tiens à remercier mille fois, ces personnes qui sont toujours là en cas de difficultés. Que celles-ci soient théoriques, techniques ou juste personnelles. Parmi elles, je tiens à remercier Chantal Rhéaume, sans qui ce doctorat aurait été beaucoup plus pénible. Merci pour les heures (je ne sais pas s'il faut que je dise dizaines ou centaines) passées à l'animalerie. Merci pour ta bonne humeur en toute circonstance, que l'expérience fonctionne ou non, tu gardes le cap. Je vais garder un très beau souvenir de venir te voir et de te dire « T'Chantal, on fait des souris ». Je tiens également à remercier Julie Carbonneau, plus qu'une collègue, une amie. Ce n'est peut-être pas en nombre d'heures que l'on peut compter nos échanges, mais peut être en nombre de mots. Outre les discussions que l'on a eues (scientifiques ou non), les mises au point (vive les WB), les formations (haha), les rires (que le tien va me manquer!), les échanges d'e-mail ont été pour moi d'un support illimité. J'espère pouvoir perdurer ta web-série préférée. Je tiens à remercier de tout cœur Nathalie Goyette, notre maman du laboratoire, notre « ma

tante » du laboratoire, mais en aucun cas notre policière du laboratoire. Merci, Nath pour toutes les petites et grandes choses que tu fais au quotidien pour que nous puissions avoir un environnement de travail exemplaire. Merci de ne jamais dire non à la question « Nath, tu as une minute ?? » alors que tu as « la broue dans le toupet ». Tu as été celle qui m'a formée, le plus, sur les différents appareils, les différentes pratiques et techniques en place dans le laboratoire. Travailler avec toi sur les différentes mises au point a été vraiment enrichissant, et je vais garder ce souvenir longtemps. Je tiens également à remercier Marie-Hélène Cavanagh, Marie-Ève Hamelin, Marianna Baz, Marie-Christine Levesque, Liva Checkmahomed avec qui j'ai eu bien du plaisir sur les heures de diner. Enfin, je tiens à remercier Olus, pour son énergie expansive et son aide en cette fin de doctorat. Merci également aux étudiant.es présent.es ou parti.es pour leur bonne humeur contagieuse.

Je souhaite également remercier ma famille pour leur support à distance, notamment mes sœurs et le plus beau des neveux, qui sans en avoir conscience m'a redonné le sourire plus d'une fois au cours de ces 3 années de vie. Je voudrais remercier les amis qui sont une source de réconfort à toute épreuve. Ils sont ma famille et malgré les distances qui se créent par les choix de chacun, ils restent des rocs sans failles. Mille MERCIS à vous tous, pour m'avoir fait rire, fait pleurer, aidé dans les choix à faire, visité et m'avoir poussé plus loin que je ne pensais être capable. Merci à vous tous « les coupains » pour votre présence au quotidien. Merci d'enrichir ma vie.

Avant-propos

Dans le cadre de cette thèse, j'ai étudié la réponse immunitaire cérébrale innée dans le contexte de l'encéphalite herpétique expérimentale. Afin d'introduire mon sujet de thèse, j'ai fait une revue de la littérature en vue de présenter le virus herpès simplex 1, sa réplication, ses propriétés telles que la latence et la neurovirulence. Je cite les différentes manifestations cliniques qui lui sont associées ainsi que le diagnostic et les traitements actuels. Je décris ensuite la réponse immunitaire cérébrale, les barrières anatomiques et les cellules résidentes du CNS, puis la reconnaissance du virus, les voies de signalisation découlant de cette reconnaissance, le rôle de la réponse interféron de type I et des cytokines/chimiokines, l'implication des cellules immunitaires périphériques et la neuroinflammation. Enfin, j'introduis les nouvelles approches thérapeutiques.

Cette thèse comprend trois articles scientifiques publiés. Le premier pour lequel je suis la première auteure s'intitule « *The recruitment of peripheral blood leukocytes to the brain is delayed in susceptible BALB/c compared to resistant C57BL/6 mice during herpes simplex virus encephalitis* », a été publié dans le « *Journal of NeuroVirology* », le 13 février 2019, et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de cet article, j'ai écrit le manuscrit, réalisé toutes les expériences animales, les polymérisations en chaîne (PCR) quantitatives (qPCR), l'évaluation des titres viraux, le dosage des interférons (IFNs) de type I par « *enzyme-linked immunosorbant assay* » (ELISA) et des autres cytokines et chimiokines par Luminex ainsi que les expériences de cytométrie en flux (FACS) que j'ai préalablement mises au point. J'ai également réalisé l'analyse des résultats. Olus Uyar et Chantal Rhéaume m'ont supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Olus a également pris une grande part dans la mise au point et la réalisation des expériences de FACS. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

Le second article intitulé « *Both IRF3 and Especially IRF7 Play a Key Role to Orchestrate an Effective Cerebral Inflammatory Response in a Mouse Model of Herpes Simplex Virus Encephalitis* ». Il a été publié comme communication dans le « *Journal of NeuroVirology* », le 11 juillet 2018 et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de cet article, j'ai écrit le manuscrit, réalisé toutes les expériences animales, les qPCRs, l'évaluation des titres viraux, le dosage des interférons (IFNs) de type I par ELISA et des autres cytokines et chimiokines par Luminex. J'ai également travaillé, sans succès, sur la mise au point du « *western blot* » (WB) pour mettre en évidence l'activation des facteurs de transcription régulateurs des IFNs (IRF) 3 et IRF7. Chantal Rhéaume m'a supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Manon Lebel a refait les WBs, sans parvenir à des résultats interprétables. Le Dr Gosselin nous a fourni les souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 et a fait une relecture de

l'article avant soumission. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

Le troisième article dont je suis la première auteure s'intitule « *Valacyclovir Combined with Artesunate or Rapamycin Improves the Outcome of Herpes Simplex Virus Encephalitis in Mice Compared to Antiviral Therapy Alone* ». Il a été publié dans « *Antiviral Reseach* » le 11 septembre 2015 et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de cet article, j'ai écrit le manuscrit, réalisé toutes les expériences animales pour tester l'effet d'agents immunomodulateurs (artésunate et rapamycine) administrés par voie intrapéritonéale des jours 4 à 13 après l'infection, les qPCR que j'ai préalablement remis au point afin de passer d'une PCR en capillaires à une PCR en plaques de 96 puits, l'évaluation des titres viraux dont j'ai changé le protocole afin de mieux détecter les faibles charges virales, le dosage de l'IFN- β par ELISA et des autres cytokines et chimiokines par Luminex. Rafik Menasria et Chantal Rhéaume m'ont supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

Au cours de mon doctorat, j'ai également participé à des études en lien avec l'encéphalite herpétique qui ont été publiées sous forme d'article dans différentes revues scientifiques. Néanmoins, ces résultats n'entrent pas dans le cadre de cette thèse et la liste ci-dessous n'est donnée qu'à titre indicatif.

Menasria R, Canivet C, Piret J, Boivin G. Infiltration Pattern of Blood Monocytes into the Central Nervous System during Experimental Herpes Simplex Virus Encephalitis. PLoS One. 2015 Dec 23. PMID: 26700486

Menasria R, Canivet C, Piret J, Gosselin J, Boivin G. Protective role of CX3CR1 signalling in resident cells of the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis. J Gen Virol. 2017 Mar;98(3):447-460. PMID: 27902351

Menasria R, Canivet C, Piret J, Gosselin J, Boivin G. Both Cerebral and Hematopoietic Deficiencies in CCR2 Result in Uncontrolled Herpes Simplex Virus Infection of the Central Nervous System in Mice. PLoS One. 2016 Dec 8. PMID : 27930721

Introduction

I Historique

Hippocrate a été le premier à rapporter des lésions qui auraient pu être causées par le virus herpès simplex (VHS), mais les signes cliniques causés par ce virus n'ont été décrits plus en détail qu'au cours des trois derniers siècles. La majeure partie des recherches concernant l'infection et le traitement du VHS a commencé au début du XXe siècle. Celles-ci vont de la découverte de certains mécanismes à l'origine de la latence et de la réactivation du virus au développement de l'acyclovir (ACV) le premier antiviral, inhibiteur sélectif de la réplication du VHS.

Les premiers documents traitant du VHS remontent aux Grecs antiques, qui ont inventé la dénomination « *herpès* », du grec ancien « *ἕρπηξ* », « *herpein* » signifiant ramper. Hippocrate a utilisé ce terme pour décrire des ulcérations superficielles de la peau et des inflammations cutanées.

À la fin du XIXe et au début du XXe siècle, la transmission d'agents infectieux, dont le VHS, à des volontaires humains était en vogue. Vidal a eu le privilège douteux de prouver que le VHS est infectieux, en transmettant l'infection d'un humain à un autre. Alors que des études étaient effectuées chez l'humain, Gruter a débuté une série d'études animales qui a démontré la nature infectieuse du VHS sans équivoque. C'est à lui que la communauté des virologistes attribue le mérite de l'isolement du VHS (1).

II Les virus herpétiques

Les virus herpétiques sont très répandus dans la nature. De nombreuses espèces animales peuvent être infectées par ces virus. Il existe des centaines d'espèces virales différentes chez les vertébrés (*Alloherpesviridae* et *Herpesviridae*) et les invertébrés (*Malacoherpesviridae*) (2). Ce sont des virus enveloppés, de grandes tailles, mesurant approximativement 200 nanomètres (nm) et contenant la nucléocapside qui baigne dans le tégument. La capsid renferme une copie unique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral linéaire dont la taille peut atteindre 295 kilobases paires de base et qui code jusqu'à 170 protéines. Les virus herpétiques infectent leurs hôtes respectifs et établissent une latence selon un tropisme propre à chaque virus. Actuellement, neuf virus herpétiques infectant l'homme ont été identifiés (3).

II.1 Les virus herpétiques infectant l'humain

D'après la nouvelle nomenclature du comité international de taxonomie des virus (ICTV) établie en 2016, les virus herpétiques humains (HHV) font partie de la famille des *Herpesviridae*. Neuf virus herpétiques ont été décrits (HHV-1 à HHV-8 - HHV-6A et HHV-6B étant deux espèces distinctes) et sont classés en 3 sous-familles (Tableau 1) (2).

Tableau 1 : Taxonomie des *Herpesviridae* infectant l'humain.

Sous Famille/Virus	Site de Latence	Manifestations cliniques
<i>Alphaherpesvirinae</i>		
<i>Simplexvirus</i>		
<i>Human alphaherpesvirus 1 (HHV-1)</i>	– Nerfs sensitifs et ganglions trijumeaux – Ganglions trijumeaux et neurones	– Infections oropharyngées – Infections cérébrales (encéphalites)
<i>Human alphaherpesvirus 2 (HHV-2)</i>	– Ganglions sacrés – Ganglions trijumeaux et neurones	– Infections génitales – Infections néonatales – Infections cérébrales (encéphalite et méningite)
<i>Varicellovirus</i>		
<i>Human alphaherpesvirus 3 (HHV-3)</i>	– Ganglions dorsaux – Nerfs crâniens	– Varicelle – Zona
<i>Bêtaherpesvirinae</i>		
<i>Cytomegalovirus</i>		
<i>Human bêtaherpesvirus 5 (HHV-5)</i>	– Cellules endothéliales – Cellules hématopoïétiques – Muscles lisses – Épithélium des glandes salivaires	– Syndrome mononucléosique – Rétinite – Encéphalite chez le fœtus – Pneumonie – Hépatite
Human bêtaherpesvirus 6A, 6B et 7 (HHV-6A, HHV-6B et HHV-7)	– Cellules T CD4 – Cellules myéloïdes progénitrices – Épithélium des glandes salivaires – Poumons – Monocytes sanguins (HHV-6A et -6 B)	– Roséole – Pneumonie – Syndrome mononucléosique – Hépatite (HHV-6A) – Encéphalite (HHV-6A, HHV-6B et HHV7)
<i>Gammaherpesvirinae</i>		
<i>Lymphocryptovirus</i>		
<i>Human gammaherpesvirus 4 (HHV-4)</i>	—Lymphocytes	– Mononucléose – Lymphome de Burkitt – Carcinome naso-pharyngé
<i>Rhadinovirus</i>		

—Human (HHV-8)	<i>gammaherpesvirus 8</i>	– Cellules endothéliales – Lymphocytes	– « sarcome de Kaposi » – Maladie de Castelman – Lymphome des cavités corporelles
-------------------	---------------------------	---	---

Adapté de (4) : La classification, les différents sites de latence et les principales manifestations cliniques des virus infectant l'humain de la famille des *Hesperiviridae*.

II.2 Les virus alpha-herpétiques – Virus herpès simplex

II.2.1 La particule virale du virus herpès simplex 1

La particule virale infectieuse du VHS-1 a une taille de 186 nm, qui peut aller jusque 225 nm si on inclut les spicules ancrés dans son enveloppe. Elle est constituée de 4 éléments distincts : de l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve l'enveloppe constituée d'une bicouche lipidique contenant 11 glycoprotéines (g) de surface et renfermant un tégument amorphe où baigne la capsidie icosaédrique composée de 162 capsomères dans laquelle se trouve une copie de l'ADN viral linéaire se trouvant au centre de la capsidie (Figure 1) (1).

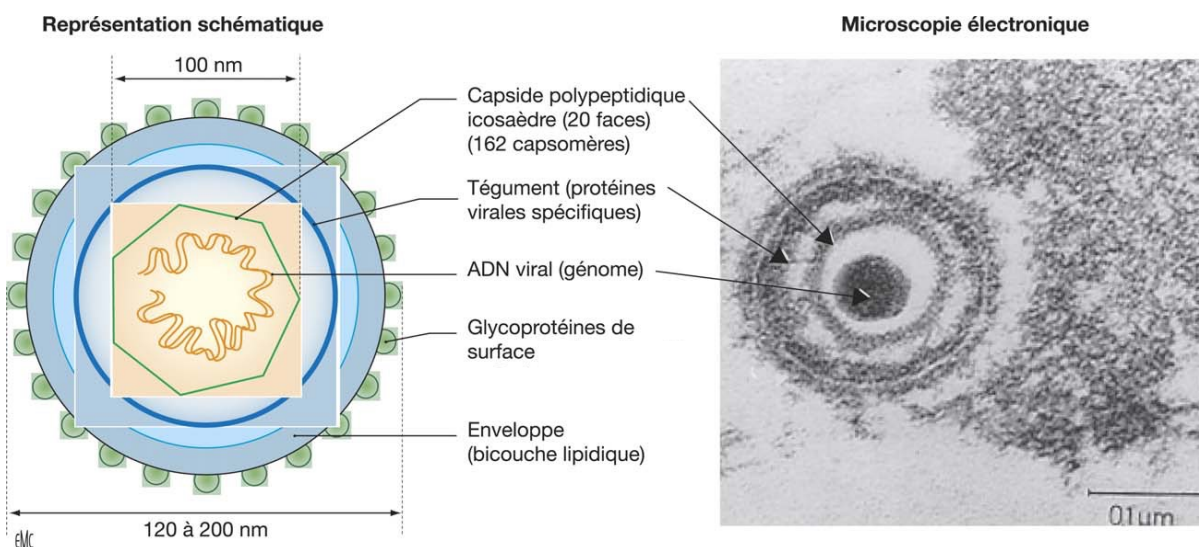


Figure 1 : Représentation schématique et image de microscopie électronique de la particule virale du VHS.

Adapté de (5) : De haut en bas, les quatre composants de la particule virale. La capsidie virale baignant dans le tégument et contenant l'ADN viral entouré de l'enveloppe externe où sont ancrées les glycoprotéines de surface.

Le noyau de la particule du VHS-1 contient l'ADN double brin (db) viral principalement linéaire (6). Le génome du VHS-1 est environ de 152 000 paires de bases (pb) (152 260 pb pour la souche 17 du VHS-1) et

contient 68 % de C+G (cytosine + guanosine) (68,3 % pour la souche 17 du VHS-1) (6). Le génome se présente sous forme d'une hélice torsadée dont les extrémités sont positionnées afin de faciliter leur rapprochement. La majorité de l'ADN viral est synthétisé en continu et forme de longs concatémères qui sont ensuite coupés durant le processus d'assemblage de la nucléocapside (6, 7). La capside est composée de 162 capsomères (150 hexagonaux, 11 pentagonaux et un portail protéique icosaédrique), qui une fois assemblée a une taille de 100 - 110 nm environ. La capside est constituée essentiellement de quatre protéines virales, « *virion protein* » (VP) 5, VP26, VP23 et VP19c (1, 6). L'espace séparant la nucléocapside de l'enveloppe est occupé par une substance amorphe largement non structurée : le tégument (1). Sa morphologie est principalement granulaire, mais présente certaines structures fibrillaires (6). Le tégument n'est pas uniformément réparti au sein de la particule virale et est composé d'une vingtaine de protéines. La majorité de ces protéines est nécessaire à la réplication du virus (p. ex. VP16) et à l'inhibition des mécanismes traductionnels de la cellule hôte comme la protéine « *virus host shutoff* » (vhs) (7, 8).

L'enveloppe consiste en une bicouche lipidique contenant au moins 11 glycoprotéines distinctes. Les glycoprotéines de l'enveloppe sont gB (VP7 et VP8.5), gC (VP8), gD (VP17 et VP18), gE (VP12.3 et VP12.6), gG, gH, gI, gK, gL et gM. L'enveloppe peut aussi contenir au moins deux et possiblement plus de protéines virales intrinsèques non glycosylées (par exemple U_s9, U_L20) (1).

II.2.2 La réplication virale

Le cycle de réplication (Figure 2) est un processus regroupant de nombreuses étapes décrites dans les paragraphes suivants.

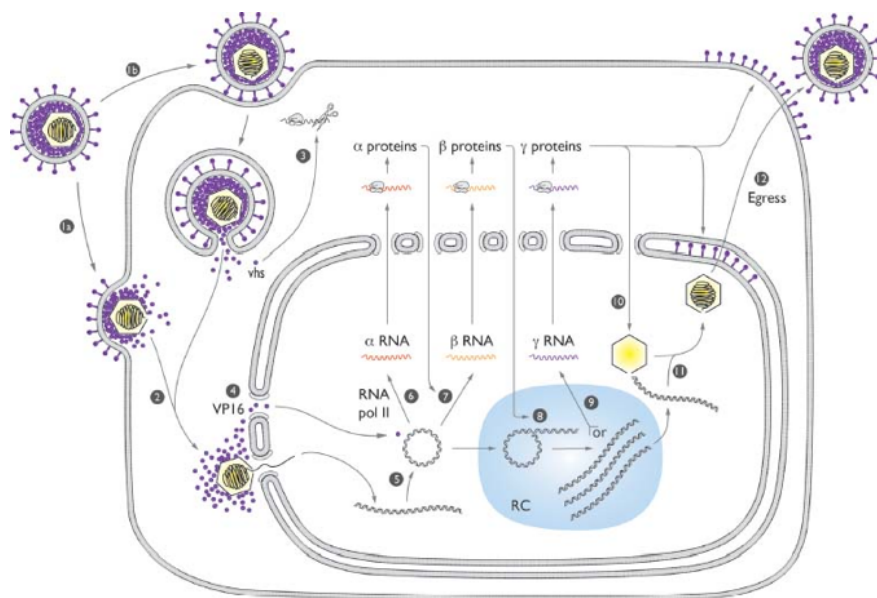


Figure 2 : Représentation schématique de la réplication virale du VHS.

Adapté de (1). 1 : Le virus se lie à la surface de la cellule et l'enveloppe du virion fusionne avec la membrane plasmique (1 a) ou le virus entre par endocytose (1 b), libérant les protéines de la capsidite et du tégument dans le cytoplasme cellulaire. 2 : La capsidite est transportée vers un pore nucléaire, où l'ADN viral est libéré dans le noyau. 3 : La protéine vhs permet la dégradation des acides ribonucléiques (ARN) messager (ARNm) de la cellule hôte. 4 : VP16 se localise dans le noyau. 5 : L'ADN viral se circularise. 6 : Il est ensuite transcrit par l'ARN polymérase (ARN pol) II de l'hôte pour donner d'abord les ARNm α . La transcription des gènes α est stimulée par la protéine tégumentaire VP16. Cinq des six protéines immédiates et précoces agissent pour réguler l'expression des gènes viraux dans le noyau. 7 : les protéines α transactivent la transcription des gènes β . 8 : Les protéines β participent à la réplication de la molécule d'ADN viral. 9 : La synthèse de l'ADN viral stimule l'expression des gènes γ . 10 : Les protéines participantes à l'assemblage de la capsidite migrent dans le noyau et selon le modèle de dé-enveloppement/réenveloppement, le réseau de lamine nucléaire est altéré afin de permettre la sortie des virions du noyau. 11 : L'ADN est incorporé dans la capsidite. 12 : La capsidite contenant l'ADN bourgeonne à partir de la membrane nucléaire interne pour former un virion enveloppé, et le virion sort de la cellule par les mécanismes de bourgeonnement.

Le VHS peut entrer dans la cellule par deux mécanismes distincts. La voie d'entrée dite primaire résulte de la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale. Elle nécessite l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et des récepteurs spécifiques présents à la surface de la cellule hôte (7). La voie d'entrée dite auxiliaire passe par l'endocytose de la particule virale, et nécessite l'interaction entre les récepteurs de fusion présents à la surface de la particule virale et la membrane de la vésicule d'endocytose (1).

La première étape d'entrée du virus par l'une ou l'autre de ces deux voies est amorcée par l'interaction de gB et gC avec les glycosaminoglycanes (GAGs) (6, 7). Dans la voie d'entrée principale du virus, cette interaction est renforcée par la liaison de gD avec un récepteur membranaire. Les nectines 1 et 2 (9, 10), l'« *herpesvirus entry mediator* » (HVEM), un membre de la famille des récepteurs du « *tumor necrosis factor* » (TNF) et finalement, une forme d'héparanes sulfates (1) peuvent servir de récepteurs pour la gD. L'entrée du virus par fusion a été décrite comme un mode d'entrée précoce après le contact de la cellule hôte avec le virus alors que l'entrée par endocytose pourrait survenir tout au long de l'exposition avec le virus (11, 12). Les récepteurs cellulaires engagés dans la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes sont l'HVEM et les nectines. Après la fusion, la capsidite virale et le tégument sont relargués dans le cytoplasme. Une partie du tégument se dissocie de la nucléocapsidite et permet le relargage de certaines protéines pouvant moduler la cellule hôte afin de créer un environnement propice à la réplication virale. La nucléocapsidite, quant

à elle, est transportée jusqu'au noyau grâce au réseau des microtubules (13). La libération de l'ADN viral se fait par un pore nucléaire. Les protéines du tégument, relarguées en même temps que la capsid, migrent vers le noyau, soit en même temps que la capsid (p.ex. VP1/2) (14), soit indépendamment de la capsid (p.ex. U_L16) (15) ou alors se localisent dans le cytoplasme (p.ex. U_L41) (16).

Le génome viral code pour 90 acides ribonucléiques (ARN) messenger (ARNm) dont 84 sont traduits en protéines. (1, 7). Lors de l'infection, les protéines du VHS-1 sont exprimées en cascade de façon très régulée. Elles sont classées selon la cinétique de transcription de leurs gènes respectifs. Il existe trois classes de gènes : α pour les gènes précoces immédiats, β pour les gènes précoces (β 1 et β 2) et γ pour les gènes tardifs (γ 1 et γ 2) (1). La transcription de l'ADN viral se déroule dans le noyau. L'ARN polymérase (ARN pol) II de l'hôte est responsable de la transcription de tous les gènes viraux au cours de l'infection, bien que les produits des gènes viraux puissent modifier son activité. Les gènes immédiats précoces α sont exprimés en premier. Lors de la transcription des gènes précoces β 1 et β 2, de nombreuses enzymes vont être synthétisées incluant celles assurant la réplication du génome viral, c'est-à-dire la thymidine kinase virale (TK) et l'ADN polymérase (ADN pol) (1). Les gènes tardifs sont transcrits pendant et après la réplication virale. Ils codent entre autres pour des protéines de structure nécessaire à l'assemblage de la capsid (VP5) et pour certaines glycoprotéines de surface (gB, gC, gD) (1, 6). L'enchaînement des événements conduisant à l'expression des différentes classes de gènes est la suivante : 1 : activation de la transcription des gènes α par VP16, une protéine γ présente dans le virion 2 : autorégulation de l'expression des gènes α . 3 : activation de la transcription des gènes β . 4 : activation de la transcription des gènes γ par les produits des gènes α et β et la réplication de l'ADN viral. 5 : Désactivation de l'expression des gènes α et β par les produits des gènes γ en fin d'infection.

La réplication du génome viral requiert la transformation de l'ADN linéaire en ADN circulaire (17). Elle nécessite 7 protéines et est communément décrite en deux étapes (1) (Figure 3).

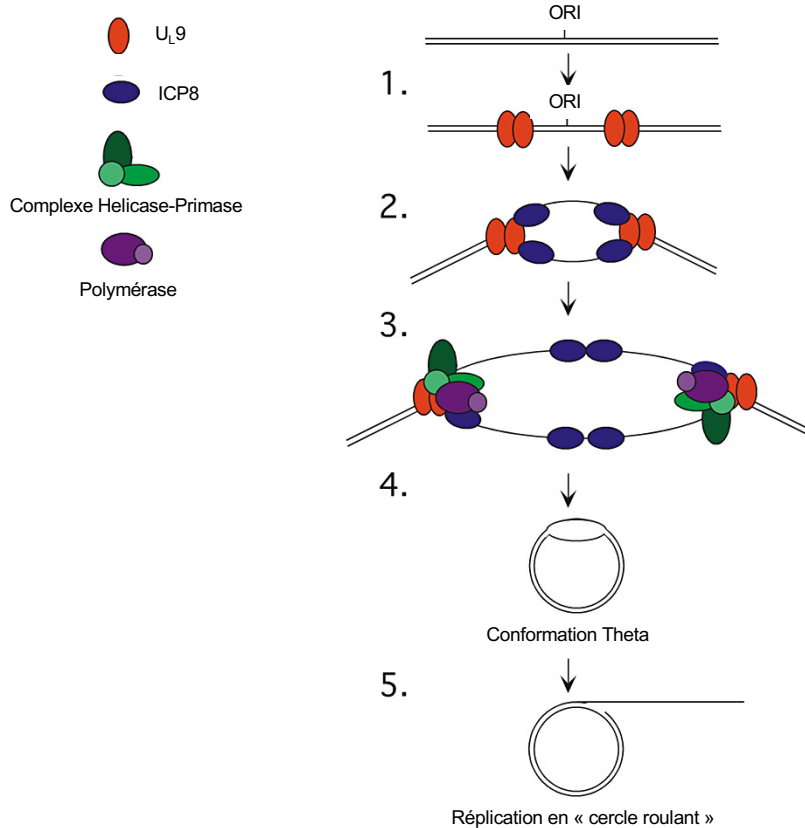


Figure 3 : Réplication du génome du VHS.

Adapté de (18) : 1) La protéine UL9 se lie à une des origines de réplication (oriL ou oriS) et amorce le déroulement de l'ADN viral. 2) La protéine ICP8 est recrutée et se lie à l'ADN sb. 3) Recrutement des 5 autres protéines (UL₅, UL₅₂, UL₈, UL₃₀, UL₄₂) requises lors du processus de réplication. 4) La réplication est alors amorcée pour ensuite faire place à 5) la réplication virale sous forme de cercle roulant.

L'assemblage de la capside se fait dans le noyau. Elle nécessite quatre protéines tardives VP5 (UL₁₉), VP19C (UL₃₈), VP23 (UL₁₈) et VP26 (UL₃₅). Des protéines mineures interviennent également dans les étapes de formation de la capside ainsi que dans l'encapsidation du génome viral. La protéine VP5 et la préprotéine VP22a forment un complexe dans le cytoplasme afin de migrer dans le noyau. Les protéines UL₆, VP19C, VP23 et VP26 vont également intervenir dans la formation, la maturation et la sortie nucléaire de la procapside (17, 19). Plusieurs protéines permettent l'incorporation et le maintien de l'ADN viral au sein de la procapside (19). Elles reconnaissent des signaux d'encapsidation du génome viral et coupent les concatémères d'ADN en monomères.

Trois mécanismes de sortie du VHS à l'extérieur de la cellule ont été proposés. Un premier modèle suggère que la capside enveloppée migre de la membrane nucléaire interne jusqu'à l'appareil de Golgi ou au

lumen du réticulum endoplasmique par le système vésiculaire de la cellule. Elle est ensuite relâchée par les voies de sécrétion de la cellule. Cependant, la composition de l'enveloppe des particules virales ressemble davantage à celle de la membrane cytoplasmique qu'à la membrane nucléaire (1). Dans un second modèle, les virus nouvellement formés fusionnent avec la membrane nucléaire interne. La particule virale est ensuite désenveloppée lors du passage au niveau de l'enveloppe nucléaire externe puis relâchée dans le cytoplasme. Les nucléocapsides sont ensuite transportées jusqu'aux endosomes et/ou à l'appareil de Golgi pour y être enveloppées, puis finalement relarguées à l'extérieur de la cellule par exocytose (1). Enfin, le troisième modèle suggère que les capsides virales sortent par les pores nucléaires. Elles rejoignent ensuite l'appareil de Golgi où elles sont enveloppées, transportées à la membrane plasmique par le système de vésicules et relarguées de la cellule par exocytose (1).

II.2.3 Caractéristiques biologiques spécifiques

Le VHS a deux propriétés biologiques spécifiques : la neurovirulence et la latence. La plupart du temps, le virus établit une latence, fournissant un réservoir pour la transmission du virus à d'autres individus, s'il est réactivé. Dans certains cas, le VHS peut envahir, se répliquer dans le système nerveux central (SNC) et induire une infection sévère ; l'encéphalite herpétique (HSE).

II.2.3.1 Latence

La capacité du VHS à établir une infection latente à vie chez son hôte humain est l'un des aspects les plus difficiles à comprendre de la biologie du VHS. Le VHS pourrait établir une latence en trois phases : la phase d'établissement, la phase de maintenance et la phase de réactivation (20). Après propagation dans le tissu au site primaire de l'infection, le virus pénètre dans les neurones sensitifs par fusion avec les extrémités axonales. La nucléocapside migre par transport axonal rétrograde vers le noyau dans le corps cellulaire du neurone.

L'ADN viral persiste dans le noyau sous la forme d'un épisome circulaire associé aux nucléosomes (21). L'expression des gènes lytiques est réprimée à l'exception de la région codante pour les transcrits associés à la latence (LATs) qui est fortement transcrite (22). Aucun virus infectieux ne peut être détecté dans les ganglions sensitifs au cours d'une infection latente. Dans une fraction de neurones contenant du VHS latent, le virus est périodiquement réactivé. Le virus infectieux migre alors par transport axonal antérograde vers les tissus périphériques, généralement vers les cellules du site ou à proximité du site de l'infection initiale (Figure 4). Les mécanismes menant à la réactivation du virus restent inconnus, mais il semblerait qu'une région de 348 pb située près de la partie 5' des LATs participe dans ce processus (23). De plus, les premiers 1,5 kilo base de la séquence des LATs sont cruciaux pour permettre une réactivation du virus dans les modèles animaux. La réactivation se produit en présence d'une immunité humorale et cellulaire efficace. Elle peut être spontanée,

mais est souvent associée à un stress physique ou émotif, à la fièvre, à une exposition aux radiations ultraviolettes, à des lésions tissulaires et à l'immunosuppression (1). En fonction de plusieurs facteurs, y compris le statut immunitaire de l'hôte, la réactivation peut être asymptomatique ou conduire à des lésions récurrentes, dont la sévérité peut varier considérablement et se présenter sous forme de lésions ponctuées invisibles à l'œil nu ou de lésions sévères.

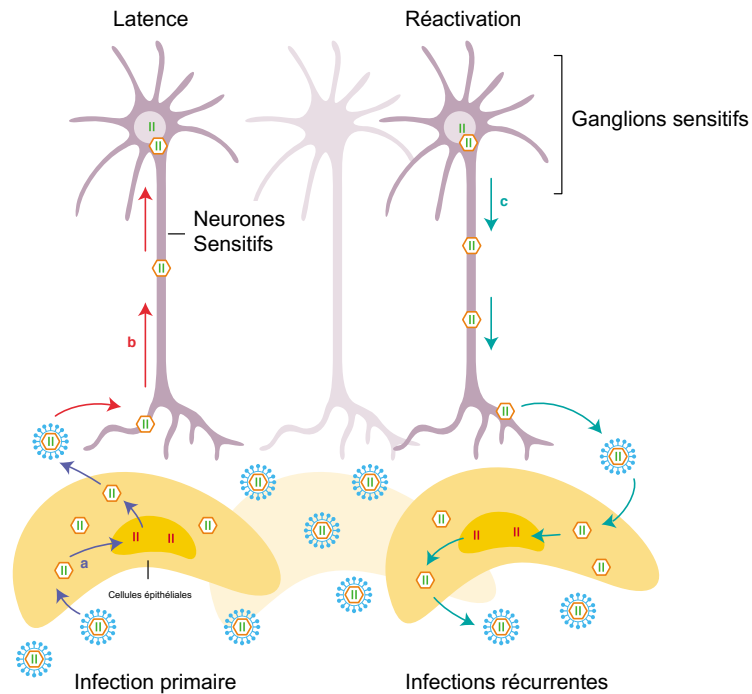


Figure 4 : Représentation schématique de la latence et de la réactivation du VHS.

Adapté de (24) : Le VHS lyse les cellules épithéliales de la peau pour provoquer une infection primaire. (b) Certains virus pénètrent dans les terminaisons des neurones sensitifs. Ils migrent par transport rétrograde vers le noyau. Le virus établit ensuite la latence dans les ganglions sensitifs. (c) La réactivation périodique s'effectue par transport antérograde des particules virales et réinfection des cellules épithéliales, ce qui conduit à une excrétion asymptomatique ou à des lésions récurrentes.

II.2.3.2 Neurovirulence

La neurovirulence englobe à la fois la neuroinvasion des sites périphériques et la capacité du VHS à se répliquer dans les cellules neuronales et gliales. Une encéphalite aiguë, focale et nécrosante localisée dans les lobes temporaux et frontaux apparaît alors de façon progressive (25).

Pour atteindre le système nerveux, le virus doit démontrer une très grande capacité de réplication (forte virulence) pour permettre le transport rétrograde des virions et ainsi l'infection des neurones. Bien que cette propriété soit probablement associée à plusieurs gènes, la délétion du gène $\gamma_134.5$, en particulier, supprime la capacité du VHS à envahir et à se répliquer dans le SNC. En effet, certaines mutations ou la suppression de ce gène produisent une réduction très importante de l'infection neuronale par le VHS autant chez la souris que chez l'humain, et ce, bien que le virus mutant puisse facilement se répliquer en culture cellulaire (26). Une des fonctions de ce gène est de protéger les cellules infectées de l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire en interagissant avec les phosphatases de la cellule hôte (27). De plus, une autre fonction cruciale de $\gamma_134.5$ dans la neurovirulence est d'inhiber l'autophagie de la cellule hôte (28). Par ailleurs, la protéine VP22 est requise pour une neurovirulence, une réplication virale et une propagation virale efficace au niveau du cerveau chez la souris après une inoculation intracérébrale. En effet, une modification du motif Di-Leu de la protéine VP22 du VHS-1 engendre une augmentation de la dose létale 50 % (LD_{50}), une diminution de la charge virale au niveau de cerveau ainsi qu'une distribution du virus limitée à certaines zones du cerveau (29). Également, la phosphorylation Tyr288 de la protéine de surface gB par Us_3 est requise pour une neurovirulence efficace chez la souris après une infection intracérébrale (30).

En outre, plusieurs autres gènes (p.ex. l'*ADN pol* et la *TK*) intervenant dans la réplication virale semblent également participer à la neurovirulence. La délétion d'un seul de ces gènes diminue la capacité d'envahir le SNC et de s'y répliquer. En effet, un virus mutant pour la *TK* et/ou l'*ADN pol* (pouvant conférer une résistance aux antiviraux) n'affecte pas le taux de survie de 100 % chez un modèle murin d'encéphalite herpétique (31). Par ailleurs, en fonction du type de modification du gène de la *TK* (faible taux de production, *TK* déficiente, ou *TK* altérée), la neurovirulence peut être inaltérée ou diminuée comparativement à la souche VHS-1 sauvage (32, 33). En outre, il existe une bonne corrélation entre la capacité répliquative *in vitro* et le potentiel neurovirulent de différentes souches mutantes de VHS-1 pour l'*ADN pol* (31, 34). Finalement, puisque les cellules neuronales ne peuvent plus se diviser et ne produisent donc pas d'ADN cellulaire, le VHS-1 est ainsi très dépendant des enzymes qu'il code pour être capable de se répliquer.

II.2.4 Transmission et pathogenèse des virus herpès simplex

Une primo-infection est la première infection d'une personne séronégative (ne possédant pas d'anticorps dirigés contre le VHS). Une infection initiale non primaire est une infection par le VHS-1 ou le VHS-2 chez une personne possédant déjà des anticorps dirigés contre l'autre type de VHS (respectivement VHS-2 ou VHS-1). Bien que très rare chez les personnes immunocompétentes séropositives pour le VHS-1 ou le VHS-2, une réinfection avec une souche différente du même type à un site anatomique différent reste possible. Cependant, cette infection est généralement bien contrôlée par le système immunitaire (35). Finalement, la

réactivation du virus latent au niveau des ganglions sensitifs peut occasionner des lésions au site d'infection primaire, ce qui résulte en une infection récurrente (1).

Le VHS-1 est principalement transmis par la salive et également lors d'exposition directe des muqueuses ou de la peau lésée d'une personne saine avec des lésions ou des sécrétions mucosales d'un individu infecté excréant du virus. Par ailleurs, les contacts sexuels sont la principale voie de transmission du VHS-2, et ce de façon plus efficace lors d'infections symptomatiques (1). Actuellement, on rapporte une augmentation du nombre de cas de transmission orogénitale du VHS-1.

À la suite d'une infection oropharyngée, le VHS-1 se réplique dans les cellules du site d'infection primaire et infiltre les nerfs sensitifs par lesquels il migre jusqu'aux ganglions trijumeaux. Le VHS-2, quant à lui, est contracté au niveau des voies génitales et se réplique dans les cellules des parois périgénitales. Par la suite, le virus colonise les ganglions sacrés où il établit la latence. Les particules virales peuvent se réactiver et retourner vers le site d'infection primaire causant des lésions récurrentes dont l'étendue dépend de la production virale (1).

II.2.5 Épidémiologie et manifestations cliniques.

II.2.5.1 Épidémiologie

Les virus herpès simplex sont répandus à travers le monde, quel que soit le niveau de développement du pays. L'humain reste le seul réservoir du virus. Le virus est transmis par contact direct entre une personne infectée et une personne saine. Comme les infections herpétiques sont rarement fatales et que le virus devient latent, la séroprévalence associée au virus herpès simplex dépasse 50 %. Les individus séropositifs sont capables de transmettre le virus lors d'épisodes d'infection productive symptomatique ou non. La séroprévalence de l'infection au VHS peut être influencée par différents facteurs : la localisation géographique, le statut socio-économique ainsi que l'âge (36). La séroprévalence du VHS-1 est plus élevée que celle du VHS-2. De plus, le VHS-1 est associé à 85 % des infections orolabiales alors que le VHS-2 est associé aux 15 % restant. À l'inverse, le VHS-2 est responsable de 60 à 70 % des infections génitales tandis que les autres cas sont causés par le VHS-1.

II.2.5.2 Manifestations cliniques distinctes du système nerveux central

Les symptômes associés aux infections primaires oropharyngées se présentent sous forme de fièvre, de maux de gorge, de lésions ulcératives et vésiculaires, de gingivostomatite, d'œdème, de lymphoadénopathie localisée, d'anorexie et/ou de malaises (37). Un tiers des patients symptomatiques présente une virémie

associée à l'infection oropharyngée primaire (38). La fréquence de la récurrence varie selon les individus. Les facteurs responsables de la récurrence chez les humains sont à la fois très variables et mal définis (37).

L'infection génitale primaire est associée à

- a : de plus grandes quantités de virus se répliquant dans le tractus génital et
- b : une période d'excrétion virale qui peut persister pendant 3 semaines en moyenne (1, 39).

Pour des raisons inconnues, la gravité de l'infection primaire et son association avec des complications sont statistiquement plus élevées chez les femmes que chez les hommes (1). Les complications systémiques fréquentes s'observent chez 70 % de toutes personnes atteintes (40). Lors de l'infection primaire chez les femmes, les lésions apparaissent sur la vulve, sont généralement bilatérales et peuvent toucher également le périnée, les fesses, le col de l'utérus et/ou le vagin. Chez les hommes, les infections génitales primaires causées par le VHS sont le plus souvent associées à des lésions vésiculaires superposées à une base érythémateuse, apparaissant habituellement sur le gland ou sur le pénis. Des lésions extragénitales de la cuisse, des fesses et du périnée peuvent survenir. L'herpès génital récurrent est la forme la plus bénigne de la maladie. Un problème majeur est la fréquence des récurrences, qui varie d'un individu à l'autre. Elle est directement liée à la sévérité de l'infection primaire. Chez les personnes atteintes d'une infection génitale causée par le VHS-1, la probabilité de récurrence est significativement moindre en comparaison avec celle provoquée par le VHS-2 et est pratiquement nulle chez certains patients (41). Une transmission de l'infection à des partenaires sexuels peut se produire que les récurrences soient symptomatiques ou asymptomatiques.

Les infections virales oculaires sont généralement causées par le VHS-1 excepté chez le nouveau-né. La kératoconjonctivite herpétique primaire est associée à une conjonctivite unilatérale ou bilatérale, Plus rarement, l'infection peut être associée à un ulcère de la cornée dans les cas de maladie progressive (37). Environ 300 000 cas d'infections oculaires herpétiques sont diagnostiqués chaque année aux États-Unis. Ces infections sont la seconde cause principale de cécité cornéenne aux États-Unis. Les infections oculaires récurrentes dues au VHS sont fréquentes. Le plus souvent, les récurrences sont unilatérales (42). La voie de dissémination et la pathogenèse de l'infection restent inconnues.

Les infections cutanées provoquées par le VHS se manifestent généralement par un eczéma herpétique chez les patients atteints d'une dermatite atopique sous-jacente. Les lésions peuvent être soit localisées ressemblant à des lésions zostérimorphes, soit disséminées. Des infections des doigts causées, par le VHS-1 ou le VHS-2, connues sous le nom de panaris herpétique, ont été rapportées et sont particulièrement fréquentes chez le personnel médical et dentaire (1). Les patients présentant des abrasions ou des brûlures cutanées semblent particulièrement sensibles aux infections cutanées causées par le VHS-1 ou le VHS-2 et

certains patients peuvent développer une infection disséminée. Des infections herpétiques cutanées ont également été décrites chez les lutteurs comme l'« *Herpès gladiatorum* » (1). D'autres infections associées à des lésions cutanées étendues incluent la maladie de Darier et le syndrome de Sézary (1). Des récurrences localisées, suivies d'un second épisode de dissémination ont été rapportées.

L'incidence des infections néonatales est estimée à 1 cas sur 3 000 ou 5 000 naissances et peut atteindre 1 cas sur 1 500 naissances. L'infection causée par le VHS-2 représente 60 à 70 % des cas. Il existe au moins quatre facteurs influençant la transmission de l'infection de la mère au fœtus. Premièrement, le risque de transmission d'une infection primaire ou d'un premier épisode génital maternel au cours du troisième trimestre est de 30 à 50 %, contre 3 % ou moins lors d'une infection récurrente (1, 37). Deuxièmement, la présence d'anticorps maternels semble avoir un effet bénéfique sur la fréquence d'acquisition de l'infection et sur la gravité de la maladie chez l'enfant. Troisièmement, une rupture prolongée des membranes (> 6 h) augmente le risque d'acquisition du virus. Quatrièmement, certaines formes d'intervention médicale lors du travail ou de l'accouchement peuvent augmenter le risque d'infection néonatale par le VHS. La transmission du virus de la mère à l'enfant peut se faire lors d'une acquisition *in utero*, *intrapartum* ou postnatale. La voie d'infection la plus courante (75 à 80 %) est par contact *intrapartum* du fœtus avec les sécrétions génitales maternelles infectées. (1, 43). L'acquisition postnatale du VHS par les bébés est principalement la conséquence de contacts entre les membres de la famille et/ou du personnel médical infectés avec le nouveau-né (43). Le VHS-1 est responsable de plus de 10 % des cas de transmission postnatale. L'HSE semble être une composante fréquente chez les enfants ayant une infection disséminée puisqu'elle survient chez environ 60 à 75 % des cas (43). La mortalité en l'absence de traitement antiviral dépasse 80 %, et la majorité des survivants conservent des séquelles neurologiques irréversibles (37).

Les patients dont le système immunitaire est compromis sont exposés à un risque accru d'infections sévères au VHS. Les patients transplantés rénaux, hépatiques, cardiaques et de moelle osseuse sont particulièrement à risque de développer une infection herpétique. L'acquisition d'une infection au VHS à partir d'un organe transplanté a été rapportée. (37). La gravité de la maladie progressive chez ces patients semble être directement liée au type de traitement immunosuppresseur. À travers le monde, la séroprévalence des infections au VHS est plus élevée chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) comparativement à la population générale. Elle s'élève à environ 90-100 % pour le VHS-1 et à 52-95 % pour le VHS-2 (44).

II.2.5.3 Infections du système nerveux central

Le VHS peut infecter presque toutes les régions anatomiques du système nerveux. Il peut causer entre autres une méningite, une myélite et une radiculite (1). La méningite aseptique est un phénomène fréquent chez

les personnes atteintes d'une infection génitale primaire au VHS. Des méningites aseptiques récurrentes (méningite de Mollaret) peuvent également survenir chez les patients atteints d'herpès génital (45). Une relation causale entre les infections herpétiques du cerveau et les maladies dégénératives, les troubles psychiatriques ou la paralysie de Bell n'a pas encore été clairement établie (46).

Le VHS est également responsable d'infections plus dévastatrices. En effet, il est l'agent étiologique de l'HSE et est la principale cause d'encéphalite virale sporadique mortelle aux États-Unis (45, 47, 48). Elle est responsable d'environ 75 % des cas d'hospitalisation dus à des encéphalites virales. Son incidence reste faible (1 cas par 250 000 individus, soit un taux national annualisé d'environ 1250 cas aux États-Unis (49)) et elle touche préférentiellement les adultes de plus de 50 ans (50). Un tiers des cas survient chez les moins de 20 ans et plus de 10 % des cas sont des enfants âgés de 6 à 10 ans. Le genre ne semble pas être un facteur de risque pour développer une HSE, bien que l'on note une légère prédominance de l'infection chez les hommes. Cette infection herpétique est souvent fatale. En effet, en l'absence d'un traitement antiviral, la mortalité associée à cette infection est de plus de 70 %. Elle est réduite entre 10 et 30 % chez les patients traités avec de l'ACV. Cependant, la majorité des patients survivants gardent des séquelles neurologiques. Près d'un tiers des cas survient lors de primo-infection alors que les deux autres tiers sont causés par une infection secondaire ou une réactivation du virus latent, bien que cela ne soit associé à aucune différence dans les signes cliniques. Les encéphalites herpétiques chez l'adulte sont principalement causées par le VHS-1 tandis que le VHS-2 n'est responsable que de 2 à 6 % des cas. La situation inverse est observée chez le nouveau-né (51). Les manifestations de l'HSE chez l'enfant (infection non néonatale) et l'adulte sont révélatrices des régions affectées du cerveau. La maladie ne présente pas de signes avant-coureurs ni de facteurs déclenchants, bien que les neurochirurgies (52) ou des irradiations thérapeutiques (53) du SNC aient été rapportées comme des facteurs pouvant augmenter les risques d'une HSE.

Les manifestations cliniques sont principalement une encéphalite focale associée à de la fièvre, une altération de la conscience, un comportement étrange, des mouvements désordonnés, occasionnellement des hallucinations olfactives et des troubles neurologiques localisés. Ces signes et symptômes cliniques sont généralement associés à une infection localisée unilatéralement dans la région temporale et/ou frontale comme en témoignent les atteintes neurologiques (54). Aucune constatation pathognomonique n'existe pour l'HSE, mais un niveau de détérioration progressive de la conscience, de la fièvre, une formule anormale du liquide céphalorachidien (LCR) et des signes neurologiques focaux en l'absence d'autres causes doivent suggérer fortement cette maladie. La mortalité chez les patients non traités est supérieure à 70 %, et seulement 2,5 % de tous les patients retrouvent une fonction neurologique normale (36).

L'analyse d'isolats de VHS provenant du cerveau ainsi que de la lèvre ou de la bouche des patients atteints d'HSE, confirmés par la virologie, a démontré qu'environ 65 % des patients seulement présentaient des isolats identiques dans les deux sites. De plus, des études effectuées sur des tissus *post-mortem* ont montré que le virus pouvait être détecté dans les nerfs olfactifs et au niveau du cortex cérébral (55). Lors de l'HSE, on observe une encéphalite nécrosante affectant le lobe temporal, le lobe frontal inférieur et/ou le cortex insulaire (47), associée à une forte inflammation. Lors d'une maladie progressive, une hémorragie se produit dans la zone d'inflammation et les nécroses peuvent induire des cavités. La nécrose associée à une HSE met en jeu tous les types de cellules c'est-à-dire les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Des examens histopathologiques montrent des zones d'inflammation associées à une infiltration de cellules inflammatoires le long de corps d'inclusion intranucléaire de Cowdry de type A, caractéristique de la réplication du VHS (47).

Lors de l'HSE, les dommages du SNC peuvent être attribués à la combinaison de la réplication virale et de mécanismes immunitaires. En effet, chez les patients présentant une HSE, des cytokines et des récepteurs solubles de cytokines (p.ex : l'interleukine (IL)-6, l'interféron (IFN)- γ , le TNF et le récepteur à l'IL-2) peuvent être détectés dans le sérum et le LCR à différents stades de la maladie. La présence de ces marqueurs inflammatoires signe une réponse immunitaire vigoureuse qui apparaît au cours de l'HSE aiguë et suggère que l'inflammation puisse contribuer aux dommages pathologiques (55).

II.2.5.4 Diagnostic de l'encéphalite herpétique

Historiquement, le diagnostic des infections du SNC par le VHS n'était réalisé que par biopsie cérébrale et culture (47). Actuellement, les examens neurologiques standards sont utilisés pour l'évaluation des patients suspectés d'avoir une HSE et notamment l'analyse du LCR. Les anomalies caractéristiques du LCR chez les patients atteints d'HSE comprennent des niveaux peu élevés de cellules (généralement mononucléaires) et de protéines (56, 57). Les hématies sont également retrouvées dans le LCR de la plupart des patients. De nos jours, la détection de l'ADN viral dans le LCR par une réaction en chaîne par polymérase (PCR) est devenue la méthode diagnostique de choix (56). La sensibilité reliée à ce test est de plus de 95 % et la spécificité proche de 100 % (56). L'évaluation du LCR par PCR peut être utilisée pour suivre la réponse thérapeutique chez les patients atteints d'HSE. En général, il n'est suggéré de refaire les prélèvements du LCR qu'après 14 jours et seulement si les signes cliniques reliés à l'HSE persistent malgré le traitement. La persistance de l'ADN du VHS dans le LCR des nouveau-nés atteints d'encéphalite à la fin de la thérapie antivirale prédit des résultats neurologiques médiocres (56).

En plus des analyses effectuées sur le LCR, des techniques d'imagerie cérébrale sont utilisées afin de faire le diagnostic de l'HSE. L'électroencéphalogramme (EEG) localise généralement l'activité de pointe et à

ondes lentes au niveau du lobe temporal. Le tracé d'une HSE peut être typique, avec la présence d'une activité pseudo-périodique (2 à 3/secondes) unilatérale ou bilatérale sur fond d'ondes lentes. Outre son intérêt diagnostique, l'EEG apporte un argument pronostique. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettra la localisation de la maladie au lobe temporal. Peu de temps après le début de l'infection, seul un œdème est détectable. Il est suivi par une hémorragie et un changement de la ligne médiane dans les structures corticales. La biopsie peut encore être nécessaire pour le diagnostic de présentations cliniques inhabituelles ou lors de cas complexes (58, 59).

II.2.6 Les traitements antiviraux

Historiquement, le premier antiviral découvert est l'idoxuridine. La vidarabine a été le premier antiviral systémique utilisé pour traiter les patients souffrants d'une HSE prouvée par biopsie. De nos jours, les antiviraux se répartissent en trois catégories (Figure 5) (1) :

- des analogues des nucléosides (acyclovir [ACV], et sa prodrogue le valacyclovir [VACV], le penciclovir [PCV], et sa prodrogue le famciclovir [FCV]),
- un analogue des nucléotides (cidofovir [CDV])
- un analogue des pyrophosphates (foscarnet [FOS]).

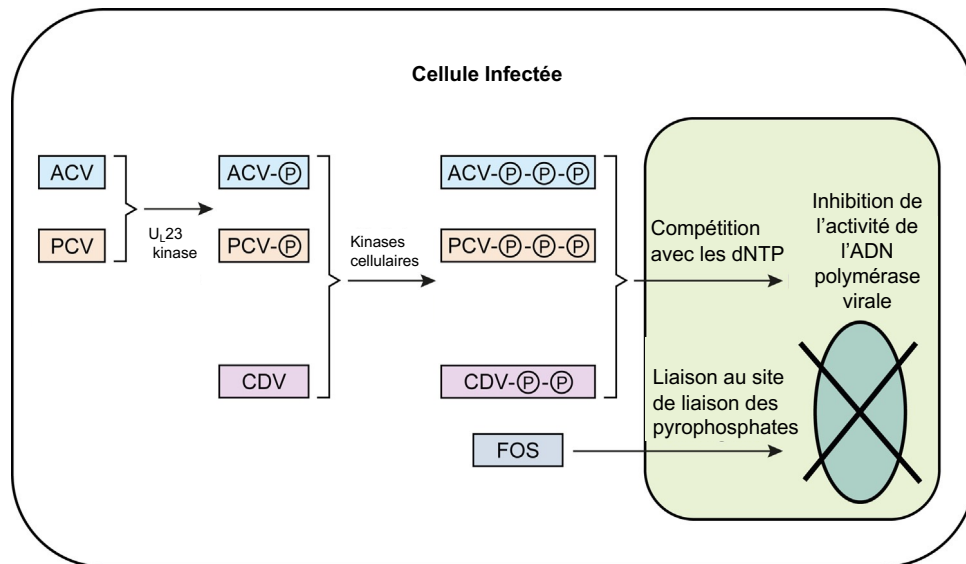


Figure 5 : Les principales molécules antivirales et leurs mécanismes d'actions.

Adapté de (60) : Les analogues nucléosidiques, tels que l'acyclovir (ACV) et le penciclovir (PCV), doivent d'abord être phosphorylés par la thymidine kinase virale (TK, UL₂₃) puis par des kinases cellulaires afin d'être transformés en leur forme active. Les analogues de nucléosides tels que le cidofovir (CDV) doivent être phosphorylés uniquement par des kinases cellulaires pour être actifs. La forme triphosphate résultante des

analogues nucléotidiques et la forme diphosphate des dérivés nucléosidiques entrent en compétition avec le désoxynucléotide triphosphate (dNTP) pour inhiber la réplication virale. L'analogue du pyrophosphate foscarnet (FOS) inhibe directement l'activité de l'ADN pol virale. © : représente un groupement phosphate.

II.2.6.1 Traitement de l'encéphalite herpétique

Lorsqu'une infection du SNC par le VHS est suspectée, un début rapide du traitement antiviral est d'une importance capitale pour obtenir des résultats positifs. L'ACV est administré par voie intraveineuse afin de traiter l'HSE (47). La durée optimale du traitement n'est pas clairement établie, mais comme la majorité des survivants peuvent souffrir de séquelles neurologiques, une thérapie plus longue est souvent préférée, spécialement chez les individus immunosupprimés (61). Des rechutes sont possibles et peuvent survenir entre 1 semaine et 3 mois après l'arrêt du traitement. Il est suggéré qu'une thérapie à base de VACV, par voie orale durant cette période critique de 3 mois, ait un effet bénéfique à long terme, mais cela doit encore être validé. Certains cas de résistance à l'ACV peuvent apparaître chez des patients atteints d'HSE. Le traitement suggéré est alors le FOS par voie intraveineuse, mais il doit être administré avec une grande précaution (54).

Dans certains cas d'HSE, l'examen par IRM montre une déviation de la ligne médiane secondaire à un œdème cérébral. Celle-ci est reliée à une forte réponse inflammatoire qui semble contribuer à l'exacerbation de la maladie. Dans ce cas, des anti-inflammatoires sont administrés en combinaison avec l'agent antiviral afin de mieux contrôler la réponse inflammatoire (62). Des études ont suggéré que l'administration de corticostéroïdes, lors de la phase aiguë de la maladie, permettait l'amélioration du pronostic de la maladie (63, 64). Les glucocorticoïdes sont des immunosuppresseurs. Ils agissent sur la réponse immunitaire innée et la réaction inflammatoire qui s'en suit. Ils réduiraient l'activité du « *nuclear factor-kappa B* » (NF- κ B) et permettraient une diminution de la réponse pro-inflammatoire (65). Une forte expression du gène *NF- κ B* au niveau du cerveau a été décrite lors de l'HSE (33). Cependant, des études cliniques de grande échelle sont indispensables pour établir s'il existe un bénéfice de l'administration systématique des corticostéroïdes. Dans ce sens, une étude clinique allemande a été mise en place afin d'évaluer l'efficacité de la dexaméthasone lorsqu'elle est administrée en combinaison avec l'ACV (66). Cependant, cette étude est terminée en raison d'un trop faible recrutement. Récemment, au Royaume-Uni, une étude a été mise en place afin d'étudier l'effet de la combinaison de la dexaméthasone et de l'acyclovir dans le traitement de l'HSE (67). Par ailleurs, des études dans des modèles murins d'encéphalite herpétique ont démontré qu'un traitement tardif avec un glucocorticoïde permet une amélioration du pronostic de la maladie alors qu'un traitement précoce exacerbe celle-ci, suggérant une fois encore une composante immunitaire dans la pathogenèse de l'HSE (68).

II.2.7 La résistance aux antiviraux

La résistance aux antiviraux est très rarement observée chez les individus immunocompétents lors du traitement ou de la thérapie suppressive. En revanche, l'émergence de souches résistantes à l'ACV, au VACV ou au CDV peut se développer particulièrement chez les individus immunosupprimés. Chez les individus immunocompétents, la résistance à l'ACV a une incidence très faible qui varie de 0,1 à 0,7 % selon les études et est souvent associée aux traitements d'infections génitales et oculaires récurrentes, de lésions disséminées et de l'HSE (69). En revanche, chez les individus immunosupprimés, de 3,5 à 10 % des patients excrètent un virus avec une susceptibilité réduite à l'ACV. La résistance à l'ACV a une incidence de 3,5 à 7 % chez les patients atteints du VIH, alors qu'elle varie de 2,5 à 10 % chez les receveurs d'organes solides. Cette incidence est encore plus élevée (4,1 à 10,9 %) chez les patients transplantés avec des cellules souches hématopoïétiques (69).

Les mécanismes participant à la résistance à l'ACV sont associés, dans 95 % des cas, à des mutations dans le gène de la TK et dans 5 % à des mutations dans le gène de l'ADN pol virale. Les variants résistants au FOS présentent uniquement une substitution d'acides aminés dans l'ADN pol. De plus, les mutations responsables de la résistance au FOS peuvent induire une résistance croisée avec les analogues de nucléosides (60, 70). Certaines mutations connues pour conférer une résistance croisée à l'ACV et au FOS sont également responsables d'une sensibilité réduite au CDV (71).

Le phénomène de résistance doit être pris très au sérieux chez les patients immunosupprimés, car il peut se manifester par des infections cutanées chroniques et peut aussi mener à des infections invasives des viscères et du SNC pouvant être fatales.

III La réponse immunitaire

III.1 Mise en place de la réponse immunitaire cérébrale contre le virus herpès simplex 1

III.1.1 Les barrières anatomiques

La structure anatomique unique et la physiologie du cerveau et de la moelle épinière font du SNC un organe longtemps considéré comme immunoprivilégié. Les barrières du SNC limitent l'entrée libre des solutés et des cellules du sang vers le parenchyme cérébral (72-74). À l'exception de différences structurales mineures, l'anatomie et la physiologie du système vasculaire du SNC sont assez semblables chez les humains et les

rongeurs (75). Selon les emplacements anatomiques, la composition structurale et la fonction, il existe au moins trois barrières principales du SNC ; à savoir, la barrière hématoencéphalique (BHE), la barrière hématocéphalorachidienne (BCSFB) et la barrière hématoleptoméningée (BLMB) (73).

En 1900, Lewandowsky a été le premier à utiliser le terme BHE (76), mais cette barrière est également connue sous le nom d'unité neurovasculaire (NVU). Bien que la BHE soit présente dans tout le système microvasculaire du SNC (capillaires et veinules post-capillaires), elle présente certaines différences phénotypiques et fonctionnelles sur des sites anatomiques distincts. Aux veinules post-capillaires, les membranes basales endothéliales et parenchymateuses « *glial limitans* » sont séparées par un espace périvasculaire drainé par le LCR alors qu'elles sont complètement fusionnées au niveau capillaire (73). Ces différences phénotypiques sont à l'origine de la distinction fonctionnelle entre les veinules capillaires et post-capillaires. Par conséquent, le transport des nutriments est plus commun aux capillaires où les neurones sont à proximité. Cependant, la migration des cellules immunitaires se produit principalement dans les veinules post-capillaires où dans l'espace périvasculaire drainé par le LCR et les cellules présentatrices d'antigène (CPAs) y sont présentes (73). La BHE se trouve dans les microvaisseaux du SNC et est formée par les vaisseaux endothéliaux spécialisés entourés de péricytes, d'extrémités astrocytaires et de cellules microgliales. Ces différents types de cellules s'associent et forment une barrière ferme, qui limite l'entrée des cellules immunitaires dans le parenchyme du SNC (77). Les jonctions intercellulaires complexes et fermes limitent principalement la diffusion transcellulaire et paracellulaire des molécules de solutés dans le SNC (78) (Figure 6).

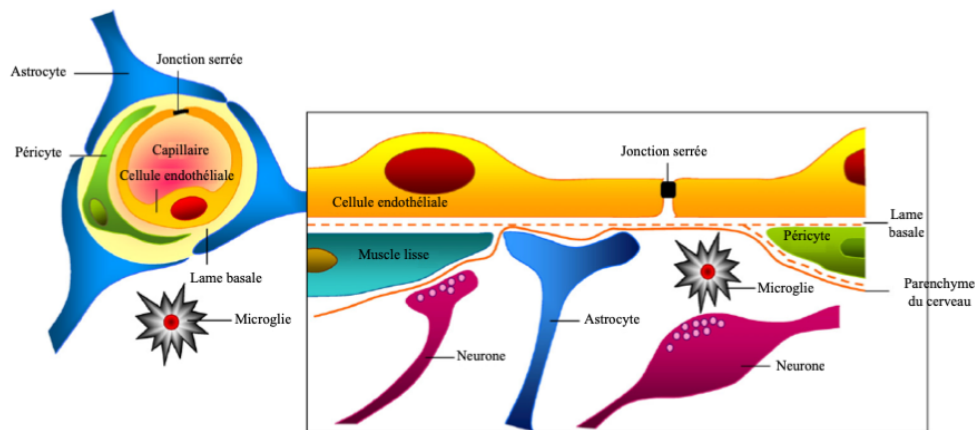


Figure 6 : Les associations des cellules de la BHE

Adapté de (79). Les cellules endothéliales cérébrales forment des jonctions serrées à leurs bords qui scellent la voie de diffusion paracellulaire aqueuse entre les cellules. Les péricytes sont distribués de façon discontinue le long des capillaires cérébraux et entourent partiellement l'endothélium. Les cellules endothéliales cérébrales et les péricytes sont entourés et contribuent à la membrane basale locale, qui forme une matrice extracellulaire périvasculaire distincte la lame basale 1 (BL1), de composition différente de la matrice

extracellulaire des extrémités gliales limitant le parenchyme cérébral (BL2). Les processus de pied des astrocytes forment un réseau complexe entourant les capillaires et cette association étroite de cellules est importante dans l'induction et le maintien des propriétés de barrière.

La BCSFB, présente dans le ventricule du cerveau, est formée par les cellules épithéliales du plexus choroïdien et limite la diffusion libre de molécules présentes dans le LCR (80). Cependant, des rapports récents ont suggéré que la BCSFB fonctionne comme une barrière éducative plutôt que comme une barrière ferme qui donne accès aux cellules T mémoires pour l'immunosurveillance des antigènes et des agents pathogènes drainés par le LCR (81, 82). De plus, le plexus choroïdien joue un rôle central dans la formation et la régulation du LCR (83).

Les BLMBs sont présentes à la surface méningée du cerveau et de la moelle épinière et sont constituées de vaisseaux endothéliaux méningés dépourvus d'extrémités astrocytaires. Elles séparent les espaces leptoméningés drainés par le LCR de la circulation sanguine (73).

Par ailleurs, le cerveau est enveloppé par la membrane arachnoïdienne située sous la dure-mère. L'arachnoïde est avasculaire, mais se trouve près du sinus sagittal supérieur et en est séparée par la dure-mère. L'arachnoïde est un épithélium multicouche avec des jonctions serrées entre les cellules de la couche interne qui forment un joint efficace. Les villosités arachnoïdiennes pénètrent dans le sinus sagittal à travers la dure-mère. Une quantité importante de LCR se déverse dans le sinus par l'intermédiaire de ces villosités qui ne permettent au sang de circuler que dans le cerveau.

III.1.2 Les cellules immunitaires résidentes du cerveau

À l'état d'équilibre, le SNC héberge plusieurs populations myéloïdes, dont la microglie parenchymateuse, les cellules périvasculaires, les macrophages méningés et les macrophages du plexus choroïdien (84). Malgré le fait que toutes ces populations de macrophages partagent de nombreux marqueurs spécifiques des cellules myéloïdes et des macrophages, incluant le « *ionized calcium binding adaptor molecule 1* » (Iba-1), F4/80 (souris) et « *CX3C chemokine receptor 1* » CX3CR1, les microglies ont leur signature unique (85). Par ailleurs, les populations myéloïdes, associées au SNC, ont une ontogenèse distincte. La vision actuelle soutient que les microglies proviennent exclusivement de progéniteurs hématopoïétiques dérivés du sac vitellin, tandis que les autres sous-ensembles de macrophages résidents du SNC apparaissent plus tard au cours du développement embryonnaire (86). Les microglies possèdent deux propriétés remarquables : leur origine prénatale restreinte et leur capacité d'autorenouvellement et de longévité. Une fois

le SNC complètement développé, la taille de la population microgliale est maintenue par un équilibre entre la mitose et l'apoptose (87). De plus, plusieurs fonctions homéostatiques vitales conduites par les microglies aident à établir et maintenir la santé globale du système nerveux, y compris la régulation de la survie et de la mort neuronale ainsi que la synaptogénèse (88-90). Par ailleurs, le nombre de microglies augmente au cours du vieillissement. Cependant, elles ont une morphologie moins élaborée, une distribution irrégulière dans les tissus et des réponses plus lentes aux signaux environnementaux (91, 92).

Les microglies fonctionnent comme un médiateur immunitaire majeur dans le SNC et remplissent les fonctions nécessaires au recrutement du système immunitaire périphérique. Dans le SNC mature, les microglies sont apparemment dormantes (microglies au repos), mais surveillent activement l'environnement, contribuant au maintien de l'intégrité neurovasculaire afin d'empêcher l'accès à des éléments du système immunitaire périphérique potentiellement nuisibles. Les microglies présentent une morphologie « ramifiée » caractéristique de leur état de repos dans le parenchyme cérébral (93). Lors de l'activation, les microglies deviennent amiboïdes et migrent vers le site de la lésion où elles peuvent proliférer et libérer des cytokines pro-inflammatoires pour recruter des cellules immunitaires périphériques (comme les neutrophiles et les cellules « natural killers » [NKs]) afin de prévenir d'autres dommages au cerveau infecté (93). En tant que cellules immunitaires résidentes du SNC, les microglies constituent la première ligne de défense contre les pathogènes envahisseurs. Les microglies partagent de nombreuses caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les macrophages périphériques (93). Les microglies communiquent avec d'autres cellules du SNC au moyen de cytokines et de chimiokines. Les microglies activées libèrent les cytokines IL-1 β , TNF et IL-6. L'IL-1 β entraîne la prolifération des astrocytes et la néovascularisation dans les tissus cérébraux endommagés. Par ailleurs, en réponse à divers stimuli inflammatoires, la microglie activée libère de l'acide arachidonique (AA), qui est rapidement converti en prostaglandines (PGE2, PGD2) catalysées par les cyclooxygénases (COX-1, COX-2). L'oxydation des AA par la lipoxygénase (5-LO) génère des leucotriènes (LTB4, LTC4), qui sont de puissants agents pro-inflammatoires et chimiotactiques, aidant à recruter des cellules immunitaires périphériques sur le site de l'inflammation. L'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP) par les microglies entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE. L'infiltration locale des neutrophiles et d'autres leucocytes, qui libèrent des médiateurs pro-inflammatoires supplémentaires, permet d'activer davantage la microglie et d'exacerber la réponse inflammatoire. La libération des PGs et des LTs suivie de l'activation de leurs récepteurs respectifs est associée aux événements initiaux dans l'inflammation (par exemple, douleur, fièvre, œdème, vasodilatation) (Figure 7).

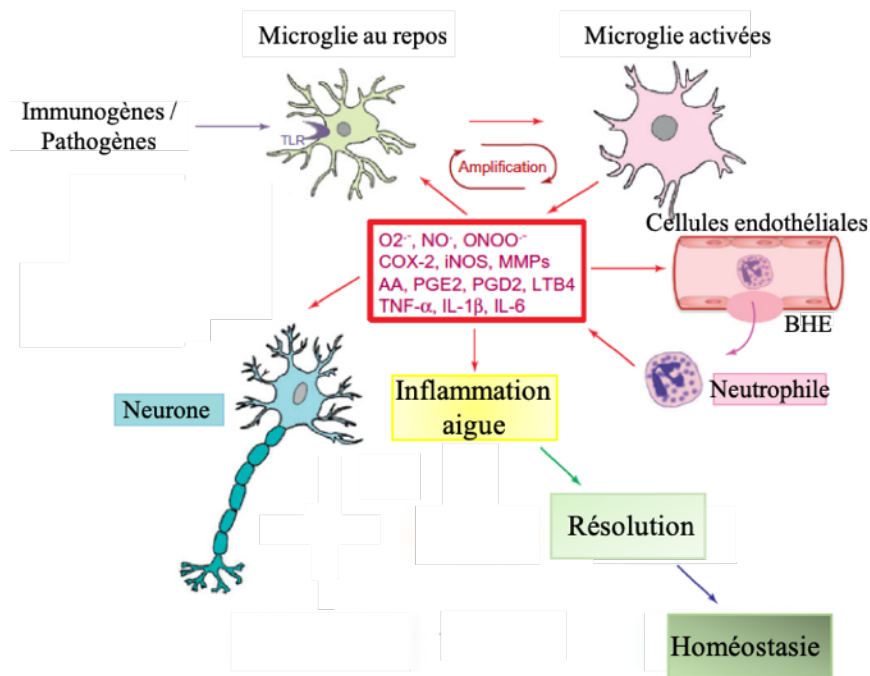


Figure 7 : Activation de la microglie

Adapté de (94) : Les microglies au repos sont activées lors de l'exposition à divers stimuli du système nerveux central. La microglie déclenche la libération de cytokines et de chimiokines (par exemple, IL-1, IL-6, TNF), de l'oxyde nitrique (NO) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'activation des cascades de médiateurs lipidiques déclenche la libération d'acide arachidonique (AA), qui est facilement oxygéné par les cyclooxygénases (COX-1, COX-2) et les lipoxygénases (5-LO, 15-LO) pour former une série d'éicosanoïdes (par exemple, prostaglandines [PG], thromboxanes [TX], leucotriènes [LT] ou lipoxines [LX]). À la suite de la libération de médiateurs pro-inflammatoires, ce processus est rapidement amplifié par l'activation supplémentaire des microglies, entraînant une réponse inflammatoire aiguë qui peut être bénéfique pour le SNC.

Lors de la reconnaissance du VHS, les microglies activées s'accumulent sur les sites de lésions tissulaires et sécrètent entre autres l'IL-1 β , CXCL10, « CC chemokine ligand » (CCL)2 et CXCL9 (95, 96). De plus, afin de mettre en place une réponse immunitaire cérébrale efficace et coordonnée contre le VHS, les microglies communiquent avec les cellules avoisinantes du SNC à l'aide de cytokines et de chimiokines (95, 97-102). Cependant, des études animales ont révélé que ces réponses microgliales ne sont pas suffisantes pour protéger contre l'infection par le VHS-1 (95, 96).

III.2 La reconnaissance du virus

Le virus herpès simplex 1 est reconnu par de nombreux « *pathogen recognition receptors* » (PRRs). Ils comprennent plusieurs membres de la famille des « *Toll-like receptors* » (TLRs) et certains senseurs d'ADN et d'ARN (103). Les TLRs sont les premiers à avoir été découverts et identifiés comme des PRRs qui détectent les « *pathogen-associated molecular pattern* » (PAMPs). Les récepteurs « *retinoic-acid-inducible gene-1-like receptors* » (RLRs), y compris le « *retinoic-acid-inducible gene 1* » (RIG-I) et le « *melanoma differentiation-associated protein 5* » (MDA5) ainsi que d'autres senseurs d'ARN peuvent détecter des structures d'ARN distinctes. L'ADN cytoplasmique est détecté par des senseurs d'ADN, tels que la « *guanosine monophosphate (GMP)-adenosine monophosphate (AMP) synthase cyclique* » (cGAS), l'« *interferon gamma-inducible protein 16* » (IFI16), le « *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors* » (DAI) et plusieurs autres protéines engagées dans la réponse à l'ADN (103). La reconnaissance des constituants viraux est la première étape de l'activation de la voie des interférons (IFNs) de type I. Ceux-ci induisent ensuite l'expression de plusieurs gènes stimulés par l'IFN (ISGs), ce qui résulte en des réponses antivirales innées.

III.2.1 Les récepteurs

III.2.1.1 Les récepteurs « Toll-Like »

Les TLRs sont des récepteurs homologues aux récepteurs « *Toll* » découverts chez la drosophile. Ils ont été identifiés chez l'humain et leur rôle pivot dans l'immunité innée a été découvert dans les années 1990 (104). Cette découverte a valu le prix Nobel de Médecine au Dr Hoffmann en 2011. À l'heure actuelle, dix TLRs humains et 13 TLRs murins ont été identifiés. Dans le SNC humain et murin, les TLRs sont exprimés sur différents types de cellules, et participent à la reconnaissance des virus neurotropiques (105). Au niveau cellulaire, certains TLRs sont exprimés dans le compartiment endosomal : c'est le cas des TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 (ainsi que TLR11, TLR12 et TLR13 chez la souris) ou comme des récepteurs transmembranaires (tous les autres TLRs). Le VHS est détecté par les TLR2, TLR3 et TLR9. Le TLR2 se trouve à la surface de la cellule et reconnaît les glycoprotéines de surface tandis que le TLR3 et le TLR9 se localisent au niveau de la membrane endosomale et détectent les acides nucléiques (103). Après engagement par leurs ligands respectifs, les TLR2 et TLR9 recrutent la protéine adaptatrice nommée « *myeloid differentiation primary response 88* » (MyD88) tandis que le TLR3 va recruter la protéine « *Toll/Interleukin (IL)-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor-inducing IFN- β* » (TRIF) (Figure 8 et 9). Par ailleurs, l'interaction entre la protéine membranaire du réticulum endoplasmique UNC-93B et certains TLRs (TLR3, TLR7 et TLR9) est essentielle à la mise en place des voies de signalisation qui découlent de la reconnaissance par ces TLRs (106).

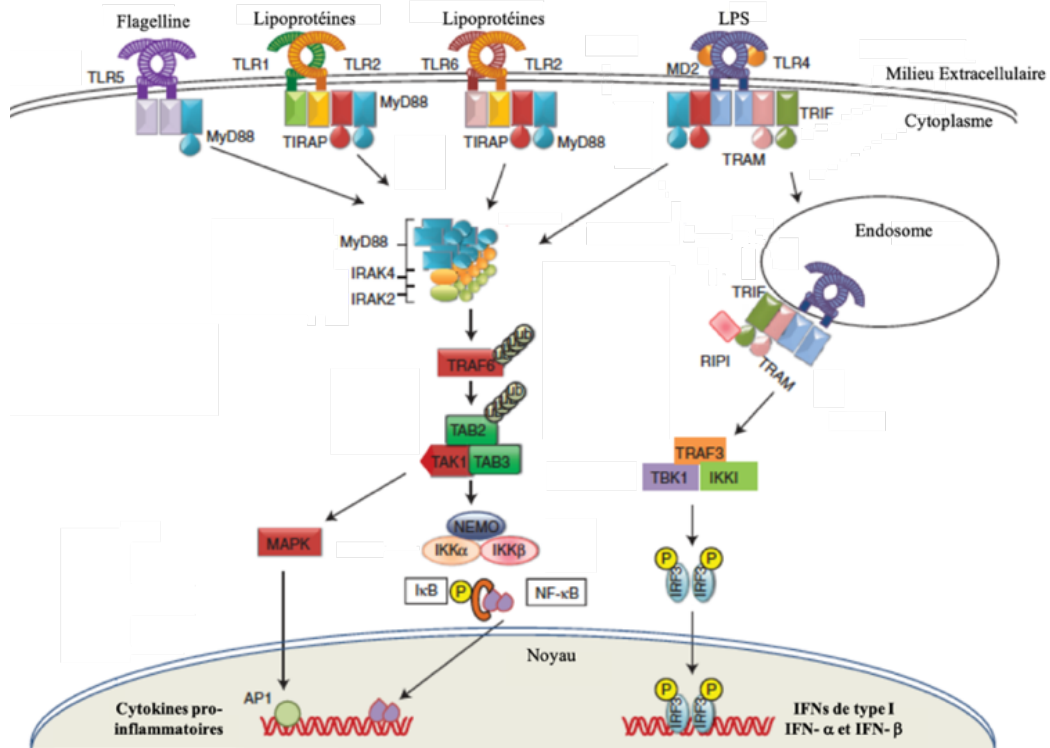


Figure 8 : Aperçu des voies de signalisation passant par les TLRs membranaires

Adapté de (103) : Les TLRs localisés à la surface cellulaire ou au niveau de la membrane endosomale reconnaissent le VHS et transmettent des signaux via MyD88 ou TRIF. En réponse à l'infection par le VHS, les récepteurs de reconnaissance des pathogènes de l'hôte amorcent un programme complexe qui active les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, IRF3 et IRF7. Cela conduit à l'induction d'IFN- α / β et de cytokines pro-inflammatoires.

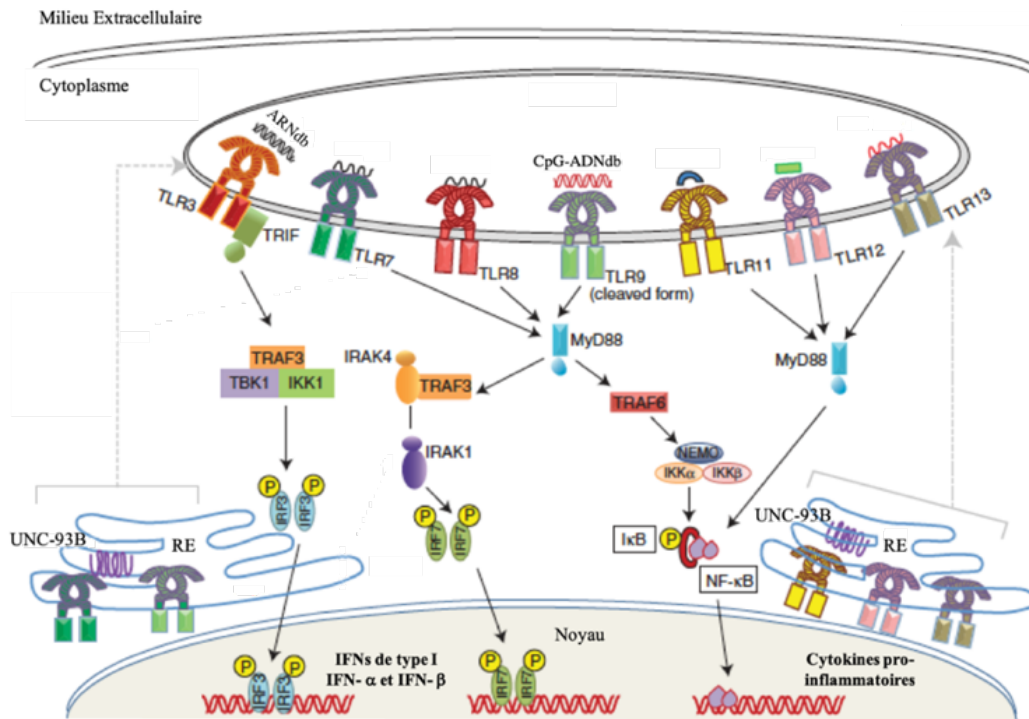


Figure 9 : Un aperçu des voies de signalisation passant par les TLRs endosomaux.

Adapté de (103) : Les TLRs localisés niveau de la membrane endosomale reconnaissent le VHS et transmettent des signaux via MyD88 ou TRIF. En réponse à l'infection par le VHS, les récepteurs de reconnaissance des pathogènes de l'hôte amorcent un programme complexe qui active les facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et IRF7. Cela conduit à l'induction d'IFN- α - β et de cytokines pro-inflammatoires. La protéine UNC-93B est nécessaire à la localisation endosomale des TLRs.

III.2.1.1.1 Le récepteur « Toll-Like » 2

Le TLR2 est ancré dans la membrane plasmique et est probablement en complexe avec le TLR1. Le TLR2 reconnaît des PAMPs de nature hydrophobe, comme les lipopeptides. Il est possible que le TLR2 détecte les peptides hydrophobes des glycoprotéines gB et gH, qui sont seulement exposés durant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique cellulaire (107). Dans le cas du VHS-1, il existe aussi des indices d'une reconnaissance des glycoprotéines virales indépendante du TLR2 (108).

Une fois activé, le TLR2 recrute les protéines adaptatrices MyD88 et « TIR-associated protein » (TIRAP). Une cascade de signalisation en aval de ces protéines se met en place et active le facteur de

transcription NF- κ B et la protéine « *activator protein 1* » (AP-1) induisant respectivement la production de cytokines inflammatoires et des IFNs de type I.

Au niveau du cerveau, le TLR2 est exprimé constitutivement par les microglies et par les oligodendrocytes (109). L'expression du TLR2 par les astrocytes reste controversée. En effet, certaines études montrent une expression de TLR2 par les astrocytes et d'autres non (110). Cependant, la fonction du TLR2 au niveau de ces cellules reste inconnue. Des études chez les souris ont montré soit un effet protecteur, soit un effet délétère du TLR2 dans les défenses de l'hôte contre le VHS-1. En effet, des souris déficientes en TLR2 sont protégées contre une HSE après une infection intrapéritonéale. Cette protection est due à une réduction de l'inflammation (111). D'autres études ont quant à elles montré un rôle protecteur du TLR2 lors d'infection avec le VHS-2. Des souris déficientes en TLR2 et TLR9 sont plus susceptibles à la dissémination du VHS-2 dans le SNC que les souris déficientes seulement en TLR2 ou en TLR9 après une infection intrapéritonéale ou vaginale (112). Cette sensibilité accrue passe par une réduction de l'expression de cytokines et de l'activation des cellules NKs. Des études génétiques chez les humains ont aussi démontré un rôle protecteur du TLR2 au cours d'infection naturelle par les virus herpétiques. Deux haplotypes de TLR2 ont été associés avec une fréquence élevée de lésions à VHS-2 (113).

III.2.1.1.2 Le récepteur « Toll-Like » 3

Lors de la réplication virale, il y a accumulation intracellulaire de structures d'ARN db qui peuvent avoir la fonction d'agoniste du TLR3 (114). Cependant, l'ARN db spécifique qui stimule le TLR3 n'est pas encore caractérisé. Le TLR3 est constitutivement exprimé dans de nombreux types cellulaires. L'expression du TLR3 spécifiquement chez les cellules dendritiques (DCs) CD8- α favorise la cross-présentation d'antigène du VHS-1 et contribue au développement d'une réponse T efficace (115). De plus, des études chez les souris montrent que la déficience en TLR3 engendre une réponse T CD8 altérée, associée à une perte de contrôle de la réplication virale, à des temps tardifs post-infection (115). La signalisation du TLR3 jouerait ainsi un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (116).

La reconnaissance du virus par le TLR3 déclenche la voie de signalisation passant par la protéine adaptatrice TRIF. Cette voie de signalisation active en aval le facteur de transcription régulateur des IFNs (IRF) 3 et IRF7, ce qui permet la production d'IFN de type I et d'autres cytokines inflammatoires (117, 118) [Voir section I.3.2.2.2]. D'autre part, le TLR3 peut également activer NF- κ B via TRIF (114). La région C-terminale de TRIF contient le motif « *C-terminal receptor interacting protein [RIP] homotypic interaction motif* » (RHIM) (117). Des analyses indiquent que RHIM est nécessaire pour l'activation de NF- κ B. Dans les cellules dépourvues de RIP1, l'activation de NF- κ B par le TLR3 et l'activation subséquente de gènes cibles est altérée, indiquant que

les interactions TRIF et RIP1 participent à l'activation de NF- κ B dans la signalisation via le TLR3 (119). TRIF possède également dans la région N terminale, trois domaines de liaison « *TNF receptor-associated factor* » (TRAF) 6. La surexpression du dominant négatif de TRAF6 inhibe l'activation de NF- κ B par TRIF. De plus, une protéine TRIF mutée, qui ne se lie pas à TRAF6 est incapable d'activer NF- κ B (120). Ces observations suggèrent que TRIF active NF- κ B en recrutant TRAF6 et/ou en interagissant avec RIP-1.

Dans le cerveau, les microglies expriment le TLR3 (109, 110) et répondent aux stimuli par l'expression de cytokines pro-inflammatoires incluant l'IFN- β , l'IL-1 β et l'IL-6 (97). Les astrocytes peuvent également répondre aux stimuli via le TLR3 par la production de médiateurs pro-inflammatoires. De plus, les oligodendrocytes (109) ainsi que les neurones (121) expriment également le TLR3. L'importance de ce récepteur a été démontrée par l'identification de mutations monogéniques dans la voie de signalisation du TLR3 chez des enfants susceptibles à une encéphalite herpétique (122). En effet, il a été révélé plusieurs étiologies génétiques d'encéphalite herpétique : une déficience autosomale récessive (AR) dans la protéine membranaire du réticulum endoplasmique UNC-93B, entraînant une altération des réponses antivirales interféron- α - β (123), une déficience autosomale dominante (AD) (124) et AR (125) en TLR3, une déficience AD en TRAF3 (126) et une déficience AD en la protéine « *TANK-binding kinase 1* » (TBK1) (122). Cependant, le TLR3 humain semble être largement redondant pour l'immunité antivirale en périphérie, car les patients déficients connus en TLR3 et en UNC-93B ont eu de nombreuses infections virales sans développer de maladies graves. Par ailleurs, une déficience AR et AD en TRIF ont été décelées bien que celles-ci ne soient pas apparentées à une encéphalite herpétique (127). Ces différentes études indiquent le caractère redondant de la signalisation par TLR3 pour l'immunité protectrice contre le VHS-1 dans le SNC ainsi que l'importance de TRIF dans la synthèse des IFNs de type I dans le SNC lors d'infection primaire chez l'enfant.

Par ailleurs, plusieurs études dans des modèles murins ont aussi démontré le rôle important du TLR3 (67). En effet, alors que des souris déficientes en la voie de signalisation passant par TLR3 présentent des charges virales inchangées dans le tissu périphérique (au niveau vaginal), les contrôles de la réplication virale et de la propagation dans le SNC du VHS-2 sont altérés, suggérant un rôle important de TLR3 dans le SNC. Par ailleurs, des études réalisées dans notre laboratoire ont montré qu'un prétraitement avec du « *polyribinosinic : polyribocytidylic acid* » (poly [I : C]), qui est un agoniste chimique du TLR3, renforce les mécanismes de l'immunité innée et de la neuroprotection contre le VHS-1 dans un modèle murin d'encéphalite herpétique (128). De plus, nos travaux ont illustré l'importance de la voie de signalisation passant par TRIF au cours de l'encéphalite herpétique. En effet, comparativement aux souris sauvages C57BL/6, les souris TRIF^{-/-} montrent une sensibilité accrue à l'infection intranasale par le VHS-1, associée à une perte de contrôle de la réplication virale, une dissémination du virus dans le cerveau et une production altérée d'IFNs de type I

combinée à une diminution de la phosphorylation d'IRF3 (129). D'autres études ont mis en avant un rôle antiviral des produits de la voie de signalisation du TLR3 dans une large gamme de types cellulaires du SNC (130). Le mécanisme antiviral en aval du TLR3 dans le SNC nécessite cependant une clarification. Bien que la croyance commune soit que l'immunité antivirale dans le SNC procède en grande partie par l'induction d'IFNs de type I, l'autophagie est probablement concernée. Il est possible que l'autophagie déclenchée par le TLR3 joue un rôle dans la protection contre le VHS-1 dans le SNC puisque les TLRs sont connus pour stimuler l'autophagie à travers une voie passant par TRIF (131). À la lumière de ceci, il est intéressant de noter que la protéine ICP34.5 du VHS-1 cible la bectine-1. Elle est essentielle à l'autophagie et la fonction d'ICP34.5 en tant que facteur de neurovirulence dépend de la capacité à cibler cette protéine (28).

III.2.1.1.3 Le récepteur « Toll-Like » 9

Le composant viral le plus immunogène est sûrement l'ADN du VHS-1. Le TLR9 reconnaît l'ADN viral dans les endosomes cellulaires (132). Des études utilisant l'ADN naturel suggèrent que la teneur en « *Cytosine-phosphate-Guanosine* » (CpG) et le niveau de méthylation du motif affectent fortement la capacité de l'ADN à activer le TLR9 (133). Ainsi, le mécanisme moléculaire de la détection de l'ADN du VHS par le TLR9 n'est pas complètement élucidé. Chez l'homme, l'expression du TLR9 est limitée aux cellules B et aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), alors que chez la souris, elle est largement exprimée par de nombreux types de cellules (134, 135). Par exemple, en plus des cellules immunitaires telles que les macrophages, les DCs et les lymphocytes B, le TLR9 est exprimé au niveau du système nerveux central par les microglies (97) et les astrocytes (110).

Les premières études sur les infections causées par le VHS chez des souris déficientes en TLR9 n'ont pas montré d'effet sur l'activité antivirale (136). Par la suite, des effets modestes du déficit en TLR9 sur les réponses IFNs de types I conduites par les pDCs, la réponse inflammatoire précoce et l'activation précoce des cellules NKs après des infections avec le VHS ont été rapportés (112, 137, 138). Fait important, dans un modèle d'infection cornéenne avec le VHS-1, les souris déficientes en TLR9 présentent un phénotype d'infection plus prononcé. Les souris montrent une expression fortement compromise des ISGs, un niveau de recrutement des neutrophiles réduit et la perte du contrôle de la réplication virale (139). Par ailleurs dans le laboratoire, nous avons montré que le prétraitement de souris BALB/c, naturellement sensibles, avec des agonistes de TLR9 avant l'infection par le VHS-1 réduit la charge virale cérébrale et les taux de cytokines dans le cerveau, ce qui entraîne une augmentation des taux de survie. Nous pensons que l'activation du TLR9 avant l'infection apporte un environnement cérébral qui empêche la réplication virale et par conséquent la production de médiateurs pro-inflammatoires tardive, entraînant une diminution de la sévérité et de la mortalité au cours de l'HSE expérimentale. D'autre part, le traitement par des antagonistes du TLR9 (débuté 3 jours après l'infection)

améliore le pronostic de l'encéphalite herpétique chez les souris BALB/c par une diminution de la réponse inflammatoire tardive qui pourrait être préjudiciable (140).

La reconnaissance du VHS par le TLR9 permet l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B par phosphorylation via la voie MyD88. Les IRF3 et IRF7 activent les gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation tels que l'IFN- α / β , l'IL-6 et l'IL-12 (141, 142).

III.2.1.2 Les récepteurs « retinoic-acid-inducible gene-1-like »

Les RLRs sont des PRRs cytoplasmiques qui détectent les ARNs entraînant la production d'IFNs de type I tels que l'IFN- α et l'IFN- β (143). La famille des RLRs est composée de trois récepteurs : RIG-I, MDA5 et le « *laboratory of genetics and physiology 2* » (LGP2) (144). Les RLRs contiennent un domaine hélicase « DExD/H-box » et un domaine C-terminal (CTD) qui se lie à l'ARN. En outre, RIG-I et MDA5 ont un domaine « *caspase recruitment domain* » (CARD) à l'extrémité N-terminale (144, 145). Les RLRs participent à la mise en place d'une réponse immunitaire lors d'infection au niveau du SNC (146, 147) (Figure 10).

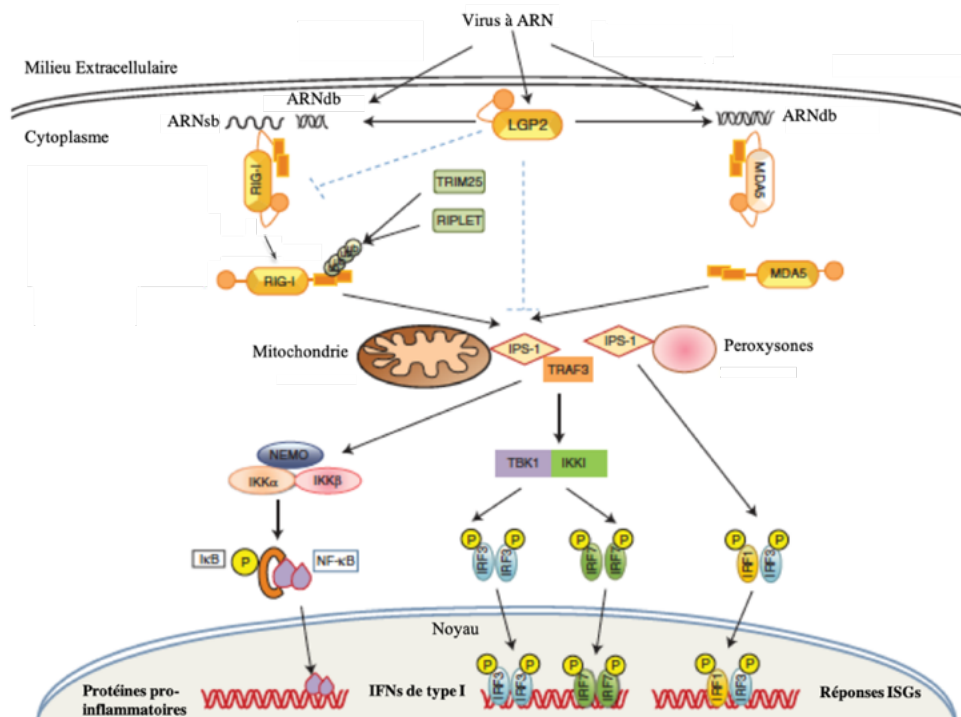


Figure 10 : Un aperçu des voies de signalisation passant par les RLRs.

Adapté de (103) : Les RLRs mitochondriaux ou péroxisomaux reconnaissent le VHS et transmettent des signaux via IPS-1. En réponse à l'infection par le VHS, les récepteurs de reconnaissance des pathogènes

de l'hôte amorcent un programme complexe qui active les facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et IRF7. Cela conduit à l'induction d'IFN- α / β et de cytokines pro-inflammatoires et à une réponse via les ISGs ».

III.2.1.2.1 Les récepteurs «*retinoic-acid-inducible gene 1*» et «*melanoma differentiation-associated protein 5*»

RIG-I est une ARN-hélicase avec un motif «*DEAD box*» (DDX 58 humaine) contenant deux domaines CARDs (144). RIG-I se lie préférentiellement à des ARNs db courts (<300 pb) qui ont des extrémités franches et un fragment 5'-triphosphate, facilitant la discrimination entre l'ARN db viral et celui de l'hôte (148, 149). Les structures cristallines de RIG-I liées à un ligand d'ARN db de 12 pb et de RIG-I libre ont fourni des informations détaillées sur le mécanisme d'activation de ce récepteur. En l'absence de ligands d'ARN db, RIG-I est dans un état autoréprimé. Cette conformation empêche ainsi la signalisation passant par l'«*interferon- β promoter stimulator-1*» (IPS-1) via les motifs CARDs de RIG-I (150).

MDA5, également connu sous le nom de Helicard, est structurellement similaire à RIG-I, qui contient également deux domaines CARDs et un domaine hélicase (151, 152). Contrairement à RIG-I, MDA5 se lie préférentiellement à l'ARN db long (> 1000 pb) sans spécificité de fin et s'assemble de manière coopérative sur l'ARN db (153). Les domaines CARDs de MDA5 ne sont pas séquestrés en l'absence de ligands (153). Une structure cristalline des domaines hélicase et CTD liés à l'ARN db a révélé comment MDA5, malgré une architecture de domaine similaire à celle de RIG-I, reconnaît l'ARN db d'une manière différente (153).

Dans la signalisation RLR, le signal est propagé séquentiellement du RLR (via les domaines CARDs) lié à son ligand puis à IPS-1 qui à son tour active les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et IRF3 (154). NF- κ B et IRF3 activés migrent dans le noyau, où ils induisent l'expression d'IFNs de type I et d'autres molécules antimicrobiennes et inflammatoires (par exemple le TNF, l'IL-1 β , IL-6, IL-12). La sortie de signalisation d'IPS-1 est différente selon qu'elle se produit à la membrane péroxyssomale ou mitochondriale. IPS-1 péroxyssomal permet l'expression rapide et interféron-indépendante des facteurs de défense, précédant l'activation de la principale voie dépendante de l'interféron par IPS-1 mitochondrial qui amplifie et stabilise la réponse antivirale (155). Ainsi, la signalisation IPS-1 dépend de la localisation cellulaire, et les peroxyssomes sont un site important de la transduction du signal antiviral (155). La réponse résultant de la signalisation RLR pourrait se produire au détriment de la fonction tissulaire normale. En effet, la polymérisation d'IPS-1 peut provoquer un remodelage de la membrane mitochondriale et/ou péroxyssomale, et causer la mort cellulaire en perturbant le potentiel de ces membranes et en activant les caspases (156). Des mécanismes de régulation multiples ont évolué pour

permettre une activation, une amplification et une inactivation rapide de la signalisation RLR, et pour obtenir le compromis optimal entre le coût et le bénéfice de la réponse inflammatoire (157). La signalisation RLR est notamment modulée par plusieurs protéines différentes, dérivées à la fois de l'hôte et des pathogènes.

Dans le contexte de l'infection cérébrale au VHS-1, nous avons révélé l'importance de cette voie de signalisation passant par IPS-1. En effet, en utilisant des souris déficientes en IPS-1, nous avons observé une sensibilité accrue à l'infection, associée à une perte de contrôle de la réplication virale ainsi qu'une dissémination du virus dans le cerveau, une production altérée des interférons de type I, accompagnée d'un défaut de phosphorylation d'IRF7 (129).

III.2.1.2.2 *Le récepteur « Laboratory of Genetics and Physiology 2 »*

LGP2, le troisième RLR possède des domaines hélicase et CTD similaires à RIG-I et MDA5, mais il ne possède pas de CARDs (144). LGP2 reconnaît les terminaisons de l'ARN db par des contacts protéine-ARN similaires à RIG-I et MDA5 (144). L'hydrolyse de l'ATP améliore la reconnaissance de l'ARN par LGP2 (158).

Parce qu'il est dépourvu de motifs CARDs, LGP2 ne peut pas activer IPS-1. Cependant, sa capacité à reconnaître l'ARN db lui permet de moduler les capacités de signalisation de RIG-I et MDA5. LGP2 diminue la signalisation de RIG-I (144). Cette activité a été attribuée à LGP2 reconnaissant de manière compétitive le même ligand viral que RIG-I. En revanche, LGP2 améliore la signalisation de MDA5 (158, 159). Le mécanisme moléculaire de cette amélioration reste peu clair, mais LGP2 semble faciliter la reconnaissance de l'ARN viral par MDA5 grâce à des interactions entre le CTD de LGP2 et l'ARN (160, 161). Il existe donc des rôles contradictoires de LGP2 dans la signalisation RLR. Les approches expérimentales utilisées pour étudier LGP2 par rapport à MDA5 et RIG-I ont été différentes, ce qui pourrait expliquer certains résultats contradictoires. Cependant, comme les indices de rôles opposés de LGP2 sur la signalisation RLR s'accumulent, la perspective émergente est que LGP2 pourrait contrôler l'équilibre entre les réponses RIG-I et MDA5 au cours d'une infection virale.

III.2.1.3 Les senseurs cytosoliques

Au cours de la dernière décennie, de nombreux senseurs et adaptateurs d'ADN cytosoliques, y compris DAI, IFI16, cGAS et l'ARN pol III ont été identifiés et caractérisés (Figure 11). La plupart de ces senseurs d'ADN fonctionnent en amont du « *stimulator of interferon genes* » (STING) et déclenchent la production d'IFNs de type I dans divers types cellulaires (162-167).

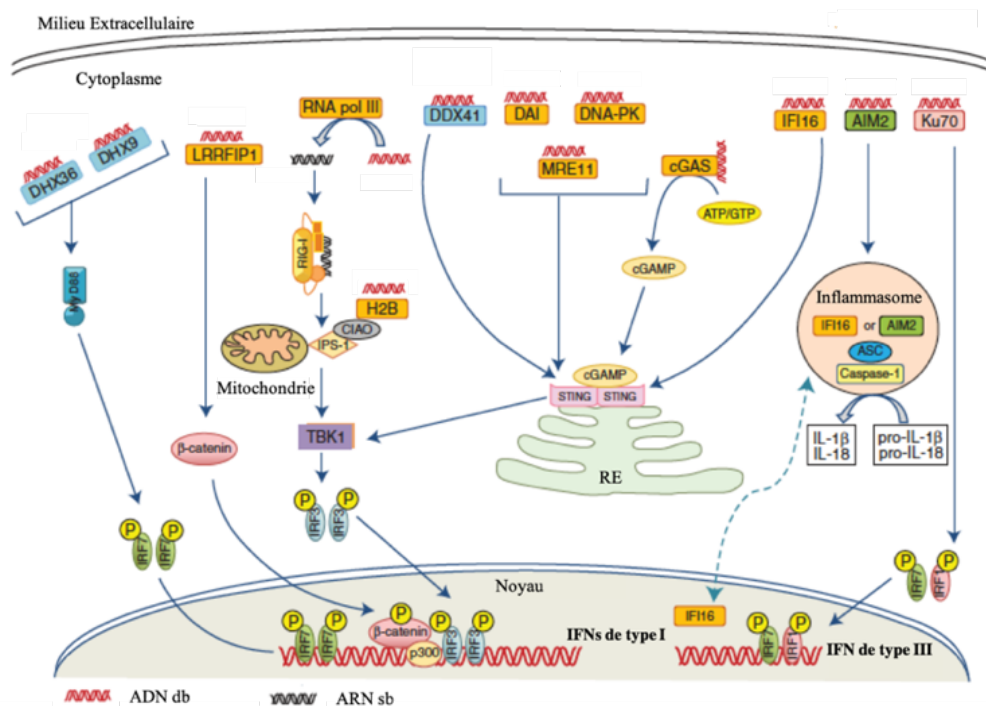


Figure 11 : Un aperçu des voies de signalisation passant par les senseurs cytosoliques.

Adapté de (103) : Les senseurs cytosoliques reconnaissent le VHS et transmettent des signaux principalement via IPS-1, STING et MyD88. En réponse à l'infection par le VHS, les récepteurs de reconnaissance des pathogènes de l'hôte amorcent un programme complexe qui active les facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Cela conduit à l'induction d'IFN de type I et de type III. La reconnaissance via IFI16 ou AIM2 active également l'inflammasome, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL18.

Dans la recherche du facteur responsable de la signalisation innée lors de la stimulation par l'ADN cytosolique, DAI a été la première protéine proposée pour lier l'ADN cytosolique et participer à la réponse immunitaire innée (163). Dans les fibroblastes, DAI signale via IRF3 pour induire la réponse IFN- β tandis que IRF3 et IRF7 sont nécessaires pour l'induction des différents types d'IFN- α . Après stimulation avec de l'ADN cytosolique, DAI s'associe à TBK1 (163). Par ailleurs, DAI est phosphorylé sur plusieurs sites par TBK1, et cette phosphorylation est nécessaire pour l'induction de l'expression génique par IRF3 (168). En plus de signaler via IRF3, DAI a un rôle essentiel dans l'activation de NF- κ B (163). L'activation de NF- κ B par DAI dépend de l'interaction de DAI avec RIP1. Cette activation est soutenue lors de l'interaction avec RIP3 (169).

La déficience de DAI apporte une réduction de la réponse des microglies et des astrocytes infectés par le VHS-1 (170). Dans les cellules vaginales présentant une expression réduite de DAI, la réponse à l'infection par le VHS-2 ou la stimulation par l'ADN du VHS-2 s'est avérée être également altérée (171). Cependant, *in vivo* l'ARN interférence de DAI n'entraîne pas d'augmentation des titres viraux après une infection oculaire par le VHS-1 (172). La production des cytokines dans ces cellules n'est également pas affectée par la modulation de l'expression de DAI (173).

IFI16 (p204 chez la souris) appartient à la famille « *Pyrin and hematopoietic, interferon-inducible nuclear proteins (HIN) domain-containing* » (PYHIN), avec un domaine pyrine à son extrémité N-terminale et deux domaines HINs en C-terminal. Il a également été identifié comme une protéine de liaison à l'ADN non redondante. Contrairement à d'autres senseurs cytosoliques d'ADN, IFI16 se localise dans le noyau et le cytoplasme, mais est principalement nucléaire, avec seulement une petite fraction détectée dans le cytoplasme à l'état de repos. Lors de l'infection, IFI16 reconnaît et s'associe directement à l'ADN dérivé du VHS-1 dans le noyau. Elle interagit ensuite avec l'histone acétyl-transférase p300 et est acétylée par celle-ci, entraînant sa redistribution vers le cytoplasme. Dans ce compartiment cellulaire, elle interagit avec STING et permet ensuite la phosphorylation d'IRF3 et la production d'IFNs pour restreindre la réplication virale (174, 175). IFI16 inhibe la réplication virale en se liant directement aux promoteurs du VHS-1 et en empêchant l'association avec des activateurs transcriptionnels par des modifications de l'histone (176). La détection de l'ADN du VHS-1 par IFI16 a lieu indépendamment de l'entrée nucléaire de l'ADN viral. En effet, dans des lignées cellulaires et de macrophages dérivés de monocytes, IFI16 colocalise avec l'ADN du VHS-1 dans le cytosol (164, 177). Cependant, le NLS d'IFI16 s'est révélé essentiel pour l'induction de l'IFN- β lors d'une infection par le VHS-1 dans des cellules U2OS (une lignée de cellules épithéliales humaines) transfectées par IFI16 (175). Une étude a montré que dans les cellules HFFs (fibroblastes de prépuce humain), la reconnaissance du génome du VHS-1 dans le noyau permet la translocation d'IFI16 dans le cytosol où il permet l'activation de l'inflammasome (178). En effet, IFI16 pourrait interagir avec la protéine « *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD* » (ASC) et la procaspase 1 pour assembler les inflammasomes pendant l'infection (178).

IFI16/p204 permet la production d'IFN de type I et d'autres cytokines inflammatoires, telles que « *C-X-C chemokine ligand* » (CXCL) 10, IL-6, et TNF, lors d'une infection par le VHS-1 de cellules humaines et murines (164, 172, 177, 179). L'expression des cytokines déclenchée par IFI16 passe par la voie STING/TBK1/IRF3 et la voie NF- κ B (164). La présence de STING est essentielle pour la signalisation via IRF3 dans les HFFs infectés par le VHS-1 (179). Un rôle important de IFI16/p204 dans la réponse immunitaire innée a également été proposé. De plus, une réduction de l'induction de l'IFN- α et une augmentation des titres viraux après infection par le VHS-1 et le VHS-2 ont été démontrées par l'utilisation d'ARNs interférence d'IFI16 dans un modèle murin (172). Par ailleurs, l'inhibition par ARN interférence d'IFI16 bloque la translocation nucléaire de IRF3 et de NF-

κ B dans des macrophages murins infectés par le VHS-1 (164). La perte d'IFI16, par ARNs interférence, a également bloqué la translocation nucléaire d'IRF3, mais pas la translocation d'IRF7 dans les cellules de l'épithélium cornéen humain immortalisées par la télomérase en réponse au VHS-1 (172). Ces études suggèrent, que les productions d'IFN de type I et de cytokines menées par la voie de signalisation passant par IFI16 serait IRF3-dépendante et/ou NF- κ B-dépendante, mais IRF7-indépendante.

La voie de détection de l'ADN passant par cGAS/STING est importante pour les réponses cellulaires innées et la résistance intrinsèque à l'infection par les virus à l'ADN (180, 181). Il a été démontré que la capsid du VHS-1 peut subir une ubiquitination par la protéine K48 et être dégradée par le protéasome. Il en résulte une libération de l'ADN génomique dans le cytoplasme (177). En outre, le VHS-1 déclenche un stress mitochondrial, conduisant à la libération de l'ADN mitochondrial dans le cytosol (182). Ces deux processus aboutissent à l'exposition d'un fragment d'ADN au senseur d'ADN cytosolique cGAS, qui utilise ensuite la guanosine triphosphate (GTP) et l'ATP afin d'activer STING. Ce dernier recrute alors TBK1 ce qui conduit à l'activation de IRF3 et à la production d'IFNs de type I.

Lors de la découverte de RIG-I, des études ont révélé son rôle dans la détection de l'ADN cytosolique, mais il n'a pas été trouvé que RIG-I se lie directement à l'ADN db (183). Des études ont démontré que l'activation de RIG-I se produit via un ARN intermédiaire (184). L'ARN intermédiaire a été identifié comme étant db et est synthétisé par l'ARN pol III (184, 185). La liaison de l'ADN à l'ARN pol III dépend vraisemblablement de la composition nucléotidique de l'ADN puisque l'ADN riche en C+G ne peut pas être transcrit (185). Au stade actuel, l'importance physiologique de la voie de l'ARN pol III dans la reconnaissance du VHS-1 reste non résolue, puisque les données publiées sont contradictoires. La désactivation de l'activité de l'ARN pol III par un inhibiteur chimique bloque l'induction de l'IFN- β en réponse au VHS-1 dans les cellules RAW264.7 (cellules macrophagiques murines) (185, 186). Cependant, une autre étude a démontré que les cellules qui contiennent un système ARN pol III/RIG-I fonctionnel, n'ont pas répondu à l'ADN du VHS (187).

Des indices croissants montrent que STING est une protéine adaptatrice importante pour l'induction de l'IFN de type I par l'ADN cytosolique. Elle est exprimée dans les lymphocytes T, les DCs, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les fibroblastes, et joue un rôle essentiel dans la signalisation immunitaire innée (188, 189). STING est ancré dans le réticulum endoplasmique à travers quatre domaines transmembranaires résidant dans sa région N terminale, tandis que son extrémité C-terminale recrute TBK1 et IRF3, et facilite la phosphorylation de IRF3 par TBK1. STING a récemment été identifié comme un ISG. Son

expression ectopique dans les cellules HEK293T (cellules de foie fœtal humaines) pourrait induire une production robuste d'IFN- β (190). Des souris déficientes en STING sont significativement plus sensibles au VHS-1 par rapport aux souris de type sauvage (181). Ces données suggèrent que STING pourrait jouer un rôle important dans la restriction de l'infection par le VHS-1.

III.2.2 Les facteurs de transcription

L'engagement de ces différents PRRs, à la suite d'une infection par le VHS-1, conduit à l'activation principalement de trois voies de signalisation : les voies de NF- κ B, des « *mitogen-activated protein kinases* » (MAPKs) et des IRFs (1, 114, 187, 191-193).

III.2.2.1 Les facteurs de transcription « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell » et « activator protein 1 »

NF- κ B est un facteur de transcription dimérique qui appartient à la famille des protéines contenant le domaine « *Rel homology* », qui comprend p65/RelA, p50/NF- κ B1, p52/NF- κ B2, RelB et c-Rel (194). On pense que, dans la plupart des types de cellules, les sous-unités p65 et p50 forment l'hétérodimère qui constitue la forme active de NF- κ B (194). Dans les cellules non stimulées, le « *nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* » ($I\kappa$ B) séquestre NF- κ B dans le cytoplasme sous forme inactive. Lors d'une stimulation avec différents ligands de TLRs, les $I\kappa$ Bs sont phosphorylés au niveau des résidus sérine par un complexe « *inhibitor κ kinases* » ($I\kappa$ K) constitué des protéines kinases $I\kappa$ K- α et $I\kappa$ K- β et d'une molécule régulatrice, $I\kappa$ K- γ /« *NF- κ B essential modulator* » (Nemo). La phosphorylation cible $I\kappa$ B, ce qui conduit à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome, permettant à NF- κ B d'être libéré dans le noyau, de se lier au site κ B et d'activer la transcription des gènes cibles.

Des membres de la famille cJun, Fos, « *activating transcription factor* » (ATF) et la sous-famille « *macrophage arming factor* » (Maf) composent l'hétéroprotéine AP-1. Parmi les membres de la famille AP-1, cJun semble jouer un rôle central dans la réponse inflammatoire (195, 196). L'activation d'AP-1 dans la signalisation via les TLRs passe principalement par des MAPKs telles que « *c-Jun N-terminal kinases* » (JNK), p38 et des membres de la famille « *extracellular signal-regulated kinases* » (ERK). De nombreux ligands des TLRs activent ces MAPKs avec des cinétiques similaires (195, 196).

III.2.2.2 Les facteurs de transcription « interferon regulatory factors » 3 et 7

Les IRFs régulent la transcription en interagissant avec des séquences de promoteurs de gènes, appelées « *IRF-element* » (IRF-E). Les IRFs se lient également à des séquences d'ADN étroitement

apparentées, dénommées « *interferon-stimulated response elements* » (ISRE). Elles se retrouvent dans le promoteur d'un groupe de gènes inductibles par le virus et dont les IFNs de type I amplifient la transcription (197-200). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) hautement conservé des IRFs, et caractérisé par un motif hélice-tour-hélice unique contenant des résidus tryptophane conservés, est situé dans leur région N-terminale (201). Dans certains IRFs, l'homologie de séquence s'étend au domaine associé à l'IRF (IAD) qui permet la formation d'homo- ou hétérodimères d'IRF ou l'association d'IRF avec d'autres facteurs de transcription. La partie C-terminale moins conservée comprend le domaine d'activation de la transcription (TAD), un domaine riche en proline, les signaux d'export et de localisation nucléaire (NES et NLS) et le domaine de phosphorylation sérine/thréonine (également appelé domaine de régulation ou de réponse) (201). Le TAD définit la spécificité de chaque IRF à interagir, directement ou en association avec d'autres facteurs de transcription, avec différents composants du complexe de préinitiation de la transcription et des coactivateurs de la transcription tels que « *C-AMP response element-binding protein (CREB) binding protein* » (CBP/p300) ou « *p300/CBP-associated factor/general control of amino acid synthesis protein 5* » (PCAF/GCN5) (202). Bien que le rôle des différents domaines contenus dans la région C-terminale ne soit pas encore compris, ils régulent, au moins dans certains cas, la localisation subcellulaire des IRFs en réponse à une infection virale (203, 204).

Les rôles fonctionnels des IRFs, via des interactions entre eux ou avec d'autres membres de la famille des facteurs de transcription, dans la régulation de la défense de l'hôte, y compris les réponses immunitaires (innée et/ou adaptative), ont été fortement étudiés. Des études approfondies sur la localisation subcellulaire de l'IRF3 et de l'IRF7 ont révélé leurs mécanismes d'activation distincts par rapport aux autres membres de la famille des IRFs.

L'IRF3 a été identifié à la suite de recherches dans une base de données « *expressed sequence tag* » (EST) pour les homologues d'IRF1 et d'IRF2 (205). L'ARNm de l'IRF3 est exprimé constitutivement dans tous les tissus et n'est pas provoqué par une infection virale ou un traitement par les IFNs (205). Dans les cellules non infectées, l'IRF3 migre entre le noyau et le cytoplasme. La localisation cytoplasmique y est prédominante et dépend de l'interaction de l'exportine 1 et d'un sous-ensemble de récepteurs de l'importine- α avec les séquences NES et NLS, respectivement (204). L'IRF3 contient également un domaine IAD situé à l'extrémité C-terminal. Des interactions intramoléculaires maintiennent l'IRF3 dans une conformation fermée, masquant à la fois le DBD et l'IAD, dans le cytoplasme des cellules non infectées (203). La phosphorylation d'un groupe sérine/thréonine (Ser385, Ser386) situé dans l'IAD, provoquée par le virus, conduit à un changement de conformation de l'IRF3 qui lève l'auto-inhibition intramoléculaire et permet la translocation vers le noyau (202, 203, 206, 207). Des mutations de ces résidus abolissent l'activation menée par le virus (202, 203).

Le NLS permet l'accumulation nucléaire d'IRF3 phosphorylé qui peut se lier à la protéine CBP/p300 résidant dans le noyau, cette association empêchant l'export d'IRF3 vers le cytoplasme. L'IRF3 séquestré dans le noyau peut ainsi former des complexes liant l'ADN tel que « *viral induced factor* » (VIF). Il est essentiellement formé par les homodimères d'IRF3, de « *double strand RNAs-activated factor 1* » (DRAF1) ou de « *virus activated-IRF* » (VA-IRF) formé par IRF3 et CBP ou p300 (202, 208). IRF3 s'associe à l'IRF7 pour former avec CBP et p300, le complexe de liaison à l'ADN « *virus-activated factor* » (VAF). Ce complexe reconnaît avec une haute affinité l'ISRE du promoteur du gène ISG-15 qui est sensible à l'IFN ou au virus (198).

L'IRF7 a d'abord été identifié comme un nouveau membre de la famille des IRFs et directement soumis à la base de données GeneBank. Par la suite, l'ADNc de l'IRF7 a été cloné en 1997 en tant que facteur qui se lie à la région du promoteur Q (Qp) du virus d'Epstein Bar en utilisant le système hybride de levure (197). Le gène humain *Irf7* est situé sur le chromosome 11p15.5, et code pour quatre isoformes, IRF7A, -B, -C et -H (209). L'IRF7 est un facteur spécifique lymphoïde, qui est exprimé de manière constitutive dans le cytoplasme des lymphocytes B, des pDCs, des monocytes de la rate, du thymus et des lymphocytes du sang périphérique. Il est inducible par les IFNs de type I, l'infection virale et d'autres stimuli dans différents types cellulaires (209). La phosphorylation de la sérine (Ser) dans le domaine régulateur C-terminal, hautement homologue à la région correspondante de l'IRF3, est également requise pour l'activation de l'IRF7. Le domaine IAD de la partie C-terminale de l'IRF7 n'a pas encore été déterminé avec précision. Cependant, une mutation ou une délétion dans cette région entraîne l'inactivation de ce facteur (210, 211).

Le domaine régulateur d'IRF7 est également engagé dans le contrôle de la rétention de la protéine phosphorylée dans le noyau ainsi que dans la capacité de l'IRF7 à former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription (212, 213). L'activation transcriptionnelle par IRF7 a été localisée dans deux régions distinctes. L'activation des deux régions est nécessaire pour une activité complète tandis que toutes leurs fonctions sont inactives dans IRF7 latent. Par ailleurs, la rétroaction régulatrice positive entre l'IRF7 et les IFNs de type I pendant les réponses immunitaires antivirales est la principale source d'expression d'IRF7 dans la cellule (210, 211, 214). Au stade précoce de l'infection virale, le faible taux d'IRF7 endogène dans la cellule est phosphorylé et activé par la signalisation déclenchée par les PRRs. Avec NF- κ B et IRF3, également activés par les mêmes voies en amont, l'IRF7 se lie aux IRF-E des promoteurs des IFN- α et IFN- β et permet la production de petites quantités d'IFN de type I (215). L'IRF7 joue un rôle central dans l'expression des gènes IFN- α (210). La liaison des IFNs à leurs récepteurs entraîne la synthèse *de novo* d'IRF7. Plus tard, l'IRF7 nouvellement synthétisé est activé et promeut la production d'IFN de type I, de sorte que de

plus en plus d'IRF7 et d'IFN de type I sont produits, mais IRF3 à un stade avancé est dégradé par l'infection virale (216).

L'IRF3 et l'IRF7 sont étroitement liés l'un à l'autre en termes de structures primaires (217, 218). Il existe également des indices que IRF3 et IRF7 forment des homo- ou hétérodimères. Chacune des trois combinaisons différentes de dimères peut affecter sélectivement les sous-familles des gènes de l'IFN- α et de l'IFN- β (198, 207, 210, 216). Ces facteurs peuvent également subir une modification en réponse à d'autres types de stimuli (217). La modification et la coopération d'IRF3 et IRF7 ont été étudiées plus largement dans le contexte de la régulation des gènes *IFN- α - β* dans des cellules infectées par un virus.

III.3 La réponse interféron de type I

Les interférons, découverts en 1957, jouent un rôle unique, car ils peuvent à la fois activer les cellules immunitaires et inhiber directement la réplication virale. Ils ont été largement étudiés dans le contexte de la défense de l'hôte contre l'infection virale. Les IFNs sont des membres de la famille des cytokines qui interviennent dans diverses réponses biologiques et cellulaires, parmi lesquelles on retrouve la résistance aux infections virales, la régulation de la survie cellulaire, la promotion des activités antitumorales et la modulation de la réponse immunitaire (219).

Les interférons de type I humains comprennent 13 IFN- α (14 chez la souris) similaires avec une homologie de 80 % ainsi que les IFN- ω , IFN- κ , IFN- ε et IFN- β unique avec une homologie plus faible (30 à 50 %). En plus du type I, il existe des interférons de type II (avec un seul membre : IFN- γ) et de type III (IFNs- λ). L'activation de l'activité antivirale est commune à tous les interférons. Cependant, les composants du ligand et du récepteur diffèrent entre les interférons de type I, II et III. De manière intéressante, les différents interférons partagent plusieurs des mêmes composants de cascade de signalisation.

L'IFN de type II est produit par les lymphocytes T activés et les cellules NKs. Les IFNs de type III (IFN- λ_1 (IL-29), IFN- λ_2 (IL-28A), IFN- λ_3 (IL-28B), et IFN- λ_4), découverts il y a une quinzaine d'années (220, 221), présentent des activités similaires aux IFNs de type I (222-224). Cependant, ils exercent leur action à travers un complexe récepteur distinct des IFNs de type I (220, 221).

Après une activation par les PAMPs du VHS, les microglies, les macrophages, les DCs et les astrocytes provoquent la libération d'IFN de type I, ainsi que la production des ISGs. Les IFNs de type I limitent la propagation virale en augmentant la régulation des protéines antivirales, en recrutant des cellules immunitaires périphériques et en modifiant les protéines de jonction serrées endothéliales pour diminuer la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) (225, 226). Par ailleurs, l'absence de signalisation IFN empêche la

différenciation de la microglie vers une forme activée, diminue la proportion des monocytes périphériques circulants et augmente significativement le nombre de cellules myéloïdes résidentes du SNC infecté (227).

Les IFNs de type I sont retrouvés chez tous les vertébrés. Ils n'ont pas d'introns et ont subi une duplication et une évolution des gènes relativement rapides (228). Les IFNs de type I sont des composants centraux de la défense de l'hôte contre le VHS, notamment par un contrôle de réplication virale rapide, une production de cytokines pro-inflammatoires et d'ISGs. Les souris incapables de répondre à cette classe de cytokines ont une sensibilité élevée aux infections par le VHS (229). Cependant, les IFNs de type I ont également des fonctions potentiellement pathologiques (230). En effet, une production excessive d'IFN au cours d'infection ou dans des conditions stériles entraîne des lésions tissulaires et est associée à la maladie (231, 232). Parmi les IFN de type I, les IFN- α et - β sont de loin les plus étudiés et sont les deux sous-types qui ont démontré des rôles à la fois bénéfiques et délétères dans la défense immunitaire et la maladie.

La plupart, sinon la totalité, des cellules nucléées ont la capacité de produire et de répondre aux IFNs de type I (233). L'expression d'IFN- α /- β engendrée par le virus est stimulée par les PRRs [voir section I.3.1]. Les IFNs de type I ont une action autocrine ou paracrine. Ils sont engendrés par des infections virales à des niveaux élevés, mais sont également exprimés constitutivement à des niveaux très bas (234). La signalisation de l'IFN conduit à une faible expression constitutive des ISGs, qui affecte les équilibres homéostatiques dans le système immunitaire et établit également le seuil pour les réponses immunitaires aux infections. Les processus affectés par la signalisation de l'IFN comprennent certaines des réactions immunitaires précoces telles que les facteurs de restriction, qui sont des ISGs.

Les protéines IFNs de type I sont des cytokines sécrétées et agissent par liaison aux récepteurs des IFN- α /- β (IFNARs), qui comprend les chaînes IFNAR1 et IFNAR2 (219). L'IFNAR émet des signaux à travers les kinases « *Tyrosine kinase 2* » (TYR2) et « *Janus kinase 1* » (JAK1) pour activer le complexe « *interferon-stimulated gene factor 3* » (ISGF3). Il comprend un transducteur de signal, un membre de la famille des « *signal transducers and activators of transcription* » (STAT1 ou STAT2) et IRF9, pour stimuler l'expression des ISGs. Les facteurs de transcription STAT peuvent également former des homodimères et des hétérodimères (Figure 12).

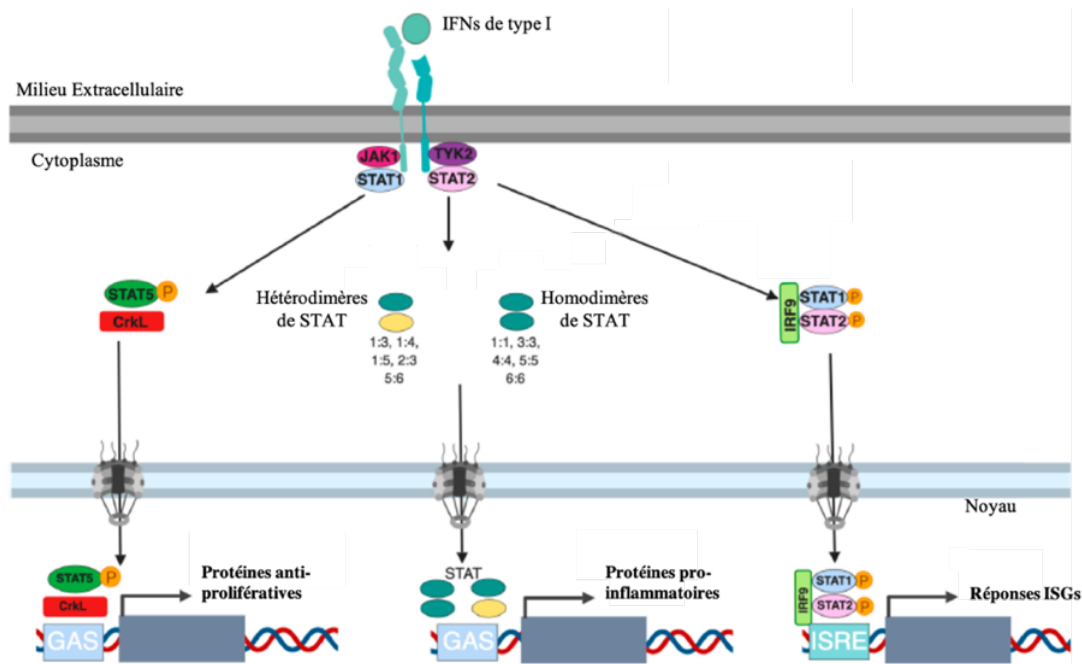


Figure 12 : Voies de signalisation activées par les IFN de type I

Adapté de (219) : Les IFNs de type I lient leur récepteur spécifique et induisent la production de protéines antiprolifératives, pro-inflammatoires et stimulent l'expression des ISGs. Les voies de signalisation engagée passent par l'activation des protéines JAK/STAT et la formation de l'ISGF3 : STAT1/STAT2/IRF9.

Plusieurs centaines d'ISGs ont été rapportées (235), et ils exercent de nombreuses fonctions. Un important sous-ensemble des ISGs a une activité antivirale directe grâce à leur capacité à bloquer des étapes spécifiques du cycle viral (235). Les mécanismes d'action de plusieurs de ces ISGs ont été décrits (Figure 13). Certains des plus connus sont la résistance à « *myxovirus 1* » (MX1), la « *protein kinase R* » (PKR) codée par « *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2* » (EIF2AK2), la « *2'-5'-oligoadénylate synthetase* » (2'-5'OAS), les protéines « *interferon-induced transmembrane proteins* » (IFITMs), l'« *Apolipoprotein B-editing enzyme, catalytic polypeptide-1* » (APOBEC1) et la famille de molécules « *tripartite motif* » (TRIM) (236). La voie OAS/« *Ribonuclease L* » (RNase L) semble engagée dans la restriction de la dissémination du VHS-1 dans les infections oculaires (237). Par ailleurs, les infections oculaires par le VHS-1 semblent plus sévères chez la souris PKR^{-/-} que chez les souris PKR^{+/+} indiquant que l'enzyme joue un rôle important dans le contrôle de la réplication du virus (238).

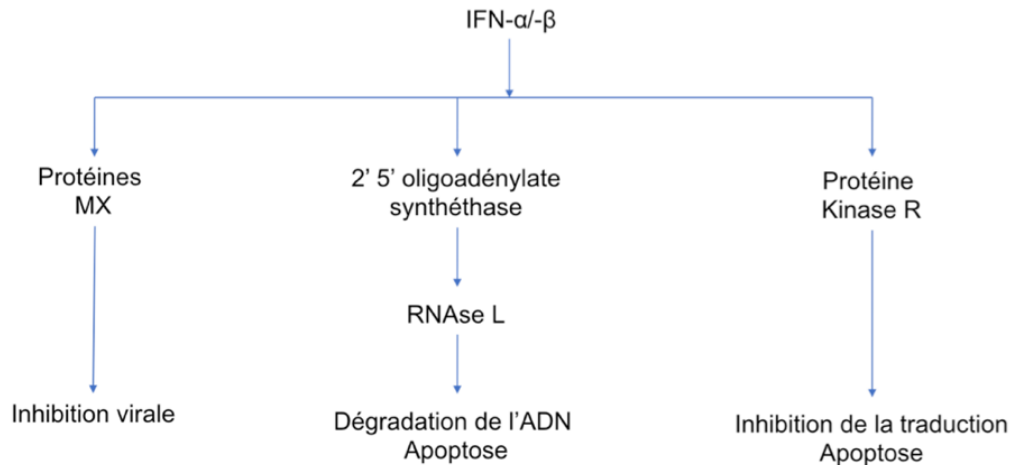


Figure 13 : Différentes fonctions des principaux ISGs

Adapté de (239). Les interférons de type I induisent la synthèse de composés antiviraux. Parmi ceux-ci, les protéines MX qui induisent l'inhibition virale, la RNase L qui permet la dégradation de l'ADN viral et l'apoptose des cellules infectées, le facteur « eukaryotic translation initiation factor 2'α » (eIF2'α) qui inhibe la traduction et provoque également l'apoptose des cellules infectées.

Les effets des IFNs-α/β sur la réponse de l'hôte à l'infection ne sont pas limités à la réponse antivirale aiguë intrinsèque décrite ci-dessus. L'IFN-α/β a des effets à la fois sur la réponse immunitaire cellulaire innée et adaptative. L'IFN-α/β affecte les cellules myéloïdes, les lymphocytes T et les cellules NKs, améliorant ainsi la réponse immunitaire, résolvant plus efficacement l'infection virale et améliorant la génération de réponses mémoires qui permettront de répondre aux défis viraux futurs (Figure 14)

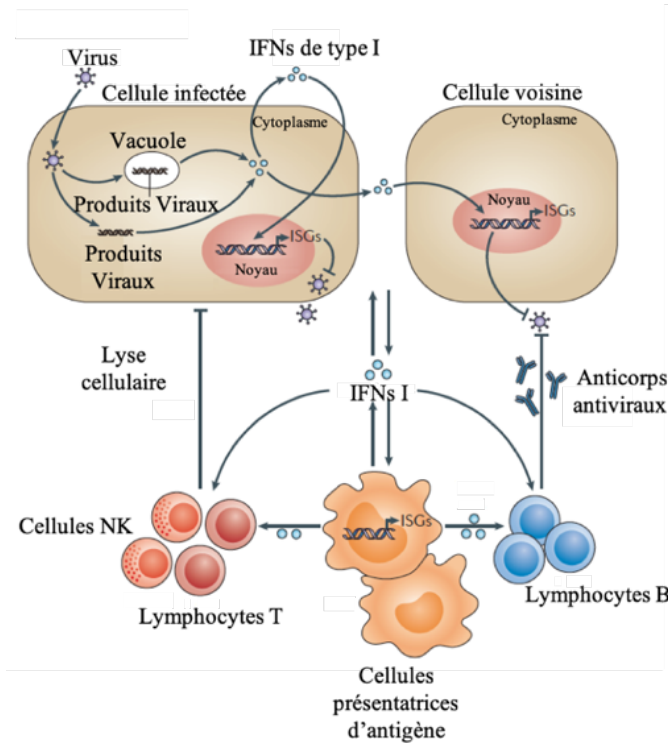


Figure 14 : Effets des IFNs de type I sur les différentes populations de cellules immunitaires

Adapté de (240). Les cellules infectées produisent des IFNs de type I en réponse à une infection virale et/ou un contact avec des produits viraux. La rétroaction des IFNs de type I sur des cellules infectées et des cellules voisines entraîne l'induction des ISGs, qui bloquent le cycle de réplication virale. Les IFNs de type I sont également produits par et agissent sur des cellules immunitaires innées, y compris des cellules présentatrices d'antigène (CPAs) professionnelles, en réponse à une infection virale et aux produits viraux. Les IFNs de type I agissant sur les CPAs peuvent améliorer la fonction de présentation de l'antigène de ces cellules. Ils peuvent également améliorer la fonction antivirale des cellules NK et des cellules immunitaires adaptatives, y compris les lymphocytes B et les cellules T, qui limitent l'infection virale par la production d'anticorps (lymphocytes B) et de réponses cytotoxiques (lymphocytes T et cellules NK).

Les cytokines dérivées des macrophages, y compris l'IFN- β , jouent un rôle clé dans la différenciation des cellules immunitaires effectrices, aidant ainsi à orchestrer les réponses immunitaires innées et adaptatives. Les cellules présentatrices d'antigène (CPAs) comme les macrophages et les DCs produisent à la fois des IFNs de type I et II. Elles expriment des niveaux élevés du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II qui permettent l'activation des réponses des lymphocytes T (241).

De nombreuses études dans les systèmes humains et murins indiquent que les IFNs- α/β sont engagés à différents stades de l'activation des réponses cellulaires immunitaires adaptatives par les DCs, activant ou inhibant ces cellules en fonction du contexte. L'IFN- α/β inhibe ou favorise la différenciation des précurseurs en DCs (242, 243). Par ailleurs, l'IFN- α/β stimule l'activité des lymphocytes T, en améliorant l'expression du CMH et des molécules costimulatrices (CD80, CD86) à la surface des DCs (244, 245). L'IFN- α/β favorise également la capacité des DCs à présenter des antigènes viraux sur le CMH-II aux lymphocytes T CD8. Enfin, l'IFN- α/β peut favoriser la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques, en régulant à la hausse l'expression des récepteurs des chimiokines, favorisant ainsi l'activation des lymphocytes T (246, 247).

Les IFNs- α/β peuvent également agir directement sur les cellules T CD4 et CD8 (248). L'IFN- α/β a été décrit comme ayant des effets inhibiteurs et stimulateurs sur la survie et la prolifération des lymphocytes T, la production de cytokines (IFN- γ), la fonction cytotoxique et la formation de la mémoire. Les différents effets sont régulés par l'activation des molécules STATs en aval des IFNARs (249).

Les IFNs- α/β favorisent également la fonction et la survie des cellules NKs, par des moyens directs et indirects. Les conditions inflammatoires lors d'infections virales spécifiques semblent dicter les effets des IFNs- α/β sur la fonction des cellules NKs. Par exemple, dans l'infection au CMV murin (mCMV), la signalisation conduite par les IFNs- α/β via STAT1 est nécessaire pour l'accumulation de cellules NKs et la fonction cytolytique, mais pas pour la production d'IFN- γ (250).

III.4 Les cellules immunitaires périphériques infiltrant le système nerveux central

Normalement, le parenchyme cérébral contient très peu de leucocytes provenant de la périphérie. L'infiltration de cellules inflammatoires allant des neutrophiles aux cellules NK, en passant par les macrophages et enfin les lymphocytes, a lieu en réponse à une série de signaux provenant de molécules chemoattractantes.

Les polymorphonucléaires neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans le sang humain, constituant environ 50-70 % de la population de leucocytes et contribuent aux premiers stades de la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes. Les neutrophiles sont les premiers à réagir à l'invasion virale. On constate une augmentation spectaculaire de leur nombre dans le microenvironnement local après une infection virale. Le nombre de neutrophiles recrutés à la périphérie au cours d'une infection virale est augmenté et la durée de vie des neutrophiles infiltrants est prolongée. Cela permet aux neutrophiles de recruter des cellules immunitaires supplémentaires et d'empêcher la dissémination du virus (251).

Les neutrophiles possèdent notamment la capacité de reconnaître, de séquestrer et de tuer directement les agents pathogènes ainsi que de favoriser les interactions entre les cellules immunitaires (252). Les neutrophiles phagocytent classiquement les pathogènes opsonisés en présence du système du complément et les cellules infectées, mais ils peuvent aussi reconnaître directement les agents pathogènes par l'intermédiaire des PRRs comme les TLRs (253, 254). Les pathogènes sont détruits par des médiateurs stockés ou générés dans des granules neutrophiles, y compris des peptides antimicrobiens, des enzymes protéolytiques et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (251). Les « *neutrophil extracellular traps* » (NETs), produisent par les neutrophiles, sont des structures extracellulaires composées d'ADN génomique en complexe avec des protéines nucléaires et granulaires telles que des histones, des défensines et diverses protéases. Au cours d'une infection virale, les NETs peuvent éliminer les virus ou au moins empêcher la propagation locale dans les tissus de l'hôte. Ils peuvent jouer un rôle bénéfique dans l'élimination et la limitation de la dissémination virale, mais possèdent également des propriétés nuisibles en réponse à plusieurs infections virales. Une meilleure compréhension est donc nécessaire pour élucider l'importance des NETs dans la défense antivirale (255) (Figure 15).

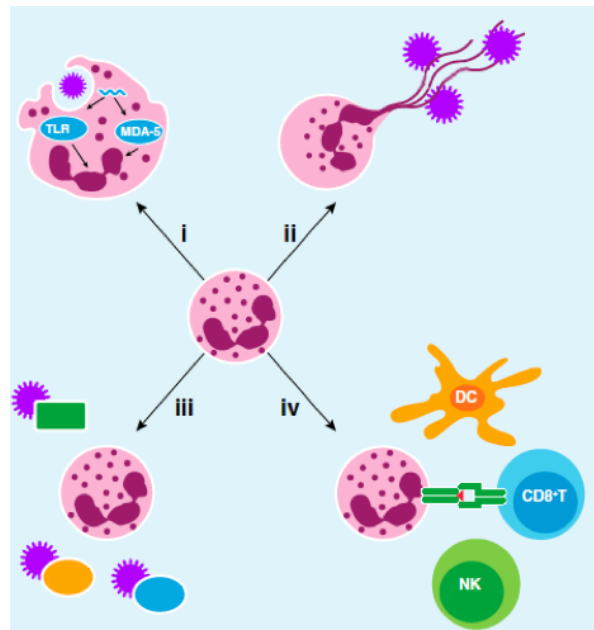


Figure 15 : Modes d'action des polynucléaires neutrophiles au cours de la réponse antivirale.

Adapté de (256) : Mécanismes antiviraux par lesquels les neutrophiles contribuent à la défense de l'hôte. (i) Les neutrophiles peuvent phagocyter le virus et amorcer un programme antiviral ou devenir activés par des PRRs tels que MDA5 et les TLRs. (ii) Les neutrophiles peuvent produire divers agents antimicrobiens inactivant le virus. (iii) Les neutrophiles à travers les NETs peuvent piéger le virus et l'inactiver via des molécules

antimicrobiennes liées aux NETs. (iv) Les neutrophiles, par leur interaction avec d'autres populations de cellules, telles que les cellules T CD8 + et les cellules NKs, peuvent orchestrer des réponses antivirales.

Les neutrophiles interagissent avec les cellules infectées par le virus et les virions. En utilisant la microscopie électronique, van Strijp et collaborateurs (et.coll.) ont observé des fibroblastes infectés par le VHS entourés de neutrophiles et des neutrophiles capturant des virions (257). Les défensines, contenues dans les granules des neutrophiles sont capables de se lier directement aux particules virales en interagissant avec les bicouches lipidiques, les glycoprotéines et les glycolipides du VHS (258). De plus, l' α -défensine des neutrophiles humains inactive *in vitro* le VHS-1 et -2 (259). Les neutrophiles produisent des ROS en réponse au VHS-1 qui possèdent des effets virucides endommageant directement l'ADN viral et induisant également la mort cellulaire par apoptose des cellules infectées par le virus pour limiter sa dissémination (260). D'autre part, de nombreux neutrophiles infiltrent la cornée lors d'une kératite herpétique stromale expérimentale. Le rôle important des neutrophiles dans l'élimination du virus au cours de cette maladie herpétique a été observé par l'appauvrissement en neutrophiles. En effet, dans ces conditions, les titres viraux cornéens sont augmentés (261). Par ailleurs, les neutrophiles migrent en réponse à la libération d'IL-8 par des cellules épithéliales cornéennes et des cellules stromales infectées par le VHS-1 (262). De plus, les neutrophiles peuvent protéger la rétine lors d'infections herpétiques oculaires (263).

Outre les neutrophiles, les monocytes et les macrophages jouent un rôle crucial, mais distinct dans l'homéostasie tissulaire et l'immunité. Les monocytes jouent un rôle clé dans l'inflammation, alors que les macrophages résidants dans les tissus jouent un rôle important dans le développement, l'homéostasie tissulaire et la résolution de l'inflammation. Les monocytes sont définis par leur localisation, leur phénotype et leur morphologie, ainsi que par les signatures d'expression caractéristique des gènes et des « miRNA » (microARN) (264-266). Chez les souris et les humains, les monocytes représentent respectivement 4 % et 10 % des cellules nucléées dans le sang, avec des réserves marginales considérables dans la rate et les poumons qui peuvent être mobilisées à la demande (267). Des études ont établi l'existence de deux sous-populations de monocytes dans le sang humain (268). Il s'agit des monocytes CD14^{high} (qui peuvent être subdivisés en populations distinctes de monocytes CD14^{high}, CD16⁻ et CD14^{high}, CD16⁺) qui sécrètent des cytokines inflammatoires essentielles lors d'une stimulation *in vitro* et des monocytes CD14^{low} CD16^{high}. Chez les souris, les sous-ensembles de monocytes « *colony-stimulating factor 1 receptor 1* » (CSF1R) positifs comprennent les monocytes inflammatoires « *lymphocyte antigen 6 complex locus C1* » (Ly6C^{hi}), « *CX3C chemokine receptor 1* » (CX3CR1^{low}), « *C-C chemokine receptor 2* » (CCR2^{high}), « *L-selectine* » (CD62L⁺), CD43^{low}, les monocytes intermédiaires Ly6C^{high}, CX3CR1^{int}, CCR2^{int} et les monocytes patrouilleurs Ly6C^{low}, CX3CR1^{high},

CCR2⁺, CD62L⁻, CD43^{high} (269-271). Ces trois sous-ensembles de monocytes expriment des récepteurs de chimiokines distincts et des molécules d'adhésion qui reflètent leurs fonctions respectives et leurs schémas migratoires (272) (Figure 16). Les monocytes inflammatoires infiltrent les tissus inflammés d'une manière dépendante de CCR2 et exercent des fonctions pro-inflammatoires, phagocytaires et protéolytiques essentielles à la digestion des tissus endommagés et à l'élimination des débris (273-275). En revanche, les monocytes patrouilleurs exercent des fonctions anti-inflammatoires et interviennent dans la régénération tissulaire, la croissance, l'angiogenèse et le dépôt matriciel (276-278).

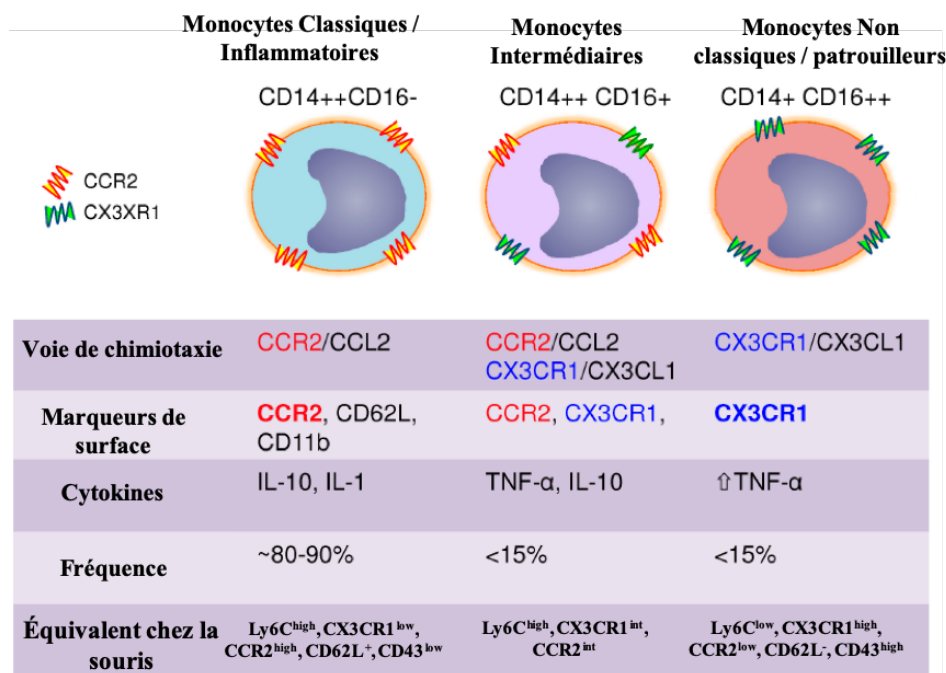


Figure 16 : Différentes sous-populations de monocytes.

Adapté de (272) : Les monocytes humains sont classés en trois sous-types basés sur l'expression différentielle de CD14 et CD16 : monocytes classiques ou inflammatoires CD14⁺⁺ CD16⁻ (Ly6C^{high}, CX3CR1^{low}, CCR2^{high} chez la souris), les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺ CD16⁺ (Ly6C^{high}, CX3CR1^{int}, CCR2^{int} chez la souris) et les monocytes non classiques ou patrouilleurs CD14⁺ CD16⁺⁺ (Ly6C^{low}, CX3CR1^{high}, CCR2^{low} chez la souris).

Des indices suggèrent qu'à l'état d'équilibre, les sous-ensembles de monocytes sanguins Ly6C^{hi} se différencieraient, très probablement dans la circulation, en cellules Ly6C^{low} (279). Les cellules de souris Ly6C^{low}, et leurs équivalentes humaines CD14^{low}, CD16⁺, peuvent donc être des macrophages résidants dans le sang, différenciés en phase terminale plutôt que des monocytes authentiques. En effet, il existe maintenant des indices

suggérant que la fonction principale des cellules Ly6C^{low} est d'assurer l'intégrité endothéliale (276, 280). En revanche, les monocytes Ly6C^{hi} chez la souris représentent des « *monocytes classiques* » qui sont recrutés aux sites d'inflammation et peuvent agir comme précurseurs des phagocytes mononucléaires périphériques (281).

Les monocytes et les neutrophiles infiltreraient le SNC au cours de l'infection par le VHS-1 (282). De plus, l'infiltration des cellules immunitaires périphériques, principalement des neutrophiles et des macrophages dérivés de monocytes induirait une susceptibilité à l'infection intranasale par le VHS-1 chez les souris 129S6 (283). En outre, des études réalisées dans notre laboratoire ont montré par cytométrie de flux que les monocytes sanguins et les neutrophiles infiltrent le SNC de souris chimériques C57BL/6 au cours de l'encéphalite herpétique. Plus précisément, nous avons utilisé des souris C57BL/6 traitées par chimiothérapie et transplantées avec la moelle osseuse de souris C57BL/6 transgéniques hémizygotés exprimant la *green fluorescent protein* [GFP⁺] sous promoteur de la β -actine de poulet et de l'activateur de CMV. Ainsi les cellules périphériques de sang expriment la GFP alors que les cellules résidentes du cerveau ne l'expriment pas. Nos résultats ont révélé que les profils d'infiltration des monocytes inflammatoires « Ly6C^{hi} » et patrouilleurs « Ly6C^{low} » dans le cerveau des souris infectées suivent des cycles temporels différents avec une migration retardée pour les monocytes « Ly6C^{low} ». En outre, les analyses immunohistochimiques ont indiqué que ces cellules colonisent principalement les bulbes olfactifs et plusieurs régions du tronc cérébral, y compris le cerveau intermédiaire et le cerveau postérieur, où les particules virales sont disséminées. De plus, dans le modèle expérimental d'encéphalite herpétique utilisé au laboratoire, les cellules immunitaires infiltrent le SNC d'une manière fonctionnelle sans nécessiter une altération de la BHE. Une fois dans le SNC, les cellules de la lignée monocyttaire (GFP⁺/Iba-1⁺) ont la capacité de se différencier en macrophages (284).

Lors d'infections virales, les cellules NKs, qui sont des lymphocytes innés, jouent un rôle majeur dans les défenses cellulaires, avant qu'une réponse adaptative efficace soit générée (285). Les cellules NKs ont la capacité spécifique de reconnaître et de lyser les cellules cibles sans exposition préalable. Elles ont deux fonctions effectrices principales : la cytotoxicité et la production de cytokines. Les réponses des cellules NKs ont été considérées comme non spécifiques en raison de l'expression des récepteurs codés par la lignée germinale qui ne se recombinent pas pour générer des récepteurs spécifiques de l'antigène comme les cellules T et B (286). Les cellules NKs partagent, en particulier avec les lymphocytes T, non seulement les progéniteurs lymphoïdes communs et bipotents T/NK, mais aussi une série de caractéristiques fonctionnelles. En effet, les cellules NKs sont activées par les DCs (287), participent à la réponse auto-immune (288), et sont capables de reconnaître et de répondre aux peptides viraux (289, 290). De plus, les cellules NKs interagissent avec les cellules immunitaires innées et adaptatives pour coordonner les réponses antivirales appropriées. En effet, les cellules NKs produisent précocement de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , une cytokine aux effets pléiotropes, capable de potentialiser les effets de l'immunité innée et de l'immunité adaptative

(291). De plus, les cytokines telles que l'IL-12, IL-15, IL-18, TNF et IFN- β recrutent et modulent d'autres cellules immunitaires, telles que les neutrophiles, les macrophages, les cellules T et autres (292, 293). Les cellules NKs possèdent également une cytotoxicité naturelle via un ensemble de récepteurs activateurs qui détectent une variété d'antigènes de stress typiquement exprimés à la surface des cellules cancéreuses ou infectées par un virus. La maturation des cellules NKs s'accompagne de l'expression d'un certain nombre de récepteurs activateurs et inhibiteurs (294). Les récepteurs sensitifs du CMH-I transmettent des signaux inhibiteurs qui épargnent les cellules saines (295). Les principaux récepteurs activateurs responsables de la cytotoxicité spontanée des NKs engagent leurs ligands exprimés à la surface des cellules « stressées » en l'absence de signaux inhibiteurs, conduisent à l'activation des cellules NKs et à la mort cellulaire (294, 296) (Figure 17).

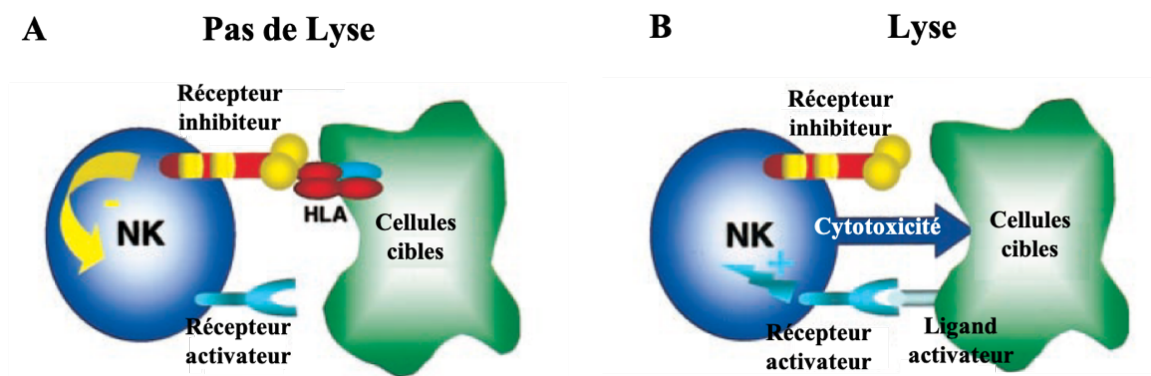


Figure 17 : Régulation de la réponse des cellules NKs par des récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Adapté de (297). (A) Lorsque les récepteurs inhibiteurs engagent l'« human leukocyte antigen » (HLA) en l'absence d'une interaction récepteur/ligand activateur, un signal négatif net est généré, ce qui entraîne l'absence de lyse des cellules cibles. (B) Inversement, lorsque les récepteurs d'activation engagent leurs ligands sur les cellules cibles en l'absence d'interaction récepteur/ligand inhibiteur, un signal d'activation net est généré, ce qui entraîne la lyse des cellules cibles.

Un autre récepteur activateur important est le récepteur à faible affinité pour l'IgG, capable de se lier aux complexes immuns et aux cellules opsonisées revêtues d'IgG. La liaison de ce récepteur avec le fragment cristallisable d'IgG sur les cellules cibles opsonisées active les cellules NKs pour tuer par le mécanisme « *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* » (ADCC). (Figure 18)

Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

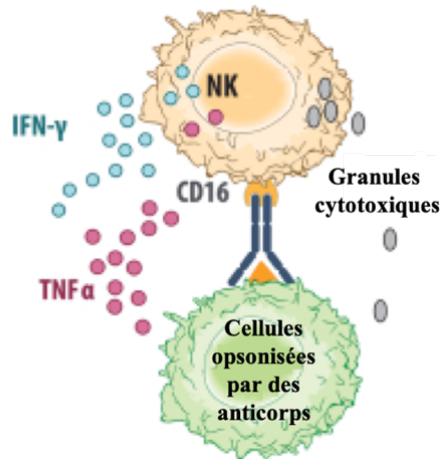


Figure 18 : Les différents mécanismes cytotoxiques des cellules NKs.

Adapté d'une figure disponible à la page 101 du document suivant : https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1326110/000119312515229037/d917371ds1.htm#toc917371_23.

Les cellules NKs peuvent être activées et induire la destruction des cellules via le mécanisme ADCC, en liant son récepteur CD16.

Enfin, les sous-populations NKs effectuent une expansion clonale de façon stable en réponse à certaines infections virales ou certains cancers et semblent capable de contrôler à long terme ces maladies (298-300). De plus, une série d'études récentes a remis en question la nature « innée » des cellules NKs. En effet, il existerait des cellules NKs à mémoire vive. À la suite de l'infection de souris par le mCMV, des cellules NKs ont pu être retrouvées 70 jours après l'infection. Ces cellules NKs « mémoires » sont fonctionnelles puisqu'elles produisent de l'IFN- γ et libèrent le contenu cytotoxique de leurs granules après stimulation *ex vivo* (301). Similairement, d'autres études révèlent la contribution de ces cellules NKs « mémoires » dans le contrôle viral lors d'infections latentes ou à la suite d'une réinfection (302, 303). Par ailleurs, les réponses des cellules NKs peuvent être spécifiques d'un ligand. En effet, des souris infectées avec le virus mCMV ont un nombre de NKs augmenté au cours de l'infection, ce qui n'est pas le cas des souris infectées avec le virus dépourvu de m17, suggérant ainsi que m17 est essentiel à la prolifération des NKs (301). Les cellules NKs possèdent donc, en plus de leurs deux fonctions effectrices principales, des caractéristiques adaptatives et une potentielle activité de type mémoire (304, 305) (Figure 19).

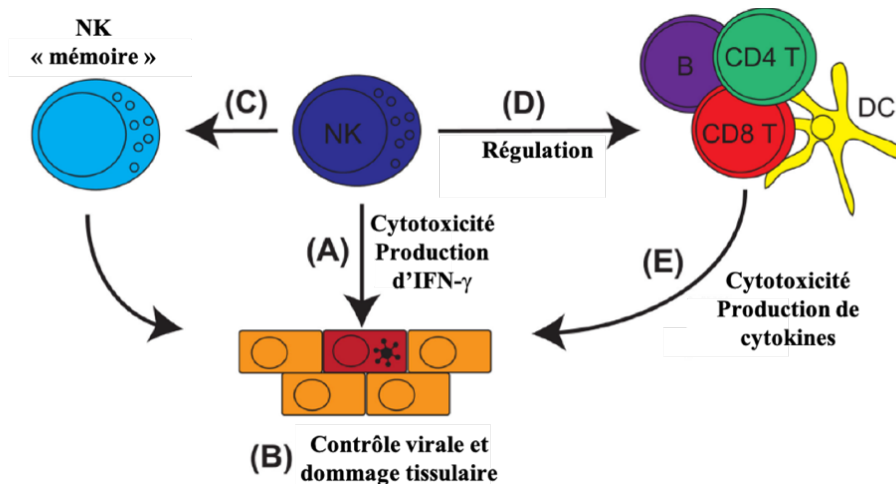


Figure 19 : Différents modes d'action des cellules NKs au cours de la réponse antivirale

Adapté de (292) : Les cellules NKs ont le potentiel (A) de reconnaître et de tuer les cellules infectées par le virus ou de libérer des cytokines antivirales pro-inflammatoires pouvant inhiber la réplication du virus. Ces activités peuvent être protectrices, mais peuvent également contribuer à (B) des dommages pathologiques des tissus hôtes. L'inflammation et les antigènes viraux peuvent également déclencher le développement de cellules NKs « mémoires » (C) de longue durée qui peuvent protéger contre la réinfection ou empêcher la réactivation virale de la latence. En revanche, la promotion ou l'inhibition des cellules immunitaires adaptatives par les cellules NKs (cellules T et B, par exemple) ou d'autres cellules innées (cellules dendritiques, par exemple) peut influencer la réponse immunitaire globale contre le virus, ce qui peut avoir des conséquences sur le contrôle du virus (E) ou sur la pathogenèse de la maladie et l'issue de l'infection.

Les patients présentant des mutations génétiques entraînant une diminution du nombre de cellules NKs ou de leur fonction succombent aux infections récurrentes à l'herpès virus, soulignant l'importance de ces cellules dans le contrôle de cette infection virale (306). D'autre part, des patients présentant une déficience en cellules NKs développent des encéphalites herpétiques plus sévères (307). Les cellules NKs seraient capables de restreindre la dissémination du VHS-1. En effet, la déplétion des cellules NKs conduit à une plus grande dissémination du virus dans le SNC ainsi qu'à une augmentation de la susceptibilité des souris. Lors d'une infection intranasale avec le VHS-1, les cellules NKs agiraient au niveau de la cavité nasale et des ganglions trijumeaux, mais ne seraient pas les seules cellules immunitaires à participer à la restriction de la dissémination du VHS au niveau du tronc cérébral (308).

Depuis qu'elles ont été décrites pour la première fois à la fin des années 1980, les cellules « *natural killer T* » (NKTs) invariantes (iNKTs) ont été reconnues comme une population de lymphocytes T avec des fonctions diverses dans le système immunitaire. Le nombre de cellules iNKT dans le sang périphérique humain est très variable et varie de 0,03 à 0,78 % des lymphocytes (309). Ils fonctionnent de manière similaire aux cellules du système immunitaire inné, car ils présentent moins de spécificité et une activation plus rapide par rapport aux cellules immunitaires adaptatives (310). Les cellules NKTs sont définies de manière étroite comme une lignée de cellules T exprimant des récepteurs de la lignée NK, y compris NK1.1, en plus d'un « *T-cell receptor* » (TCR) $\alpha\beta$ semi-invariant restreint par CD1d (311), une molécule de CMH type I non classique exprimée sur des CPAs (312, 313). Contrairement aux cellules T conventionnelles, qui reconnaissent les antigènes peptidiques présentés sur les molécules du CMH classiques, les cellules iNKTs reconnaissent les antigènes lipidiques présentés sur CD1d (314).

Les cellules iNKTs activées peuvent rapidement produire diverses cytokines T auxiliaires et interagir avec d'autres populations cellulaires dans le système immunitaire. Ainsi, elles sont un facteur important dans le résultat des réponses immunitaires globales contre les maladies infectieuses (315). L'activation bidirectionnelle entre les cellules iNKTs et les DCs conduit à l'induction de réponses immunitaires innées et adaptatives, y compris la transactivation des cellules NKs (316) et la réponse accrue des cellules T CD4 et CD8 classiques aux antigènes peptidiques (310, 317, 318). Les rôles protecteurs des cellules iNKTs en réponse à l'infection par les VHS ont été démontrés chez la souris. En effet, les souris dépourvues de cellules iNKTs sont plus sensibles aux infections par les virus herpès simplex 1 et 2. (319, 320). En plus des cellules iNKTs ou NKTs de type 1, il existe une autre population de cellules NKTs appelées « *diverse NKT* » (dNKT) ou cellules NKT de type 2. Les cellules dNKTs expriment des TCRs plus diversifiés et reconnaissent différents ensembles d'antigènes lipidiques par rapport aux cellules iNKTs (314).

Équipées d'une large gamme de PRRs, les DCs sont très efficaces pour détecter les agents pathogènes et les PAMPs. Plusieurs études ont donc examiné la capacité des DCs à reconnaître le VHS et évalué comment cette reconnaissance conduit à la sécrétion de cytokines antivirales essentielles. L'exposition *in vitro* de DCs dérivées de la moelle osseuse au VHS entraîne la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 (321). La reconnaissance du VHS par les DCs mène également la libération d'IFN- α/β (322). Ceux-ci ont des activités antivirales puissantes telles que le blocage de l'expression immédiate des gènes du VHS, la libération des virions des cellules infectées et la limitation de la progression de l'infection des tissus périphériques au système nerveux (323). Un rôle central des DCs dans les infections virales est d'activer des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) spécifiques des antigènes naïfs dans les ganglions lymphatiques. Plusieurs études ont démontré que les DCs isolées des ganglions lymphatiques, drainant le site de l'infection par le VHS, peuvent stimuler efficacement les réponses des lymphocytes T spécifiques au virus (324-326). Par toutes leurs activités, les DCs

sont au centre de la coordination des réponses immunitaires innées et adaptatives aux infections primaires à VHS. (Figure 20)

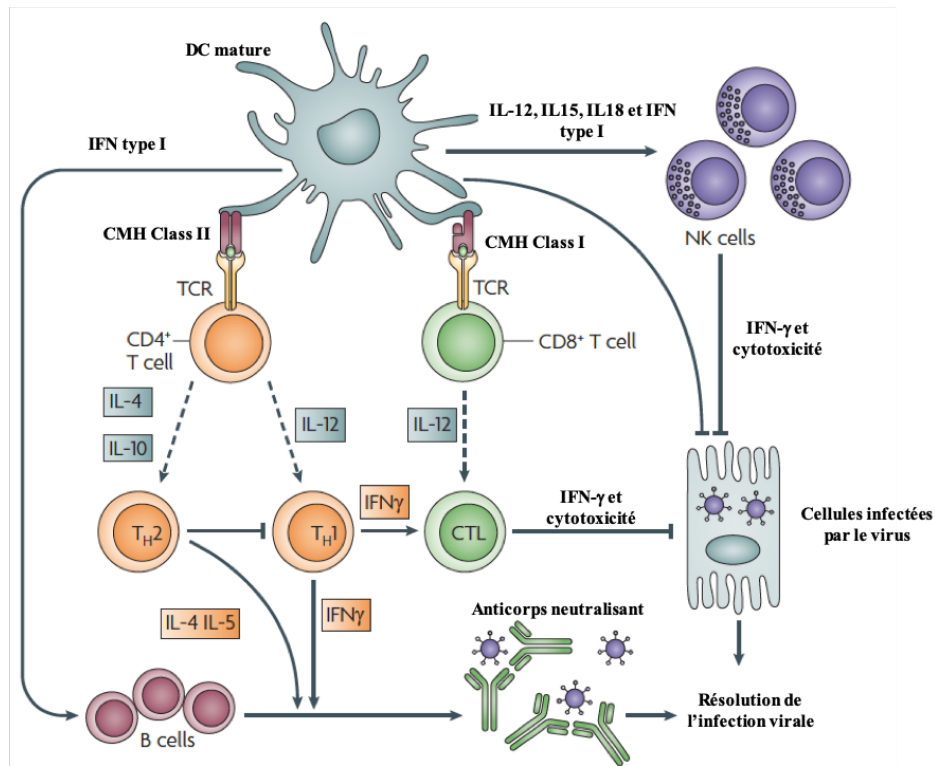


Figure 20 : Actions des cellules dendritiques au cours de la réponse immunitaire.

Adapté de (327) : À la suite de l'absorption de l'antigène viral, les sous-ensembles de DCs myéloïdes et plasmacytoïdes (mDC, pDC) migrent vers le tissu lymphoïde pour amorcer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naifs. De plus, les DCs activées produisent une gamme de cytokines, telles que IFN- α , IL-12 et IL-15, qui activent à leur tour les cellules NKs et influencent la survie et la différenciation des cellules T. En fonction du signal de cytokine, les cellules T CD4⁺ se différencient en cellules T CD4⁺ de type Th1 ou Th2. La sécrétion d'IFN- γ à médiation Th1 stimule l'activation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) et la production d'IgG par les cellules B. La production de cytokines par les Th2 agit sur les cellules B pour simuler la production d'IgG, mais a également la capacité d'inhiber l'activation des cellules T de type Th1. Les anticorps spécifiques du virus peuvent neutraliser et prévenir la réinfection virale. Les cellules NKs et les CTLs inhibent la réplication virale par la sécrétion d'IFN- γ ou la lyse de cellules infectées par le virus par la libération de molécules cytotoxiques (perforine, granzymes). De plus, les pDCs se caractérisent par leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à de nombreux virus et, par conséquent, à produire une première vague importante d'IFN- α , qui non seulement inhibe la réplication virale, mais constitue également un puissant activateur pour la cytotoxicité menée par les NKs.

Il est maintenant bien établi que les cellules dendritiques sont constituées de plusieurs sous-groupes dont le phénotype et la fonction diffèrent (328, 329). Les organes non lymphoïdes contiennent au moins deux types de DCs conventionnelles (cDCs) caractérisés par l'expression de CD11b ou de CD103 (330, 331). Ces cDCs sont dans les tissus périphériques non lymphoïdes et ont la capacité de quitter le tissu d'origine, de pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques et de migrer vers les ganglions lymphatiques locaux. Ces DCs sont souvent appelées DCs migratoires. Mis à part les DCs migratoires, les organes lymphoïdes contiennent également une population distincte de DCs résidentes localement. Le sous-ensemble CD11b^{low} contient des DCs CD8- α chez les souris et chez les humains (332). Seules les DCs migratoires collectent des antigènes dans les tissus non lymphoïdes. Les DCs résidentes ont accès aux antigènes présents dans le tissu lymphoïde particulier qu'elles occupent. Les DC plasmacytoïdes diffèrent sensiblement des DCs migratoires et résidentes. En plus des cDCs et pDCs, l'inflammation peut également conduire à la différenciation *in situ* des monocytes CCR2⁺ Ly6C^{hi} en DCs inflammatoires ou dérivées de monocytes (moDCs) à la fois dans la périphérie et les organes lymphoïdes (333) (Figure 21).

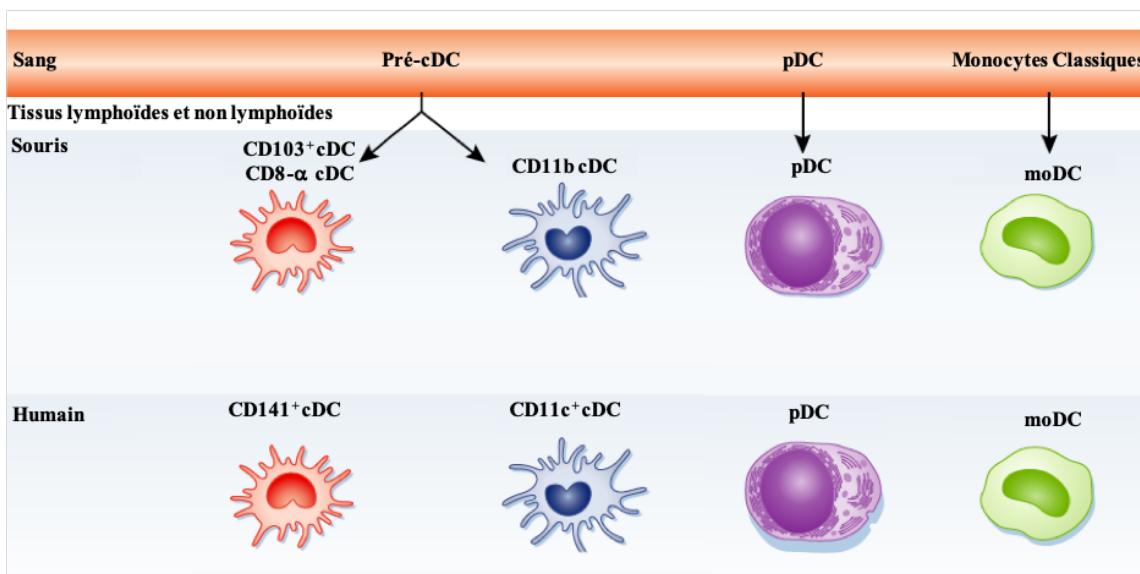


Figure 21 : Les différents sous-types de cellules dendritiques

Adapté de (334) : Les sous-ensembles de DC chez l'homme et la souris peuvent être alignés en quatre sous-ensembles principaux, quelle que soit leur localisation dans les tissus lymphoïdes secondaires ou dans le parenchyme d'organes non lymphoïdes. Ils correspondent aux CD103⁺/CD8- α cDCs, CD11b⁺ cDCs, pDCs et moDCs.

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'immunité adaptative cellulaire de l'hôte contre de nombreux agents pathogènes intracellulaires dont les virus (335). Les cytokines produites par les DCs vont permettre la différenciation des lymphocytes T CD4 immature (Th0) en lymphocytes Th1 et Th2. Lors d'une infection, les cellules T CD4 sont les premières à infiltrer le site de lésions, suivies par les cellules T CD8 permettant ainsi l'élimination du virus. La réponse cellulaire débute quand une cellule CD4 reconnaît un CMH-II sur une CPA. À la suite de cette reconnaissance, les cellules CD4 Th1 vont synthétiser des cytokines comme le TNF, l'IFN- γ , l'IL-2 et l'IL-12 qui à leur tour vont activer plusieurs cellules comprenant les cellules T CD8. Les cellules T CD8 naïves peuvent se différencier en CTLs (Tc)1, Tc2 ou Tc17 (336, 337). Au cours de l'infection virale, la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8 est divisée en trois phases caractéristiques : l'activation initiale et l'expansion, une phase de contraction et l'établissement et le maintien de la mémoire (338). Au cours de la phase aiguë de l'infection virale chez l'homme, les réponses immunitaires robustes des cellules T CD8 ont également été observées (339). Lors d'une stimulation antigénique, les expressions des granzymes et de la perforine sont régulées à la hausse par les lymphocytes T CD8, puis ces cellules deviennent cytolytiques et acquièrent la capacité d'entrer dans les tissus non lymphoïdes (338, 340, 341). Les lymphocytes T CD8 secrètent également l'IFN- γ en réponse à l'infection virale. L'IFN- γ favorise la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8. En effet, la présence de cette cytokine permet un meilleur chargement des peptides viraux dans le CMH-I, ce qui soutient la réponse immunitaire par une présentation antigénique plus robuste et inhibe l'infection virale (342). Ces lymphocytes T CD8 sont fortement engagés dans la réponse immunitaire adaptative lors d'infection au VHS-1 (343). Cependant, la résistance naturelle des souris C57BL/6 lors de l'HSE serait le résultat d'une redondance du système immunitaire. C'est-à-dire que la déplétion d'une seule population immunitaire ne permet pas la dissémination du virus dans le SNC (308). Cependant, la participation des lymphocytes T CD8 producteurs d'IFN- γ au niveau du SNC serait essentielle dans la réponse immunitaire lors de l'HSE (282).

De plus, les cellules T sont les principaux fournisseurs d'aide pour le développement d'anticorps par les lymphocytes B. Les lymphocytes B sont les cellules sécrétrices d'anticorps neutralisants, participant à l'immunité adaptative humorale. L'infection par le VHS conduit à une forte production d'anticorps qui sont principalement dirigés contre les glycoprotéines de surface. En effet, les premiers anticorps synthétisés après l'infection sont dirigés contre les protéines gB, gC, gD, gE, gG-1, gG2, IPC4 et des protéines de structures (344). Les premiers anticorps synthétisés sont des IgM suivis par des IgG et des IgA. Les IgG vont être présents chez l'hôte à vie. Cette présence d'anticorps peut servir à des fins diagnostiques, permettant même de faire la différence entre le VHS-1 et le VHS-2. La réponse humorale par les lymphocytes B peut être supportée par les lymphocytes Th2 qui synthétisent des cytokines, dont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Le rôle des lymphocytes B dans l'immunité anti-VHS est encore controversé. Une meilleure compréhension de leur rôle est nécessaire (345).

III.5 La neuroinflammation

La réponse inflammatoire aiguë est généralement bénéfique pour neutraliser les menaces potentielles pour le système nerveux central en minimisant les dommages cellulaires (346). Cependant, une réponse neuroinflammatoire de longue durée peut être préjudiciable et conduire à une lésion neuronale et à une neurodégénérescence via une accumulation soutenue de médiateurs neurotoxiques pro-inflammatoires. Lorsque l'inflammation aiguë ne produit pas de résolution et de réparation et ne cesse pas ensuite dans un laps de temps relativement court, l'inflammation devient chronique et souvent pathologique (347). La réponse inflammatoire réparatrice, autrefois protectrice, entre dans un cycle destructeur qui perpétue les dommages provoqués par le déclencheur initial. Le terme neuroinflammation désigne généralement une inflammation chronique du SNC. Les microglies sont les premières cellules à participer à la neuroinflammation. Le dérèglement ou la suractivation de la microglie et l'inflammation chronique prolongée et non résolue qui en résulte ont des conséquences neurotoxiques pouvant entraîner la mort des neurones et des cellules gliales. L'accumulation de microglies activées, connue sous le nom de microgliose (348), résulte soit d'une suractivation directe due à des stimuli neurotoxiques, soit d'une réaction à des lésions neuronales. (Figure 22)

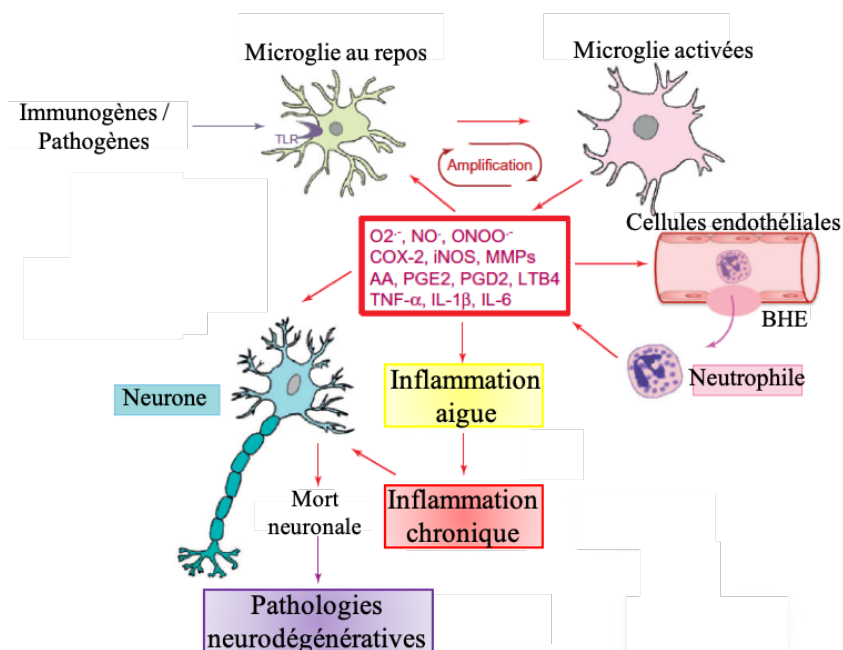


Figure 22 : Activation de la microglie dans la neuroinflammation et la neurodégénérescence

Adapté de (94) : Les microglies au repos sont activées lors de l'exposition à une variété de stimuli du SNC. Lors de l'activation, la microglie déclenche la libération de médiateurs pro-inflammatoires. À la suite de la libération de médiateurs pro-inflammatoires, ce processus est rapidement amplifié via l'activation

supplémentaire des microglies, entraînant une réponse inflammatoire aiguë pouvant être bénéfique pour le SNC. La réponse inflammatoire prolongée et non résolue conduit à une inflammation chronique destructrice (neuroinflammation) entraînant la mort neuronale.

Par ailleurs, il existe un rôle discutable des monocytes au cours de la neuroinflammation. En effet, dans plusieurs modèles de maladie du SNC, les monocytes inflammatoires Ly6C^{hi} provoquent des dommages et une destruction importante dans le cerveau, contribuant directement à la morbidité et à la mortalité. Dans le cas des maladies encéphaliques, des études menées utilisant le « *West Nile virus* » (WNV) ainsi que d'autres utilisant le « *Theilers's encephalomyelitis virus* » (TMEV) ont montré que les monocytes Ly6C^{hi} sont recrutés dans le cerveau infecté où ils contribuent de manière significative à l'immunopathogénèse de la maladie. L'inhibition de la migration des monocytes inflammatoires dans le cerveau infecté par le WNV ou le TMEV peut réduire considérablement la morbidité et la mortalité (349, 350), alors qu'un défaut de recrutement des monocytes inflammatoires, amené par la déficience hématopoïétique en CCR2, est responsable d'une mortalité accrue lors de l'encéphalite herpétique expérimentale (351). Cependant, l'abrogation de la migration des monocytes dans le système nerveux central au cours de l'encéphalite au « *mouse hepatitis virus* » (MHV) entraîne l'apparition tardive de la maladie démyélinisante (352). Les voies précises par lesquelles les monocytes inflammatoires contribuent à la pathologie font encore l'objet de recherches approfondies.

D'autre part, le TNF est cytotoxique et entraîne la démyélinisation des oligodendrocytes (353). La surexpression de l'IL-6 chez les souris transgéniques entraîne une augmentation de la maladie neurologique en corrélation avec le niveau de cette cytokine (354). De plus, l'infection par le VHS-1 entraîne une régulation à la hausse des ROS (355), de l'oxyde nitrique synthase induite (iNOS) et de l'hème oxygénase, causant ainsi des dommages oxydatifs au tissu cérébral (356). Cependant, il est clair que la différenciation en cellules effectrices telles que les macrophages et les DCs joue un rôle important. Une fois différenciées, ces cellules sont des productrices importantes d'oxyde nitrique (NO), de MMPs et d'autres facteurs connus pour aboutir à la destruction tissulaire, à la dégradation de la BHE et aux dommages neuronaux. Par ailleurs, le dérèglement des cytokines et des chimiokines est un élément central du développement de la neuroinflammation, de la neurodégénérescence et de la démyélinisation dans le système nerveux central et périphérique (Figure 23).

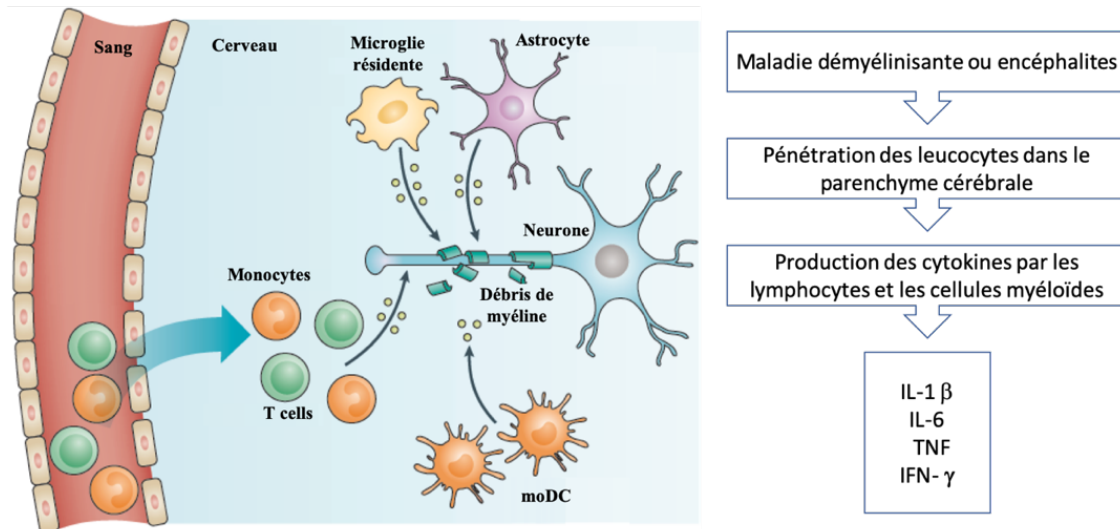


Figure 23 : Processus neuroinflammatoires.

Adapté de (357) : Les affections neuro-inflammatoires classiquement définies, telles que celles observées dans les maladies démyélinisantes inflammatoires (par exemple, la sclérose en plaques) et les infections (encéphalite bactérienne et virale) sont caractérisées par une invasion des leucocytes par le parenchyme du système nerveux central et une perte importante d'intégrité de la barrière hématoencéphalique. Ici, les lymphocytes et les cellules myéloïdes sont les principaux médiateurs des lésions tissulaires et délivrent des cytokines au tissu, alimentant ainsi la cascade inflammatoire. L'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'IL-6 peuvent être détectées par toutes les cellules du système nerveux central inflammé et jouent un rôle central dans le processus inflammatoire.

IV Nouvelles approches thérapeutiques

IV.1 Les vaccins préventifs et thérapeutiques

La vaccination reste la méthode idéale pour la prévention des maladies virales. Cependant, la prévention des infections causées par le VHS pose des défis uniques en raison des récurrences de la maladie en présence de réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire. Néanmoins, une protection contre une maladie potentiellement mortelle peut être obtenue dans des modèles animaux avec des vaccins glycoprotéiques avirulents, inactivés ou sous-unitaires. De nombreuses stratégies ont été mises en place pour trouver un vaccin candidat : (a) virus inactivé ou tué (b) vaccins sous-unitaires (c) vaccins vivants (d) les virus recombinants et (e) les « *virus like particles* » (VLP) (358).

Les premiers vaccins inactivés ont été fabriqués à partir de tissus provenant d'animaux infectés et traités au phénol. En raison du risque de démyélinisation associé à l'administration de protéines d'animaux, ces vaccins ont été peu étudiés (1). L'utilisation de virus purifié inactivé a permis de mettre en évidence que malgré des inoculations répétées, les titres d'anticorps restent inchangés chez la plupart des patients ou ont seulement montré de légères augmentations. Il existe plusieurs vaccins vivants atténués ou présentant des défauts de réplication. Un vaccin contre le VHS-2 (HSV529) déficient pour la réplication est entré dans les essais de phase I pour des indications à la fois préventives et thérapeutiques. Un virus vivant atténué pour gD2 a prévenu des maladies cutanées, neuronales et vaginales chez la souris, et constitue également la première construction vaccinale permettant d'éliminer la latence dans les ganglions de la racine dorsale (359). Plus récemment, un virus VHS-1 KOS-NA présentant des mutations pour ICP6 a été identifié et montre une neuro-atténuation significative. Le virus KOS-NA pourrait être le fondement d'un vaccin prophylactique efficace pour prévenir ou limiter les maladies oculaires dues au VHS-1 (360). Par ailleurs, la construction d'un vaccin à ADN avec une délétion complète du gène *UL18* du génome du VHS-1 pouvant induire une réponse immunitaire efficace a été réalisée (361). D'autre part, GEN-003 est un nouveau vaccin thérapeutique composé d'un mutant transmembranaire par délétion de la glycoprotéine D, d'un grand fragment d'ICP4.2 et de la protéine matricielle-M2, avec un adjuvant dérivé de saponine (Novavax, Gaithersburg, MD). Un essai clinique avec ce vaccin a démontré que la réduction de l'excrétion virale du VHS-2 et du taux de lésion est durable pendant 12 mois sans aucun effet indésirable grave notable (362).

L'immunogénicité des glycoprotéines gD et gB de l'enveloppe a été démontrée chez les animaux. Cependant, la prédictivité de ces modèles pour les études humaines est décevante. L'essai clinique le plus important d'un vaccin sous-unitaire contre le VHS, Herpevac, utilisant de la glycoprotéine D-2 (gD2) n'a pas montré d'efficacité contre la maladie à VHS-2. Cependant, le vaccin prévient l'infection génitale à VHS-1 (efficacité du vaccin = 58 %) (363). Les vaccins préventifs de deuxième génération peuvent avoir besoin de stimuler des titres d'anticorps neutralisants plus élevés ou d'induire d'autres réponses immunitaires pour une protection plus complète contre le VHS-1 ou le VHS-2. De plus, le nombre d'épitopes reconnus par le sérum immun de cobaye est en corrélation avec la protection contre les lésions génitales. Par ailleurs, en faisant une étude rétrospective de l'essai clinique de phase II Herpevac, les auteurs montrent que les humains produisent des anticorps qui bloquent significativement moins d'épitopes cruciaux de la glycoprotéine gD2 que les cobayes, et que les réponses en anticorps pour certains épitopes linéaires sont pratiquement absentes (359).

Pendant des décennies, les vaccins à virus vivants ont été considérés comme les plus susceptibles de fournir un niveau de protection élevé, comme c'est le cas pour la rougeole, les oreillons et la rubéole. Ces vaccins nécessitent habituellement de plus petites quantités d'antigènes et, par conséquent, sont plus économiques. Plusieurs approches de vaccins à virus vivant ont été tentées, y compris des mutants du VHS,

des virus herpès hétérologues, des antigènes exprimés dans des vecteurs viraux non VHS et des virus génétiquement modifiés.

La technologie actuelle permet la construction de VHS recombinants comme vaccins prototypes. Ces vaccins ont été conçus pour être atténués afin de ne pas provoquer de maladie primaire ou ne pas réactiver et être capable de protéger contre la maladie causée par le VHS-1 ou le VHS-2. Une hypothèse actuelle propose qu'un vaccin induisant une réplication vigoureuse d'un agent pathogène puisse être critique pour déclencher la réponse immunitaire la plus puissante et la plus équilibrée possible. Par conséquent, il convient d'éviter toute atténuation/inactivation (comme dans les vaccins conventionnels). Au lieu de cela, la sécurité nécessaire est assurée en plaçant la réplication de l'agent pathogène sous un contrôle rigoureux et en activant une réplication limitée dans le temps de l'agent pathogène strictement dans une région d'administration dans laquelle la pathologie ne peut pas se développer (364). Par ailleurs, des résultats indiquent que l'inclusion du peptide TpD auxiliaire de cellules T CD4 dans le vaccin sous-unitaire gD de VHS-2 peut induire une immunité protectrice à long terme, fournissant des informations pour une conception rationnelle de vaccins contre les VHS (365).

Enfin, d'autres stratégies vaccinales telles que des préparations à base de VLPs et des lipopeptides sont prometteuses, mais peu d'entre elles ont été approuvées pour un usage chez l'humain (358, 366).

À mesure que l'épidémiologie de l'herpès génital évolue, il est reconnu que les candidats vaccins doivent inclure des épitopes immunodominants de cellules T, à réactivité croisée VHS-1/-2, ainsi que des épitopes d'anticorps neutralisants pour les deux types. Une connaissance accrue des voies naturelles de l'immunité innée et adaptative à l'herpès primaire permettra d'éclairer les principales exigences à respecter dans un vaccin. En particulier, il est nécessaire de définir les sous-ensembles de DCs spécifiques à cibler (de la peau et/ou des muqueuses) afin de stimuler les réponses effectrices appropriées, y compris les lymphocytes T CD8 cutanés/muqueux en plus des lymphocytes T CD4 et des anticorps neutralisants (lymphocytes B). En outre, il est nécessaire de définir des adjuvants qui activent spécifiquement ces DCs afin d'optimiser ces réponses. Enfin, le recrutement et l'activation d'autres cellules innées critiques, telles que les cellules NKs, doivent également être pris en compte lors de la sélection des adjuvants (366).

IV.2 Les nouveaux composés ayant une activité antivirale

En l'absence de vaccins préventifs efficaces, et avec l'augmentation des souches de VHS résistantes aux antiviraux, il existe un besoin critique de développer de nouveaux traitements anti-herpétiques. Au cours des dernières années, de nombreux composés ont été étudiés.

IV.2.1 Les nouveaux composés antiviraux

L'aménamevir (ou ASP2151), initialement découvert et développé par Astellas, est un inhibiteur du complexe hélicase-primase contenant de l'oxadiazolylphényle ayant une activité à la fois contre le VHS et le virus varicelle-zona (VVZ). Dans une étude de phase II, l'efficacité de l'aménamevir était comparable à celle du valacyclovir administré, le délai de guérison des lésions ayant été réduit d'un à deux jours (367). Les résultats indésirables d'un essai clinique ont conduit Astellas à suspendre le développement, mais le développement clinique a été repris entre-temps par Maruho Co., Ltd. au Japon chez des patients présentant des lésions orofaciales ou génitales multiples (étude de phase III). Cette étude est complétée, mais les résultats ne semblent pas disponibles (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02209324>). Par ailleurs, Maruho Co., Ltd. a également réalisé une étude clinique de phase III chez des patients présentant un zona. Cette étude révèle une efficacité de l'aménamevir identique à celle du VACV ainsi qu'une bonne tolérance de la molécule (368). Il est actuellement commercialisé au Japon sous forme de comprimés oraux.

Le pritélivir (PTV [BAY57-1293]) a été découvert par Bayer et est actuellement en développement clinique par AiCuris. Il a démontré une activité supérieure à l'ACV dans un modèle d'infection disséminée chez la souris et le rat (369-371), d'herpès génital chez le cochon d'Inde (372) et d'infection oculaire chez le lapin et la souris (373). De plus, deux études de phase II ont été réalisées. Ces études montrent une réduction de l'excrétion virale de 90 % et de la durée des lésions herpétiques (374) ainsi qu'une meilleure efficacité que le VACV pour diminuer le taux d'excrétion du virus et le taux de lésions herpétiques (375, 376). Par ailleurs, une étude récente a révélé un effet antiviral du PTV lors de l'encéphalite herpétique expérimentale chez la souris. Dans cette étude, le PTV a démontré une activité antivirale *in vivo* contre le VHS-1, y compris les souches résistantes à l'ACV, lorsque le traitement était retardé de 72 h après l'inoculation virale (377).

Par ailleurs, une étude présente le SC93305 en tant que nouvelle substance antivirale puissante, très efficace non seulement contre différentes souches de VHS-1, mais également contre des souches multirésistantes de VHS-1. Le SC93305 présente une activité antivirale sans interférer avec l'activation de cellules immunitaires spécifiques. L'étude rapporte que le SC93305 n'affecte pas la fonction biologique des cellules dendritiques pour induire des réponses immunitaires antivirales ni la stimulation des cellules T et la libération de cytokines inflammatoires (378).

IV.2.2 Les molécules dérivées de plantes

Depuis plusieurs années, de nombreuses études analysent la possibilité de créer de nouveaux médicaments antiviraux à partir de plantes médicinales présentant un potentiel élevé pour le traitement des

infections herpétiques. Les essences végétales et leurs huiles sont utilisées en médecine traditionnelle et possèdent de nombreuses molécules telles que phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, stéroïdes, glycosides et tanins, qui peuvent être utilisées pour le traitement de maladies infectieuses. Par exemple, le thé noir qui est dérivé des feuilles de *Camellia sinensis*, est riche en polyphénols de théaflavine, en particulier la théaflavine (TF) 1, le théaflavine-3-monogallate (TF2A), la théaflavine-30-monogallate (TF2B) et la théaflavine-3,30 digallates (TF3). Ces théaflavines présentent un effet anti-VHS-1 dépendant de la dose (379). Par ailleurs, des extraits ou des huiles essentielles de *E. caesia* (380), *R. officinalis* (381), *A. arborescens* (382), *Chamaecyparis obtusa* (383), *Tripterygium hypoglaucum* (384), *Z. multiflora*, *A. kermanensis* et *S. hotensis L* (385) ont montré *in vitro* une activité antivirale contre VHS-1 et/ou -2. De plus, les proanthocyanidines de type A purifiées (PACs-A) contenues dans un extrait de canneberge (Oximacro®) ont la capacité d'inhiber la réplication *in vitro* du VHS-1 en empêchant l'adsorption du VHS-1 sur les cellules cibles. D'autre part, une étude a démontré que le PHA76749 (1,5,6,7-Tetrahydro-2-(4-pyridinyl)-4H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-4-one hydrochloride), rapporté comme un médicament antitumoral, bloque efficacement la réplication virale du VHS-1. Ainsi, PHA767491 pourrait être un agent prometteur pour le développement d'un nouveau traitement anti-VHS (386).

IV.3 Les stratégies immunomodulatrices

Une réponse immunitaire saine avec une expression et une résolution optimale du processus inflammatoire est une clé de voûte pour une bonne santé, mais un système immunitaire constamment actif avec une inflammation chronique peut entraîner de nombreuses affections problématiques nécessitant des interventions thérapeutiques (387).

L'IFN- β possède un large spectre antiviral et est nécessaire pour contrôler une infection par l'un des VHS. L'IFN- β , en combinaison avec l'ACV, exerce un effet inhibiteur synergique sur l'infection au VHS-1 (388, 389), de manière dépendante des lymphocytes T (390). Cependant, des études cliniques doivent être réalisées afin de déterminer les modalités de combinaison de traitements (jour d'administration de l'IFN- β , dose).

Plusieurs agonistes synthétiques de différents TLRs ont été testés chez l'humain et ont été très bien tolérés (391, 392). La modulation de la réponse immunitaire par les agonistes ou les antagonistes des TLRs administrés avant ou après l'infection des souris, respectivement, améliore l'évolution de l'encéphalite herpétique (128, 140).

Parmi les molécules inflammatoires ayant un rôle néfaste potentiel au cours de l'infection à VHS, l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF, le NO et les ROS ont été les plus rapportés *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs études ont donc analysé l'action d'inhibiteurs, notamment des inhibiteurs d'iNOS et de TNF (393-395). Parmi celles-ci, la N-nitro-L-

arginine (L-NA) (394), la S-Methyl-Isothiouré (SMT) (395) et plusieurs molécules anti-TNF (396, 397) ont un effet anti-inflammatoire bénéfique au cours de l'infection au VHS. Bien que ces molécules montrent un potentiel certain sur le traitement des infections au VHS, l'administration doit se faire avec précaution. En effet, plusieurs cas d'infection du SNC à VHS ont été rapportés chez des patients traités par des anti-inflammatoires et la moitié présentait une HSE (398, 399).

IV.3.1 Les dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine est une substance active extraite de la plante « *Artemisia annua L.* » dont la vertu médicinale est connue en Chine depuis plus de 2 000 ans. Il s'agit d'une lactone sesquiterpénique portant un groupe peroxyde responsable de son efficacité thérapeutique. Afin d'améliorer la solubilité et les propriétés pharmacocinétiques de l'artémisinine, une large gamme d'artémisines semi-synthétiques et synthétiques a été développée (l'artéether, la dihydroartémisinine, l'acide artélinique et l'artésunate [ART]) (400). Ces études représentent une percée dans la découverte de l'artémisinine (401) qui a valu au Dre Youyou Tu, le prix Nobel de Médecine en 2015.

Des données suggèrent que les artémisines peuvent également moduler différents éléments du système immunitaire (402). Il a été montré des effets immunomodulateurs des artémisines sur les cellules immunitaires, y compris les neutrophiles (403), les macrophages (404), les lymphocytes T (405, 406) et les lymphocytes B (407). Par ailleurs, il a été rapporté que l'artémisinine inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL-6 d'une manière dose-dépendante. Ces effets sont probablement liés au blocage de l'activation de NF- κ B par l'artémisinine (408-413). D'autres études ont démontré que l'artésunate exerce une activité immunomodulatrice en modulant les voies des TLR2 et TLR9 dans des modèles murins d'infections bactériennes (414, 415). L'artésunate a également montré un fort potentiel anti-inflammatoire en diminuant de manière dose-dépendante la production d'IL-1 β , IL-6 et IL-8 dans des fibroblastes isolés de patients atteints d'arthrite rhumatoïde comme les synoviocytes stimulées par le TNF. L'artésunate permet également le blocage de NF- κ B et l'inhibition de la voie de signalisation « *phosphoinositide 3-kinase* »/« *protein kinase B* » (PI3K/Akt) (416).

Par ailleurs, l'artésunate a également été rapporté comme étant efficace contre les infections multirésistantes causées par le VHS-2 chez des receveurs de cellules souches hématopoïétiques (417).

IV.3.2 La rapamycine

La rapamycine (RAPA) a été découverte en 1964. Elle a été isolée à partir d'échantillons de plantes provenant de l'île de Pâques. Son nom lui a été donné en référence au nom indigène de l'île de Pâque : « *Rapa*

Nui ». Elle a été utilisée comme antifongique, mais étant donné ses caractéristiques immunosuppressives, elle a été mise de côté. C'est en 1987 que la rapamycine a de nouveau été étudiée. En effet, elle possède une composition chimique similaire à celle du tacrolimus, qui avec la cyclosporine, est à l'origine d'une innovation dans le domaine de la transplantation d'organes. La rapamycine a ensuite été commercialisée en 1999 sous le nom de Rapamune® (sirolimus). La rapamycine pourrait agir sur les voies de signalisation dépendante de « *mammalian TOR* » (mTOR). L'ARNm de mTOR est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des types cellulaires et des tissus. MTOR est le centre catalytique de deux complexes protéiques nommés « *mammalian target of rapamycin complex* » (mTORC) 1 et mTORC2 (418).

La rapamycine peut bloquer la sécrétion d'IFN- α en réponse à la stimulation par les ligands de TLR4, TLR7 et TLR9, mais pas en réponse à la stimulation de TLR3 (419). Par ailleurs, l'équipe de Zhao a montré que la rapamycine peut moduler la voie de signalisation cellulaire passant par TLR3 (420). Dans cette étude, les auteurs montrent que la signalisation via mTOR est indispensable et joue un rôle important dans la modulation de la réponse stimulée par le TLR3 par des mécanismes directs et indirects (Figure 20).

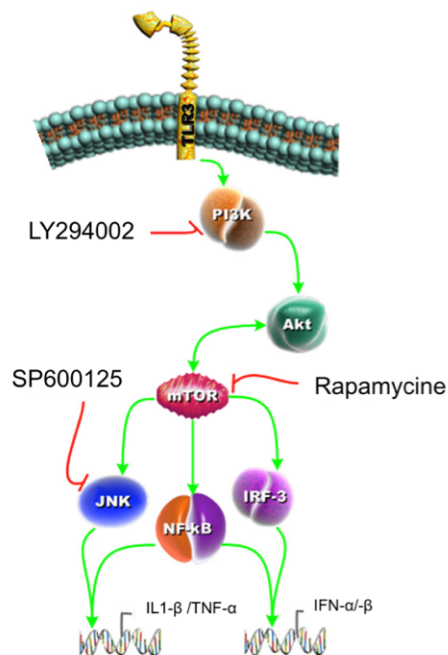


Figure 24 : La régulation de la voie mTOR activée par TLR3

Adapté de (420). La stimulation du TLR3 par le poly (I : C) conduit à l'activation de PI3K. L'activation de PI3K par le TLR3 recrute Akt. L'Akt est ensuite activé par phosphorylation de la Ser473 par la PI3K. La PI3K/Akt activée phosphoryle la Ser2448 de mTOR. mTOR phosphorylé contrôle l'activation de JNK sur la thréonine183/tyrosine185 et NF- κ B via I κ B α pour induire des cytokines pro-inflammatoires et la

phosphorylation de la Ser396 de IRF3 pour induire la production de l'IFN- β dans les kératinocytes. La rapamycine inhibe l'activité de mTor.

D'autre part, la rapamycine agit en inhibant l'expansion clonale des lymphocytes T stimulés par les cytokines (Figure 21) (421, 422). Dans des modèles murins de kératite herpétique, la rapamycine réduit la gravité des lésions en diminuant la réponse inflammatoire (423).

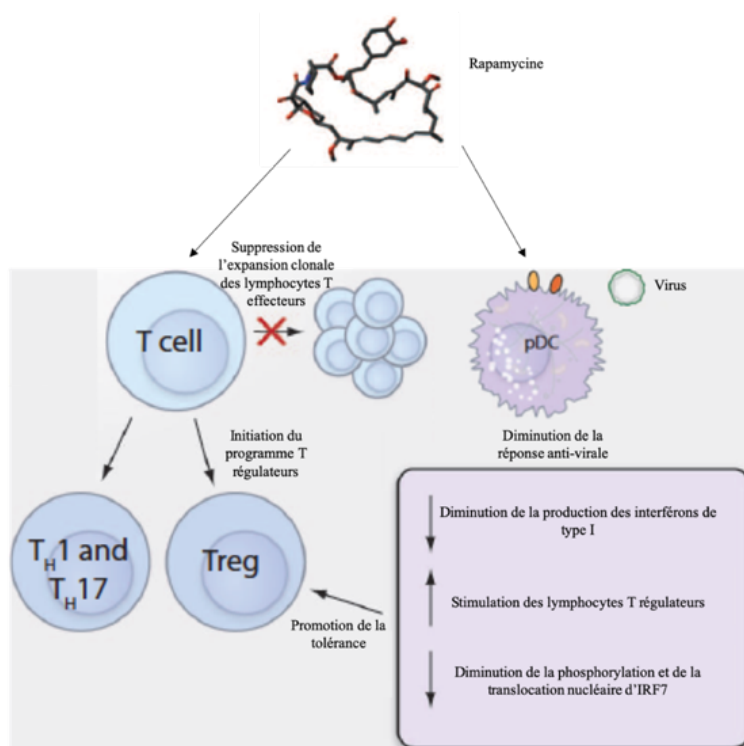


Figure 25 : Effet de la rapamycine sur les lymphocytes T et les pDCs

Adapté de (421) : La rapamycine permet la suppression de l'expansion clonale des lymphocytes T effecteurs, la différenciation des lymphocytes T régulateurs. Elle permet également la diminution de la réponse antivirale par les pDCs, notamment par la diminution de la production des interférons de type I, et la diminution de la phosphorylation et la translocation nucléaire d'IRF7.

V Hypothèse et Objectifs de recherche

V.1 Hypothèse et Objectifs

Malgré un traitement antiviral puissant, l'issue clinique de l'HSE reste médiocre (47). En effet, l'encéphalite herpétique cause des symptômes sévères et laisse des séquelles neurologiques permanentes chez une grande partie des patients atteints (47, 424). La réponse immunitaire cérébrale qui se développe au cours de l'encéphalite herpétique est importante pour la survie ainsi que pour le contrôle de la réplication virale. D'autre part, des études réalisées autant chez des modèles animaux que chez l'humain suggèrent qu'une neuroinflammation délétère participerait aux dommages cérébraux en plus de ceux causés par la réplication du virus (54, 283, 425).

La réponse immunitaire à la suite de l'infection du SNC par les VHS-1 est activée par les microglies qui sont la première ligne de défense. Ces cellules exercent des fonctions phagocytaires et produisent des médiateurs inflammatoires tels que CCL2, TNF, CCL5, IL-1 β , IL-6 et les IFNs de type I (426). Une réponse interféron de type I rapide a été révélé dans la résistance naturelle des souris C57BL/6 à l'HSE (436). À cet égard, la déficience dans la réponse IFN amène une susceptibilité accrue à l'HSE aussi bien chez l'homme que chez les souris (437). La réponse interféron de type I est mise en place lors de la reconnaissance du virus par différents PRRs. La détection du VHS-1 par ces PRRs déclenche des voies de signalisation et l'activation des facteurs de transcription comme NK- κ B et plusieurs membres de la famille des IRF tels que IRF3, IRF7 (438). L'activation de ces facteurs de transcription permet la production de cytokines pro-inflammatoires et des interférons de type I (439). D'autres parts, en réponse à l'infection virale, l'infiltration des leucocytes périphériques dans le SNC est considérée comme la signature d'une inflammation cérébrale, comme c'est le cas au cours de l'HSE. L'infiltration de ces cellules peut avoir un effet protecteur en contrôlant l'infection virale. Au contraire, une infiltration non contrôlée de cellules immunitaires périphériques pourrait participer aux dommages cérébraux et aggraver la pathologie, comme cela a été suggéré dans plusieurs cas de maladies reliées à des troubles neurologiques (356, 427). Les connaissances accumulées sur la réponse immunitaire cérébrale innée au cours de l'HSE ont été acquises par l'utilisation de différents modèles murins. Depuis le premier indice, en 1975, d'une différence de susceptibilité à l'infection par le VHS-1 chez différentes souches de souris, de nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier les facteurs participants à cette différence (428). La grande majorité de ces études ont été réalisées chez les souris C57BL/6 résistantes à l'infection. La résistance naturelle des C57BL/6 inclue de multiples loci en relation avec les cellules NKs (283, 429-431). Cependant, d'autres cellules immunitaires comme les DCs, les macrophages, les lymphocytes T et les lymphocytes B sont importantes lors de la réponse contre le VHS-1 (425, 432, 433). D'un autre côté, des études chez les souris BALB/c ont montré une sensibilité accrue à l'infection par le VHS-1 (283). Bien que cela ne soit

pas complètement démontré, il est proposé que l'infiltration de cellules immunitaires périphériques soit délétère et exacerbe la maladie chez les souris BALB/c (68, 283, 434, 435).

La réponse immunitaire cérébrale innée aurait donc des effets contradictoires au cours de l'encéphalite herpétique. D'un côté, il est essentiel de contrôler la réplication et la dissémination du VHS dans le SNC au début de l'infection, notamment par la réponse interféron. Mais de l'autre, la réponse immunitaire cérébrale innée pourrait également entraîner une réponse neuroinflammatoire chronique pouvant devenir préjudiciable.

La neuroinflammation semble être une composante importante de l'encéphalite herpétique. En effet, les patients atteints d'une HSE ont un taux élevé de cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans le LCR à différents stades de la maladie (55). Par ailleurs, dans certains cas d'HSE, il y a une déviation de la ligne médiale secondaire à un œdème cérébral, relié à une forte inflammation. Dans ces cas-là, des anti-inflammatoires sont administrés en complément de la thérapie antivirale. À cet égard, une corticothérapie adjuvante est suggérée comme permettant une amélioration du pronostic de la maladie (63, 64). De plus, des traitements combinés entre le VACV et des molécules anti-inflammatoires (glucocorticoïdes, anti-TNF) ont montré un effet bénéfique sur le pronostic de l'encéphalite herpétique expérimentale comparativement au traitement antiviral seul (68, 397). Par ailleurs, plusieurs études animales ont démontré le rôle très important de la réponse immunitaire innée développée au cours de l'encéphalite herpétique via les TLRs, notamment les TLR2, TLR3 et TLR9. En ce sens, nous avons démontré au laboratoire en utilisant un modèle d'infection par le VHS-1 chez les souris sensibles BALB/c, l'efficacité thérapeutique de l'administration retardée d'un antagoniste du TLR9 à la journée 3 post-infection permettant ainsi d'augmenter le taux de survie des souris (140) et indiquant que la réponse immunitaire cérébrale innée doit être contrôlée plus tardivement au cours de l'infection pour éviter tout excès d'inflammation qui pourrait exercer un impact négatif chez la souris sensible BALB/c.

Ces données marquent l'importance de développer des thérapies afin de moduler la réponse neuroinflammatoire qui se développe au cours de l'infection. Combiner un traitement immunomodulateur à des agents antiviraux serait une stratégie intéressante. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires participants au contrôle de la réplication virale et la neuroinflammation lors de l'encéphalite herpétique est nécessaire.

En dépit des connaissances accumulées sur la pathogenèse de l'encéphalite herpétique, des interrogations restent en suspens quant aux mécanismes par lesquels l'infection au SNC cause la mortalité. Est-ce que la réaction inflammatoire cérébrale serait exagérée et/ou incontrôlée et au cœur de la sensibilité à l'encéphalite herpétique ?

Ce projet de doctorat vise principalement à comprendre quelles sont les composantes de la réponse immunitaire cérébrale innée participantes au contrôle et à l'exacerbation de l'HSE expérimentale.

Mon hypothèse de travail est qu'en plus d'une réplication virale non contrôlée, une infiltration des cellules immunitaires périphériques inadéquate, un défaut de la réponse interféron, passant par l'activation des facteurs de transcription IRF3 ou IRF7, ainsi qu'une neuroinflammation délétère, induite par la reconnaissance du virus par les TLR2 et/ou TLR9, participeraient au mauvais pronostic de l'encéphalite herpétique expérimentale.

Afin de répondre à cette hypothèse, j'ai défini trois objectifs :

- Démontrer que, comparativement aux souris naturellement résistantes C57BL/6, la sensibilité des souris BALB/c est associée à une infiltration altérée des cellules immunitaires périphériques et à une neuroinflammation.
- Démontrer que la déficience en IRF3 ou en IRF7 engendre une sensibilité accrue des souris à l'infection intranasale par le VHS-1, associée à une altération de la production d'IFN de type I et à une neuroinflammation.
- Démontrer que la neuroinflammation ayant lieu au cours de l'HSE expérimentale peut être diminuée par l'ajout d'un traitement immunomodulateur, agissant sur les voies de signalisation passant par les TLR2 et/ou TLR9, à la thérapie antivirale.

Les résultats de ces trois objectifs de recherche sont présentés dans les chapitres I, II et III.

V.2 Aperçu des résultats et contribution scientifique.

Mes travaux de doctorat ont démontré un rôle très important de la cinétique de la réponse immunitaire cérébrale innée au cours de l'encéphalite herpétique. En effet, la résistance naturelle des souris C57BL/6 est associée non seulement à un contrôle de la réplication virale au sein du système nerveux, mais également à une réponse immunitaire rapide, soutenue et coordonnée. À cet égard, l'infiltration des monocytes inflammatoires, des cellules NK/NKT, des cDCs, et des pDCs a débuté très tôt après l'infection intranasale par le VHS-1. L'infiltration des monocytes inflammatoires a persisté au cours du temps et a été suivie par celle des lymphocytes T. Alors que chez les souris BALB/c, naturellement sensibles, en plus d'une réplication virale non contrôlée, l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le SNC est retardée, de courte durée et non coordonnée. En effet, seule l'infiltration des monocytes inflammatoires et des lymphocytes T a lieu au cours de l'HSE expérimentale chez ces souris et ce, uniquement au pic de l'infection soit au jour 6 post-infection. Par

ailleurs, la réponse inflammatoire résultante est beaucoup plus importante chez les souris BALB/c sensibles que chez les souris C57BL/6 résistantes.

De plus, les résultats obtenus grâce à l'utilisation des souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 ont conforté l'importance de la cinétique d'intervention dans la réponse immunitaire cérébrale innée au cours de l'HSE expérimentale. En effet, cette étude m'a permis de démontrer qu'IRF3 et plus particulièrement IRF7 joue un rôle important pour orchestrer une réponse immunitaire cérébrale innée efficace précocement au cours de l'HSE expérimental. En ce sens, la susceptibilité accrue des souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 est liée à des patrons de production des interférons de type I altérés (plus tardive) et une neuroinflammation excessive associée à une perte du contrôle de la réplication virale comparativement aux souris C57BL/6 sauvages.

Enfin, l'importance de bloquer la neuroinflammation excessive existante lors de l'HSE a été démontrée par l'ajout d'ART ou de la RAPA au traitement antiviral dans le modèle d'encéphalite herpétique murin, mimant les situations cliniques du traitement antiviral non optimal. En particulier, l'ajout d'ART (agissant sur les voies de signalisation en aval des TLR2 et TLR9) au traitement antiviral VACV permet une diminution de l'inflammation chronique, sans effet antiviral, et l'amélioration du pronostic des souris, comparativement aux souris BALB/c sensibles traitées avec l'antiviral seul.

Chapitre I : La cinétique d'infiltration de cellules immunitaires périphériques et la réponse inflammatoire engendrée au niveau du système nerveux central participant à la différence de pronostic de l'encéphalite herpétique entre les souris résistantes C57BL/6 et les souris sensibles BALB/c.

I Avant-propos

Ce chapitre correspond à l'article intitulé « *The Recruitment of Peripheral Blood Leukocytes to the Brain Is Delayed in Susceptible BALB/c Compared to Resistant C57BL/6 Mice during Herpes Simplex Virus Encephalitis* » publié en 2019 dans « *Journal of NeuroVirology* » (PMID: 30758810, DOI : 10.1007/s13365-019-00730-5). J'en suis la première auteure et l'article est présenté tel que publié. Dans le cadre de cet article, j'ai réalisé les expériences animales, les qPCR, l'évaluation des titres viraux, le dosage de l'IFN- β par ELISA et des autres cytokines et chimiokines par Luminex ainsi que les expériences de cytométrie en flux (FACS) que j'ai préalablement mises au point. J'ai également effectué l'analyse des résultats. Olus Uyar et Chantal Rhéaume m'ont supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Olus a également pris une grande part dans la mise au point et la réalisation des expériences de FACS. Quant aux Drs Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

II Résumé

L'impact de la souche génétique de la souris sur la réponse immunitaire cérébrale au cours de l'encéphalite herpétique a été évalué chez des souris sensibles BALB/c et résistantes C57BL/6 (symptomatiques et asymptomatiques). La charge virale, les titres infectieux, les taux de cytokines/chimiokines et l'infiltration des leucocytes périphériques ont été déterminés dans des homogénats cérébraux. La mortalité des souris BALB/c est supérieure à celles des animaux C57BL/6 et est associée à une charge virale, des titres infectieux ainsi que des taux de cytokines/chimiokines plus élevés par rapport aux animaux C57BL/6. D'autres parts, nos observations suggèrent qu'un recrutement rapide, soutenu et coordonné des leucocytes

périphériques dans le cerveau des souris C57BL/6 symptomatiques permet un contrôle efficace de la réplication virale et de la réponse inflammatoire. En revanche, l'infiltration retardée des cellules immunitaires chez les souris BALB/c est associée à une réponse inflammatoire exacerbée au cours de l'HSE.

III Article scientifique

Title Page

The Recruitment of Peripheral Blood Leukocytes to the Brain Is Delayed in Susceptible BALB/c Compared to Resistant C57BL/6 Mice during Herpes Simplex Virus Encephalitis

Coraline Canivet, Olus Uyar, Chantal Rhéaume, Jocelyne Piret and Guy Boivin*

Research Center in Infectious Diseases, CHU of Quebec and Laval University, 2705 Boul. Laurier, Quebec City, QC, Canada, G1V 4G2

*****, Corresponding author:

Dr. Guy Boivin
E-mail: Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca
Tel.: +1-418-654-2705
Fax: +1-418-654-2715

Keywords: Herpes simplex virus; encephalitis; cerebral inflammation; peripheral leukocyte infiltration; C57BL/6; BALB/c.

Abstract

The cerebral immune response induced by herpes simplex virus (HSV) encephalitis (HSE) was evaluated in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice. BALB/c and C57BL/6 (named C57BL/6-high) mice were respectively infected intranasally with 1×10^3 and 5×10^5 plaque forming units (PFUs) of HSV-1. C57BL/6 mice (named C57BL/6-low) infected with a low inoculum (1×10^3 PFUs) of HSV-1 were tested in parallel. Mice were monitored for weight loss, sickness signs and survival for 21 days. The viral load, infectious titers, cytokine/chemokine levels and peripheral leukocyte infiltration were determined in brain homogenates on days 0 (non-infected), 4, 6 and 8 post-infection (p.i.) by qPCR, plaque assay, ELISA/Luminex™ and flow cytometry, respectively. Our results showed that the mortality of BALB/c mice (67%) was higher compared to those of C57BL/6-low (0%; $P \leq 0.01$) and C57BL/6-high (20%; $P \leq 0.05$) animals. This higher mortality was associated with increased infectious titers and cytokine/chemokine levels in brains of BALB/c compared to C57BL/6 mice. Recruitment of inflammatory monocytes, dendritic cells, natural killer and natural killer T cells to the brain was higher in C57BL/6-high compared to BALB/c animals on day 4 p.i. Infiltration of inflammatory monocytes and T cells in brain of BALB/c mice was seen on day 6 p.i. Our data suggest that a rapid, sustained and coordinated recruitment of peripheral leukocytes to the brain of C57BL/6-high mice results in an effective control of viral replication and inflammation whereas the delayed infiltration of immune cells in brain of BALB/c mice was associated with an exacerbated inflammatory response during HSE.

Introduction

Herpes simplex virus encephalitis (HSE) is the most common cause of lethal viral encephalitis in Western countries (Tyler 2004). In adults, herpes simplex virus (HSV) 1 is responsible of 90% of HSE cases (Rozenberg, Deback et al. 2011). In the absence of antiviral treatment, the mortality rate is estimated to be 70%. Despite early intravenous administration of acyclovir, the antiviral of choice for the treatment of HSE, the mortality rate is still close to 30% with 60% of survivors developing neurological sequelae (Kennedy and Steiner 2013, Tuppeny 2013). The pathogenesis of HSE remains incompletely understood. It is believed that the high mortality rate associated with this disease could involve both virally- and immune-mediated damage in the central nervous system (CNS) (Sergerie, Boivin et al. 2007, Lundberg, Ramakrishna et al. 2008, Conrady, Drevets et al. 2010, Canivet, Menasria et al. 2015, Piret and Boivin 2015). In this respect, HSE consists in a diffuse inflammatory process in brain parenchyma associated with signs of cerebral dysfunctions.

Several factors, such as genetic immune deficiency and use of immunomodulatory drugs, are known to predispose individuals to HSE emphasizing the importance of a coordinated immune response to HSV-1. The immunological control of HSV-1 infection first involves the early innate response, which limits virus spread to target organs and subsequently orchestrates an effective adaptive immune response (Braciale and Hahn 2013). Components implicated in the innate immune response are phylogenetically acquired and exhibit host variability (Kimbrell and Beutler 2001). The first evidence of a difference in susceptibility of inbred mouse strains to HSV-1 infection was reported by Lopez and colleagues in 1975 (Lopez 1975). In this study, the authors demonstrated that, after intraperitoneal infection, the inoculum of HSV-1 that was lethal for 50% (LD_{50}) of BALB/c mice was 1×10^3 plaque forming units (PFUs) whereas the LD_{50} for C57BL/6 animals was greater than 10^6 PFUs. BALB/c and C57BL/6 mice were thus respectively considered as moderately susceptible and resistant to HSV-1 infection.

It was first reported that a rapid interferon (IFN) response was implicated in resistance of C57BL/6 mice to HSV-1 infection (Zawatzky, Gresser et al. 1982). Further studies then demonstrated the inherited character of natural resistance of inbred mouse strains to lethal HSE as well as the role of various components of the innate immune response (Pepose and Whittum-Hudson 1987). Natural resistance to HSV-1 infection in inbred mouse strains is complex and likely involves multiple interacting loci (Lundberg, Ramakrishna et al. 2008). Indeed, resistance of C57BL/6 mice to lethal HSE was associated with three different loci that have been mapped to chromosome 6. These three distinct loci were shown to play specific roles in several steps of HSV-1 infection when studied in different experimental models using various mice and viral strains as well as routes of inoculation. The first identified resistance locus, named the herpes resistance locus (*Hrl*), was closely related to the tumor necrosis factor (TNF)- α p55 receptor (TNFR1) (Lundberg, Welander et al. 2003). However, later

studies demonstrated that TNF^{-/-} mice were more susceptible to ocular infection with HSV-1 compared to p55^{-/-} and wild type (WT) C57BL/6 counterparts (Lundberg, Welander et al. 2007). It was thus concluded that TNF- α was involved in resistance of C57BL/6 mouse strain to lethal HSE but that this effect could be independent of TNFR1 signaling pathways. The second locus, called resistance to herpes simplex virus 1 (*Rhs1*), is linked to the complex locus of natural killer (NK) cells. The expression of this locus could play a role in the restriction of viral spread to the sensory ganglia and in a better control of viral reactivation leading to a delay in the development of a zosteriform rash in C57BL/6 mice compared to BALB/c animals (Pereira, Scalzo et al. 2001). The authors suggested a role for NK and NKT cells in mediating the effect of *Rhs1* locus. Finally, the third locus, named *Hrl2*, was shown to be involved in the restriction of viral spread in brains of mice infected via the oral mucosa with HSV-1. The *Hrl2* locus is also mapped to a segment linked to NK cells on chromosome 6 and restriction of viral spread in the CNS was shown to involve NK1.1-expressing cells (Kastrukoff, Lau et al. 2015). Furthermore, other components of innate immune system such as dendritic cells (DCs) and macrophages as well as elements of adaptive response such as T cells and specific antibodies were shown to be important factors in host defense against HSV-1 infection in various mouse models using different viral strains (Paludan, Melchjorsen et al. 2002, Lundberg, Ramakrishna et al. 2008, Kastrukoff, Lau et al. 2012, Lucinda, Figueiredo et al. 2017). By using C57BL/6 mice infected via the oral mucosa with HSV-1, it was also suggested that the roles played by different types of immune cells in the restriction of viral spread in the CNS are redundant rather than cell specific (Kastrukoff, Lau et al. 2010). However, the mechanisms mediating resistance of inbred mouse strains to lethal HSE are still incompletely understood.

In this study, we compared the cerebral immune response in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice infected by the intranasal route with a neurovirulent strain of HSV-1 using an inoculum corresponding to the LD₅₀ determined for BALB/c mice (1x10³ PFUs) and an inoculum corresponding to 500-times this LD₅₀ value (5x10⁵ PFUs) for C57BL/6 mice. We determined the kinetic of viral replication, cytokine/chemokine levels and infiltration of peripheral immune cells in brain homogenates by qPCR/plaque assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)/magnetic bead-based immunoassay and flow cytometry, respectively.

Materials and methods

Animals and experimental procedures

BALB/c and C57BL/6 male mice at 5 to 6 weeks of age were purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada). Animals were housed three to five per cage and acclimated to standard laboratory conditions for one week. All animals were used in accordance to the Canadian Council on Animal Care

guidelines and the protocol was approved by the Animal Care Ethics Committee of Laval University (protocol no. 2017072).

BALB/c and C57BL/6 mice were infected intranasally with 1×10^3 PFUs or with 5×10^5 PFUs (high inoculum; referred to as C57BL/6-high) of the neurovirulent clinical HSV-1 strain H25 described elsewhere (Sergeie, Boivin et al. 2007). C57BL/6 mice infected with 1×10^3 PFUs (low inoculum; referred to as C57BL/6-low) of the same HSV-1 strain by the intranasal route were also tested in some experiments. Viral titers were determined by plaque assay in Vero cells after virus stock production and at the end of each experiment (back titration).

For survival curve experiments, mice were monitored for the appearance of HSE-related signs (i.e., weight loss, isolation with no social interaction, limited movements, swollen eyes, neurological disorders, convulsions and mortality) for 21 days. Animals were sacrificed when a weight loss equal to or greater than 20% or a combination of two other obvious sickness signs were recorded.

To determine the viral DNA loads, infectious viral titers, cytokine and chemokine levels in brain homogenates, non-infected animals (i.e., day 0) and subsets of infected mice were sacrificed on days 4, 6 and 8 post-infection (p.i.). Mice were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture and intracardiac perfusion was performed with cold 0.9% saline. Brains were harvested and homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) (both from Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada).

Viral DNA load and infectious titer measurements

Total DNA was extracted from volumes of homogenates containing 10 mg of brain tissue using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Roche Molecular System, Laval, QC, Canada) and eluted in 200 μ L of elution buffer according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using 5 μ L of extracted total DNA mixed with LightCycler[®] 480 Probes Master on a LightCycler[®] 480 system (both from Roche Molecular System). External standards were run in parallel as described elsewhere (Boivin, Goyette et al. 2006). Primers and probes targeted a conserved region of the DNA polymerase of HSV-1. The limit of detection of the assay is 200 copies/mg of brain. Infectious viral titers were determined in brain homogenates by a standard plaque assay on Vero cells. Briefly, monolayers of Vero cells were infected with serial dilutions of brain homogenates in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Life

Technologies, Burlington, ON, Canada) and 1% of a mixture of gentamicin [1 mg/mL (Life Technologies)], vancomycin [0.1 mg/mL (PharmaScience, Montreal, QC, Canada)] and amphotericin B [0.125 mg/mL (MultiCell Technologies, Woonsocket, RI)] (GVF). Plates were centrifuged at 800 x g for 45 min at room temperature. Samples were removed and replaced by MEM + 2% FBS + 1% GVF containing 0.4% SeaPlaque agarose (Lonza, Walkersville, MD) for 3 days. Cells were fixed, stained and the number of plaques was counted. The limit of detection of the assay was 5 PFUs per well.

Cytokine and chemokine levels measurements

Brain homogenates were centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4 °C. IFN- β protein levels were measured in supernatants by ELISA (Life Technologies). Levels of IFN- γ , interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)1, C-C motif chemokine ligand (CCL)2, CCL3, CCL4 and CCL5 were determined in supernatants by magnetic bead-based immunoassays using the Bio-Rad Bio-Plex mouse cytokine group I plex assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed with the Bio-Plex system equipped with the Bio-Plex Manager Software v6.0 (Bio-Rad Laboratories).

Analyses of infiltration of leukocytes in the CNS

Non-infected animals (i.e., day 0) and subsets of infected mice (4-5 animals per group for each time point) were sacrificed on days 4, 6 and 8 p.i. Mice were deeply anesthetized and perfused intracardially with ice-cold Dulbecco's PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (DPBS; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Brains were extracted, immediately homogenized with a plunger in 20 mL of DPBS supplemented with a cocktail of enzymes [Liberase (1.54 mg/mL) and DNase (5 U/mL)] and N α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (10 mg/mL) (all from Sigma-Aldrich). After an incubation period of 1 h at 37 °C, brain homogenates were filtered through a 70- μ m cell strainer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The cell suspension was centrifuged at 300 x g for 10 min at room temperature. The supernatant was aspirated and cells were gently resuspended in 7 mL of 37% Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The cell suspension was underlaid beneath 80% Percoll and centrifuged at 600 x g for 40 min with slow acceleration and without deceleration rates. The cell ring at the interphase was collected and mixed thoroughly with DPBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ containing 2% of inactivated FBS. Cells were then centrifuged at 300 x g for 10 min and washed twice with DPBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ supplemented with 2% of inactivated FBS. Cells were first incubated with Fixable Viability Stain 510

(FVS510; BD Biosciences) on ice for 35 min. After two washing steps, cells were incubated with purified rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse Fc Block; clone 2.4G2; BD Biosciences) on ice for 35 min. After a washing step, cells were incubated for 1 h on ice with the pool of antibodies described in Table 1. Flow cytometry analyses and data acquisition were performed using a BD SORP LSR II (BD Biosciences) equipped with the FlowJo software V10 (FlowJo LLC, Ashland, OR), respectively.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software v6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences in mouse survival rates were analyzed using the Log-Rank (Mantel-Cox) test. Differences in weight changes were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey multiple comparison post-test. Differences in viral DNA loads, infectious viral titers, levels of cytokines/chemokines were analyzed by a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test using log transformed data. Percentages of infiltrating cells in the CNS were analyzed by a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test. All statistical analyses were performed after excluding outliers by Grubb's test. A P value ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

Results

BALB/c mice are more susceptible to HSV-1 infection than C57BL/6 animals.

To evaluate the impact of mouse genetic background on the susceptibility to lethal HSE, BALB/c and C57BL/6-high mice were respectively infected with 1×10^3 PFUs and 5×10^5 PFUs of HSV-1 strain H25 by the intranasal route whereas C57BL/6-low mice were infected with a low inoculum (1×10^3 PFUs) of the same strain. Fig. 1a shows that the mortality rate of BALB/c mice (67%) was higher than those of C57BL/6-low (0%; $P \leq 0.01$) and C57BL/6-high (20%; $P \leq 0.05$) animals. Body weight changes were not statistically different between BALB/c and C57BL/6-high groups during the infection. The differences in weight changes between BALB/c and C57BL/6-low groups were significant on days 5 ($P \leq 0.05$), 6, 7, 8 ($P \leq 0.001$ for the three) and 11 ($P \leq 0.05$) p.i. (Fig. 1b). The weight loss of C57BL/6-high mice was significantly greater compared to that of C57BL/6-low on days 4 ($P \leq 0.01$), 5 and 6 (both $P \leq 0.001$) p.i. Thus, as expected, BALB/c mice were more susceptible to HSE than both groups of C57BL/6 animals.

Viral replication is uncontrolled in the brain of BALB/c mice.

The influence of mouse genetic background on the control of viral replication in the CNS was then evaluated in the different groups of animals after intranasal challenge with HSV-1. Brains were harvested on days 4, 6 and 8 p.i. Fig. 2a shows that the viral DNA load in brain homogenates of BALB/c mice was significantly higher compared to that of C57BL/6-low animals on days 6 ($P \leq 0.01$) and 8 ($P \leq 0.05$) and to that of C57BL/6-high group on day 8 ($P \leq 0.05$) p.i. The infectious viral titers were significantly increased in brain homogenates of BALB/c mice compared to those of C57BL/6-low animals on days 4, 6 and 8 ($P \leq 0.001$ for all) and to those of C57BL/6-high group on days 6 ($P \leq 0.001$) and 8 ($P \leq 0.05$) after the infection. As expected, infectious viral titers in brains of C57BL/6-high mice were higher compared to those of C57BL/6-low counterparts on days 4 ($P \leq 0.05$), 6 and 8 (both $P \leq 0.001$; Fig. 2b) p.i. These results show that viral replication was uncontrolled in the CNS of BALB/c animals compared to that seen in both groups of C57BL/6 mice.

The inflammatory response is uncontrolled in the CNS of BALB/c mice.

The levels of cytokines and chemokines were determined in brain homogenates of BALB/c and C57BL/6-high mice after intranasal challenge with HSV-1 (Fig. 3). Brains were harvested in non-infected animals (i.e., day 0) and in subset of infected mice on days 4, 6 and 8 p.i. In BALB/c mice, the levels of a series of cytokines/chemokines were significantly increased compared to those of non-infected animals on days 4 [IFN- β ($P \leq 0.001$) and CCL2 ($P \leq 0.05$)], 6 [IFN- β , CCL2 (both $P \leq 0.001$), CCL5 ($P \leq 0.01$), IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-10, CXCL1 and CCL3 ($P \leq 0.05$ for the six)] and 8 [IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL5 ($P \leq 0.001$ for the seven), IL-1 β , IL-6, IL-10, CXCL1, CCL4 ($P \leq 0.01$ for the five) and IL-12p70 ($P \leq 0.05$)] after infection (P values not indicated in Fig. 3). In contrast, the levels of only a few immune mediators were increased in C57BL/6-high mice compared to those of non-infected animals on days 4 [IFN- β ($P \leq 0.001$) and CCL2 ($P \leq 0.01$)], 6 [IFN- β , CCL2, CCL5 ($P \leq 0.001$ for the three) and CCL3 ($P \leq 0.05$)] and 8 [IFN- β ($P \leq 0.001$), CCL5 ($P \leq 0.01$), IL-12p40 and CCL2 (both $P \leq 0.05$)] p.i. (P values not indicated in Fig. 3).

No significant differences were observed between the levels of cytokines and chemokines measured in brains of BALB/c and C57BL/6-high mice on day 4 p.i. On day 6 p.i., the level of IL-1 α ($P \leq 0.05$) was increased in BALB/c mice compared to that of C57BL/6-high animals. On day 8 p.i., levels of IL-1 α , CCL2, CCL3 ($P \leq 0.001$ for the three), IL-1 β , IL-6 (both $P \leq 0.01$), IFN- β , IFN- γ , IL-10, CXCL1 and CCL4 ($P \leq 0.05$ for the five) were significantly higher in the CNS of BALB/c mice compared to those of C57BL/6-high group. Taken together, these data suggest that the inflammatory response was exacerbated in the CNS of BALB/c mice compared to C57BL/6-high animals.

Recruitment of peripheral immune cells to the CNS is delayed in BALB/c mice.

Infiltration of blood leukocytes into the brain of BALB/c and C57BL/6-high mice was evaluated by flow cytometry analyses on days 4, 6 and 8 after intranasal challenge with HSV-1 and compared to non-infected counterparts (i.e. day 0). The gating strategy presented in Fig. 4 shows that single cells were selected from live cell population. The CD45 marker was used to discriminate resident microglia (i.e., CD45^{low}; gate A) from infiltrating leukocytes (i.e., CD45^{high}; gate B). DCs were identified from CD45^{high} population based on the expression of both CD11b and CD11c markers (i.e., CD11b^{pos}/CD11c^{pos}; right upper quadrant C). The expression of B220 and BST2 markers was used to further differentiate DCs into conventional dendritic cells (cDCs; i.e., B220^{neg}/BST2^{pos}; left upper quadrant D) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs; i.e., B220^{pos}/BST2^{neg}; right lower quadrant E). B cells were excluded from the non-DC population based on the granularity and expression of B220 marker (i.e., B220^{pos}; gate F). In the B220^{neg} population, the expression of NK1.1 and CD3 ϵ markers was used to separate NK cells (i.e., NK1.1^{pos}/CD3 ϵ ^{neg}; left upper quadrant G), natural killer T cells (NKT; i.e., NK1.1^{pos}/CD3 ϵ ^{pos}; right upper quadrant H) and T cells (i.e., NK1.1^{neg}/CD3 ϵ ^{pos}; right lower quadrant I). Neutrophils were identified as Ly6G^{pos} cells (gate J) in the NK1.1^{neg} and CD3 ϵ ^{neg} cells. Total monocytes were selected from Ly6G^{neg} cells based on the expression of CD115 and CD11b markers (i.e., CD115/CD11b^{pos}; gate K). Finally, inflammatory monocytes were identified based on the levels of expression of both Ly6C and CCR2 markers (i.e., Ly6C^{high}/CCR2^{high}; gate L) and separated from intermediate monocytes (i.e., Ly6C^{int}/CCR2^{int}; gate M) and patrolling monocytes (i.e., Ly6C^{low}/CCR2^{low}; gate N).

Based on this gating strategy, Fig. 5 shows that the percentage of CD45^{high} cells (infiltrating leukocytes) was respectively 3.5- and 5.6-fold higher in brain homogenates of BALB/c and C57BL/6-high mice on day 6 p.i. compared to their non-infected counterparts (i.e., day 0). In BALB/c mice, percentages of T cells and inflammatory monocytes were respectively 4.1- ($P \leq 0.01$; P value not indicated in Fig. 5) and 12.0-fold ($P \leq 0.05$; P value not indicated in Fig. 5) higher in the CNS on day 6 p.i. compared to non-infected animals. In C57BL/6-high mice, percentages of cDCs, NK, NKT, pDCs and inflammatory monocytes that infiltrated the brain were respectively 12.8-, 9.7-, 12.8- ($P \leq 0.001$ for the three; P values not indicated in Fig. 5), 10.1- and 4.6-fold (both $P \leq 0.01$; P values not indicated in Fig. 5) higher on day 4 p.i. compared to non-infected counterparts. Compared to the non-infected group, percentages of inflammatory monocytes and T cells that are recruited to the brain were 13.0- and 3.4-fold ($P \leq 0.001$ for both; P values not indicated in Fig. 5) higher in C57BL/6-high mice on days 6 and 8 p.i., respectively. Recruitment of B cells, neutrophils, intermediate monocytes and patrolling monocytes to the brain was not different between infected and non-infected animals for the two groups of mice at all time points investigated (data not shown).

On day 4 p.i., percentages of cDCs, NK, NKT, inflammatory monocytes and pDCs were respectively 9.3-, 14.2-, 5.8- ($P \leq 0.001$ for the three), 4.5- and 2.6-fold (both $P \leq 0.05$) higher in the CNS of C57BL/6-high animals compared to BALB/c mice. On day 6 p.i., NKT and T cells that infiltrated the brain were respectively 7.9- ($P \leq 0.01$) and 4.8-fold ($P \leq 0.001$) higher in BALB/c mice compared to C57BL/6-high animals. On day 8 p.i., infiltration of T cells was 3.7-fold ($P \leq 0.001$) higher in brains of C57BL/6-high mice compared to BALB/c animals. Taken together, our results showed that the recruitment of immune cells to the brain is delayed in BALB/c mice and could be ineffective to control viral replication.

Discussion

In the present study, we compared the cerebral immune response in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice during HSE. Using the intranasal route of inoculation, we confirmed that BALB/c mice were more susceptible to infection with a neurovirulent clinical strain of HSV-1 than C57BL/6 animals. This higher mortality rate was associated with increased viral DNA loads and infectious titers in brains of BALB/c animals compared to those seen in C57BL/6 mice. The recruitment of NK/NKT cells, cDCs, pDCs and inflammatory monocytes to the brain of C57BL/6-high mice started as early as day 4, with a persistence of inflammatory monocytes infiltration on day 6, followed by T cells infiltration on day 8 after infection. In contrast, an infiltration of both inflammatory monocytes and T cells in brains of BALB/c mice occurred only at the peak of viral replication (day 6 p.i.). These results suggest that a rapid, sustained and coordinated infiltration of peripheral immune cells in the CNS as seen in resistant C57BL/6-high mice is critical for an early and effective control of viral replication in the CNS. In contrast, the recruitment of peripheral leukocytes to the brains of susceptible BALB/c mice was delayed, short lasting, uncoordinated and limited to inflammatory monocytes and T cells that could result in increased infectious viral titers in this tissue and mortality. Furthermore, the production of inflammatory cytokines and chemokines was increased in brains of BALB/c mice compared to that of C57BL/6-high animals. We suggest that, in addition to uncontrolled viral replication, such higher cerebral inflammatory response could contribute to the increased mortality rate of BALB/c mice.

Our results show that the viral titers in brains of BALB/c mice were significantly higher compared to those of C57BL/6 animals with a peak of viral replication on day 6 p.i. It was previously reported that, after infection through oral mucosa with HSV-1, the virus spreads throughout the brain of susceptible BALB/c mice whereas it is restricted to the brainstem of resistant C57BL/6 animals (Kastrukoff, Lau et al. 2010). These authors suggested that the ability of the host to restrict viral spread in the CNS could be one of the factors that are involved in resistance to lethal HSE. The control of HSV-1 infection in the CNS is mainly dependent on the immune response mediated by microglia (Lokensgard, Hu et al. 2001, Marques, Hu et al. 2006). Furthermore, the infiltration of peripheral blood leukocytes in the brain has been shown to contribute to the global immune

response (Menasria, Canivet et al. 2015) but also to worsen the outcome of HSE by amplifying the cerebral inflammatory state (Marques, Cheeran et al. 2008).

The role of NK and NKT cells in the restriction of viral spread at the site of virus inoculation and in sensory ganglia is controversial and differs according to animal models of mucosal and cutaneous HSV-1 infections (Ghiasi, Cai et al. 2000, Cornish, Keating et al. 2006, Grubor-Bauk, Arthur et al. 2008). The involvement of NK cells in the control of HSV-1 infection in the CNS was first reported using C57BL/6 mice infected by the intraperitoneal route with HSV-1 and depleted in NK cells activity by multiple intravenous injections of anti-sialo GM1 antibodies. Mice depleted in NK cells demonstrated increased viral titers in brains that were associated with a higher mortality rate compared to control animals (Habu, Akamatsu et al. 1984). NKT cells are innate lymphocytes that respond rapidly to an infection. NKT cells recognize lipid-derived antigen presented by class I major histocompatibility complex related protein CD1d. Using mice deficient in CD1d or in $\text{J}\alpha 18$ T-cell receptor and infected cutaneously with HSV-1, it was reported that NKT cells contribute to the control of viral replication at the site of infection and in sensory ganglia as well as to the prevention of neuroinvasion, loss of sensory neurons and mortality (Grubor-Bauk, Arthur et al. 2008). Furthermore, the role of both NK/NKT cells in the restriction of viral spread in the CNS has been demonstrated using C57BL/6 mice that were infected with HSV-1 via the oral mucosa and treated with an anti-NK1.1 (PK136) monoclonal antibody (Kastrukoff, Lau et al. 2015).

DCs play a pivotal role in immunity against herpesvirus infections by establishing a link between innate and adaptive immune responses. C57BL/6 mice depleted in CD11c-positive DCs by intraperitoneal injection of diphtheria toxin and infected in the footpad with HSV-1 had shortened survival rate and higher infectious viral titers in the CNS compared to controls. The increased mouse susceptibility was attributed to impaired NK and T cell activation in the absence of DCs (Kassim, Rajasagi et al. 2006). Both cDCs and pDCs are involved in the promotion of NK cell activation and immunity against HSV based on cytotoxic T cells (Andrews, Scalzo et al. 2003). In our experiments, an infiltration of NK/NKT cells, cDCs and pDCs was observed as early as day 4 p.i. in brain of C57BL/6-high mice but not in BALB/c animals. These results suggest that the lack of infiltration of NK/NKT cells and DCs in the CNS of BALB/c mice after the infection could be responsible for an uncontrolled viral replication.

Our group already reported that inflammatory monocytes infiltrate the CNS of chimeric C57BL/6 mice transplanted with bone marrow-derived cells expressing the green fluorescent protein after intranasal challenge with HSV-1 (Menasria, Canivet et al. 2015). This study also demonstrated that infiltrating monocytes has the ability to differentiate into macrophages that are activated during HSE. Inflammatory monocytes were shown to infiltrate inflamed cerebral tissue and exert pro-inflammatory and phagocytic activities (Shechter, London et al.

2013). Depletion of monocytes by multiple intraperitoneal injections of liposomal clodronate to C57BL/6 mice infected by corneal inoculation increased the mortality rate compared to animals receiving empty liposomes and suggests a protective role for infiltrating monocytes during HSE (Lundberg, Welander et al. 2007). Our group also demonstrated that chimeric C57BL/6 mice with a hematopoietic deficiency in CCR2 and infected intranasally with HSV-1 exhibited a reduced infiltration of inflammatory monocytes in the CNS leading to an uncontrolled viral replication and an increased mortality compared to WT animals (Menasria, Canivet et al. 2016). In this respect, the recruitment of inflammatory monocytes to the CNS of susceptible BALB/c mice was delayed and short lasting (day 6 p.i.; peak of viral replication) compared to that of C57BL/6-high animals (days 4 and 6 p.i.) which could also contribute to a lack of control of HSV-1 replication.

C57BL/6 mice deficient in CXCL10 (a cytokine critical for the mobilization of both innate and adaptive immune cells) infected with HSV-1 via the cornea exhibited higher mortality rate and viral titers in the CNS compared to WT animals (Wuest and Carr 2008). This was associated with defects in leukocyte recruitment in brainstem including NK cells and HSV-1 specific CD8⁺ T cells. By using C57BL/6 mice treated with anti-CD8⁺ and anti-NK1.1 monoclonal antibodies prior to HSV-1 infection of oral mucosa, it was demonstrated that CD8⁺ T-cells and NK/NKT cells are important to restrict the spread of HSV-1 in the brainstem compared to untreated infected controls (Kastrukoff, Lau et al. 2010). Our results showed that the recruitment of T cells to the brain of C57BL/6-high mice occurred on day 8 p.i. and followed the infiltration of NK/NKT cells, DCs and inflammatory monocytes whereas T cell recruitment was observed earlier (day 6 p.i.) and concomitantly with inflammatory monocytes in BALB/c mice. This suggests that the infiltration of T cells in the brain of BALB/c mice is uncoordinated with that of other peripheral leukocytes which could result in an altered immune response during HSE.

Infection of the CNS with HSV-1 induces the production of cytokines (mainly type I IFNs, IL-1 β and IL-6) and chemokines that play an important role in the control of viral replication (Vilela, Mansur et al. 2008, Conrady, Drevets et al. 2010, Teixeira, Vilela et al. 2010). It was previously reported that a delayed leukocyte infiltration may contribute to amplify the global cerebral inflammation triggered by virally-infected cells (Conrady, Drevets et al. 2010) as seen in our study. Indeed, higher levels of several pro-inflammatory cytokines (IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β and IL-6) and chemokines (CXCL1, CCL2, CCL3 and CCL4) were observed in brains of BALB/c mice compared to C57BL/6-high animals on day 8 p.i. The increased production of these immune mediators could result from a failure to modulate the inflammatory response. In this respect, susceptible 129 mice infected via the cornea with HSV-1 and treated with acyclovir on day 4 p.i. had reduced to undetectable viral titers in brains but these animals still demonstrated cerebral inflammation and succumbed to infection (Lundberg, Ramakrishna et al. 2008). The authors suggested that an uncontrolled inflammatory response could be the major determinant in disease exacerbation and mortality of susceptible mouse strains to HSE.

In conclusion, we confirmed the implication of NK/NKT cells in the resistance phenotype of C57BL/6 mice to lethal HSV-1 infection as already suggested (Pereira, Scalzo et al. 2001, Kastrukoff, Lau et al. 2015). More interestingly, our results highlight the importance of a timely, sustained and coordinated infiltration of NK/NKT cells, DCs, inflammatory monocytes and T cells in the resistance of C57BL/6 mice to HSE. The role of these infiltrating cells in the pathogenesis of HSE should be evaluated in future studies. We cannot exclude, however, that differences in the control of viral replication in nasal mucosa (site of inoculation) of both mouse strains could have contributed to their susceptibility to HSV-1 infection but this parameter was not evaluated in our study. Murine models of HSE that consist in a primary and acute infection may not accurately reflect the pathology in humans (which is mainly due to virus reactivation). However, these observations support the hypothesis that both virally- and immune-mediated damage are involved during HSE.

Acknowledgments

The authors would like to thank Julie-Christine Levesque from Luminex technology platform of Research Center of the CHU of Quebec-Laval University for assistance in Bio-Plex system and Bio-Plex manager software as well as Alexandre Brunet from Imaging and Cytometry platforms of Research Center of the CHU of Quebec-Laval University for assistance in acquisition of flow cytometry data.

This study was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B.). G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest

References

- Andrews DM, Scalzo AA, Yokoyama WM, Smyth MJ, Degli-Esposti MA (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol* 4: 175-81.
- Boivin G, Goyette N, Sergerie Y, Keays S, Booth T (2006). Longitudinal evaluation of herpes simplex virus DNA load during episodes of herpes labialis. *J Clin Virol* 37 : 248-51.
- Braciale TJ, Hahn YS (2013). Immunity to viruses. *Immunol Rev.* 255:5-12.

- Canivet C, Menasria R, Rheume C, Piret J, Boivin G (2015). Valacyclovir combined with artesunate or rapamycin improves the outcome of herpes simplex virus encephalitis in mice compared to antiviral therapy alone. *Antiviral Res* 123: 105-13.
- Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ (2010). Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *J Neuroimmunol* 220:1-9.
- Cornish AL, Keating R, Kyparissoudis K, Smyth MJ, Carbone FR, Godfrey DI (2006). NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution. *Immunol Cell Biol* 84: 13-9.
- Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL (2000). The role of natural killer cells in protection of mice against death and corneal scarring following ocular HSV-1 infection. *Antiviral Res* 45:33-45.
- Grubor-Bauk B, Arthur JL, Mayrhofer G (2008). Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol* 82: 11073-83.
- Habu S, Akamatsu K, Tamaoki N, Okumura K (1984). In vivo significance of NK cells on resistance against virus (HSV-1) infections in mice. *J Immunol* 133: 2743-7.
- Kassim SH, Rajasagi NK, Zhao X, Chervenak R, Jennings SR (2006). In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. *J Virol* 80: 3985-93.
- Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Carbone FR, Scalzo AA (2015). A NK complex-linked locus restricts the spread of herpes simplex virus type 1 in the brains of C57BL/6 mice. *Immunol Cell Biol* 93: 877-84.
- Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Smyth MJ, Jones CM, Clarke SR, Carbone FR (2010). Redundancy in the immune system restricts the spread of HSV-1 in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 mice. *Virology* 400: 248-58.
- Kastrukoff LF, Lau AS, Thomas EE (2012). The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae* 3: 4.
- Kennedy PG, Steiner I (2013). Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol* 19: 346-50.
- Kimbrell DA, Beutler B (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2: 256-67.
- Lokensgard JR, Hu S, Sheng W, vanOijen M, Cox D, Cheeran MC, Peterson PK (2001). Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J Neurovirol* 7: 208-19.
- Lopez C (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-3.
- Lucinda N, Figueiredo MM, Pessoa NL, Santos BS, Lima GK, Freitas AM, Machado AM, Kroon EG, Antonelli LR, Campos MA (2017). Dendritic cells, macrophages, NK and CD8(+) T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virol J* 14: 37.
- Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM (2008). The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol* 82: 7078-88.
- Lundberg P, Welander P, Openshaw H, Nalbandian C, Edwards C, Moldawer L, Cantin E (2003). A locus on mouse chromosome 6 that determines resistance to herpes simplex virus also influences reactivation, while an unlinked locus augments resistance of female mice. *J Virol* 77: 11661-73.

- Lundberg P, Welander PV, Edwards CK, 3rd, van Rooijen N, Cantin E (2007). Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol* 81: 1451-60.
- Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Urban SL, Lokensgard JR (2008). Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *J Immunol* 181: 6417-26.
- Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR (2006). Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res* 121:1-10.
- Menasria R, Canivet C, Piret J, Boivin G (2015). Infiltration pattern of blood monocytes into the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis. *PLoS One* 10: e0145773.
- Menasria R, Canivet C, Piret J, Gosselin J, Boivin G (2016). Both cerebral and hematopoietic deficiencies in CCR2 result in uncontrolled herpes simplex virus infection of the central nervous system in mice. *PLoS One* 11: e0168034.
- Paludan SR, Melchjorsen J, Malmgaard L, Mogensen SC (2002). Expression of genes for cytokines and cytokine-related functions in leukocytes infected with Herpes simplex virus: comparison between resistant and susceptible mouse strains. *Eur Cytokine Netw* 13: 306-16.
- Pepose JS, Whittum-Hudson JA (1987). An immunogenetic analysis of resistance to herpes simplex virus retinitis in inbred strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1549-52.
- Pereira RA, Scalzo A, Simmons A (2001). Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol* 166: 5869-73.
- Piret J, Boivin G (2015). Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Rev Med Virol* 25: 300-19.
- Rozenberg F, Deback C, Agut H (2011). Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infect Disord Drug Targets* 11: 235-50.
- Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S (2007). Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis* 195: 817-25.
- Shechter R, London A, Schwartz M (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol* 13: 206-18.
- Teixeira MM, Vilela MC, Soriani FM, Rodrigues DH, Teixeira AL (2010). Using intravital microscopy to study the role of chemokines during infection and inflammation in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 224: 62-5.
- Tuppeny M (2013). Viral meningitis and encephalitis. *Crit Care Nurs Clin North Am* 25: 363-80.
- Tyler KL (2004). Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis* 1: 169-78.
- Vilela MC, Mansur DS, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Arantes RM, Kroon EG, Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL (2008). Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neurosci Lett* 445:18-22.
- Wuest TR, Carr DJ (2008). Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *J Immunol* 181: 7985-93.

Zawatzky R, Gresser I, DeMaeyer E, Kirchner H (1982). The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of herpes simplex virus type 1. *J Infect Dis* 146: 405-10.

Table 1: Antibodies used for flow cytometry analyses

Antibody (clone)/fluorochrome	Manufacturer (catalog number)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{brain homogenate}$)
Rat anti-CD45 (30-F11)/APC-Cy7	BD Biosciences (#557659)	0.1
Rat anti-CD11b (M1/70)/BUV737	BD Biosciences (#564443)	0.1
Hamster anti-CD11c (HL3)/Pe-Cy7	BD Biosciences (#558079)	0.1
Rat anti-B220 (RA3-6B2)/PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (#552771)	0.1
Rat anti-BST2 (927)/BV421	BD Biosciences (#566431)	0.1
Mouse anti-NK1.1 (PK136)/BUV395	BD Biosciences (#564144)	0.1
Hamster anti-CD3 ϵ (145-2C11)/PE-CF594	BD Biosciences (# 562286)	0.1
Rat anti-CD115 (AFS98)/APC	Thermo Fisher Scientific (#17-1152-82) ^a	0.1
Rat anti-Ly6G (1A8) / FITC	BD Biosciences (# 561105)	0.5
Rat anti-Ly6C (AL-21)/BV605	BD Biosciences (#563011)	0.1
Rat anti-CCR2 (475301)/PE	R&D System (#FAB5538P) ^b	2.5

^a, Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada; ^b, R&D System, Oakville, ON, Canada

Legends to Figures

Fig. 1 Effect of mouse genetic background on survival rates (a) and percentage of body weight changes (b) of mice after intranasal challenge with HSV-1. Groups of 8 to 10 mice were infected by the intranasal route with 1×10^3 PFUs (BALB/c (●) and C57BL/6-low (■) mice) or with 5×10^5 PFUs (C57BL/6-high mice (▲)) of HSV-1 strain H25. Mice were monitored three times a day and a $\geq 20\%$ weight loss or two obvious sickness signs were considered as endpoints for sacrifice. (a) The differences in survival rates were evaluated using a Log-Rank (Mantel-Cox) test. (b) Data represent the means \pm standard error of the mean (SEM). The digits above the arrows correspond to the numbers of dead mice on the indicated day for BALB/c and C57BL/6-high groups. The differences in body weight changes were evaluated using a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ compared to C57BL/6-low mice or between indicated groups

Fig. 2 Effect of mouse genetic background on viral DNA loads (a) and infectious viral titers (b) in brain homogenates of mice after intranasal challenge with HSV-1. Mice were infected intranasally with 1×10^3 PFUs (BALB/c (●) and C57BL/6-low (■) mice) or with 5×10^5 PFUs (C57BL/6-high mice (▲)) of HSV-1 strain H25. Brains were collected on days 4, 6 and 8 post-infection. Viral DNA loads and infectious viral titers were measured in brain homogenates by qPCR and plaque assay on Vero cells, respectively. Data for each individual mouse and the mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 4-7$ mice per group) is represented. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test after log transformation of the data. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ compared to BALB/c mice or between indicated groups. Dotted lines represent limits of detection of each assay

Fig. 3 Cytokine and chemokine levels in brain homogenates of mice infected with HSV-1. Mice were infected intranasally with 1×10^3 PFUs (BALB/c mice (●)) or with 5×10^5 PFUs (C57BL/6-high mice (▲)) of HSV-1 strain H25. Levels of cytokines (a to h) and chemokines (i to m) were measured by ELISA (IFN- β) or magnetic bead-based immunoassay (all others) in supernatants of brain homogenates collected in non-infected mice (i.e., day 0) and in subsets of infected mice sacrificed on days 4, 6 and 8 post-infection. Data for each individual mouse and the mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 4-7$ mice per group) is represented. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test after log transformation of the data. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ compared to BALB/c mice.

Fig. 4 Representative flow cytometry plots illustrating the gating strategy used to differentiate infiltrating leukocytes in the CNS of mice. (a) Single cells were isolated from live cell population and further distinguished into resident microglia (gate A) and infiltrating leukocytes (gate B). (b) Infiltrating leukocytes population were differentiated into dendritic cells (DCs; gate C) that were separated into conventional DCs (cDCs; gate D) and plasmacytoid DCs (pDCs; gate E). (c) The non-DC cells were first distinguished into B cells (gate F). The remaining cell population was differentiated into natural killer cells (NK; gate G), natural killer T cells (NKT; gate H) and T cells (gate I) whereas neutrophils (gate J) corresponded to Ly6G^{pos} cells. (d) Total monocytes (gate K) were selected in the Ly6G^{neg} cells and inflammatory monocytes (gate L) were then separated from intermediate monocytes (gate M) and patrolling monocytes (gate N). SSC, side scattered; FSC, forward scattered

Fig. 5 Infiltration patterns of peripheral blood leukocytes in the CNS of mice infected with HSV-1. Mice were infected intranasally with 1×10^3 PFUs (BALB/c mice (●)) or with 5×10^5 PFUs (C57BL/6-high mice (▲)) of HSV-1 strain H25. The infiltration of peripheral blood leukocytes in the CNS of non-infected animals (i.e., day 0) and subsets of infected mice sacrificed on days 4, 6 and 8 after infection was determined by flow cytometry analyses. The percentages of CD45^{high} infiltrating leukocytes (a) were calculated with respect of total live cells whereas the percentages of individual cell types (b to g) were expressed with respect to total CD45^{high} infiltrating leukocytes. Data represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 4 to 5 mice per time point. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-test. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ compared to BALB/c mice

Figure 1:

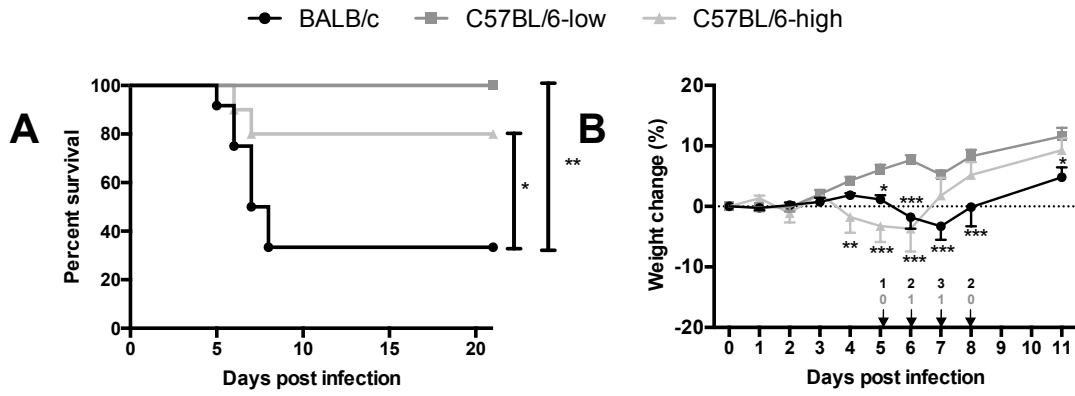


Figure 2:

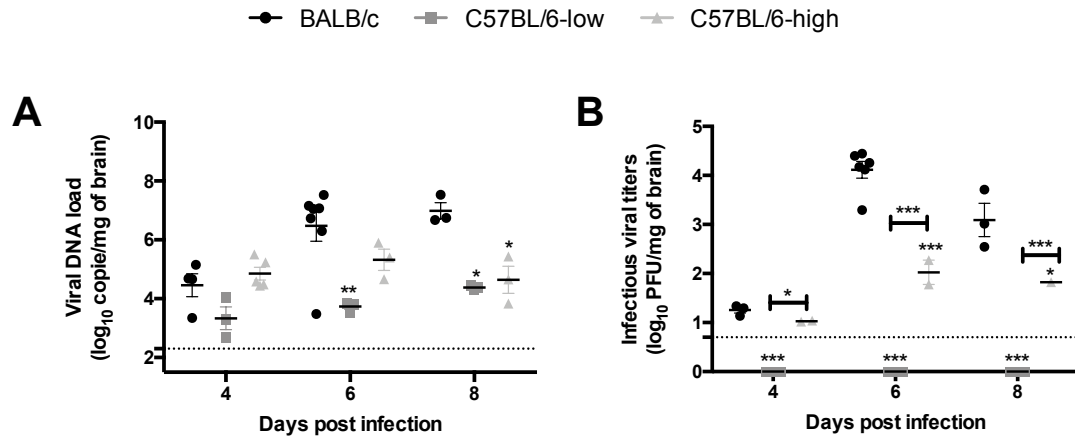
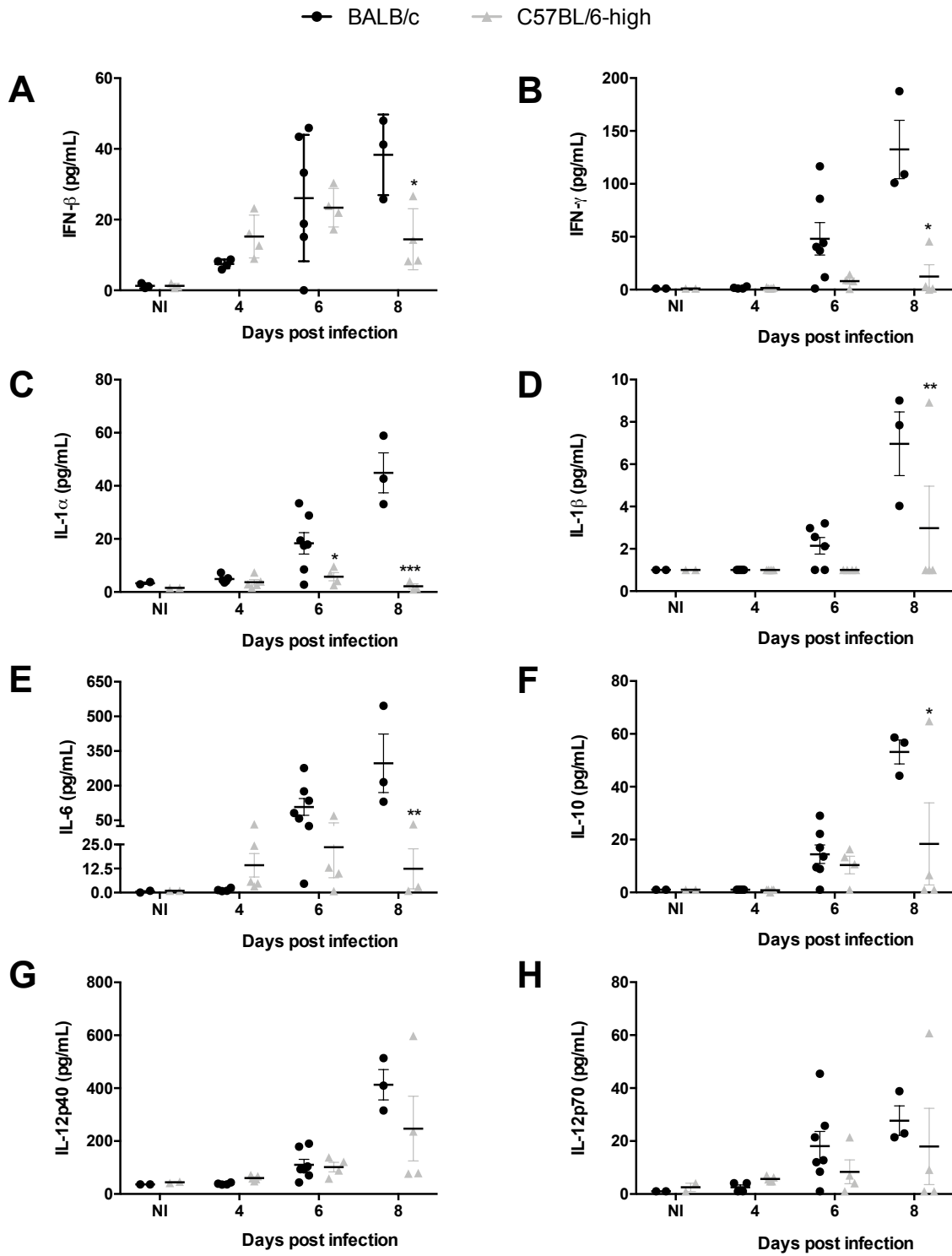


Figure 3:



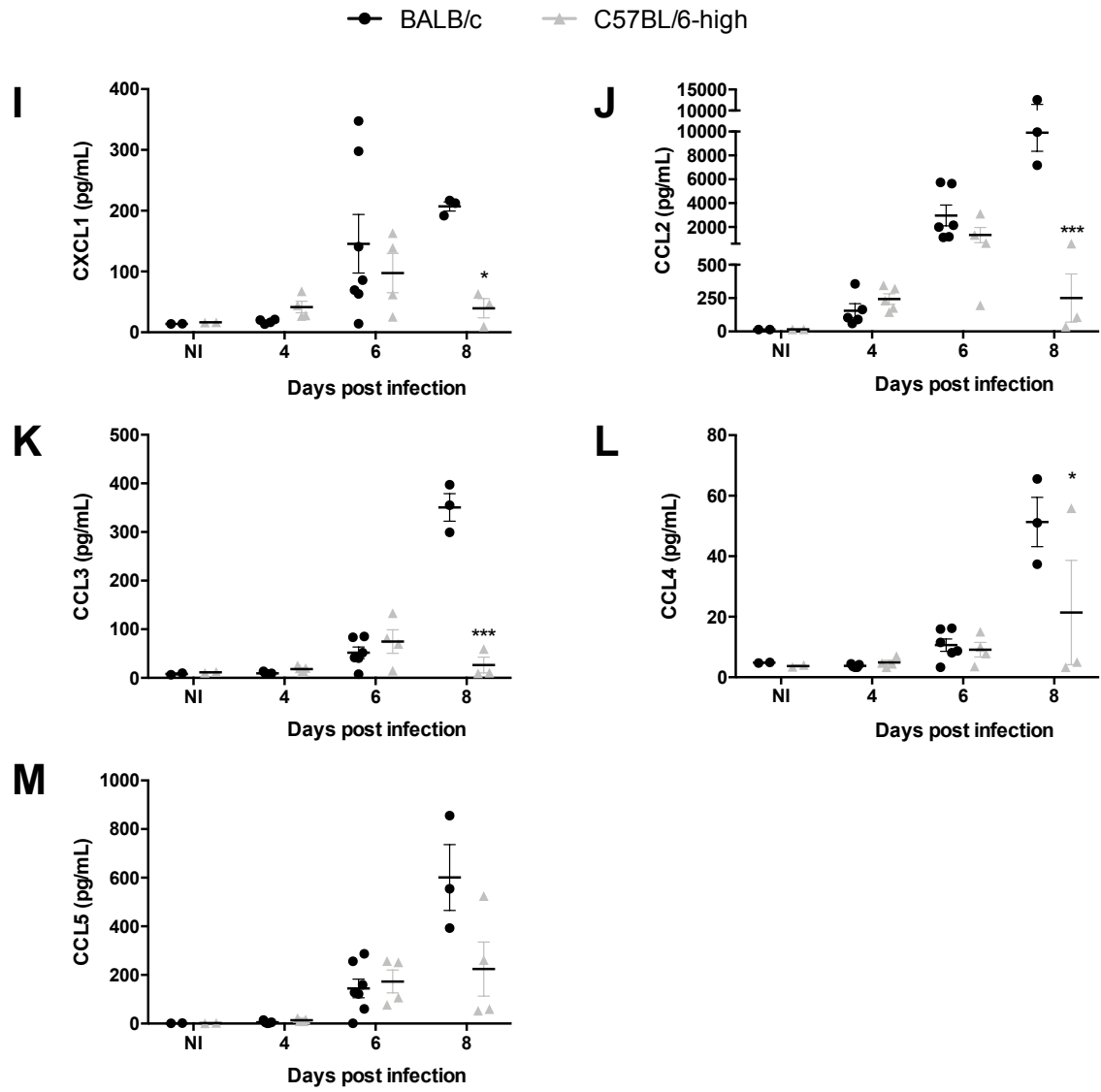


Figure 4:

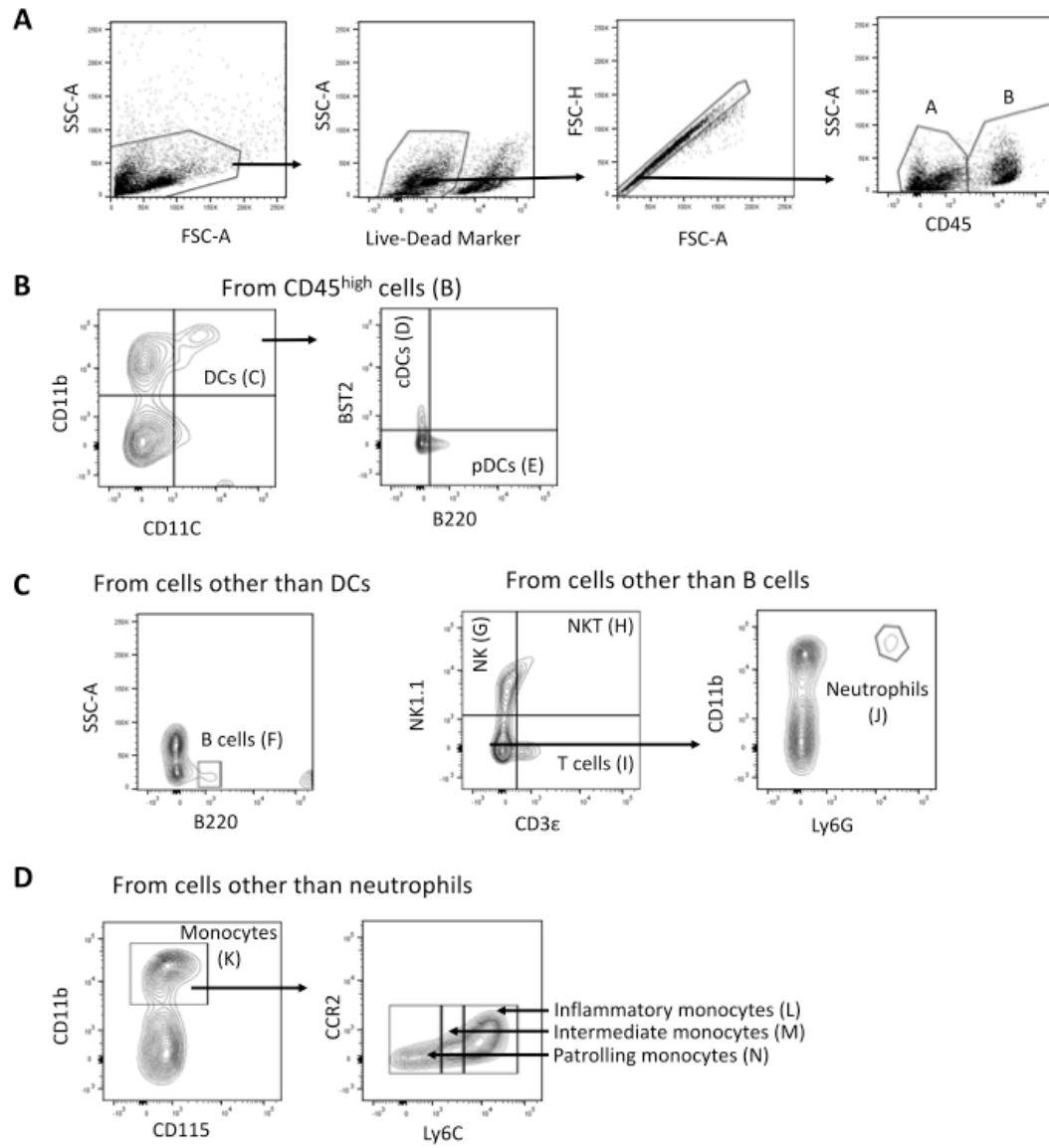
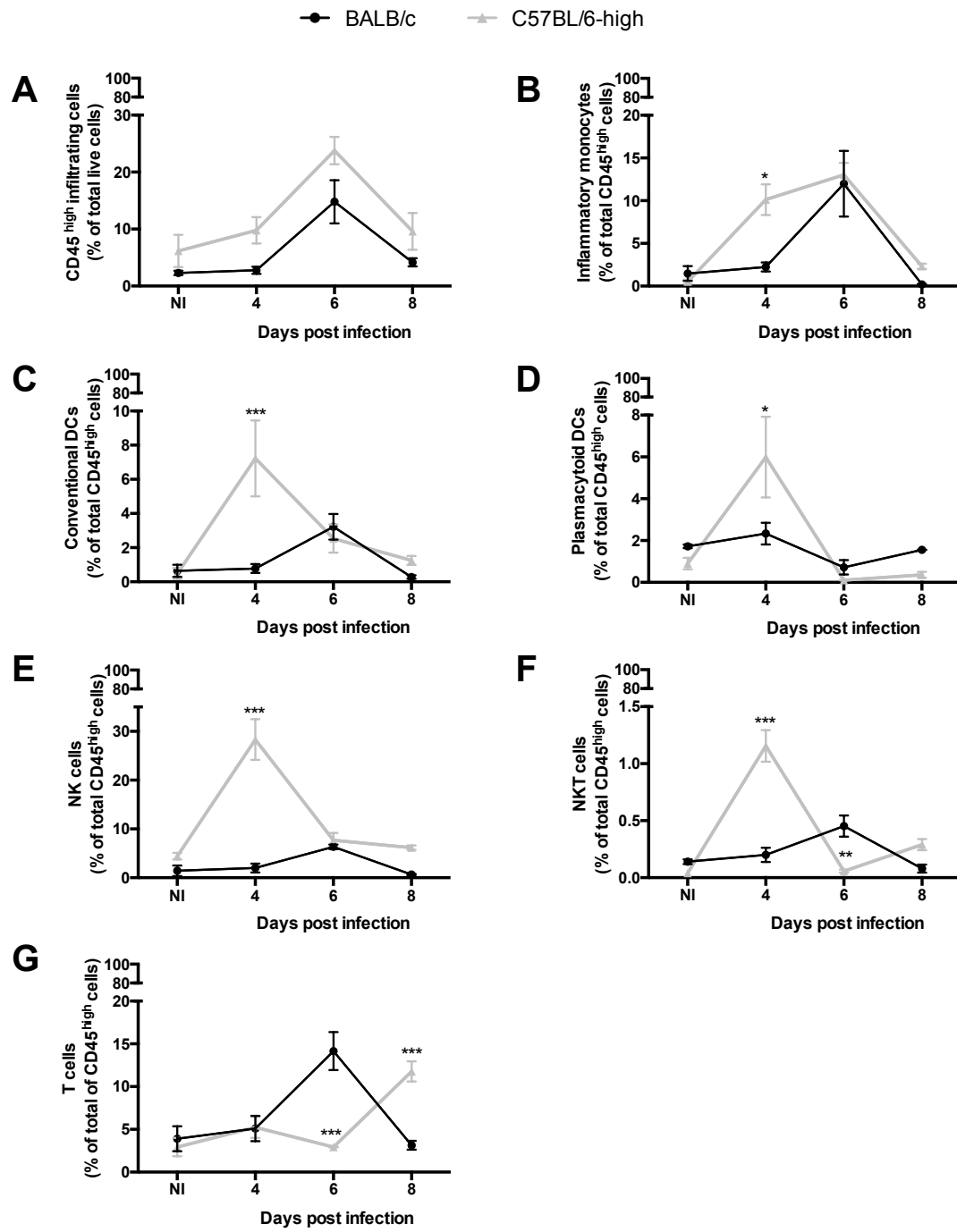


Figure 5



Chapitre II : La résistance naturelle des souris C57BL/6, par la réponse interféron de type I, dépend de la voie de signalisation en aval des facteurs de transcription IRF3 et surtout IRF7.

I Avant-propos

Ce chapitre correspond à la communication intitulée « *Both IRF3 and Especially IRF7 Play a Key Role to Orchestrate an Effective Cerebral Inflammatory Response in a Mouse Model of Herpes Simplex Virus Encephalitis* » publiée en 2018 dans le « *Journal of NeuroVirology* » (PMID : 30094631, DOI : 10.1007/s13365-018-0666-9). J'en suis la première auteure et l'article est présenté tel que publié. Dans le cadre de cet article, j'ai réalisé les expériences animales, les qPCR, l'évaluation des titres viraux, le dosage de l'IFN de type I par ELISA et des autres cytokines et chimiokines par Luminex. J'ai également travaillé, sans succès, à la mise au point du WB pour mettre en évidence l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Chantal Rhéaume m'a supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Manon Lebel a refait les WBs, sans parvenir à des résultats interprétables. Le Dr Gosselin nous a fourni les souris déficientes en IRF3 ou IRF7 et a fait une relecture de l'article avant soumission. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

II Résumé

Les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) 3 et 7 jouent un rôle central dans la réponse à l'IFN de type I. L'impact d'une déficience en IRF3 et IRF7 a été évalué dans un modèle expérimental d'HSE. Les taux de mortalité des souris déficientes sont significativement plus élevés que ceux des souris « *wild type* » (WT) et sont associés à des titres viraux infectieux significativement augmentés dans les cerveaux. À des temps précoces après l'infection, la production d'IFN- β était respectivement significativement et marginalement réduite chez les souris IRF7^{-/-} et IRF3^{-/-} par rapport aux WT. À des temps plus tardifs, les niveaux d'IFN-I et d'une série de médiateurs inflammatoires, incluant l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ et CCL2 sont augmentés dans les cerveaux des deux types de souris déficientes par rapport aux WT. Nos résultats suggèrent qu'IRF3, et surtout IRF7, sont des composants clés pour orchestrer les réponses IFN de type I et inflammatoires précoces au cours de l'HSE.

III Article scientifique

Title Page

Both IRF3 and Especially IRF7 Play a Key Role to Orchestrate an Effective Cerebral Inflammatory Response in a Mouse Model of Herpes Simplex Virus Encephalitis

Coraline Canivet¹, Chantal Rhéaume¹, Manon Lebel², Jocelyne Piret¹, Jean Gosselin² and Guy Boivin^{1*}

¹ Research Center in Infectious Diseases of the CHU of Quebec and Laval University, 2705 Boul. Laurier, Quebec City, QC, Canada, G1V 4G2

² Laboratory of Innate Immunology of the CHU of Quebec and Laval University, 2705 Boul. Laurier, Quebec City, QC, Canada, G1V 4G2

* Corresponding author: Guy Boivin, MD, M.Sc., FRCP

E-mail: Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Tel.: +1-418-654-2705

Fax: +1-418-654-2715

Keywords: Herpes simplex virus encephalitis; cerebral inflammation; interferon; interferon-regulatory factors; mouse.

Abstract

The impact of a deficiency in interferon regulatory factor (IRF)3 and IRF7 was evaluated in an herpes simplex virus encephalitis (HSE) model. Compared to wild type (WT), the mortality rates of infected IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-} mice were higher and associated with increased brain viral titers. At a critical time post-infection, IRF7^{-/-} mice exhibited a deficit in IFN- β production. At a later time point, levels of type I IFNs and cytokines were increased in brains of both deficient mice compared to WT. Our results suggest that IRF3, and especially IRF7, are important for an effective control of inflammatory responses during HSE.

Introduction

Herpes simplex virus encephalitis (HSE) is the most common cause of lethal viral encephalitis in Western countries (Tyler 2004). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is responsible for 90% of HSE cases in adults (Rozenberg et al. 2011). HSE consists in a diffuse inflammatory process in the central nervous system (CNS) parenchyma associated with cerebral dysfunction. In the absence of antiviral treatment, the mortality rate is estimated to be 70%. Despite early intravenous administration of acyclovir, the mortality is still close to 30% with only 40% of survivors resuming their normal activity (Kennedy and Steiner 2013). The pathogenesis of HSE remains incompletely understood. It is believed that the high mortality rate associated with this disease could involve both virally- and immune-induced brain damage (Conrady et al. 2010; Piet and Boivin 2015)

The innate immune response constitutes the first line of host defenses that limits viral spread. HSV components are sensed via distinct pattern recognition receptors (PRRs) (Paludan et al. 2011) such as Toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), gamma-interferon-inducible protein 16 (IFI16), absent in melanoma 2 (AIM2) and DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (DAI). The detection of different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of HSV by these PRRs triggers signaling pathways and the activation of transcription factors such as the nuclear factor (NF)- κ B and interferon (IFN) regulatory factor (IRF) family members leading to the secretion of effector cytokines, chemokines and type I IFNs (Brennan and Browie 2010).

Type I interferons play a major role in the host innate immune response to HSV infection (Sorgeloos et al. 2013). In this respect, both humans and mice lacking components of the IFN production pathways demonstrate an increased susceptibility to HSE (Zhang et al. 2013). The positive regulatory *cis*-elements in the promoter region of IFN- β gene constitute virus inducible enhancers and some of them are known to bind members of the IRF family, especially IRF3 and IRF7 (Paludan et al. 2011). IRF3 is a constitutively expressed protein present in the cytoplasm as an inactive monomer whereas only small amounts of IRF7 are found in most cell types and its synthesis is strongly induced by type I IFN-mediated signaling. Upon activation, phosphorylated IRF3 and IRF7 assemble into homodimers or heterodimers, which translocate to the nucleus. These IRF complexes are involved in the production of large amounts of IFN- α and - β . Type I IFNs then induce the expression of interferon-stimulated genes in infected and neighboring non-infected cells. Interestingly, an increased susceptibility to HSE has been reported in a patient with a functional IRF3 deficiency (Andersen et al. 2015). Our group has previously shown that both IRF3 and IRF7 seem to participate in IFN- β secretion in the brain during HSE by using mice deficient for the adaptor proteins Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain-containing adaptor inducible IFN- β (TRIF) and IFN- β promoter stimulator-1 (IPS-1) (Menasria et al. 2013).

However, it has not been clearly demonstrated which of these two IRFs plays a predominant role in type I IFN production in response to HSV infection.

In the present study, we investigated the differential role of IRF3 and IRF7 during HSE using mice deficient for each transcription factor. In parallel, we also determined the kinetics of viral replication, type I IFN synthesis and cytokine/chemokine levels in brain homogenates by plaque assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and magnetic bead-based immunoassay, respectively.

Materials and Methods

Five- to six-week-old male mice deficient for IRF3 (provided by Dr. Karen Mossman (McMaster University, ON, Canada)) and IRF7 (obtained from Dr. Tadatsugu Taniguchi (University of Tokyo, Tokyo, Japan)) (Honda et al. 2005; Sato et al. 2000) as well as C57BL/6 wild type (WT) animals (purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada)) were infected by the intranasal route with 5×10^5 plaque forming units (PFUs; in a 20 μ L volume) of the neurovirulent clinical HSV-1 strain H25 described elsewhere (Sergeie et al. 2007b). Mice were monitored for weight loss, clinical signs of infection (i.e., isolation with no social interaction, limited movements, swollen eyes, neurological disorders, convulsions) and mortality for 21 days. Animals were sacrificed when a weight loss greater than 20% or two obvious neurological signs were observed. In order to evaluate the effect of a deficiency in IRF3 or IRF7 on infectious viral titers, IFN- α and - β synthesis as well as cytokine and chemokine levels in the brain, subsets of mice were sacrificed prior to (non-infected) and on days 3, 4 and 5 post-infection (p.i.) by intracardiac perfusion with cold 0.9% saline. Brains were harvested and homogenized in phosphate-buffered saline containing protease (cOmplete™) and phosphatase (PhosSTOP™) inhibitor cocktails (both from Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Infectious viral titers were determined in brain homogenates by plaque assays on Vero cells (Canivet et al. 2015). Brain homogenates were centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. The levels of IFN- α /- β proteins and cytokines/chemokines were respectively measured in supernatants by ELISA (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and the Bio-Rad Bio-Plex mouse cytokine group I plex assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using the Bio-Plex system equipped with the Bio-Plex Manager Software v6.0 (Bio-Rad Laboratories).

All animals were used in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines, and all procedures were approved by the Animal Care Ethics Committee of Laval University (protocol no. 2013-078).

Results

Fig. 1a shows that the survival rates of IRF3^{-/-} (10%) and IRF7^{-/-} (0%) mice were significantly lower than that of C57BL/6 WT animals (70%; both $P \leq 0.001$). Differences in weight losses between IRF3^{-/-} and WT animals were statistically significant on days 3 (-16.5% versus -9.6%; $P \leq 0.05$), 4 (-17.9% versus -7.8%; $P \leq 0.001$) and 5 (-17.9% versus -8.4%; $P \leq 0.05$) p.i. Differences in weight losses between IRF7^{-/-} and WT mice were significant on day 5 p.i. (-23.0% versus -8.4%; $P \leq 0.001$; Fig. 1b) and not evaluable subsequently due to death of all IRF7^{-/-} mice. The influence of IRF3 or IRF7 deficiency on the control of viral replication was then evaluated in brain homogenates of the three groups of mice. Infectious viral titers were significantly increased in IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-} mice compared to WT animals on days 3 ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively), 4 ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively) and 5 (both $P \leq 0.001$) p.i. (Fig. 1c). Notably, no significant difference in the infectious viral titers was observed between the two groups of deficient mice. These results suggest that the recognition pathways involving these two transcription factors are important for the control of viral replication.

The contributing role of IRF3 and IRF7 transcription factors on the synthesis of type I IFNs was evaluated in brain homogenates of the three groups of mice on days 3 and 5 p.i. (Fig. 2). On day 3 p.i., levels of IFN- α in IRF7^{-/-} animals were lower (not significantly) than those of the WT group and significantly reduced compared to IRF3^{-/-} mice ($P \leq 0.01$). Subsequently, levels of IFN- α increased in IRF7^{-/-} (not significantly) and IRF3^{-/-} mice ($P \leq 0.05$) compared to WT on day 5 p.i. (Fig. 2a). On the other hand, levels of IFN- β were lower in IRF3^{-/-} (not significantly) and IRF7^{-/-} ($P \leq 0.01$) animals compared to the WT on day 3 after infection. Subsequently, levels of IFN- β were higher in IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-} animals (both $P \leq 0.001$) compared to the WT group on day 5 p.i. (Fig. 2b). Overall, these data indicate that, at a time critical to control viral replication in the brain, deficiency in the IRF7 pathway results in an altered production of IFN- β whereas deficiency in IRF3 is only associated with a marginal decreased synthesis. At a later time point, deficiencies in IRF3 and IRF7 are associated with an increased production of both IFN- α and - β suggesting the presence of alternative/compensatory IFN pathways.

In order to further evaluate the impact of a lack of IRF3 or IRF7 on the innate immune response during HSE, the production of a series of inflammatory mediators was determined in brain homogenates of the three groups of mice on day 5 p.i. at the time of peak infectious viral titers. Levels of IL-1 α ($P \leq 0.01$), IL-1 β , IL-6, IL-12p40 ($P \leq 0.001$ for the three), IL-12p70 and IFN- γ (both $P \leq 0.01$) were higher in IRF3^{-/-} mice compared to WT. In IRF7^{-/-} mice, levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ($P \leq 0.001$ for the three), IL-12p40 ($P \leq 0.05$), IL-12p70, IFN- γ (both $P \leq 0.001$) and tumor necrosis factor- α (TNF- α ; $P \leq 0.05$) were higher compared to the WT group. Interestingly, levels of some cytokines were lower in IRF3^{-/-} than IRF7^{-/-} mice such as IL-1 β ($P \leq 0.001$) and IL-6 ($P \leq 0.05$) whereas the inverse was seen for IL-12p40 ($P \leq 0.001$) (Fig. 3a to g). The levels of C-C motif chemokine ligand

(CCL)2 ($P \leq 0.001$), CCL3 ($P \leq 0.01$), CCL4 ($P \leq 0.05$) and CCL5 ($P \leq 0.001$) were significantly higher in IRF3^{-/-} compared to WT mice. Similarly, the levels of CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 ($P \leq 0.001$ for the four) were higher in IRF7^{-/-} mice compared to the WT group (Fig. 3h to k). Overall, these results suggest that the inflammatory process was uncontrolled in the brain of both IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-} mice infected with HSV-1.

Discussion

Using the intranasal route of inoculation, we showed that IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-} mice were more susceptible to infection with a neurovirulent strain of HSV-1 than C57BL/6 WT animals. These higher mortality rates were associated with increased infectious viral titers in the brain of both deficient mice compared to WT. Our data also suggest that the loss of control of viral replication observed in IRF7^{-/-} mice could be associated with a lack of IFN- β production at a critical time after infection (day 3). An overexpression of type I IFNs, pro-inflammatory cytokines and chemokines was observed in the CNS of both deficient mice at a later time (day 5).

Previous studies have already shown the critical role of type I IFNs in host immunity to HSV-1 infection in murine models. A lack of type I IFN response induced an increase in ocular virus titers after corneal inoculation of HSV-1 (Leib et al. 1999). Furthermore, HSV-1 was able to progress from a localized infection to a disseminated disease affecting multiple organs following corneal or foot pad infection of mice deficient for type I IFN receptors (Bryant-Hudson et al. 2013; Luker et al. 2003). In the present study, an alteration of IFN- β production was observed in IRF7^{-/-} animals on day 3 post-infection and could explain the loss of control of viral replication in the brain. However, the increased susceptibility of mice deficient for IRF3 was not associated with a significant alteration in the synthesis of type I IFNs in the CNS at the selected time points. Other groups have reported that IRF3 is critical for the control of HSV-1 replication in a cultured cell line (Chew et al. 2009) and cells of the murine immune system (Menachery and Leib 2009). Furthermore, the mortality rate of IRF3^{-/-} mice infected intracranially with HSV-1 was increased compared to WT and associated with a deficit of both IFN- α and - β production in the brain (Menachery et al. 2010). This difference could be linked to the viral strain, viral inoculum and route of inoculation used in the two studies (1×10^6 PFUs of HSV-1 strain 17 inoculated intracranially *versus* 5×10^5 PFUs of HSV-1 strain H25 administered intranasally in our experiment) as well as the time of measurement of IFN- α /- β levels in the CNS (12 and 18 h *versus* 3 and 5 days post-infection in our study).

Upon activation, IRF3 and IRF7 can form homodimers or heterodimers and these dimers exert differential effects on the expression of type I IFN genes (Lin et al. 2000). Activated IRF7 could also form a transcriptional complex enhanceosome with NF- κ B, c-Jun, activating transcription factor 2 (ATF-2) and p300-cAMP response element-binding (CREB) protein in the promoter region of type I IFN genes (Panne et al. 2007).

This suggests that the production of type I IFNs could be more affected in mice lacking IRF7 than IRF3 as seen in our study. It was already reported that the impact of a deficiency in IRF7 on the mortality rates was greater than that of IRF3 following corneal inoculation of HSV-1 although both transcription factors were required for the control of viral replication, the modulation of inflammatory response and thus, the prevention of a severe systemic inflammation (Murphy et al. 2013). Furthermore, it was suggested that IRF7 could be critical for the cytosolic pathway of type I IFN gene induction and that the contribution of IRF3 could be minor in the absence of IRF7 using plasmacytoid dendritic cells differentiated *ex vivo* and a murine model of intravenous infection with HSV-1 (Honda et al. 2005).

Despite the fact that the roles of IRF3 and IRF7 were shown to be non-redundant in murine embryonic fibroblasts infected with HSV-1 (Sato et al. 2000), we cannot exclude that they can compensate for each other in our deficient mice during HSE. On the other hand, other transcription factors such as IRF1 (Barnes et al. 2002), NF- κ B (Karin and Delhase 2000) and the complex of ATF-2/c-Jun (Chu et al. 2009) are positive regulators of type I IFN synthesis. The promoter of IFN- β gene is composed of at least four positive regulation domains (PRDs) named I to IV. It has been shown that IRF3, IRF7 (Barnes et al. 2002; Sato et al. 1998), and especially IRF1 (Fujita et al. 1989; Reis et al. 1992), bind to PRDI and PRDIII, whereas NF- κ B (Karin and Delhase 2000) interacts with PRDII and dimers of ATF-2 and c-Jun (Chu et al. 1999; Iordanov et al. 2000) bind to PRDIV. Thus, these transcription factors could also compensate for the lack of IRF3 and IRF7.

Later in the course of infection, the production of IFN- α and - β was higher in the brain of both groups of deficient mice than that of WT animals. The transient increased production of IFN- α could be harmful to the CNS of deficient mice. Indeed, IFN- α neurotoxicity has been implicated in several diseases such as systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis or various types of encephalitis (Fritz-French and Tylor 2012). Furthermore, blocking IFN- α with intraperitoneal injections of IFN- α neutralizing antibodies in a human immunodeficiency virus encephalitis mouse model significantly improved cognitive functions and decreased microgliosis in the brain (Sas et al. 2009).

At a later time post-infection, an overexpression of pro-inflammatory cytokines and chemokines (which mirrored the viral titers) was also observed in brain tissue of mice deficient for IRF3 and IRF7. Such an increase could induce cerebral damage and thus lead to a higher mouse susceptibility to infection as already reported in mice deficient for TLR2 (Kurt-Jones et al. 2004). It has been previously shown that cerebral inflammation could be, in part, responsible for brain damage during experimental HSE (Lundberg et al. 2008). In this respect, treatment with immunomodulatory drugs such as glucocorticoids, an anti-TNF- α antibody, artesunate and rapamycin improved the outcome of experimental HSE (Boivin et al. 2013 ; Canivet et al. 2015; Sergerie et al. 2007a).

In conclusion, the increased mortality rate observed in IRF7^{-/-} mice is associated with an alteration of IFN- β response at a time critical to control viral replication in the brain after intranasal inoculation with HSV-1 compared to WT animals. A less effective control of viral replication in the nasal mucosa could have also occurred in deficient mice compared to WT but this parameter was not evaluated in our study. Furthermore, the subsequent higher production of type I IFNs in both deficient mice is accompanied with an increased cerebral inflammatory response suggesting that other transcription factors could be involved during HSE. However, studies comparing the effects of a double deficiency in these IRFs (i.e., IRF3^{-/-}xIRF7^{-/-} (Murphy et al. 2013)) and those of mice lacking an adaptor protein and a transcription factor (i.e., TRIF^{-/-}xIRF3^{-/-} and TRIF^{-/-}xIRF7^{-/-}) are required to definitely identify the role of other signaling pathways in the cerebral innate immune response following intranasal infection with HSV-1.

Acknowledgments

We would like to thank Julie-Christine Lévesque from Luminex technology platform of Research Center of the CHU of Quebec-Laval University for assistance in Bio-Plex system, Bio-Plex manager software and cytokine quantification.

This study was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B.). G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abbreviations

AIM2, absent in melanoma 2; ANOVA, analysis of variance; ATF-2, activating transcription factor 2; CCL, C-C motif chemokine ligand; CNS, central nervous system; CREB, cAMP response element-binding protein; DAI, DNA-dependent activator of interferon regulatory factors; HSE, herpes simplex virus encephalitis; HSV, herpes simplex virus; IFI16, gamma-interferon-inducible protein 16; IFN, interferon; IPS-1, interferon- β promoter stimulator-1; IL, interleukin; IRF, interferon regulatory factor; MDA5, melanoma differentiation-associated gene 5; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NI, non-infected; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; p.i., post-infection; PRD, positive regulation domain; PRRs, pathogen recognition receptors; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TRIF, Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducible interferon- β ; WT, wild type.

References

- Andersen LL, Mork N, Reinert LS, Kofod-Olsen E, Narita R, Jorgensen SE, Skipper KA, Honing K, Gad HH, Ostergaard L, Orntoft TF, Hornung V, Paludan SR, Mikkelsen JG, Fujita T, Christiansen M, Hartmann R, Mogensen TH (2015). Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. *J Exp Med* 212: 1371-9.
- Barnes B, Lubyova B, Pitha PM (2002). On the role of IRF in host defense. *J Interferon Cytokine Res* 22:59-71.
- Boivin N, Menasria R, Piret J, Rivest S, Boivin G (2013). The combination of valacyclovir with an anti-TNF alpha antibody increases survival rate compared to antiviral therapy alone in a murine model of herpes simplex virus encephalitis. *Antiviral Res* 100: 649-53.
- Brennan K, Bowie AG (2010). Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol* 13: 503-7.
- Bryant-Hudson KM, Chucair-Elliott AJ, Conrady CD, Cohen A, Zheng M, Carr DJJ (2013). HSV-1 targets lymphatic vessels in the eye and draining lymph node of mice leading to edema in the absence of a functional type I interferon response. *Am J Pathol* 183:1233-1242.
- Canivet C, Menasria R, Rheaume C, Piret J, Boivin G (2015). Valacyclovir combined with artesunate or rapamycin improves the outcome of herpes simplex virus encephalitis in mice compared to antiviral therapy alone. *Antiviral Res* 123:105-113.
- Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol* 46: 393-9.
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 11: 721-31.
- Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ (2010). Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *J Neuroimmunol* 220:1-9.
- Fritz-French C, Tyor W (2012). Interferon- α (IFN α) neurotoxicity. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:7-14.
- Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumian EL, Taniguchi T (1989). Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* 337: 270-2.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772-7.
- Iordanov MS, Paranjape JM, Zhou A, Wong J, Williams BR, Meurs EF, Silverman RH, Magun BE (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol* 20: 617-27.
- Karin M, Delhase M (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 12:85-98.
- Kennedy PG, Steiner I (2013). Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol* 19: 346-50.
- Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW (2004). Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1315-20.

- Leib DA, Harrison TE, Laslo KM, Machalek MA, Moorman NJ, Virgin HW (1999). Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *J Exp Med* 189: 663-72.
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J (2000). Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem* 275: 34320-7.
- Luker GD, Prior JL, Song J, Pica CM, Leib DA (2003). Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *J Virol* 77: 11082-93.
- Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM (2008). The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol* 82: 7078-88.
- Menachery VD, Leib DA (2009). Control of herpes simplex virus replication is mediated through an interferon regulatory factor 3-dependent pathway. *J Virol* 83: 12399-406.
- Menachery VD, Pasieka TJ, Leib DA (2010). Interferon regulatory factor 3-dependent pathways are critical for control of herpes simplex virus type 1 central nervous system infection. *J Virol* 84: 9685-94.
- Menasria R, Boivin N, Lebel M, Piret J, Gosselin J, Boivin G (2013). Both TRIF and IPS-1 adaptor proteins contribute to the cerebral innate immune response against herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* 87: 7301-8.
- Murphy AA, Rosato PC, Parker ZM, Khalenkov A, Leib DA (2013). Synergistic control of herpes simplex virus pathogenesis by IRF-3, and IRF-7 revealed through non-invasive bioluminescence imaging. *Virology* 444: 71-9.
- Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA (2011). Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 11: 143-54.
- Panne D, Maniatis T, Harrison SC (2007). An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 129: 1111-23.
- Piret J, Boivin G (2015). Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Rev Med Virol* 25: 300-19.
- Reis LF, Harada H, Wolchok JD, Taniguchi T, Vilcek J (1992). Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. *EMBO J* 11: 185-93.
- Rozenberg F, Deback C, Agut H (2011). Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infect Disord Drug Targets* 11: 235-50.
- Sas AR, Bimonte-Nelson H, Smothers CT, Woodward J, Tyor WR (2009). Interferon-alpha causes neuronal dysfunction in encephalitis. *J Neurosci* 29 : 3948-55.
- Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441: 106-10.
- Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13: 539-48.
- Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S (2007). Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis* 195: 817-25.
- Sergerie Y, Rivest S, Boivin G (2007). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 196: 853-60.
- Sorgeloos F, Kreit M, Hermant P, Lardinois C, Michiels T (2013). Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system. *Viruses* 5: 834-57.

Tyler KL (2004). Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis* 1: 169-78.
Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Abel L, Casanova JL (2013). TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol* 25:19-33.

Legends to Figures

Fig. 1 Effect of deficiency in IRF3 or IRF7 on mouse survival rates (a) and percentage of body weight changes (b) as well as infectious viral titers in brain homogenates (c) after infection with HSV-1. C57BL/6 WT (●), IRF3^{-/-} (■) and IRF7^{-/-} (▲) mice were infected intranasally with 5x10⁵ PFUs of HSV-1 strain H25. In panel (a), the differences in survival rates were evaluated using a Log-Rank (Mantel-Cox) test (n = 8-10 mice per group). In panel (b), the differences in body weight changes were evaluated using a two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison post-test. The digits above the arrows represent the numbers of dead mice on the indicated day for each group. In Panel (c), data for each individual mouse and the means ± SEM (n = 5-6 mice per group) are represented. The differences in infectious viral titers were evaluated using a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data. Dotted line represents the limit of detection of the assay (i.e., 5 PFUs per well). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software v6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistically significant results are indicated as follows: *, P≤0.05; **, P≤0.01; ***, P≤0.001 compared to C57BL/6 WT

Fig. 2 Implication of IRF3 or IRF7 deficiency on synthesis of IFN-α (a) and IFN-β (b) in brain homogenates of mice infected with HSV-1. C57BL/6 WT (●), IRF3^{-/-} (■) and IRF7^{-/-} (▲) mice were infected intranasally with 5x10⁵ PFUs of HSV-1 strain H25. Data for each individual mouse and the means ± SEM (n = 5-6 mice per group) are represented. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data (GraphPad Prism Software v6). Statistically significant results are indicated as follows: *, P≤0.05; **, P≤0.01; ***, P≤0.001 compared to C57BL/6 WT or between indicated groups. NI, non-infected

Fig. 3 Implication of IRF3 or IRF7 deficiency on synthesis of cytokines (a to g) and chemokines (h to k) in brain homogenates of mice infected with HSV-1. C57BL/6 WT (●), IRF3^{-/-} (■) and IRF7^{-/-} (▲) mice were infected intranasally with 5x10⁵ PFUs of HSV-1 strain H25. Data for each individual mouse and the means ± SEM (n = 5-6 mice per group) are represented. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data (GraphPad Prism Software v6). Statistically significant results are indicated as follows: *, P≤0.05; **, P≤0.01; ***, P≤0.001 compared to C57BL/6 WT or between indicated groups. NI, non-infected

Figure 1 :

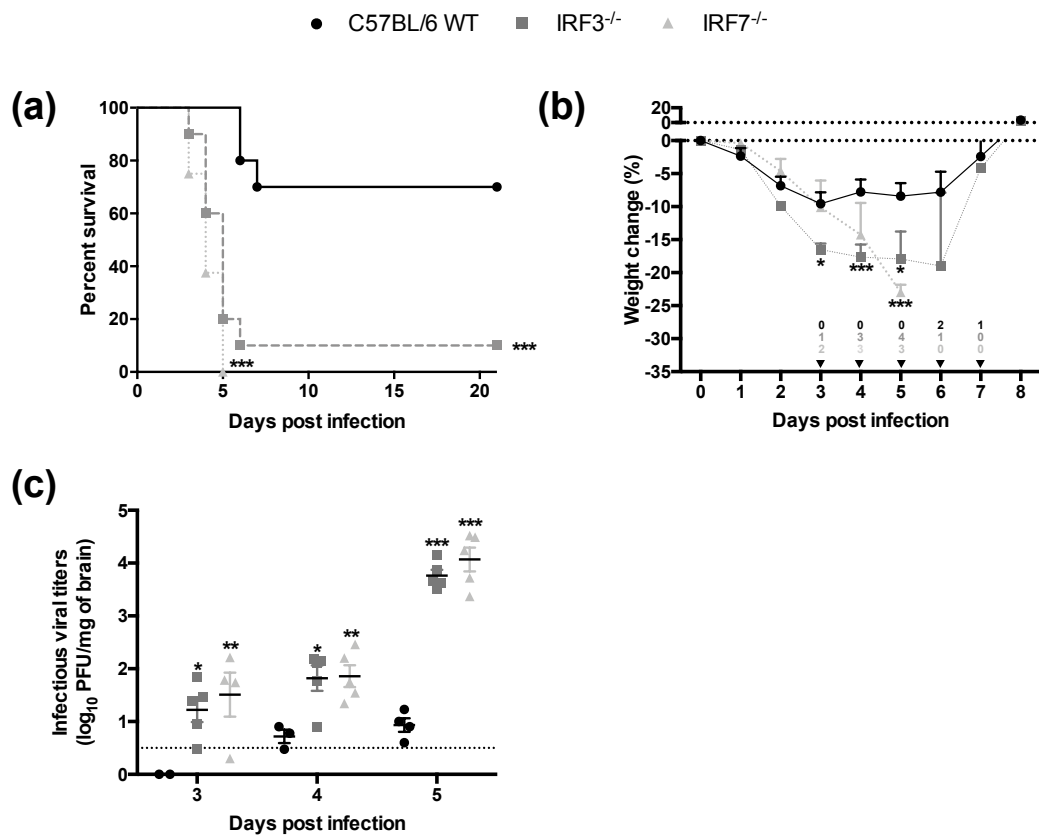


Figure 2 :

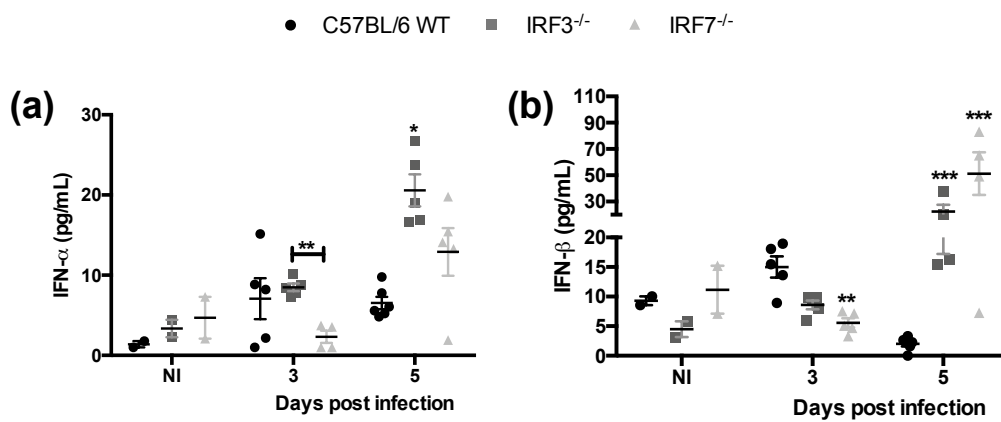
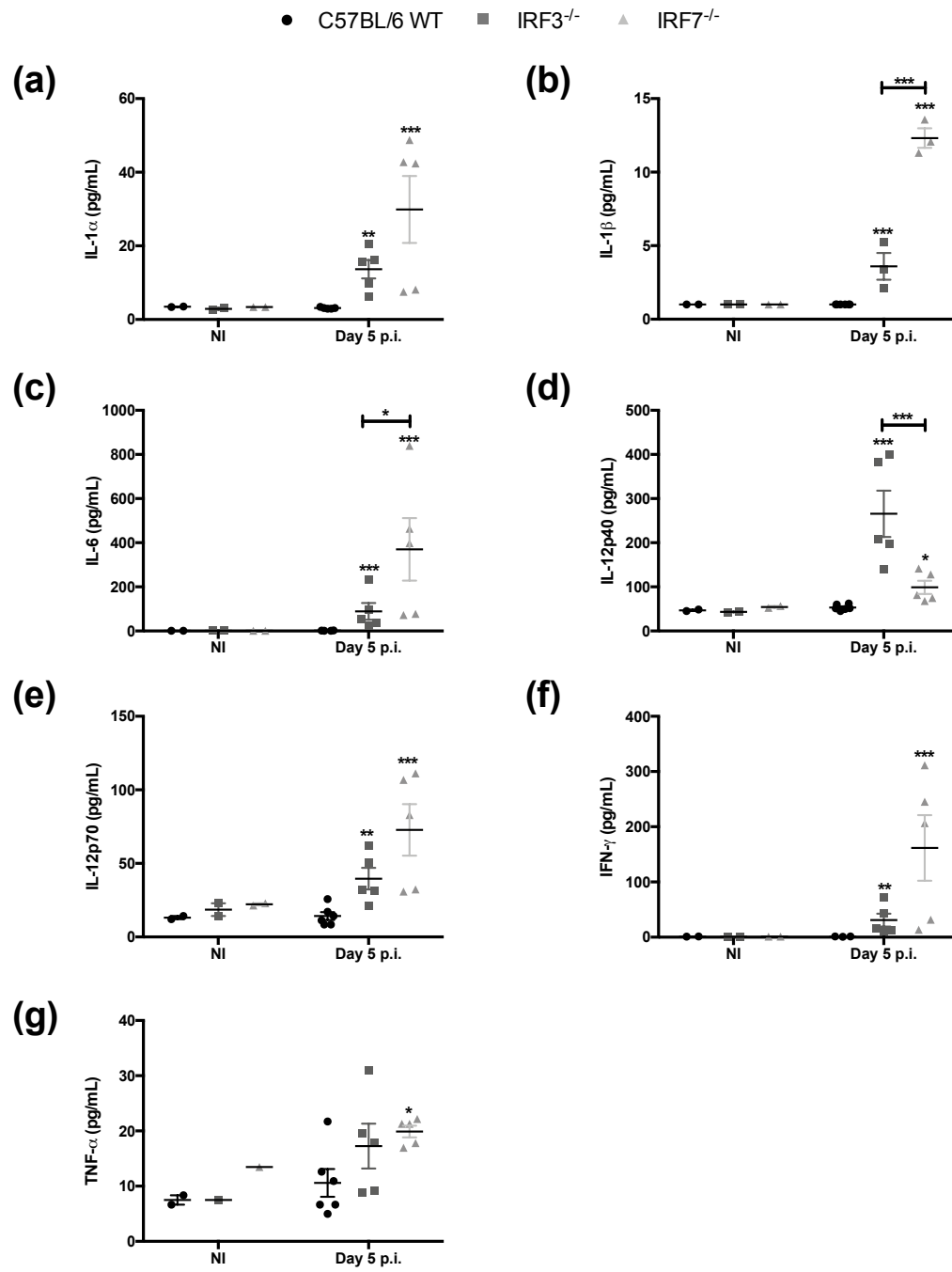
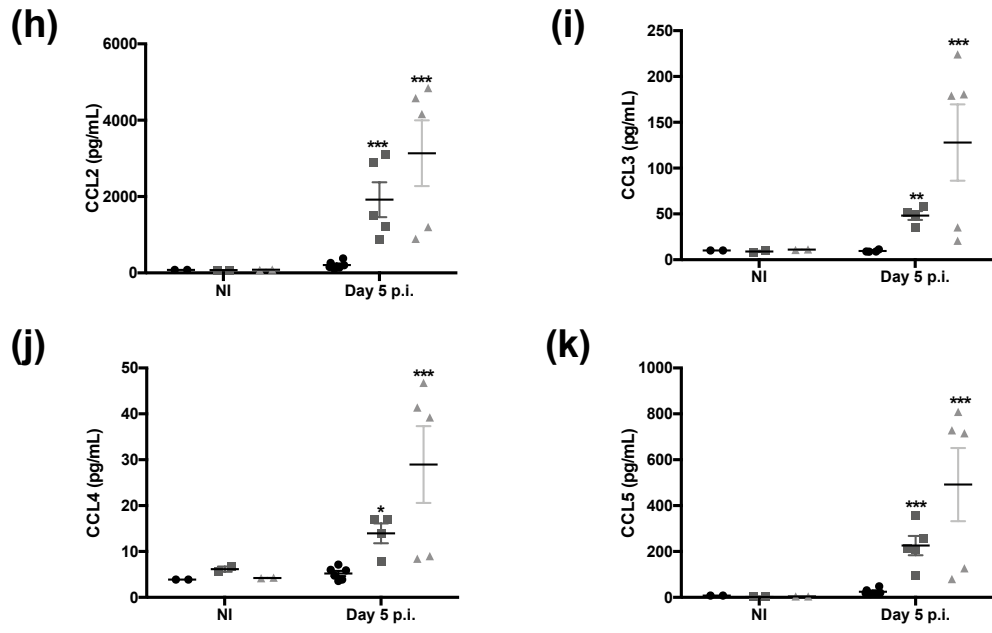


Figure 3 :



● C57BL/6 WT ■ IRF3^{-/-} ▲ IRF7^{-/-}



Chapitre III : La modulation de la réponse inflammatoire associée à un traitement antiviral permet une amélioration du pronostic de l'encéphalite herpétique, chez les souris sensibles BALB/c.

I Avant-propos

Ce chapitre correspond à l'article intitulé « *Valacyclovir Combined with Artesunate or Rapamycin Improves the Outcome of Herpes Simplex Virus Encephalitis in Mice Compared to Antiviral Therapy Alone* » publié en 2015 dans « *Antiviral Research* » (2015 ; 123:105-13, PMID 26374952, DOI : 10.1016/j.antiviral.2015.09.007). J'en suis la première auteure et l'article est présenté tel que publié. Dans le cadre de cet article, j'ai mis au point le modèle animal, réalisé les expériences animales pour tester l'effet d'agents immunomodulateurs (artésunate et rapamycine) administré par voie intrapéritonéale des jours 4 à 13 après l'infection, les qPCR que j'ai préalablement remis au point afin de passer d'une PCR en capillaires à une PCR en plaques de 96 puits, l'évaluation des titres viraux dont j'ai changé le protocole afin de mieux détecter les faibles charges virales, le dosage de l'IFN- β par ELISA et des autres cytokines et chimiokines par Luminex. Rafik Menasria et Chantal Rhéaume m'ont supportée dans les expériences animales, notamment lors des prélèvements de cerveau. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que coordonné et corrigé le manuscrit.

II Résumé

Dans cette étude, j'ai évalué le bénéfice de combiner l'artésunate (ART) ou la rapamycine (RAPA) avec le valacyclovir (VACV) lors du traitement de l'HSE expérimentale. Les souris infectées ont été traitées avec le VACV combiné ou non à l'ART ou à la RAPA. Les taux de survie des souris traitées avec le VACV et l'ART ou la RAPA sont supérieurs à celui des souris traitées avec l'antiviral seul sans différence significative de charges virales dans les cerveaux des souris. Les taux de cytokines et de chimiokines sont réduits chez les souris traitées avec la combinaison VACV-ART comparativement à ceux des souris ne recevant que le VACV. Les taux de CCL2 (jour 7), d'IL-6, d'IL-1 β et d'IFN- γ (jour 9) sont diminués chez les souris traitées avec la combinaison

VACV-RAPA comparativement aux souris traitées avec l'antiviral seul. Nos résultats suggèrent que l'ajout d'un composé immunomodulateur comme l'artésunate serait bénéfique au traitement antiviral de l'HSE.

III Article scientifique

Title Page

Valacyclovir Combined with Artesunate or Rapamycin Improves the Outcome of Herpes Simplex Virus Encephalitis in Mice Compared to Antiviral Therapy Alone

Running Title: Combination Therapy for Herpes Simplex Encephalitis

Coraline Canivet, Rafik Menasria, Chantal Rhéaume, Jocelyne Piret and Guy Boivin*

Research Center of the CHU of Quebec and Laval University, Quebec City, QC, Canada

* **Corresponding author:** Guy Boivin, MD, M.Sc., FRCP

Research Center in Infectious Diseases

CHU de Québec- CHUL

2705 Blvd Laurier, RC-709

Quebec City, QC

Canada, G1V 4G2

Tel : +1-418-654-2705

Fax: +1-418-654-2715

E-mail: guy.boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Highlights

- The effect of combining artesunate or rapamycin with valacyclovir against herpes simplex virus encephalitis was evaluated
- Both combined regimens improved survival rate in a murine model of herpes simplex virus encephalitis
- The improved survival rate with combined therapies was not due to an effect on viral replication in the brain
- Artesunate could act by decreasing the production of cytokines and chemokines in the brain
- The effect of rapamycin could be related to its immunosuppressive potency on T lymphocytes

Abstract

Despite antiviral therapy, the mortality rate of herpes simplex virus encephalitis (HSE) remains high and many surviving patients harbor neurological sequelae. Although viral replication is responsible for substantial neurological damages, an exaggerated inflammatory response could also contribute to this process. Artesunate (ART) and rapamycin (RAPA) have shown some benefits in the treatment of herpes simplex virus infections. Herein, we evaluated the benefit of combining ART or RAPA with valacyclovir (VACV) in a murine model of HSE. Infected mice were treated with VACV (1 mg/mL in drinking water) from day 3 post-infection (p.i.) combined or not with daily intraperitoneal administration of ART (30 mg/kg) or RAPA (20 mg/kg) from days 4 to 13 p.i. Viral load, infectious titers, cytokine and chemokine levels were measured in brain homogenates on days 5, 7 and 9. The survival rates of mice treated with VACV and ART or RAPA were higher than with VACV alone (71.9% versus 43.2% for ART and 66.7% versus 43.2% for RAPA; both $P \leq 0.05$) but no significant difference was seen in the brain viral loads. Levels of IL-1 β , IL-2 (both $P \leq 0.05$), IL-6, IFN- γ (both $P \leq 0.01$), CCL2 ($P \leq 0.01$), CCL3 and CCL4 (both $P \leq 0.05$) were reduced in mice treated with VACV combined with ART versus VACV alone. Levels of IL-6, IL-1 β and IFN- γ slightly increased on day 7 in mice treated with VACV combined with RAPA compared to VACV alone and then decreased on day 9. Our results suggest that immunomodulatory compounds such as ART or RAPA could benefit antiviral therapy in HSE.

Keywords: Herpes simplex virus encephalitis, inflammation, antiviral agents, immunomodulatory drugs, artesunate, rapamycin

1. Introduction

Herpes simplex virus encephalitis (HSE) is the most common cause of lethal viral encephalitis in Western countries (Tyler, 2004). The annual incidence of HSE is estimated to be 5 cases per million individuals and herpes simplex virus (HSV) 1 is responsible for 90% of cases (Rozenberg et al., 2011). HSE consists in a diffuse inflammatory process in brain parenchyma associated with signs of cerebral dysfunctions. In the absence of antiviral therapy, the mortality rate associated with HSE approaches 70%. Despite early administration of acyclovir (ACV), the mortality rate of HSE is still close to 30% with nearly 60% of survivors developing neurological sequelae. The pathogenesis of HSE is not well understood. After intranasal infection of mice with HSV-1, a prolonged microglial activation was observed and, macrophages and neutrophils rapidly infiltrated the brain followed by lymphocytes, largely composed of CD8⁺ T cells (Marques et al., 2008). It is thus suggested that direct virus-related and indirect immune-mediated mechanisms contribute to the damages occurring in the central nervous system (CNS) during HSE. In this regard, corticosteroids have been reported to improve the outcome of HSE in a murine model by reducing the activation of several inflammatory pathways (Sergegie et al., 2007). A recent review also suggested that adjunctive corticosteroid therapy may have beneficial effects in the treatment of patients suffering from HSE (Ramos-Estebanez et al., 2014).

Innate immune response constitutes the first line of host defense that limits viral spread. Toll-like receptor (TLR) 2, TLR3 and TLR9 have been reported to play a major role in the pathogenesis of HSE in murine models (Kurt-Jones et al., 2004; Reinert et al., 2012; Sorensen et al., 2008; Wang et al., 2012). TLR2 is located on the cell surface and has been shown to sense viral components such as glycoproteins H, L or B (Leoni et al., 2012). TLR3 and TLR9 are found in the endosomes and respectively participate in the recognition of double-stranded RNA intermediates produced during viral replication and unmethylated CpG DNA (Krug et al., 2004; Weber et al., 2006). After activation, these TLRs can trigger multiple cellular responses including the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines that play an important role in the activation of the adaptive immunity.

Artesunate (ART) is commonly used in the treatment of severe malaria. ART has also been reported to be effective against multidrug-resistant infections caused by HSV-2 in hematopoietic stem cell transplant recipients (Sellar et al., 2012). Previous studies have demonstrated that ART exerts an immunomodulatory activity by modulating TLR2 and TLR9 pathways in murine models of bacterial infections (Li et al., 2010; Li et al., 2008). On the other hand, rapamycin (RAPA), an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR), is a widely used immunosuppressive drug. RAPA acts by inhibiting several signal transduction pathways in cytokine-stimulated T cells and blocks the cell-cycle progression from G1 to S phase. This leads to an inhibition of the clonal expansion and cytotoxic activity of T lymphocytes (Janes and Fruman, 2009; Powell et al., 1999).

In mouse models of herpetic stromal keratitis, RAPA was shown to reduce lesions severity by decreasing the inflammatory response (Deshpande et al., 2001; Zapata et al., 2012). The use of ART or RAPA to respectively inhibit TLR2 and TLR9 activation or T cell functions at a critical time after infection could thus reduce the overzealous inflammatory response that develops during HSE.

In this study, we evaluated the added benefit of combining ART or RAPA with valacyclovir (VACV) in a murine model of HSE by analyzing the effects of individual or combined treatments on the survival rate as well as on the viral DNA load, infectious viral titers and pro-inflammatory cytokine and chemokine levels in brain homogenates at different times post-infection.

2. Materials and Methods

2.1 Drugs

ART and ACV were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Rapamycin and VACV were respectively obtained from Biorbyt (San Francisco, CA) and GlaxoSmithKline (Mississauga, ON, Canada).

2.2 Drug susceptibility assays

The activity of ART, RAPA and ACV against the HSV-1 strain H25 was evaluated in NIH/3T3 cells (mouse embryonic fibroblasts; CRL-1658™ ATCC®, Manassas, VA) by the plaque reduction assay (Zwiwekosz et al., 2004). Drugs were added to cells 30 min before and left during and after infection (pre-treatment) or added 90 min after cell infection (post-infection).

2.3 Animals and experimental procedures

Four- to five-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada). All experimental procedures were approved by the Animal Care Ethics Committee of Laval University. In a first set of experiments, the effect of ART and RAPA alone was evaluated in a low viral inoculum model of HSE. Mice were infected intranasally with 1.5×10^3 plaque forming units (PFU) of the neurovirulent clinical HSV-1 strain H25 described elsewhere (Sergeie et al., 2007). Viral titers were determined in Vero cells after virus stock production and at the end of each experiment (back titration). Mice were treated by daily intraperitoneal (ip) administration of the vehicle (0.9% saline), 15 mg/kg of ART or 10 mg/kg of RAPA from days 4 to 13 post-infection (p.i.). For survival rate experiments, mice were monitored during 21 days for appearance of HSE-related signs (i.e., weight loss, isolation with no social interaction, limited movements, swollen eyes, neurological disorders, convulsion and mortality). Animals were sacrificed when a weight loss $\geq 20\%$ or a combination of two other obvious sickness signs were recorded. To evaluate the effect of ART and RAPA on

viral load, subsets of mice were sacrificed on days 5 and 7 p.i. and brain homogenates were prepared as previously described (Boivin et al., 2012b).

In a second set of experiments, the effect of VACV alone or combined with ART or RAPA was evaluated in a high viral inoculum model of HSE. Mice were infected intranasally with 1.5×10^4 PFU of HSV-1 strain H25. Mice were treated with VACV (1 mg/mL in drinking water *ad libitum* from day 3 and on) as this dosage was previously demonstrated to be more effective than twice daily administration of 50 mg/kg by oral gavage (Field and Thackray, 1995). VACV treatment was combined or not with daily ip administration of the vehicle, ART (30 mg/kg) or RAPA (20 mg/kg) from days 4 to 13 p.i. For survival rate experiments, mice were monitored during 21 days for appearance of HSE-related signs as described above. Subsets of mice were sacrificed prior to infection and on days 5, 7 and 9 p.i. and brain homogenates were prepared as reported (Boivin et al., 2012b) to determine viral DNA load, infectious titers, cytokine and chemokine levels.

2.4 Viral DNA load and infectious titers measurements

Total DNA was extracted from 10 mg of brain homogenates using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Roche Molecular System, Laval, QC, Canada) and eluted in 200 μ L of elution buffer according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using 5 μ L of extracted total DNA and the LightCycler[®] 480 Probes Master mix in a LightCycler[®] 480 system (both from Roche Molecular System). External standards were run in parallel as described elsewhere (Boivin et al., 2006). Primers and probes targeted a conserved region of the DNA polymerase of HSV-1. Infectious titers were determined in brain homogenates by a standard plaque assay on Vero cells (Boivin et al, 2012 b). The limit of detection of the assay was 5 PFU per well.

2.5 Cytokine and chemokine levels measurements

Brain homogenates were centrifuged at 10,000 \times g for 10 min at 4 °C. IFN- β protein levels were measured in supernatants by ELISA (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, keratinocyte chemoattractant (KC), chemokine ligand (CCL)-2, CCL3, CCL4 and CCL5 were determined in supernatants by magnetic bead-based immunoassays using the Bio-Plex mouse cytokine group I plex assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using a Bio-Plex system equipped with the BioPlex Manager Software v6.0.

2.6 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software program v5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences in survival rates were analyzed using a Log-Rank (Mantel-Cox) test.

Differences in mean life expectancies were analyzed using a non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Dunn's post-test for multiple group comparison. Differences in weight changes were analyzed using a two-way ANOVA with Bonferroni post-test. Differences in viral DNA load, infectious titers, cytokine and chemokine levels were analyzed by a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after logarithmic transformation of the data. A P value ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1 *In vitro* activity of artesunate and rapamycin against HSV-1

The activity of ART and RAPA compared to ACV against HSV-1 H25 was evaluated in NIH/3T3 cells. Drugs were added 30 min before infection of cells with HSV-1 and left during and after infection (pre-treatment) or added 90 min after infection of cells (post-infection). ART and RAPA exhibited no *in vitro* activity against HSV-1 in the range of concentrations tested (0-30 μM and 0-10 μM , respectively) whereas ACV had a 50% effective concentration (EC_{50}) value of 0.26 μM in both conditions (data not shown).

3.2 Effect of artesunate and rapamycin on survival rate and viral DNA load

The effect of ART and RAPA on survival rates of mice infected with a low viral inoculum (i.e., 1.5×10^3 PFU) of HSV-1 strain H25 was evaluated. All untreated mice demonstrated sickness signs from day 5 to 10 p.i. Figure 1A shows that the survival rate of mice treated with ART (30.8%) was higher than that of control (10.0%), but the difference was not statistically significant. More interestingly, treatment of mice with RAPA resulted in a significant increase in the survival rate compared to control (75.0% *versus* 10.0%; $P \leq 0.01$). Figure 1B shows that there were no significant differences in mean life expectancies for mice that received ART or the vehicle (11.7 ± 1.9 days *versus* 8.6 ± 1.0 days) whereas a significant difference was observed in mice treated with RAPA (17.6 ± 2.2 days *versus* 8.6 ± 1.0 days; $P \leq 0.01$). Treatment with ART did not affect the weight of mice compared to those of control (Fig. 1C). In contrast, the weight change of mice treated with RAPA was significantly lower than that of control on days 6 (+5.1% *versus* -5.3%; $P < 0.001$) and 7 p.i. (+0.5% *versus* -9.7%; $P < 0.001$; Fig. 1D).

Figure 2 shows that the viral DNA load in brain homogenates of mice treated with ART was reduced compared to control on day 5 p.i. but, as expected from *in vitro* data, this effect was not statistically significant. Treatment of mice with RAPA had no effect on the brain viral DNA load compared to control on both days 5 and 7 p.i.

3.3 Effect of valacyclovir combined with artesunate or rapamycin on survival rate

The administration of VACV (1 mg/mL in drinking water *ad libitum*) on day 3 or 4 p.i. to BALB/c mice infected with a low viral inoculum (1.5×10^3 PFU) usually results in the survival of almost all animals (data not shown). We have recently demonstrated that the administration of the same dose of VACV started on day 3 or 4 p.i. to mice infected with a one-log higher viral inoculum (1.5×10^4 PFU) mimics a clinical situation in which antiviral treatment is not optimal (i.e., mortality rate of at least 50%) allowing the assessment of additional immune-based therapy (Boivin et al., 2013). The effect of VACV alone or combined with ART or RAPA on survival rate was thus compared by using this model. Figure 3A shows that mice treated with VACV alone exhibited a significant increase in survival rate (43.2%) compared to control (8.3%; $P \leq 0.01$). Interestingly, the survival rate of mice treated with VACV combined with ART (71.9%) was significantly higher than that of control (8.3%; $P \leq 0.0001$), ART alone (0%; $P \leq 0.0001$) and VACV alone (43.2%; $P \leq 0.05$). Similarly, the survival rate of mice treated with VACV combined with RAPA (66.7%) was significantly higher than that of control or RAPA alone (both 8.3%; $P \leq 0.0001$) and antiviral alone (43.2%, $P \leq 0.05$). Mice that received the vehicle, ART or RAPA alone demonstrated sickness signs from day 3 p.i. and started to die on day 5-6 after infection. Treatment of mice with VACV alone or combined with ART or RAPA delayed the appearance of HSE-related signs and mortality by 1 to 2 days. The mean life expectancy of control (7.2 ± 1.3 days) was significantly lower than those of mice treated with VACV combined with ART (16.9 ± 1.2 days; $P \leq 0.001$) or RAPA (16.4 ± 1.2 days; $P \leq 0.001$) whereas VACV, ART or RAPA alone had no significant effect (Fig. 3B). No significant difference in weight changes was observed between groups (Fig. 3C/D).

3.4 Effect of valacyclovir combined with artesunate or rapamycin on viral DNA load and infectious titers

Panel A of Fig. 4 shows the viral DNA load in brain homogenates of mice treated with VACV, ART or RAPA individually or combined. Compared to control, viral DNA load was significantly decreased in mice treated with VACV alone ($P \leq 0.05$) or combined with ART ($P \leq 0.001$) or RAPA ($P \leq 0.05$) on day 5 p.i. whereas ART or RAPA alone had no effect. The absence of surviving mice in the control group beyond day 5 p.i. precluded statistical analysis. A non-significant reduction in the viral load was observed in mice treated with VACV combined with ART compared to VACV alone at all time points whereas no reduction was seen with the combined therapy with RAPA.

Panel B of Fig. 4 shows the infectious titers in brain homogenates of mice treated with the antiviral, ART or RAPA individually or combined. Compared to control, the infectious titers were significantly decreased in mice treated with VACV alone ($P \leq 0.05$) or combined with ART ($P \leq 0.01$) on day 5 p.i. whereas ART and RAPA or VACV combined with RAPA had no effect. A non-significant reduction in the infectious titers was

observed in mice treated with VACV combined with ART compared to VACV alone at all time points whereas combined therapy with RAPA induced a non-significant reduction on day 9 p.i.

3.5 Effect of valacyclovir combined with artesunate or rapamycin on pro-inflammatory cytokines and chemokines

Figure 5 (Panels A to E) shows the levels of pro-inflammatory cytokines in brain homogenates of mice treated with VACV, ART or RAPA individually or combined. Compared to control, levels of IFN- β , IL-1 β and IL-2 (all $P \leq 0.05$) were significantly reduced in mice treated with VACV alone whereas levels of IFN- β , IL-6 (both $P \leq 0.01$), IFN- γ , IL-1 β and IL-2 (all $P \leq 0.001$) were significantly lower in mice treated with VACV combined with ART on day 5 p.i. In mice treated with VACV combined with RAPA, levels of IFN- β , IL-1 β and IL-2 (all $P \leq 0.05$) were lower compared to control on day 5 p.i. Interestingly, levels of IFN- γ in mice treated with VACV combined with ART were significantly lower compared to those of antiviral therapy alone on days 5 and 9 p.i. ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively). Levels of IFN- γ in mice that received VACV combined with RAPA were significantly lower compared to mice treated with VACV alone ($P \leq 0.05$) only on day 9 p.i. Compared to VACV alone, levels of IL-1 β were decreased in mice treated with the combination VACV and ART on day 7 p.i. ($P \leq 0.05$) and with VACV and RAPA on day 9 p.i. ($P \leq 0.01$). A significant reduction in levels of IL-2 ($P \leq 0.05$) and IL-6 ($P \leq 0.01$) was seen in mice that received VACV and ART compared to the antiviral alone on day 9 p.i. Levels of IL-6 significantly increased in mice treated with VACV and RAPA compared to the antiviral alone on day 7 p.i. ($P \leq 0.05$) and thereafter decreased on day 9 p.i. ($P \leq 0.05$).

Figure 6 (Panels A to E) shows the levels of chemokines in brain homogenates of mice treated with the antiviral, ART or RAPA individually or combined. Compared to control, VACV alone significantly decreased the level of CCL4 ($P \leq 0.01$) whereas VACV combined with ART reduced the levels of CCL3 ($P \leq 0.05$), KC, CCL2, CCL5 (all $P \leq 0.01$) and CCL4 ($P \leq 0.001$) on day 5 p.i. Levels of CCL4 were also significantly decreased in mice treated with VACV combined with RAPA ($P \leq 0.05$) compared to control on day 5 p.i. Levels of CCL2 ($P \leq 0.01$), CCL3 and CCL4 (both $P \leq 0.05$) were significantly lower in mice treated with VACV combined with ART compared to VACV alone on day 7 p.i. No other significant change in the levels of chemokines was observed in mice treated with the antiviral alone or combined with RAPA.

4. Discussion

In the present study, we first used a murine model of HSE induced by a low inoculum of HSV-1 (i.e., 1.5×10^3 PFU) to evaluate the effect of ART and RAPA alone on disease severity and mortality. Treatment of mice with ART and RAPA alone increased survival rates but this effect was not associated with a reduction of viral replication in the brain. We then used a high viral inoculum (i.e., 1.5×10^4 PFU) model of HSE, which mimics

a clinical situation in which antiviral treatment is not optimal and results in approximately 50% survival rate (Boivin et al., 2013), to evaluate the added benefit of combining ART or RAPA with VACV. Interestingly, survival rates of mice treated with both combined regimens were significantly increased compared to antiviral therapy alone. A reduction of the inflammatory response in the brain is most likely involved for ART as shown by significant decrease in pro-inflammatory cytokines and chemokines whereas the mechanisms implicated for RAPA remain less clear. We have previously evaluated the added benefit of combining VACV with an anti-TNF- α antibody and showed that such combined treatment significantly increased survival rate compared to antiviral drug alone (Boivin et al., 2013).

The improved survival rates of mice treated with VACV combined with ART or RAPA compared to antiviral alone could not be explained by a direct effect on viral replication in the CNS. Indeed, we observed no significant decrease in viral DNA load and infectious titers in brain homogenates for these two groups compared to VACV alone. Similarly, ART or RAPA added to cells before and/or after the infection did not demonstrate any *in vitro* antiviral activity against HSV-1 strain H25 at the highest concentrations tested (30 μ M and 10 μ M, respectively). Conflicting results were previously reported regarding the activity of ART against HSV. Indeed, a potent *in vitro* activity of ART on HSV-1 replication was shown in a first study (Efferth et al., 2002) whereas, as demonstrated in our experiments, no inhibitory effect on HSV-1/2 was found by another group (He et al., 2012).

Recognition of HSV components is mediated by TLR2, TLR3 and TLR9 (Melchjorsen, 2012). Studies have shown that ART protects mice in a bacterial sepsis model by acting on TLR2 and TLR9 signaling pathways (Li et al., 2010; Li et al., 2008). The mechanism of action of ART could involve a decrease in the expression of TLR2 and TLR9 mRNAs after stimulation by heat-killed bacteria and the inhibition of activation of the transcription factor NF- κ B resulting in reduced pro-inflammatory cytokines production. In our experiments, we observed that treatment of mice with VACV combined with ART significantly decreased the levels of several pro-inflammatory cytokines (i.e., IFN- γ , IL-1 β , IL-2 and IL-6) in brain homogenates compared to antiviral therapy alone. This reduced inflammatory response in the CNS could thus explain the increased survival rate seen in mice treated with combined therapy. We have already demonstrated that the administration of an antagonist of TLR9 on day 3 p.i. was beneficial and improved the survival rate in a mouse model of HSE through a better control of the inflammatory response that could be detrimental to the host (Boivin et al., 2012b).

On day 5 p.i., the levels of several chemokines (i.e., KC, CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5) were significantly increased in mice infected with HSV-1 and left untreated. By using C57BL/6 chimeric mice with bone marrow-derived cells expressing the green fluorescent protein, we demonstrated an infiltration of peripheral monocytes/macrophages into the brain parenchyma during HSE (Boivin et al., 2012a). Treatment of mice with VACV combined with ART caused a significant reduction in the levels of CCL3, CCL4, and especially CCL2 in

brain homogenates compared to mice treated with the antiviral alone on day 7 p.i. suggesting that ART could decrease the infiltration of immune cells into the brain during HSE. By using C57BL/6 mice knockout for CCR2, we have previously shown that the CCL2-CCR2 signaling pathway was responsible for the egress of inflammatory monocytes from the bone marrow to the blood during HSV encephalitis but its role in the infiltration of peripheral cells into the CNS was not clearly established (Boivin et al., 2012a). Therefore, it would be interesting to evaluate the effect of ART alone or combined with VACV on the recruitment of immune cells into the brain during HSE in our mouse models.

The immunosuppressive potency of RAPA is mainly due to a blocking of several signal transduction pathways in cytokine-stimulated T cells (Janes and Fruman, 2009; Powel et al., 1999). In innate immunity, a central role of mTOR kinase has been defined by its ability to downregulate the production of pro-inflammatory cytokines (Thomson et al., 2009). It has been demonstrated that the inhibition of mTOR kinase activity by RAPA could promote the production of several pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and IFN- γ by enhancing NF- κ B activity in human monocytes or myeloid dendritic cells during TLR stimulation (Weinchhart et al., 2008; Weichhart et al., 2011). This suggests that despite an increased production of pro-inflammatory cytokines by the innate immune system, the net effect of RAPA is to suppress T cell stimulation (Janes et Fruman, 2009). In our experiments, the levels of IFN- γ , IL-1 β and especially IL-6 were increased in brain homogenates of mice treated with VACV combined with RAPA compared to mice treated with the antiviral drug alone on day 7 p.i. whereas their levels decreased significantly on day 9. Therefore, the improved efficacy of VACV combined with RAPA over VACV alone could be due to an inhibitory effect on T cells stimulated in response to pro-inflammatory cytokines. In contrast, treatment of mice with VACV combined with RAPA did not affect the levels of chemokines in brain homogenates compared to antiviral therapy alone suggesting that RAPA might not affect the infiltration of immune cells into the CNS during HSE. It is also important to note that RAPA rapidly crosses the blood-brain barrier (Pong and Zaleska, 2003) and could exert some effects into the CNS. Further investigations are thus needed to shed some light on the mechanisms involved in the anti-inflammatory effects induced by RAPA in our murine models of HSE.

The cerebral immune response that develops during HSE is a “double edge sword” as it is critical to control viral replication in the brain early after infection but if uncontrolled may also result in an exaggerated immune response that could be detrimental to the host. In our mouse model of HSE, treatment with VACV was started on day 3 p.i. to rapidly decrease viral replication in the brain. The administration of ART or RAPA was delayed until day 4 p.i. to prevent the development of an overzealous inflammation. Of note, mice probably ingested VACV in drinking water mainly during nighttime which corresponds to their period of activity whereas ART and RAPA were given during daytime. Such administration schedule may have somewhat affected our results.

In summary, we showed that the administration of VACV combined with ART or RAPA was beneficial and improved the outcome of HSE in mice. Additional studies should be performed to validate the time at which such immunomodulatory agents should be optimally initiated as well as their dose and schedule of administration. Overall, these data suggest that it could be beneficial to combine a potent antiviral agent with immune-based therapy, such as ART and RAPA, to improve the prognosis of patients suffering from HSE. Biomarkers of inflammation in blood or in cerebrospinal fluid should nevertheless be identified for timely administration of such immunomodulatory therapy.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP-89378 to G.B.). G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance. The authors would like to thank Ms Nathalie Goyette for technical assistance.

References

- Boivin, G., Goyette, N., Sergerie, Y., Keays, S., Booth, T., 2006. Longitudinal evaluation of herpes simplex virus DNA load during episodes of herpes labialis. *J Clin Virol* 37, 248-251.
- Boivin, N., Menasria, R., Gosselin, D., Rivest, S., Boivin, G., 2012. Impact of deficiency in CCR2 and CX3CR1 receptors on monocytes trafficking in herpes simplex virus encephalitis. *The Journal of general virology* 93, 1294-1304.
- Boivin, N., Menasria, R., Piret, J., Boivin, G., 2012. Modulation of TLR9 response in a mouse model of herpes simplex virus encephalitis. *Antiviral Res* 96, 414-421.
- Boivin, N., Menasria, R., Piret, J., Rivest, S., Boivin, G., 2013. The Combination of Valacyclovir with an Anti-TNF Alpha Antibody Increases Survival Rate Compared to Antiviral Therapy Alone in a Murine Model of Herpes Simplex Virus Encephalitis. *Antiviral Res* 100, 649-653.
- Deshpande, S., Zheng, M., Lee, S., Banerjee, K., Gangappa, S., Kumaraguru, U., Rouse, B.T., 2001. Bystander activation involving T lymphocytes in herpetic stromal keratitis. *J Immunol* 167, 2902-2910.
- Efferth, T., Marschall, M., Wang, X., Huong, S.M., Hauber, I., Olbrich, A., Kronschnabl, M., Stamminger, T., Huang, E.S., 2002. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *Journal of molecular medicine* 80, 233-242.
- Field, H., Thackray, A., 1995. The effects of delayed-onset chemotherapy using famciclovir or valaciclovir in a murine immunosuppression model for HSV-1. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 6, 210-216.
- He, R., Park, K., Cai, H., Kapoor, A., Forman, M., Mott, B., Posner, G.H., Arav-Boger, R., 2012. Artemisinin-derived dimer diphenyl phosphate is an irreversible inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 3508-3515.
- Janes, M.R., Fruman, D.A., 2009. Immune regulation by rapamycin: moving beyond T cells. *Science signaling* 2, pe25.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., Colonna, M., 2004. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Kurt-Jones, E.A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M.M., Knipe, D.M., Finberg, R.W., 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1315-1320.
- Leoni, V., Gianni, T., Salvioli, S., Campadelli-Fiume, G., 2012. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *Journal of virology* 86, 6555-6562.
- Li, B., Li, J., Pan, X., Ding, G., Cao, H., Jiang, W., Zheng, J., Zhou, H., 2010. Artesunate protects sepsis model mice challenged with *Staphylococcus aureus* by decreasing TNF-alpha release via inhibition TLR2 and Nod2 mRNA expressions and transcription factor NF-kappaB activation. *International immunopharmacology* 10, 344-350.
- Li, B., Zhang, R., Li, J., Zhang, L., Ding, G., Luo, P., He, S., Dong, Y., Jiang, W., Lu, Y., Cao, H., Zheng, J., Zhou, H., 2008. Antimalarial artesunate protects sepsis model mice against heat-killed *Escherichia coli* challenge by decreasing TLR4, TLR9 mRNA expressions and transcription factor NF-kappa B activation. *International immunopharmacology* 8, 379-389.
- Marques, C.P., Cheeran, M.C., Palmquist, J.M., Hu, S., Urban, S.L., Lokensgard, J.R., 2008. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *J Immunol* 181, 6417-6426.

Melchjorsen, J., 2012. Sensing herpes: more than toll. *Reviews in medical virology* 22, 106-121.

Pong, K., Zaleska, M.M., 2003. Therapeutic implications for immunophilin ligands in the treatment of neurodegenerative diseases. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* 2, 349-356.

Powell, J.D., Lerner, C.G., Schwartz, R.H., 1999. Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J Immunol* 162, 2775-2784.

Ramos-Estebanez, C., Lizarraga, K.J., Merenda, A., 2014. A systematic review on the role of adjunctive corticosteroids in herpes simplex virus encephalitis: is timing critical for safety and efficacy? *Antiviral therapy* 19, 133-139.

Reinert, L.S., Harder, L., Holm, C.K., Iversen, M.B., Horan, K.A., Dagnaes-Hansen, F., Ulhøj, B.P., Holm, T.H., Mogensen, T.H., Owens, T., Nyengaard, J.R., Thomsen, A.R., Paludan, S.R., 2012. TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *The Journal of clinical investigation* 122, 1368-1376.

Rozenberg, F., Deback, C., Agut, H., 2011. Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infectious disorders drug targets* 11, 235-250.

Sellar, R.S., Ward, K.N., Thomson, K.J., Peggs, K.S., 2012. Evidence for clinical activity of artesunate in multidrug-resistant herpes simplex infection following HSCT. *Bone marrow transplantation* 47, 1482-1483.

Sergerie, Y., Boivin, G., Gosselin, D., Rivest, S., 2007. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis* 195, 817-825.

Sorensen, L.N., Reinert, L.S., Malmgaard, L., Bartholdy, C., Thomsen, A.R., Paludan, S.R., 2008. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J Immunol* 181, 8604-8612.

Swierkosz, E.M., Hodinka, R.L., Moore, B.M., Sacks, S., Scholl, D.R., Wright, D.K., 2004. Antiviral susceptibility testing: Herpes simplex virus by plaque reduction assay; Approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.*, pp. 1-39.

Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G., 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature reviews. Immunology* 9, 324-337.

Tyler, K.L., 2004. Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis* 1, 169-178.

Wang, J.P., Bowen, G.N., Zhou, S., Cerny, A., Zacharia, A., Knipe, D.M., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E.A., 2012. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. *Journal of virology* 86, 2273-2281.

Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., Paludan, S.R., 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of virology* 80, 5059-5064.

Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K.M., Kolbe, T., Stulnig, T.M., Horl, W.H., Hengstschlager, M., Muller, M., Saemann, M.D., 2008. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 29, 565-577.

Weichhart, T., Haidinger, M., Katholnig, K., Kopecky, C., Poglitsch, M., Lassnig, C., Rosner, M., Zlabinger, G.J., Hengstschlager, M., Muller, M., Horl, W.H., Saemann, M.D., 2011. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood* 117, 4273-4283.

Zapata, G., Racca, L., Tau, J., Berra, A., 2012. Topical use of rapamycin in herpetic stromal keratitis. *Ocular immunology and inflammation* 20, 354-359.

Legends to Figures

Figure 1: Effect of artesunate or rapamycin on survival rate (A), mean life expectancy (B) and percentage of body weight changes (C and D for artesunate and rapamycin, respectively) of HSV-1-infected mice. Groups of mice were infected intranasally with 1.5×10^3 PFU in a 20 μ L volume and received once daily intraperitoneal administration of the vehicle (\diamond , 0.9% saline), artesunate (\circ , 15 mg/kg) or rapamycin (\square , 10 mg/kg) from days 4 to 13 post-infection. Mice were examined three times a day and a $\geq 20\%$ weight loss or two obvious neurological signs were considered as end-points for sacrifice. The differences in survival rates were evaluated using a LogRank (Mantel-Cox) test. The differences in mean life expectancies were evaluated using a non-parametric one-way ANOVA with Dunn's post-test. The differences in body weight changes were evaluated using a two-way ANOVA with Bonferroni post-test. Results represent the means \pm SEM. Data from two independent experiments (of 8 to 13 mice per group) with similar results were combined. Statistically significant results are indicated as follows: **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

Figure 2: Effect of artesunate or rapamycin on viral DNA load in brain homogenates of HSV-1-infected mice. Groups of mice were infected intranasally with 1.5×10^3 PFU in a 20 μ L volume and received once daily intraperitoneal administration of the vehicle (0.9% saline), artesunate (15 mg/kg) or rapamycin (10 mg/kg) from days 4 to 7 post-infection. Viral DNA load was measured by qPCR in brain homogenates collected on days 5 and 7 post-infection in duplicate. Results are expressed as log copies/mg of brain tissue and represent the means \pm SEM ($n = 5$ mice per group). No statistical differences in the viral loads between groups were obtained using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data. Dotted lines represent the limits of detection of the assay.

Figure 3: Effect of valacyclovir combined with artesunate or rapamycin on survival rate (A), mean life expectancy (B) and percentage of body weight changes (C and D for artesunate and rapamycin, respectively) of HSV-1-infected mice. Groups of mice were infected intranasally with 1.5×10^4 PFU in a 20 μ L volume. Mice were left untreated (\diamond) or received valacyclovir (\blacklozenge , 1 mg/mL in drinking water *ad libitum*) from day 3 post-infection and on or artesunate (\circ , 30 mg/kg) or rapamycin (\square , 20 mg/kg) both by daily intraperitoneal administration from days 4 to 13 post-infection or valacyclovir combined with artesunate (\bullet) or rapamycin (\blacksquare). Mice were examined three times a day and a $\geq 20\%$ weight loss or two obvious neurological signs were considered as end-points for sacrifice. The differences in survival rates were evaluated using a Log-Rank (Mantel-Cox) test. The differences in mean life expectancies were evaluated using a non-parametric one-way ANOVA with Dunn's post-test. The

differences in percentage of body weight changes were evaluated using a two-way ANOVA with Bonferroni post-test. Results represent the means \pm SEM. Data from two independent experiments (of 12 to 21 mice per group) with similar results were combined. Statistically significant results are indicated as follows: ***, $P \leq 0.001$.

Figure 4: Viral DNA load (A) and infectious viral titers (B) in brain homogenates of mice treated with valacyclovir alone or combined with artesunate or rapamycin. Groups of mice were infected intranasally with 1.5×10^4 PFU in a 20 μ L volume. Mice were left untreated or received valacyclovir from day 3 post-infection and on or artesunate (30 mg/kg) or rapamycin (20 mg/kg) both by daily intraperitoneal administration from days 4 to 9 post-infection or valacyclovir combined with artesunate or rapamycin. Viral DNA load (A) was measured by qPCR in brain homogenates collected on days 5, 7 and 9 post-infection in duplicate. Results are expressed as log copies/mg of brain tissue and represent the means \pm SEM ($n = 5$ mice per group). Viral infectious titers (B) were measured by plaque assay on Vero cells in brain homogenates collected at similar time points in triplicate wells. Results are expressed as log PFU/mg of brain tissue and represent the means \pm SEM ($n = 5$ mice per group). Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$. Dotted lines represent the limits of detection of the assays.

Figure 5: Levels of cytokines in brain homogenates of mice treated with valacyclovir alone or combined with artesunate or rapamycin. Groups of mice were infected intranasally with 1.5×10^4 PFU in a 20 μ L volume. Mice were left untreated or received valacyclovir (1 mg/mL in drinking water *ad libitum*) from day 3 post-infection and on or artesunate (30 mg/kg) or rapamycin (20 mg/kg) both by daily intraperitoneal administration from days 4 to 9 post-infection or valacyclovir combined with artesunate or rapamycin. Levels of IFN- β (A), IFN- γ (B), IL-1 β (C), IL-2 (D) and IL-6 (E) were measured by ELISA (IFN- β) or magnetic bead-based immunoassay (all others) in supernatants of brain homogenates collected prior to infection and on days 5, 7 and 9 post-infection. Levels of cytokines are expressed in pg/mL and represent the means \pm SEM ($n = 5$ mice per group). Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ compared to vehicle or between indicated groups.

Figure 6: Levels of chemokines in brain homogenates of mice treated with valacyclovir alone or combined with artesunate or rapamycin. Groups of mice were infected and treated as described in Fig. 5 legend. Levels of KC (A), CCL2 (B), CCL3 (C), CCL4 (D) and CCL5 (E) were determined by magnetic bead-based immunoassay in supernatants of brain homogenates collected prior to infection and on days 5, 7 and 9 post-infection. Levels of chemokines are expressed in pg/mL and represent the means \pm SEM ($n = 5$ mice per group).

Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test after log transformation of the data. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ compared to vehicle or between indicated groups.

Figure 1 :

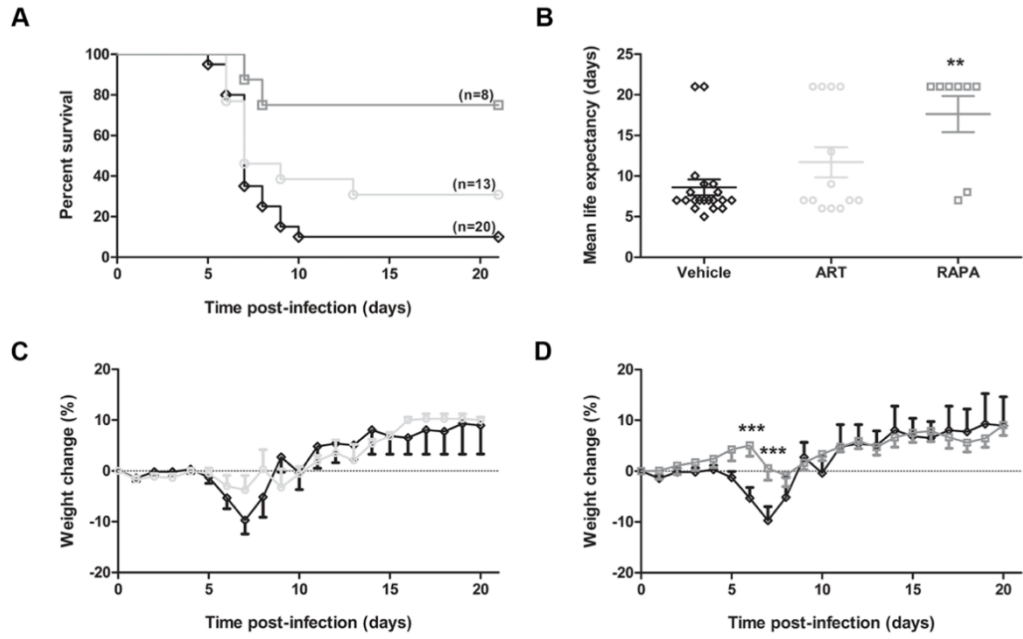


Figure 2 :

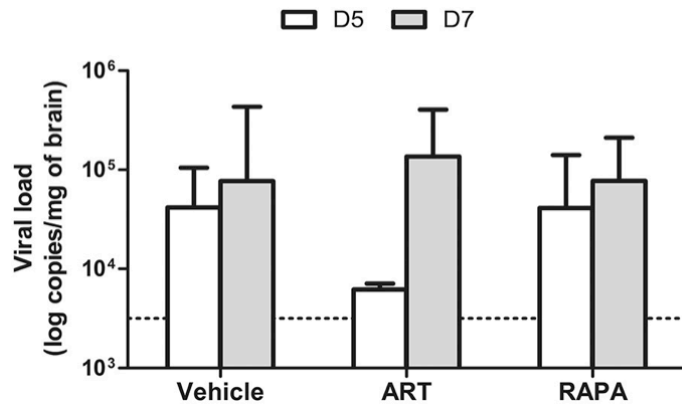


Figure 3 :

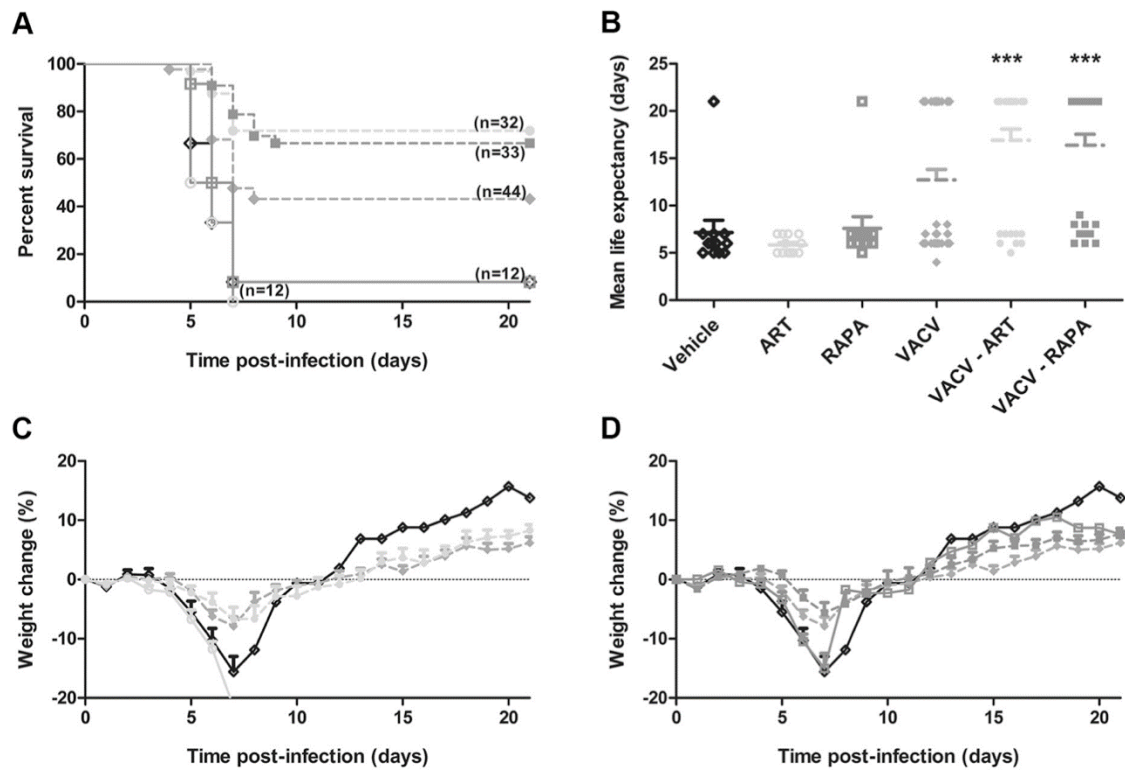


Figure 4 :

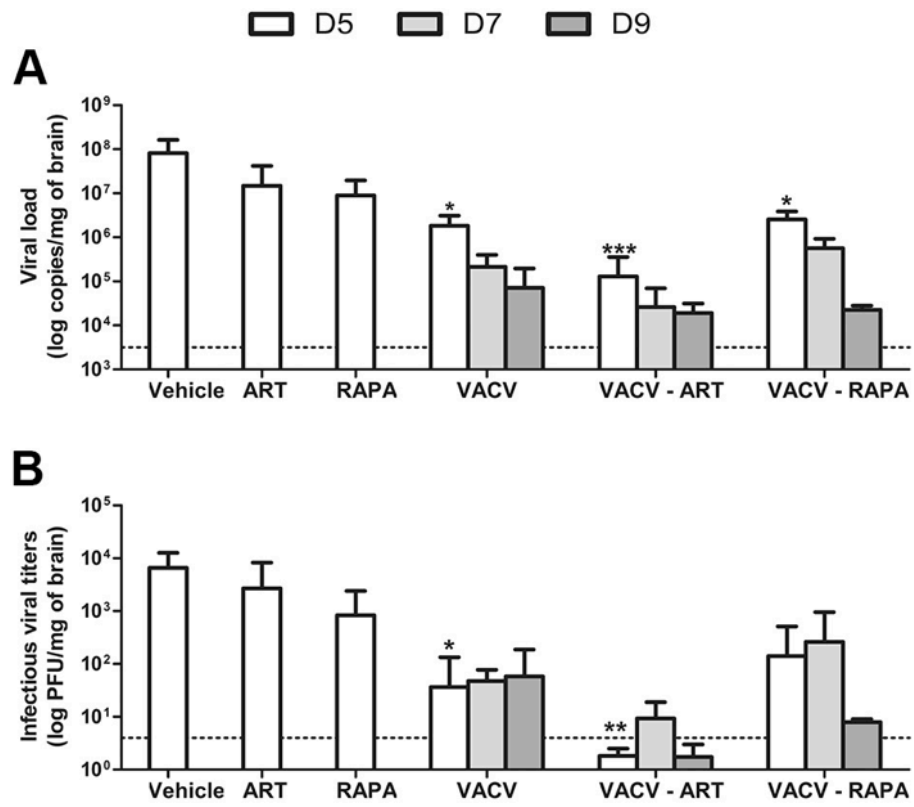


Figure 5 :

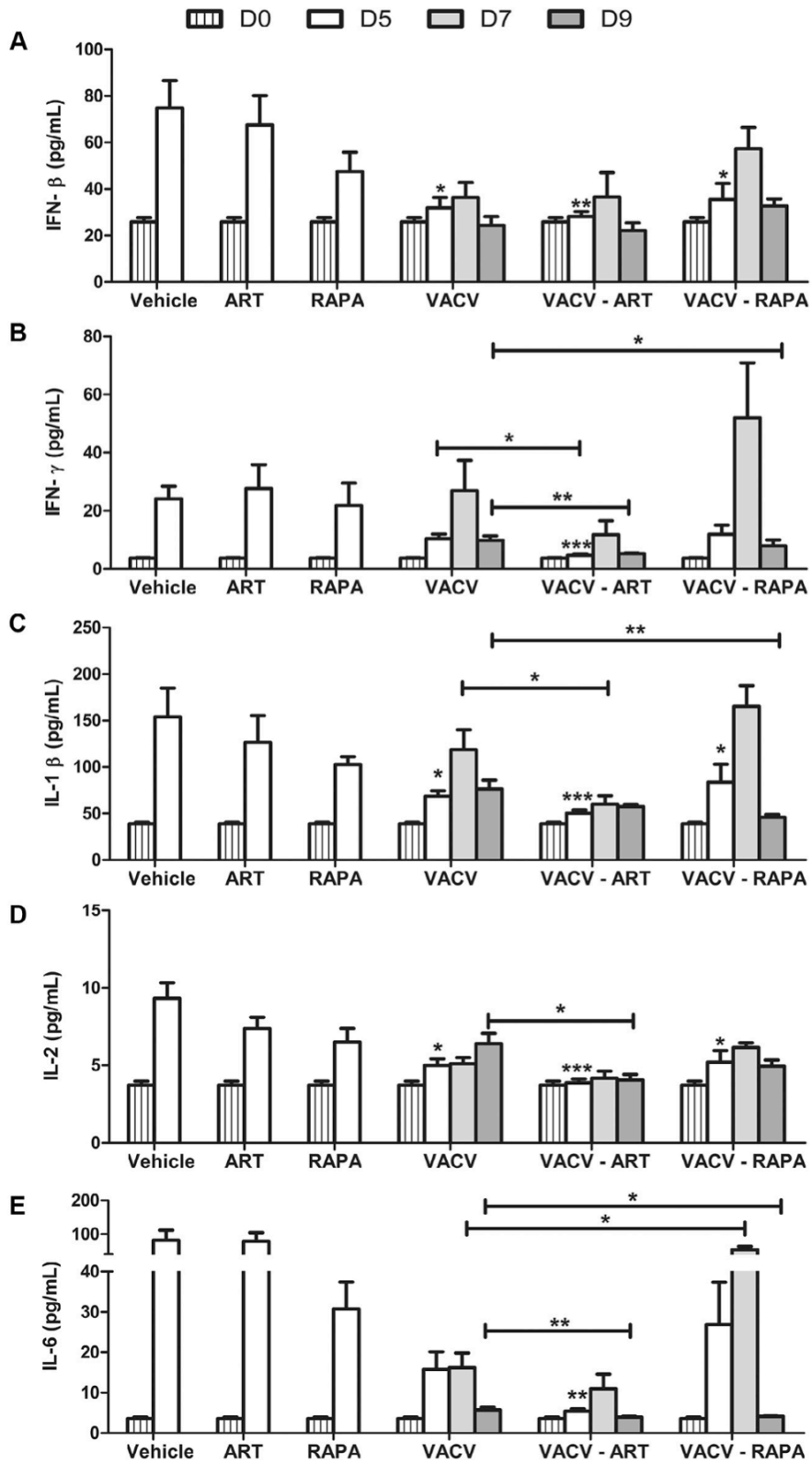
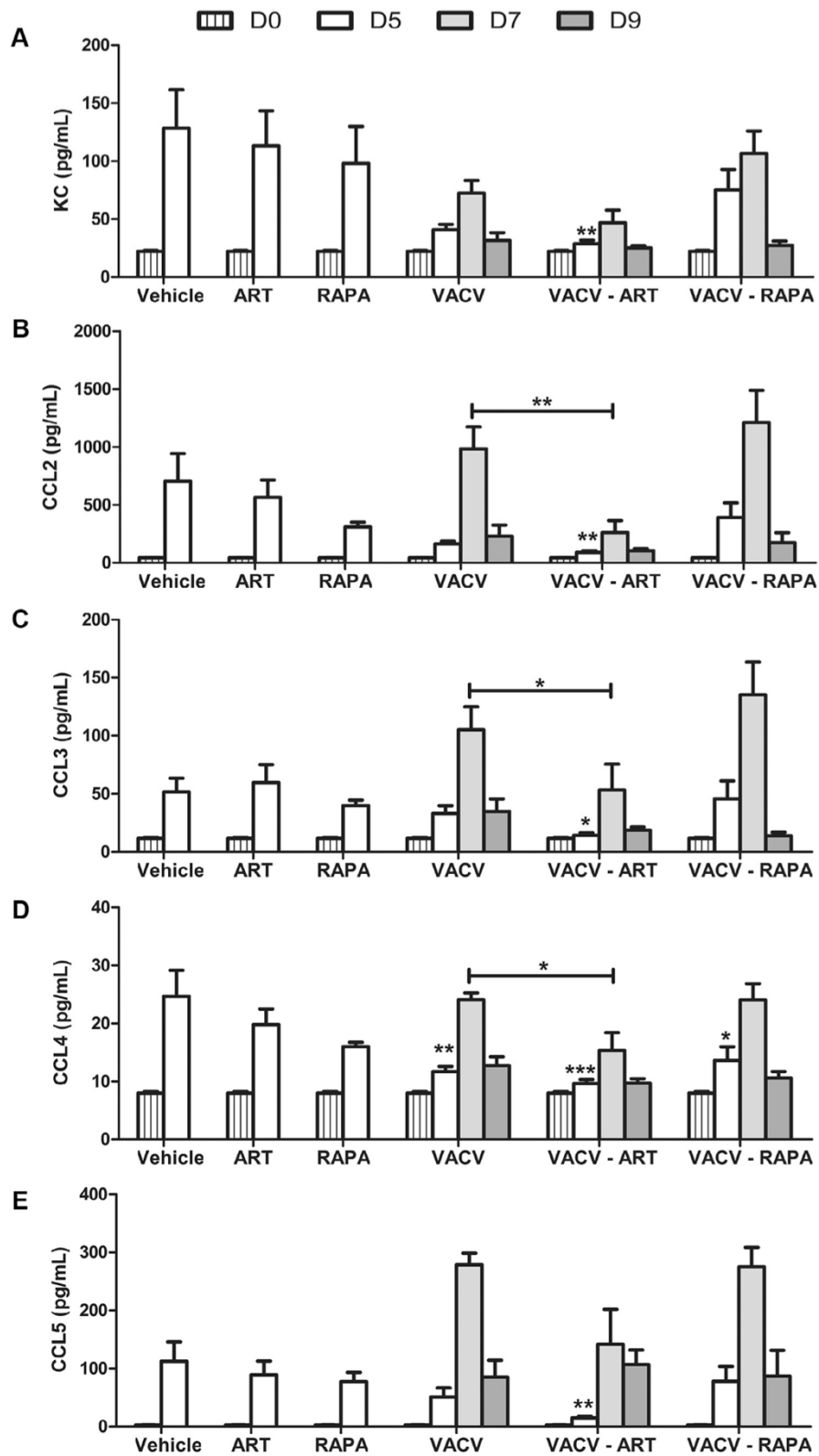


Figure 6 :



Chapitre IV : Discussion et Perspectives

Les virus herpès simplex sont des virus ubiquitaires présentant deux particularités biologiques spécifiques. En effet, en plus de pouvoir infecter de nombreux sites anatomiques, ils peuvent établir une phase de latence et sont neurovirulents. Le VHS-1 est généralement responsable d'infections orolabiales et parfois d'infections génitales bénignes, mais peut engendrer des pathologies présentant de fortes complications que ce soit via la dissémination à plusieurs organes ou l'infection du système nerveux central. Ces infections sévères peuvent être mortelles ou laisser de nombreuses séquelles malgré un traitement antiviral approprié. L'encéphalite herpétique fait partie des infections les plus sévères causées par le VHS-1. C'est la première cause d'encéphalite sporadique virale mortelle dans les pays industrialisés. Malgré un traitement antiviral administré précocement et l'élimination du virus au niveau du SNC, de nombreux patients présentent des séquelles neurologiques importantes et irréversibles. De plus en plus de preuves suggèrent la participation de la réponse immunitaire cérébrale innée dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique. En effet, celle-ci est essentielle au contrôle de la réplication virale, mais si elle n'est pas contrôlée, elle pourrait engendrer une neuroinflammation délétère.

De nombreux modèles animaux permettent l'étude de la réponse immunitaire cérébrale innée au cours de l'encéphalite herpétique, que ce soit à des temps précoces ou à des temps tardifs après l'infection. De plus, il existe une sensibilité distincte à l'infection intranasale par le VHS-1 chez différents types de souris. Dans le cadre de mon doctorat, j'ai utilisé plusieurs modèles murins différents afin d'étudier la participation de la réponse immunitaire cérébrale innée dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique. L'infection intranasale permet de mimer les signes cliniques d'une encéphalite herpétique chez l'homme et est largement utilisée (440). En effet, bien que l'infection cérébrale chez la souris présente un profil de propagation virale et de lésions disséminées par rapport aux lésions inflammatoires focales rencontrées chez l'homme, l'infection de souris jeunes et sensibles, par l'inhalation de l'inoculum viral entraîne un gonflement oculaire, une perte de poids, des mouvements d'agitation, des troubles neurologiques et une mortalité rapide due à l'œdème cérébral (33, 441, 442). Cependant, l'utilisation du modèle d'infection intranasale apporte certaines limitations. En effet, la reproductivité de l'infection peut varier entre les animaux en fonction de leur intensité respiratoire lors de l'inoculation virale. Par ailleurs, l'infection intranasale peut conduire à une infection virale pulmonaire et créer ainsi des réponses immunitaires systémiques non désirées. De plus, à la suite d'une infection intranasale chez la souris, le virus se réplique d'abord dans les cellules épithéliales nasales permissives à l'infection, puis infecte ensuite les neurones olfactifs qui innervent cette région et traverse la plaque criblée de l'ethmoïde pour atteindre le bulbe olfactif (443-445). De ce fait, la réponse immunitaire mucoale est un aspect important non pris en compte dans le cadre de mon doctorat et représente la plus grande limitation de mon étude.

La différence de la réponse immunitaire cérébrale innée entre des souris naturellement sensibles (souris BALB/c) et celles naturellement résistantes à l'infection (souris C57BL/6) présente un aspect immunologique très intéressant. Analyser cette différence m'a permis d'approfondir nos connaissances sur la composante immunitaire de la pathogenèse de l'encéphalite herpétique expérimentale. Bien que les premières preuves de la différence entre différentes souches de souris remontent à 1975, aucune étude n'avait à ce jour comparé la différence d'infiltration des cellules immunitaires périphériques et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines au niveau du SNC, entre ces deux types de souris au cours de l'infection intranasale par le VHS-1 (428). Comme attendu, les souris sensibles BALB/c sont plus susceptibles à l'infection par la souche clinique neurovirulente H25 du VHS-1, que les souris résistantes C57BL/6-symptomatiques. Cette mortalité est associée à une forte réplication virale au niveau des cerveaux des souris BALB/c par rapport à celle observée chez les souris C57BL/6. Chez les souris naturellement résistantes, l'infiltration des cellules immunitaires périphériques c'est-à-dire de monocytes inflammatoires, de cDCs, de pDCs, de cellules NKs et de cellules NKTs commence au jour 4 après l'infection intranasale, avec une persistance de l'infiltration des monocytes inflammatoires au jour 6 après l'infection suivie de l'infiltration des lymphocytes T au jour 8 après l'infection. En revanche, chez les souris BALB/c, naturellement sensibles, l'infiltration est restreinte aux monocytes inflammatoires et aux lymphocytes T, et ce seulement au pic de l'infection à savoir le jour 6 après l'infection. Par ailleurs, le taux des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines est augmenté dans le cerveau des souris naturellement sensibles BALB/c par rapport aux animaux naturellement résistants C57BL/6-symptomatiques au jour 8 après l'infection.

Les résultats de cette étude montrent que les titres viraux dans les cerveaux des souris BALB/c sont significativement plus élevés que ceux retrouvés chez les animaux C57BL/6-symptomatiques avec un pic de réplication, au jour 6 après l'infection. Il a été préalablement rapporté qu'après une infection de la muqueuse buccale par le VHS-1, le virus se propage dans tout le cerveau des souris sensibles, alors qu'il se limite au tronc cérébral chez les animaux C57BL/6 résistants (308). Les auteurs suggèrent que la capacité de l'hôte à limiter la propagation virale dans le SNC pourrait être l'un des facteurs participant à la résistance naturelle à l'HSE mortelle des souris C57BL/6. Cependant, ce paramètre n'a pas été évalué au cours de mon étude. Il serait intéressant de comparer la dissémination du virus chez les souris sensibles BALB/c et résistantes C57BL/6-symptomatiques. De plus, l'analyse des différences dans les dommages cérébraux entre les trois types de souris (BALB/c sensibles, C57BL/6 symptomatiques ou non) pourrait être réalisée. En effet, à l'aide de co-marquage immunohistochimique, nous pourrions déterminer la localisation du virus dans les différentes zones cérébrales puis évaluer la proportion de neurones, de microglies, d'astrocytes et/ou d'oligodendrocytes en apoptose dans ces zones touchées. En complément, des tests comportementaux pourraient être faits afin d'analyser les zones du cerveau endommagées au cours de l'HSE expérimentale chez les trois types de souris cités précédemment

(443). Pour cela, des souris sensibles ou résistantes seraient infectées et testées au cours de la phase aiguë de la maladie à l'aide du test « Open Field » qui permettrait de déterminer l'activité locomotrice, les habitudes d'exploration et le stress émotionnel chez les souris, ainsi qu'à l'aide du test « SHIRPA » portant sur l'évaluation de la morphologie, du comportement, de la réponse sensorielle et des aptitudes sportives (446).

Par ailleurs, par rapport aux souris BALB/c sensibles, des monocytes inflammatoires, des cDCs, des pDCs, des cellules NKs et des cellules NKTs infiltrent plus précocement (jour 4 après l'infection) les cerveaux chez les souris résistantes C57BL/6 symptomatiques. Les monocytes inflammatoires infiltrent toujours le SNC au jour 6 après l'infection et sont suivis par l'infiltration de lymphocytes T au jour 8 après l'infection. Dans le cerveau des souris BALB/c, le recrutement est limité aux monocytes inflammatoires et aux lymphocytes T seulement au pic de la réplication virale (au jour 6 après l'infection). En conclusions, une infiltration des cellules immunitaires périphériques rapide, soutenue et coordonnée est essentielle pour la restriction précoce et efficace de la réplication virale dans le SNC.

Après une infection intranasale par le VHS-1, l'infiltration des monocytes inflammatoires dans le SNC des souris C57BL/6-symptomatiques débute au jour 4 et se poursuit au jour 6 après l'infection alors qu'elle est limitée au jour 6 après l'infection chez les souris BALB/c sensibles. À l'aide de souris C57BL/6 chimériques greffées avec des cellules dérivées de la moelle osseuse exprimant la protéine fluorescente verte, nous avons déjà rapporté que les monocytes infiltrent le SNC à la suite d'une infection intranasale par le VHS-1 (284). Ces monocytes infiltrants ont la capacité de se différencier en macrophages activés lors de l'HSE expérimentale. Ils infiltrent le tissu cérébral inflammé et exercent des activités pro-inflammatoires et phagocytaires (274). L'appauvrissement des monocytes, par de multiples injections intrapéritonéales de chlodronate liposomal à des souris C57BL/6 infectées par voie cornéenne par le VHS-1, augmente le taux de mortalité par rapport aux animaux recevant des liposomes vides et suggère un rôle protecteur des monocytes infiltrants le SNC pendant l'HSE expérimentale (429). De plus, les souris présentant un déficit hématopoïétique en CCR2 et infectées par voie intranasale par le VHS-1 présente une infiltration réduite de monocytes inflammatoires dans le SNC entraînant une réplication virale incontrôlée et une mortalité accrue par rapport aux animaux sauvages (351).

Au jour 4 après l'infection, les cDCs et les pDCs infiltrent le SNC des souris C57BL/6-symptomatiques. Les pDCs jouent un rôle essentiel dans l'immunité contre les infections à herpèsvirus en établissant un lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative. L'appauvrissement en DCs, positifs pour CD11c par injections intrapéritonéales de toxine diphtérique, chez des souris infectées, par le coussinet plantaire par le VHS-1, entraîne un taux de mortalité augmenté et des titres viraux infectieux plus élevés dans le SNC par rapport aux souris témoins. L'augmentation de la sensibilité des souris est attribuée à l'activation altérée des cellules NKs et des cellules T en l'absence de DCs (447). Les cDCs et les pDCs participent toutes les deux à l'activation des

cellules NKs et à l'immunité contre les VHS-1 conduite par les lymphocytes T cytotoxiques (448). De plus, les DCs sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (449). Elles subissent une maturation caractérisée par la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (450). Elles jouent également un rôle important dans la stimulation de la prolifération des cellules T allogéniques.

Le rôle des cellules NKs et des cellules NKTs, dans la restriction de la propagation virale au site d'inoculation et dans les ganglions sensitifs, est controversé et diffère selon les modèles animaux d'infection mucosale ou cutanée par le VHS-1 (319, 451, 452). Dans les expériences réalisées au cours de mon doctorat, une infiltration des cellules NKs et des cellules NKTs est observée dès le jour 4 après l'infection chez les souris résistantes C57BL/6-symptomatiques, mais pas chez les animaux BALB/c sensibles. La participation des cellules NKs dans le contrôle de l'infection par le VHS-1 dans le SNC a d'abord été rapportée chez les souris C57BL/6 infectées par voie intrapéritonéale avec le VHS-1 et appauvries en cellules NKs par de multiples injections intraveineuses d'anticorps anti-sialo GM1. Les souris appauvries en cellules NKs présentent une augmentation des titres viraux dans le cerveau, associée à un taux de mortalité plus élevé par rapport aux animaux témoins (453). Les cellules NKs semblent d'autant plus importantes que plusieurs loci associés à la résistance naturelle des souris C57BL/6, notamment *Rhs1* et *Hrl2*, sont reliés au locus complexe des cellules NKs situé sur le chromosome 6 (431, 454). Les cellules NKTs sont, quant à elles, des lymphocytes innés qui répondent rapidement à une infection. Ces cellules reconnaissent un antigène dérivé des lipides et présenté sur la molécule CD1d du CMH de classe I. Les cellules NKTs contribuent au contrôle de la réplication virale au site de l'infection et dans les ganglions sensitifs, ainsi que dans la prévention de la neuroinvasion, de la perte de neurones sensoriels et de la mortalité, comme cela a été rapporté par l'utilisation de souris déficientes en CD1d ou en récepteur T, infectées par voie cutanée par le VHS-1 (319). De plus, la participation des cellules NKs et des cellules NKTs dans la restriction de la propagation virale dans le SNC a été démontrée par l'utilisation de souris C57BL/6 résistantes infectées par le VHS-1 via la muqueuse buccale et traitées avec un anticorps monoclonal anti-NK1.1 (431).

Au jour 8 après l'infection, une infiltration des lymphocytes T est observée dans le cerveau des souris C57BL/6-symptomatiques, alors que celle-ci est observée plus précocement dans le cerveau des souris BALB/c. Les cellules T CD8⁺, les cellules NKs et les cellules NKTs sont importantes pour limiter la propagation du VHS-1 dans le tronc cérébral, comme le montre l'étude utilisant des souris C57BL/6 traitées avec des anticorps monoclonaux anti-CD8⁺ et anti-NK1.1 avant une infection de la muqueuse buccale par le VHS-1 (308). Cependant, une anomalie dans le recrutement, au tronc cérébral, des leucocytes, y compris des cellules NKs et des cellules T spécifiques du VHS-1, amène un taux de mortalité et des titres viraux plus élevés dans le SNC au cours de l'HSE expérimentale (455).

Par ailleurs, le contrôle de l'infection par le VHS-1 dans le SNC dépend principalement de la réponse immunitaire menée par la microglie (95, 96). La participation des cellules immunitaires cérébrales n'a pas été prise en compte lors de mon analyse. À l'aide d'étude par immunohistochimie et de microscopie électronique, nous pourrions analyser les interactions entre les microglies et le virus, l'activation des microglies, et leur mort cellulaire ainsi que la différence de ces facteurs chez les souris naturellement sensibles et résistantes (456). De plus, par l'utilisation d'un inhibiteur du CSF-1R, les souris BALB/c et C57BL/6 pourraient être appauvries en microglies avant et pendant l'infection intranasale par le VHS-1 (457). Cet appauvrissement nous permettrait d'analyser le rôle des microglies dans le contrôle de la réplication virale, dans l'infiltration des cellules immunitaires périphériques et dans la sécrétion des différentes cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines au sein du système nerveux central de deux phénotypes de souris au cours de l'HSE expérimentale. Et ainsi approfondir nos connaissances sur la composante immunitaire dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique (458).

En conclusion, j'ai confirmé la participation des cellules NKs/NKTs dans le phénotype de résistance des souris C57BL/6 à l'infection létale par le VHS-1, comme déjà suggéré dans plusieurs articles. Plus intéressant, l'importance d'une infiltration rapide, soutenue et coordonnée de monocytes inflammatoires, de cellules dendritiques, de cellules NKs/NKTs, et de cellules T dans la résistance des souris C57BL/6 à l'HSE a pu être démontrée. En ce sens, il serait intéressant d'analyser, par marquage immunohistochimique, les interactions entre les différentes cellules immunitaires périphériques infiltrantes et les cellules infectées par le VHS-1 ainsi qu'avec les microglies activées au cours de l'HSE expérimentale chez les deux phénotypes de sensibilité des souris.

En outre, une infiltration retardée de leucocytes semble contribuer à amplifier l'inflammation cérébrale globale (434), comme le suggère les taux de cytokines pro-inflammatoires (IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6), et de chimiokines (CXCL1, CCL2, CCL3 et CCL4) élevés dans le SNC des souris BALB/c sensibles au jour 8 après l'infection comparativement aux animaux C57BL/6-symptomatiques. L'augmentation de la production de ces médiateurs immunitaires pourrait résulter d'un manque de modulation de la réponse inflammatoire à des temps tardifs après l'infection. À cet égard, des souris 129 sensibles infectées via la cornée par le VHS-1 et traitées par de l'acyclovir au jour 4 après l'infection ont des titres viraux indétectables dans le cerveau, mais les animaux présentent toujours une neuroinflammation et succombent à l'infection, suggérant que la réponse immunitaire incontrôlée soit le facteur déterminant de l'exacerbation de la maladie et de la mortalité des souches de souris sensibles à l'HSE (283).

La sécrétion de ces différentes cytokines et chimiokines passent par l'activation des facteurs de transcription comme NF- κ B et/ou les IRFs (1, 114, 187, 191-193). Les IRF3 et IRF7 sont largement engagés

dans la réponse interféron au cours de l'infection du SNC par le VHS-1 chez les souris naturellement résistantes (136, 229, 459, 460). L'analyse de l'effet de la déficience en facteur de transcription IRF3 ou IRF7 sur la réponse immunitaire cérébrale innée à la suite de l'infection intranasale par le VHS-1 a été réalisée par l'utilisation de souris IRF3^{-/-} et IRF7^{-/-} sur fond génétique C57BL/6, infectées par voie intranasale par la même souche neurovirulente H25 du VHS-1. Les souris IRF3 et notamment IRF7 sont plus sensibles à l'infection intranasale que les animaux naturellement résistants C57BL/6. Ces taux de mortalité accrus sont associés à des charges virales et des titres infectieux augmentés dans le cerveau des deux types de souris déficientes par rapport aux souris sauvages, suggérant ainsi que les voies de reconnaissance incluant l'un et/ou l'autre de ces facteurs de transcription sont importantes pour le contrôle de la réplication virale.

Par ailleurs, à des temps précoces après l'infection (jour 3), la production d'IFN- α et - β est altérée dans le SNC des animaux IRF7^{-/-} par rapport aux souris sauvages alors que celle de l'IFN- β seulement est légèrement diminuée chez les souris IRF3^{-/-}. À des temps plus tardifs après l'infection (jour 5), les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, d'IFN- α , d'IFN- β et de chimiokines sont augmentés dans le cerveau des souris déficientes par rapport aux souris sauvages. Ces données suggèrent que la perte de contrôle de la réplication virale observée chez les souris déficientes semble être associée à un manque de production d'IFN. Et ce, à un moment critique après l'infection ce qui conduit à une surexpression d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines à un moment ultérieur et à un taux de mortalité plus élevé. Ainsi mes résultats démontrent que l'activation des voies de signalisation passant par IRF3, et en particulier par IRF7, est importante pour orchestrer une réponse immunitaire cérébrale innée efficace précocement au cours de l'HSE expérimentale.

Le VHS-1 peut être reconnu par plusieurs PRRs participant aux voies de signalisation résultant en l'activation d'IRF3 et/ou d'IRF7. Cependant, l'attribution d'un rôle prédominant des voies de signalisation passant par IRF3 ou IRF7 dans la synthèse des IFNs de type I est complexe et n'est pas clairement établie. La sensibilité accrue des animaux déficients en IRF3 ou en IRF7 à l'infection intranasale par le VHS-1 suggère que ces deux facteurs de transcription sont importants précocement dans le contrôle de la réplication virale dans le cerveau et dans la survie de la souris. Des études antérieures ont déjà montré le rôle critique des IFNs de type I dans l'immunité de l'hôte à l'infection par le VHS-1 dans des modèles animaux. Par exemple, un manque d'IFN de type I engendre une augmentation des titres viraux oculaires à la suite d'une infection cornéenne par le VHS-1 (229). De plus, une déficience en récepteurs de l'IFN de type I rend le VHS-1 capable de progresser d'une infection localisée à une maladie disséminée affectant plusieurs organes chez la souris, après une infection de la cornée ou du coussinet plantaire (459, 460). À un moment critique après l'infection, la production d'IFN- α et d'IFN- β est altérée chez les souris déficientes en IRF7 comparativement aux souris sauvages. En utilisant des souris déficientes en protéines TRIF et/ou IPS-1, nous avons préalablement montré, au sein du laboratoire,

qu'une production altérée d'IFN- β à un moment critique après l'infection intranasale par le VHS-1 est associée à une augmentation du taux de mortalité, une charge virale plus élevée dans le cerveau et une plus grande dissémination du virus dans le SNC (129).

Lorsqu'activés, les IRF3 et/ou IRF7 peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. Ces dimères exercent des effets différentiels sur l'expression des gènes *ifn* de type I. En outre IRF7 activé peut également former un complexe transcriptionnel avec NF- κ B, c-Jun, ATF-2 et p300/CREB sur la région du promoteur des gènes *ifn* de type I (213). Ceci expliquant que la production d'IFN de type I semble plus affectée par la déficience en IRF7 qu'en IRF3, comme également démontré dans une étude utilisant un modèle d'infection intracrânienne ou intraveineuse par le VHS-1 (461, 462). D'autres groupes rapportent que les taux de mortalité des souris déficientes en IRF3, infectées par voie intracrânienne par le VHS-1 sont augmentés par rapport aux souris sauvages et associés à un déficit de production à la fois d'IFN- α et - β dans le cerveau comparé à une légère diminution d'IFN- β seulement dans mon étude (463). Ces auteurs ont utilisé un modèle murin différent et ont mesuré les taux d'IFN de type I dans les homogénats de cerveaux à 12 et 18H après l'infection. Ainsi je ne peux pas exclure que la voie d'administration ainsi que le moment auquel les taux d'IFN de type I ont été mesurés, puissent faire varier les résultats obtenus dans mon étude, comparativement à ceux retrouvés dans la littérature. En outre, la voie d'inoculation du virus peut générer des variations dans les symptômes et conduire à différentes réponses immunitaires chez la souris. Le mode d'infection intracrânienne n'étant pas la voie physiologique par laquelle le VHS-1 accède au SNC (440).

Par ailleurs les sous-types d'IFN- α produits au cours de l'HSE chez les souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 pourraient jouer un rôle délétère au niveau du SNC. En effet, la production des sous-types IFN- α 4 et IFN- α 5 est préférentielle chez la souris. Cependant, une induction privilégiée des ARNms IFN- α 1 et IFN- α 5 a été observée lors de la stimulation de fibroblastes embryonnaires murins IRF3^{-/-} comparativement aux fibroblastes provenant de souris sauvages (216). Dans mon étude, je n'ai pas observé de diminution significative de la production d'IFN- α chez les souris déficientes en IRF3, cependant je ne peux pas exclure qu'un changement dans la proportion des sous-types d'IFN- α pourrait jouer un rôle délétère au cours de la réponse immunitaire cérébrale innée lors de l'encéphalite herpétique, et ainsi participer à la sensibilité accrue observée chez ces souris déficientes en IRF3. Il serait donc intéressant d'analyser les sous-types d'IFN- α produits au cours de l'HSE chez ces souris déficientes en IRF3, comparativement à ceux produits chez les souris sauvages.

À des temps plus tardifs après l'infection, la production d'IFN- α et - β est plus élevée dans le cerveau des deux types de souris déficientes que celle chez les animaux sauvages. Par l'utilisation de souris déficientes en TRIF ou en IPS-1 infectées par voie intranasale avec le VHS-1, nous avons déjà rapporté, au sein du

laboratoire, une production augmentée tardive des IFNs de type I dans le cerveau (129). Nous suggérons que cette augmentation de la production des IFNs de type I puisse être à la fois trop tardive pour contrôler la réplication virale, et nuisible au SNC chez les souris déficientes. En effet, une production accrue transitoire d'IFN- α est neurotoxique. Dans un modèle murin, lors d'une encéphalite causée par le virus de l'immunodéficiência humaine, la microglie cérébrale associée peut être diminuée par des injections intrapéritonéales d'anticorps neutralisant l'IFN- α et ainsi, améliorer significativement les fonctions cognitives des souris (464). En outre, la neurotoxicité de l'IFN- α est associée à plusieurs maladies telles que le lupus érythémateux, la sclérose en plaques ou divers types d'encéphalites (465). Nous pourrions donc compléter l'étude de la production des sous types d'IFN- α , par l'analyse de l'effet d'un traitement à base d'anticorps neutralisant l'IFN- α chez les souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 au cours de l'encéphalite herpétique. Cette étude permettrait de définir si la surproduction d'IFN- α à des temps tardifs après l'infection joue un rôle délétère au cours de l'HSE expérimentale.

Par ailleurs, les niveaux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et chimiokines sont augmentés chez les souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 par rapport aux souris sauvages. Au jour 5 après l'infection, j'ai observé une augmentation des niveaux d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12p40, d'IL-12p70, d'IFN- γ , de CCL2, de CCL3, de CCL4 et de CCL5 dans le cerveau des souris déficientes en IRF3 ou en IRF7 par rapport aux souris sauvages et une augmentation de TNF seulement chez les souris IRF7. Les taux d'IL-1 β et d'IL-6, dans le cerveau des souris déficientes en IRF7, sont plus importants que ceux dans les cerveaux des souris déficientes en IRF3. Ces résultats suggèrent que la déficience en IRF3 ou en IRF7 chez des souris infectées par voie intranasale par le VHS-1 est accompagnée d'une surexpression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines dans le tissu cérébral, indépendante de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription. Une telle augmentation pourrait induire des dommages cérébraux et expliquer la plus grande susceptibilité de la souris à l'infection. L'inflammation cérébrale pourrait être en partie responsable des lésions cérébrales au cours de l'HSE expérimentale. À cet égard, le traitement avec des médicaments immunomodulateurs tels que les glucocorticoïdes, un anticorps anti-TNF améliore le pronostic de l'HSE expérimentale (68, 397).

Ces deux premières études m'ont permis de montrer une association entre mortalité accrue et haut taux de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines au niveau du SNC. Plus précisément, les taux d'IL-1 β , d'IL-6, d'IFN- γ , de CCL2, de CCL3 et de CCL4 étaient à la fois significativement augmentés chez les souris BALB/c naturellement sensibles à l'infection et chez les souris rendues sensibles par la déficience en IRF3 et de manière plus importante chez les souris rendues sensibles par la déficience en IRF7.

Les TLR2, 3 et 9 sont les plus engagés dans la reconnaissance du VHS-1 au cours de l'infection chez la souris (192). C'est en ce sens, que j'ai choisi d'évaluer l'effet d'un traitement immunomodulateur ciblant l'un ou l'autre de ces TLRs en combinaison avec un antiviral. Un traitement à l'artésunate est efficace contre des infections par le VHS-2 multirésistantes aux antiviraux chez des personnes receveuses de greffes hématopoïétiques. Il agit comme agent modulateur sur les voies de signalisation passant par TLR2 et TLR9 au cours d'infection bactérienne, alors que la rapamycine est connue pour ces effets immunomodulateurs et a une activité immunomodulatrice sur les voies de signalisation pouvant passer par TLR3 via la molécule adaptatrice mTOR.

Au cours de cette étude, je n'ai montré aucune activité antivirale que ce soit *in vitro* ou *in vivo* de ces deux molécules. J'ai utilisé dans un premier temps un modèle murin d'HSE à faible inoculum viral afin d'évaluer l'effet de l'ART et de la RAPA seul sur la gravité de la maladie et sur la mortalité. Le traitement de ces souris avec l'ART ou la RAPA seul a augmenté les taux de survie, sans réduction de la charge virale dans les SNC des souris traitées. J'ai ensuite utilisé un modèle d'HSE à haut inoculum viral avec un traitement antiviral, le VACV, afin d'avoir un taux de mortalité d'environ 50 %, pour évaluer l'avantage de la combinaison de l'antiviral avec l'ART ou la RAPA. Les taux de survie des souris traitées avec l'une ou l'autre des combinaisons étaient augmentés comparativement à celui des souris traitées avec l'antiviral seul. Une diminution significative des taux de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines a pu être observée chez les souris traitées avec la combinaison VACV/ART. Les mécanismes d'action de la RAPA restent moins clairs.

L'amélioration des taux de survie des souris traitées avec le VACV combiné avec l'ART ou la RAPA par rapport à l'antiviral seul ne pouvait pas être expliquée par un effet direct sur la réplication virale dans le SNC. En effet, je n'ai observé aucune diminution significative de la charge virale et des titres infectieux dans les homogénats de cerveaux pour ces deux groupes comparés au VACV seul. De même l'ART ou la RAPA ajouté aux cellules avant et/ou après l'infection par la souche H25 du VHS-1 n'a démontré aucune activité antivirale *in vitro* aux concentrations les plus élevées testées (30 μ M et 10 μ M respectivement). Des résultats contradictoires ont été précédemment rapportés dans la littérature concernant l'activité antivirale de l'ART contre le VHS. En effet, une activité *in vitro* puissante de l'ART sur la réplication du VHS-1 a été montrée lors d'une première étude (466), alors que, comme démontré dans mes expériences, aucun autre groupe n'a trouvé d'effet inhibiteur vis-à-vis du VHS-1 (467). Aucune donnée dans la littérature n'avait analysé l'effet antiviral de la RAPA sur le VHS-1 *in vitro*.

Le potentiel immunomodulateur de la RAPA est principalement dû au blocage de plusieurs voies de transduction du signal dans les lymphocytes T stimulés par les cytokines (421, 422). Dans l'immunité innée, le rôle central de la kinase mTOR est défini par sa capacité à réguler à la baisse la production de cytokines pro-

inflammatoires (468). L'inhibition de l'activité de la kinase mTOR par la RAPA pourrait favoriser la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6 et l'IFN- γ en augmentant l'activité NF- κ B dans les monocytes humains ou les cellules dendritiques myéloïdes à la suite de la stimulation TLR (469, 470). Ceci suggère que, malgré une production accrue de cytokines pro-inflammatoires par le système immunitaire inné, l'effet de la RAPA serait de supprimer la stimulation des cellules T (421). Dans mes expériences, les taux d'IFN- γ , d'IL-2 et en particulier d'IL-6 étaient augmentés dans les homogénats de cerveaux des souris traitées avec le VACV et la RAPA par rapport aux souris traitées avec la thérapie antivirale seule au jour 7 après l'infection tandis que leurs niveaux diminuaient significativement au jour 9 après l'infection. Par conséquent, l'efficacité améliorée du VACV combiné à la RAPA, comparativement au VACV seul, pourrait passer par un effet inhibiteur sur les lymphocytes T en réponse à des cytokines pro-inflammatoires produites au cours de l'HSE expérimentale par des cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes. En outre, le traitement des souris par le VACV combiné à la RAPA n'a pas affecté les niveaux de chimiokines dans les homogénats de cerveaux par rapport à la thérapie antivirale seule, suggérant que la RAPA pourrait ne pas affecter l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC au cours de l'HSE expérimentale. Il est également important de noter que la RAPA traverse rapidement la BHE (471) et pourrait exercer certains effets directs dans le SNC.

La reconnaissance des composants du VHS est réalisée par les TLR2, TLR3 et TLR9 (192). L'ART protège les souris dans un modèle de septicémie bactérienne en agissant sur les voies de signalisation des TLR2 et TLR9 (414, 415). Le mécanisme d'action de l'ART décrit résulte en une diminution de l'expression des ARNm des TLR2 et TLR9 après stimulation par des bactéries tuées par la chaleur et l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF- κ B entraînant une production réduite de cytokines pro-inflammatoires. Dans mes expériences, j'ai observé que le traitement des souris avec le VACV combiné avec l'ART a significativement diminué le taux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β , IL-2 et IL-6) dans les homogénats de cerveaux par rapport à la thérapie antivirale seule. Cette réduction de la réponse inflammatoire dans le SNC pourrait ainsi expliquer l'augmentation du taux de survie observée chez les souris traitées avec cette thérapie combinée. Au sein du laboratoire, le bénéfice de l'administration d'un antagoniste du TLR9 au jour 3 après l'infection a déjà été rapporté. Lors de cette étude, le taux de survie dans un modèle d'HSE expérimentale est amélioré grâce à un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire tardive pouvant être préjudiciable à l'hôte (140).

Au jour 5 après l'infection, le taux de plusieurs chimiokines (c'est-à-dire, CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5) est significativement augmenté chez les souris infectées non traitées. En utilisant des souris chimériques C57BL/6 transplantées avec des cellules dérivées de moelle osseuse exprimant la GFP, nous avons démontré au sein du laboratoire, l'infiltration de monocytes/macrophages périphériques dans le

parenchyme cérébral au cours de l'HSE expérimentale (284). De plus, j'ai rapporté que lors de l'HSE expérimentale, les cellules NKs/NKTs, les CD4 ainsi que les lymphocytes T infiltrent le SNC des souris, en plus des monocytes (472). Le traitement des souris avec le VACV combiné à l'ART a provoqué une réduction significative des taux de CCL3, CCL4 et en particulier de CCL2 dans les homogénats de cerveau par rapport aux souris traitées avec l'antiviral seul au jour 7 après l'infection, suggérant que l'ART pourrait diminuer et/ou modifier l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC au cours de l'HSE expérimentale. En utilisant des souris déficientes en CCR2 (soit au niveau cérébral, soit au niveau hématopoïétique), nous avons préalablement montré que la voie de signalisation CCL2-CCR2 est responsable de la sortie des leucocytes inflammatoires de la moelle osseuse vers le sang lors de l'HSE expérimentale (351). Cependant, cette dernière étude ne nous a pas permis de montrer que la signalisation via CCR2 soit critique au niveau des cellules résidentes du SNC. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'ART seul sur la production des cytokines pro-inflammatoires et sur le recrutement des cellules immunitaires périphériques au cours de l'HSE expérimentale dans nos modèles murins sensibles à l'infection intranasale par le VHS-1. Celle-ci pourrait être combinée à une étude visant à analyser le recrutement des cellules immunitaires périphériques également chez des souris BALB/c traitées par une thérapie combinée avec l'ART.

Dans notre modèle murin d'HSE, le traitement par le VACV a commencé au jour 3 après l'infection pour diminuer rapidement la réplication virale dans le cerveau. L'administration des agents immunomodulateurs a été retardée au jour 4 après l'infection pour prévenir le développement d'une neuroinflammation préjudiciable. Des études supplémentaires et la recherche de marqueurs de l'inflammation sont nécessaires pour déterminer le moment auquel le traitement avec des agents immunomodulateurs doit être initié pour exercer une activité optimale, ainsi que leurs doses et leurs schémas d'administration.

D'autres molécules immunomodulatrices pourraient avoir un potentiel thérapeutique intéressant en combinaison avec un antiviral dans le traitement de l'encéphalite herpétique. En effet, cibler des cytokines pro-inflammatoires ou des chimiokines pourrait être également une bonne stratégie thérapeutique. En ce sens, les différentes études réalisées au cours de mon doctorat mettent en avant trois cytokines pro-inflammatoires et une chimiokine dont la participation à la pathogenèse de l'HSE expérimentale pourrait être examinée plus en profondeur. En effet, les taux d'IL-1 β , d'IL-6, d'IFN- γ et de CCL2 sont à la fois augmentés chez les souris naturellement sensibles et chez les souris rendues sensibles par la déficience en IRF3 et notamment en IRF7. De plus, le taux de toutes ces cytokines pro-inflammatoires et chimiokine, est réduit par l'ajout d'ART au traitement antiviral lors de l'HSE expérimentale.

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire qui orchestre la réponse inflammatoire. Elle augmente les réponses des lymphocytes T, augmente l'expression des molécules d'adhésion vasculaire et permet la

production d'un certain nombre d'autres cytokines, chimiokines et molécules pro-inflammatoires associées à l'inflammation qui forment une cascade amplificatrice pour stimuler le système immunitaire. La microglie exprimant la caspase 1, l'enzyme responsable du clivage de la pro-IL-1 β en sa forme active, semble être la source la plus importante d'IL-1 β après une lésion, une infection ou une inflammation expérimentale du système nerveux central (473). Les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales peuvent également produire de l'IL-1 β , mais il semble que leur production soit postérieure à la réponse microgliale (474). Alors que, l'IL-1 β a des effets aigus puissants, elle joue également un rôle dans les maladies chroniques du SNC. L'IL-1 β est élevée dans le liquide céphalorachidien et dans les lésions démyélinisées des patients atteints de sclérose en plaques (475, 476) et dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de la maladie de Parkinson (477). En outre, il a été démontré que l'IL-1 β est associée à la démence associée au virus de l'immunodéficience humaine (478). La présence de l'IL-1 β dans les maladies neurodégénératives aiguës et chroniques, suggère donc un rôle important de cette cytokine dans de nombreux processus de maladies neurologiques.

En cas d'inflammation, la microglie libère des cytokines, des chimiokines, des prostaglandines, des espèces réactives d'oxygène et d'azote et des protéases (479). L'IL-1 β stimule l'expression et la libération de ces molécules à partir de la microglie. En effet, IL-1 β permet l'expression des gènes de la phospholipase A2 (480) et de la cyclooxygénase-2 (481). Ces médiateurs de l'inflammation dérivés des lipides peuvent induire un œdème, néfaste pour la fonction neuronale et la survie. Lors de mon étude, ces différents médiateurs n'ont pas été pris en compte dans l'évaluation de la neuroinflammation au cours de l'HSE expérimentale. Il serait intéressant d'analyser leur production chez les différents phénotypes de souris. En outre, un sous-produit de la catalyse par COX-2 est la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui, selon de nombreuses études, contribuent aux dommages au cerveau (482). En fait, les inhibiteurs de la cyclooxygénase sont couramment utilisés pour traiter diverses affections inflammatoires et constituent une stratégie thérapeutique pour réduire la production de PGE2 stimulée par l'IL-1 β . En ce sens, l'étude de la production de ces espèces réactives de l'oxygène et de leur neutralisation pourrait faire l'objet d'une étude approfondie en vue de compléter nos connaissances sur la composante immunitaire de la pathogenèse de l'HSE et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques afin de combiner un traitement anti-inflammatoire et le traitement antiviral.

L'IL-6 est une cytokine prototypique à quatre hélices qui est le membre fondateur des neuropoïétines, un groupe de cytokines structurellement apparentées. Les cellules gliales et neuronales expriment à la fois l'IL-6 et le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) à différents degrés dans le cerveau (483). Outre les neurones et les cellules gliales, les cellules endothéliales produisent de grandes quantités d'IL-6, qui peuvent agir sur les cellules environnantes, mais aussi de manière autocrine, régulant un certain nombre de protéines d'adhésion et

également la néo-synthèse d'IL-6. L'IL-6 du SNC est régulée à la hausse lors d'une infection, d'une blessure du SNC ou d'un certain nombre d'affections du SNC. L'IL-6 était exprimée et produite dans le SNC pendant une méningite virale, chez des modèles murins d'encéphalite et dans le LCR de patients atteints d'infections virales aiguës (484). En outre, l'IL-6 est très répandue dans le LCR des patients atteints de lupus érythémateux disséminé au système nerveux central (485) ou chez les patients à un stade avancé d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine (486). Par ailleurs, une augmentation significative de la concentration d'IL-6 est retrouvée dans le LCR des patients atteints d'HSE, par rapport au groupe témoin, ce qui suggère leur rôle dans la pathogenèse du SNC pendant l'évolution de l'infection à VHS. De plus, les taux d'IL-6 sont plus élevés dans les cas d'évolution sévères d'HSE (487). En ce sens, l'IL-6 pourrait être envisagé comme une cible thérapeutique dans le cadre d'un traitement immunomodulateur complémentaire à la thérapie antivirale au cours de l'HSE expérimentale.

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée principalement par des cellules NKs, les cellules T TH1 CD4⁺ et les cellules T CD8⁺ infiltrantes le SNC. L'IFN- γ intervient dans une vaste gamme d'effets immunomodulateurs sur l'immunité innée et acquise (488). L'IFN- γ régule positivement l'expression des CHM-I et CMH-II, active les macrophages/microglies de manière spécifique à l'antigène et engendre plusieurs mécanismes antiviraux (488). Bien que l'expression de l'IFN- γ dans le SNC ait été traditionnellement attribuée à l'infiltration de cellules NKs et de lymphocytes T CD4⁺, des rapports de la littérature indiquent qu'il peut exister des sources d'expression endogènes, comme les neurones (489) et les microglies (490). L'activation de la microglie par l'interféron- γ participe dans un certain nombre de processus de maladies inflammatoires du système nerveux central. L'IFN- γ joue également un rôle dans l'apoptose, via la voie de signalisation FAS/FAS-L (491) ou la synthèse d'espèce réactive de l'oxygène (492). En ce sens, bien que l'IFN- γ jouerait un rôle primordial dans la réponse antivirale dépendante des cellules NKs et des cellules T cytotoxiques, il serait intéressant d'analyser son rôle dans l'apoptose des cellules résidentes du SNC au cours de l'HSE expérimentale.

Tout comme l'IL-1 β , l'IL6 et l'IFN- γ , CCL2 a un effet sur la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (493-496). La barrière hématoencéphalique est une structure dynamique qui maintient l'homéostasie du cerveau. L'altération de la barrière hématoencéphalique est retrouvée dans de nombreuses conditions pathologiques incluant la neuroinflammation. La HSE est associée à des perturbations de la barrière hématoencéphalique, constituée de cellules endothéliales microvasculaires, de jonctions serrées, d'astrocytes, de péricytes et de membranes basales. À la suite d'une infection par le VHS-1, des modifications de l'intégrité et de la perméabilité de BHE peuvent entraîner une augmentation des mouvements de virus, de cellules immunitaires et/ou de cytokines dans le parenchyme cérébral. Cela conduit à une réponse inflammatoire accrue

dans le système nerveux central et à des dommages supplémentaires au cerveau. Plusieurs études indiquent une association entre la dégradation de la BHE et la pathogenèse de HSE (497). Il est intéressant de noter, que chez les souris C57BL/6 nous n'avons pas rapporté de bris de la barrière hématoencéphalique au cours de l'HSE expérimentale (284). Il est possible qu'une perturbation de la barrière hématoencéphalique participe à la sensibilité accrue chez les souris BALB/c. En ce sens, il serait intéressant d'étudier l'impact de la perturbation et/ou du bris de la barrière hématoencéphalique dans la pathogenèse de l'HSE expérimentale, et ainsi découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin de protéger la barrière hématoencéphalique en vue de réduire les dommages cérébraux au cours de l'HSE.

En outre, les voies de signalisation participantes à la production de ces différentes cytokines pro-inflammatoires restent à élucider. La déficience en IRF3 ou en IRF7 ne semble pas affecter la production de ces cytokines pro-inflammatoires et chimiokines. Cependant, malgré des preuves *ex vivo* que les rôles d'IRF3 et IRF7 ne sont pas redondants (216), je ne peux pas exclure qu'ils puissent se compenser l'un l'autre chez les souris déficientes au cours de l'HSE expérimentale. D'autres parts, d'autres facteurs de transcription tels que IRF1 (215), NF- κ B (498) et le complexe d'ATF-2/cJun (499) pourraient être engagés dans la synthèse de ces molécules au cours de l'HSE expérimentale. NF- κ B est la voie de signalisation la plus susceptible de participer à cette production. En effet, dans mon étude, l'ART réduit la production de ces cytokines pro-inflammatoires et chimiokine au cours de l'HSE expérimentale, et peut agir sur le facteur de transcription NF- κ B (414, 415). Cependant, le rôle des voies de signalisation participantes à la surexpression de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ et CCL2 au cours de la neuroinflammation durant l'HSE expérimentale, doit être approfondi.

Conclusion

Les infections, causées par le virus herpès simple, sont nombreuses et fréquentes dans les pays industrialisés, et encore plus dans ceux en voie de développement. Ce virus, par ces propriétés caractéristiques à savoir la latence et la neurovirulence, peut induire des pathologies récurrentes et/ou sévères. C'est un virus complexe qui a fait l'objet de nombreuses études visant à caractériser son cycle répliatif, comprendre ses propriétés biologiques caractéristiques ainsi que l'immunité qu'il engendre chez l'hôte. Le virus herpès simple 1 est capable d'atteindre le système nerveux central et de s'y répliquer. Il provoque alors une encéphalite herpétique qui est la cause la plus fréquente des encéphalites virales sporadiques mortelles aux États-Unis.

La pathogenèse de cette infection n'est pas totalement connue, mais la répliation du virus engendre une encéphalite aiguë nécrosante du lobe temporal/frontal et une inflammation cérébrale menant à l'infiltration des cellules immunitaires périphériques au sein du système nerveux central. Bien que la communauté scientifique possède de nombreux outils, dont les modèles animaux, les difficultés d'étude du SNC et de son immunité limitent encore notre compréhension de cette pathologie.

L'immunité innée est décrite comme étant importante pour le contrôle de la répliation virale au sein du SNC. Cependant, de plus en plus de preuves montrent un rôle délétère de cette réponse et de la réaction inflammatoire qui en découle au cours de l'encéphalite herpétique. Il est donc essentiel de mieux comprendre cette réponse immunitaire cérébrale innée qui se déroule au cours de l'encéphalite herpétique afin d'appréhender une potentielle composante immunitaire dans sa pathogenèse. Cette compréhension pourrait permettre de mettre en place des stratégies thérapeutiques complémentaires aux antiviraux, basées sur des molécules immunomodulatrices, et ainsi réduire les séquelles neurologiques irréversibles associées à l'encéphalite herpétique.

Au cours de mon doctorat, j'ai démontré l'importance critique de la cinétique d'infiltration des cellules immunitaires périphérique au cours de l'encéphalite herpétique expérimentale. En effet, les expériences ont montré qu'une infiltration rapide, soutenue et coordonnée de monocytes inflammatoires, de cellules dendritiques, de cellules NKs/NKTs, et de cellules T participe à la résistance des souris C57BL/6 à l'HSE. Cependant, le rôle de chaque cellule immunitaire spécifiquement n'a pas été analysé. En ce sens, il serait intéressant d'analyser, chez les souris sensibles (BALB/c) et résistantes (C57BL/6) à l'HSE expérimentale, les interactions entre les différentes cellules immunitaires périphériques infiltrantes et les cellules infectées par le VHS-1.

Par ailleurs, la production d'IFN de type I est altérée par la déficience en IRF3 ou en IRF7, mais pas abolie. Ces résultats suggèrent qu'il existe une redondance entre ces deux facteurs de transcription ou une compensation par d'autres voies de signalisation dans la production d'IFN de type I en réponse au VHS-1. Parmi les voies de signalisation potentielles, celles passant par STING semblent les plus importantes. En ce sens, il serait intéressant d'analyser l'effet de la déficience en STING, sur la production d'IFN de type I et sur une neuroinflammation potentielle délétère au cours de l'encéphalite herpétique expérimentale.

À l'aide des différentes expériences menées au cours de mon doctorat, j'ai également démontré une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ) et de chimiokine (CCL2), dont les taux sont diminués par l'ajout d'un traitement immunomodulateur (ART) à la thérapie antivirale dans un modèle murin d'HSE. Ces données apportent de nouvelles preuves d'une composante immunitaire de la pathogenèse de l'encéphalite herpétique, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Cependant, ces travaux ont également posé de nouvelles questions, dont les réponses permettront d'affiner nos connaissances de la pathogenèse de l'encéphalite herpétique. En effet, l'immunité mucoale n'a pas été prise en compte lors de mon analyse et représente la première défense contre le virus dans le cadre de l'infection intranasale. Cette immunité devrait être étudiée au cours de l'HSE expérimentale et son rôle dans la mise en place de l'immunité cérébrale innée analysé. Par ailleurs, les microglies sont les sentinelles du système nerveux central et participent à l'immunité cérébrale anti-VHS. Ces cellules produisent des médiateurs inflammatoires en réponse aux pathogènes et communiquent avec les cellules environnantes. Approfondir nos connaissances sur leur implication au cours de l'encéphalite herpétique, sur leur rôle dans la surproduction de médiateurs inflammatoire, sur leur interaction avec les cellules infectées et les cellules immunitaires périphériques infiltrantes est essentiel.

Bibliographie

1. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes simplex viruses. Fields virology, 6th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2013;2:1823–97.
2. Pellett P, Davison A, Eberle R, Ehlers B, Hayward G, Lacoste VH. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011.
3. Pellet PE, Roizman B. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) Fields Virology, 5th edn: Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA; 2007. p. 2480-99.
4. Zamora MR. DNA viruses (CMV, EBV, and the herpesviruses). Seminars in respiratory and critical care medicine. 2011;32(4):454-70.
5. Laurent R. Herpès. EMC - Médecine. 2005 ; 2(3) : 265-75.
6. Wagner EK, Sandri-Goldin, R.M. Herpes Simplex Viruses: Molecular Biology. Encyclopedia of Virology. 2008;2:397-405.
7. Aurelian L, Specter S, Hodinka RL, Young SA, Wiedbrauk DL. Herpes simplex viruses. Clinical virology manual. 2009(Ed. 4):424-53.
8. Muylaert I, Tang KW, Elias P. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. The Journal of biological chemistry. 2011;286(18):15619-24.
9. Lopez M, Cocchi F, Menotti L, Avitabile E, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G. Nectin2alpha (PRR2alpha or HveB) and nectin2delta are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D. Journal of virology. 2000;74(3):1267-74.
10. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. Journal of cell science. 2003;116(Pt 1):17-27.
11. Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY, Shukla D. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. J Cell Biol. 2006;174(7):1009-21.
12. Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. Journal of virology. 2005;79(11):6655-63.
13. Radtke K, Kieneke D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, Scholz T, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. PLoS pathogens. 2010;6(7):e1000991.
14. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. Journal of virology. 2008;82(7):3311-9.
15. Batterson W, Roizman B. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. Journal of virology. 1983;46(2):371-7.

16. Taddeo B, Zhang W, Roizman B. The U(L)41 protein of herpes simplex virus 1 degrades RNA by endonucleolytic cleavage in absence of other cellular or viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2827-32.
17. Livingston CM, DeLuca NA, Wilkinson DE, Weller SK. Oligomerization of ICP4 and rearrangement of heat shock proteins may be important for herpes simplex virus type 1 prereplicative site formation. *Journal of virology*. 2008;82(13):6324-36.
18. Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. Herpes simplex virus. *Front Biosci*. 2002;7:d752-64.
19. Conway JF, Homa FL, Weller SK. Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of herpes simplex virus. *Alphaherpesviruses* Caister Academic Press, Norwich, United Kingdom. 2011:175-93.
20. Perng GC, Jones C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2010;2010:262415.
21. Roizman B. The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: the role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *Journal of virology*. 2011;85(15):7474-82.
22. Bloom DC, Kwiatkowski DL. HSV-1 latency and the roles of the LATs. Weller SK *Alphaherpesviruses: Molecular Virology* 2011. p. 295-316.
23. Bloom DC, Hill JM, Devi-Rao G, Wagner EK, Feldman LT, Stevens JG. A 348-base-pair region in the latency-associated transcript facilitates herpes simplex virus type 1 reactivation. *Journal of virology*. 1996;70(4):2449-59.
24. Lachmann R. Herpes simplex virus latency. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2003;5(29):1-14.
25. Booss J, Esiri MM. Sporadic encephalitis. *Viral Encephalitis: Pathology, Diagnosis and Management*: Cambridge, Massachusetts: Blackwell Scientific Publishers, 1986:55-93; 1986.
26. Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, et al. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene therapy*. 2004;11(22):1648-58.
27. Chou J, Chen JJ, Gross M, Roizman B. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(23):10516-20.
28. Orvedahl A, Alexander D, Talloczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell host & microbe*. 2007;1(1):23-35.

29. Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, et al. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *Journal of virology*. 2012;86(9):5264-77.
30. Imai T, Arai J, Minowa A, Kakimoto A, Koyanagi N, Kato A, et al. Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B. *Journal of virology*. 2011;85(10):5003-15.
31. Dambrosi S, Martin M, Yim K, Miles B, Canas J, Sergerie Y, et al. Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. *J Med Virol*. 2010;82(6):1000-6.
32. Inagaki T, Satoh M, Fujii H, Yamada S, Shibamura M, Yoshikawa T, et al. Acyclovir Sensitivity and Neurovirulence of Herpes Simplex Virus Type 1 with Amino Acid Substitutions in the Viral Thymidine Kinase Gene, Which Were Detected in the Patients with Intractable Herpes Simplex Encephalitis Previously Reported. *Jpn J Infect Dis*. 2018;71(5):343-9.
33. Boivin G, Coulombe Z, Rivest S. Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci*. 2002;16(1):29-43.
34. Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, Kakiuchi S, Suzutani T, Nakamichi K, et al. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(5):404-10.
35. Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009;7(5):559-68.
36. Whitley RJ, Roizman B, Richman DD, Hayden FG. Herpes simplex viruses. *Clinical virology*. 2009(Edition 3):409-36.
37. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001;357(9267):1513-8.
38. Harel L, Smetana Z, Prais D, Book M, Alkin M, Supaev E, et al. Presence of viremia in patients with primary herpetic gingivostomatitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(5):636-40.
39. Smith L, Angarone MP. Sexually Transmitted Infections. *The Urologic clinics of North America*. 2015;42(4):507-18.
40. Hofstetter AM, Rosenthal SL, Stanberry LR. Current thinking on genital herpes. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(1):75-83.
41. Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A. Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(4):1454-7.

42. Hill GM, Ku ES, Dwarakanathan S. Herpes simplex keratitis. *Disease-a-month: DM*. 2014;60(6):239-46.
43. Stephenson-Famy A, Gardella C. Herpes simplex virus infection during pregnancy. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2014;41(4):601-14.
44. Tan DH, Kaul R, Walsmley S. Left out but not forgotten: Should closer attention be paid to coinfection with herpes simplex virus type 1 and HIV? *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada*. 2009 ; 20(1) :e1-7.
45. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes*. 2004;11 Suppl 2:57A-64A.
46. Baringer JR. Herpes simplex virus and Bell palsy. *Ann Intern Med*. 1996;124(1 Pt 1):63-5.
47. Gnann JW, Jr., Whitley RJ. Herpes Simplex Encephalitis: an Update. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(3):13.
48. Tyler KL. Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis*. 2004;1(4):169-78.
49. Dagsdottir HM, Sigurethardottir B, Gottfreethsson M, Kristjansson M, Love A, Baldvinsdottir GE, et al. Herpes simplex encephalitis in Iceland 1987-2011. *Springerplus*. 2014;3:524.
50. Najjioullah F, Bosshard S, Thouvenot D, Boibieux A, Menager B, Biron F, et al. Diagnosis and surveillance of herpes simplex virus infection of the central nervous system. *J Med Virol*. 2000;61(4):468-73.
51. Aurelius E. Neurological Disease in Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Infection. *INFECTIOUS DISEASE AND THERAPY SERIES*. 2005;36:317.
52. Alonso-Vanegas MA, Quintero-Lopez E, Martinez-Albarran AA, Moreira-Holguin JC. Recurrent Herpes Simplex Virus Encephalitis After Neurologic Surgery. *World Neurosurg*. 2016;89:731 e1-5.
53. Saito M, Kiyozaki H, Obitsu T, Imoto H, Taniyama Y, Takata O, et al. Herpes simplex virus-1 encephalitis induced by chemoradiotherapy and steroids in an esophageal cancer patient: a case report. *BMC Cancer*. 2016;16:233.
54. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2016;13(3):493-508.
55. Jordan B, Kosling S, Emmer A, Koch A, Muller T, Kornhuber M. A study on viral CNS inflammation beyond herpes encephalitis. *Journal of neurovirology*. 2016.
56. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*. 2004;11 Suppl 2:48A-56A.

57. Linnoila JJ, Binnicker MJ, Majed M, Klein CJ, McKeon A. CSF herpes virus and autoantibody profiles in the evaluation of encephalitis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2016;3(4):e245.
58. Algahtani H, Shirah B, Hmoud M, Subahi A. Nosocomial herpes simplex encephalitis: A challenging diagnosis. *Journal of infection and public health*. 2016.
59. Saraya AW, Wacharapluesadee S, Petcharat S, Sittidetboripat N, Ghai S, Wilde H, et al. Normocellular CSF in herpes simplex encephalitis. *BMC research notes*. 2016;9:95.
60. Zarrouk K, Piret J, Boivin G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res*. 2017;234:177-92.
61. Zuckerman R, Wald A. Herpes simplex virus infections in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 4:S104-7.
62. Lizarraga KJ, Alexandre LC, Ramos-Estebanez C, Merenda A. Are steroids a beneficial adjunctive therapy in the immunosuppressed patient with herpes simplex virus encephalitis? *Case reports in neurology*. 2013;5(1):52-5.
63. Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Current neurology and neuroscience reports*. 2013;13(12):414.
64. Solomon T, Michael BD, Smith PE, Sanderson F, Davies NW, Hart IJ, et al. Management of suspected viral encephalitis in adults--Association of British Neurologists and British Infection Association National Guidelines. *The Journal of infection*. 2012;64(4):347-73.
65. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine reviews*. 1999;20(4):435-59.
66. Martinez-Torres F, Menon S, Pritsch M, Victor N, Jenetzky E, Jensen K, et al. Protocol for German trial of Acyclovir and corticosteroids in Herpes-simplex-virus-encephalitis (GACHE): a multicenter, multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled German, Austrian and Dutch trial [SRCTN45122933]. *BMC neurology*. 2008;8:40.
67. Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnaes-Hansen F, et al. TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1368-76.
68. Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(6):817-25.
69. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(2):459-72.

70. Piret J, Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Current opinion in infectious diseases*. 2016.
71. Piret J, Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Reviews in medical virology*. 2014;24(3):186-218.
72. Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8(1):4.
73. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(9):623-35.
74. Muldoon LL, Alvarez JI, Begley DJ, Boado RJ, Del Zoppo GJ, Doolittle ND, et al. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(1):13-21.
75. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol*. 2017;18(2):123-31.
76. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*. 2011 ; 55(4-5) : 467-76.
77. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*. 2015;138 Pt 1:8-16.
78. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 2012;33(12):579-89.
79. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):13-25.
80. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):497-511.
81. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009;10(5):514-23.
82. Axtell RC, Steinman L. Gaining entry to an uninfamed brain. *Nat Immunol*. 2009;10(5):453-5.
83. Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):75-88.
84. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2011;14(10):1227-35.
85. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*. 2014;17(1):131-43.

86. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
87. Wirenfeltd M, Dissing-Olesen L, Anne Babcock A, Nielsen M, Meldgaard M, Zimmer J, et al. Population control of resident and immigrant microglia by mitosis and apoptosis. *Am J Pathol.* 2007;171(2):617-31.
88. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci.* 2013;16(5):543-51.
89. Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(1):99-108.
90. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* 2010;468(7321):253-62.
91. Hefendehl JK, Neher JJ, Suhs RB, Kohsaka S, Skodras A, Jucker M. Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell.* 2014;13(1):60-9.
92. Wong WT. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:22.
93. Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain research.* 1992;17(1):61-74.
94. Bazan NG, Halabi A, Ertel M, Petasis NA. Chapter 34 - Neuroinflammation. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. New York: Academic Press; 2012. p. 610-20.
95. Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res.* 2006;121(1):1-10.
96. Lokensgard JR, Hu S, Sheng W, vanOijen M, Cox D, Cheeran MC, et al. Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *Journal of neurovirology.* 2001;7(3):208-19.
97. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-24.
98. Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *The Journal of infectious diseases.* 2007;196(6):853-60.
99. Kaushik DK, Gupta M, Basu A. Microglial response to viral challenges: every silver lining comes with a cloud. *Frontiers in bioscience.* 2011;16:2187-205.
100. Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2016;8(1):a020560.

101. Thongtan T, Thepparit C, Smith DR. The involvement of microglial cells in Japanese encephalitis infections. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:890586.
102. Carrithers MD. Innate immune viral recognition: relevance to CNS infections. *Handbook of clinical neurology*. 2014;123:215-23.
103. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;7(1):a016246.
104. Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992;13(1):11-6.
105. Carty M, Bowie AG. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(7):825-37.
106. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. 2007;177(2):265-75.
107. Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *Journal of virology*. 2012;86(12):6555-62.
108. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Katz DR, Chain BM. Glycoprotein-dependent and TLR2-independent innate immune recognition of herpes simplex virus-1 by dendritic cells. *J Immunol*. 2008;180(11):7525-36.
109. Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research*. 2006;83(5):711-30.
110. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*. 2005;49(3):360-74.
111. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1315-20.
112. Sorensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, Bartholdy C, Thomsen AR, Paludan SR. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J Immunol*. 2008;181(12):8604-12.
113. Bochud PY, Magaret AS, Koelle DM, Aderem A, Wald A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(4):505-9.
114. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
115. Davey GM, Wojtasiak M, Proietto AI, Carbone FR, Heath WR, Bedoui S. Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *J Immunol*. 2010;184(5):2243-6.

116. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005;433(7028):887-92.
117. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
118. Perales-Linares R, Navas-Martin S. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe? *Immunology*. 2013;140(2):153-67.
119. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*. 2004;5(5):503-7.
120. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003;171(8):4304-10.
121. Prehaud C, Megret F, Lafage M, Lafon M. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *Journal of virology*. 2005;79(20):12893-904.
122. Herman M, Ciancanelli M, Ou YH, Lorenzo L, Klaudel-Dreszler M, Pauwels E, et al. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(9):1567-82.
123. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science*. 2006 ; 314(5797) : 308-12.
124. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007 ; 317(5844) : 1522-7.
125. Guo Y, Audry M, Ciancanelli M, Alsina L, Azevedo J, Herman M, et al. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(10):2083-98.
126. Perez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Plancoulaine S, Picard C, et al. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity*. 2010;33(3):400-11.
127. Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(12):4889-902.
128. Boivin N, Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Effect of pretreatment with toll-like receptor agonists in a mouse model of herpes simplex virus type 1 encephalitis. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(5):664-72.

129. Menasria R, Boivin N, Lebel M, Piret J, Gosselin J, Boivin G. Both TRIF and IPS-1 adaptor proteins contribute to the cerebral innate immune response against herpes simplex virus 1 infection. *Journal of virology*. 2013;87(13):7301-8.
130. Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, Ciancanelli MJ, Herman M, Abhyankar A, et al. Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature*. 2012;491(7426):769-73.
131. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007;27(1):135-44.
132. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European journal of immunology*. 2002;32(7):1958-68.
133. Yasuda K, Richez C, Uccellini MB, Richards RJ, Bonegio RG, Akira S, et al. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J Immunol*. 2009;183(5):3109-17.
134. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
135. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009 ; 22(2) :240-73, Table of Contents.
136. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*. 2004;103(4):1433-7.
137. Rasmussen SB, Sorensen LN, Malmgaard L, Ank N, Baines JD, Chen ZJ, et al. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *Journal of virology*. 2007;81(24):13315-24.
138. Lund JM, Linehan MM, Iijima N, Iwasaki A. Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J Immunol*. 2006;177(11):7510-4.
139. Wuest T, Austin BA, Uematsu S, Thapa M, Akira S, Carr DJ. Intact TLR 9 and type I interferon signaling pathways are required to augment HSV-1 induced corneal CXCL9 and CXCL10. *J Neuroimmunol*. 2006;179(1-2):46-52.
140. Boivin N, Menasria R, Piret J, Boivin G. Modulation of TLR9 response in a mouse model of herpes simplex virus encephalitis. *Antiviral Res*. 2012;96(3):414-21.
141. Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Current molecular medicine*. 2002;2(6):545-56.
142. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(3):513-20.

143. Szabo A, Bene K, Gogolak P, Rethi B, Lanyi A, Jankovich I, et al. RLR-mediated production of interferon-beta by a human dendritic cell subset and its role in virus-specific immunity. *J Leukoc Biol.* 2012;92(1):159-69.
144. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 2005;175(5):2851-8.
145. Kato H, Takahashi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev.* 2011;243(1):91-8.
146. Furr SR, Moerdyk-Schauwecker M, Grdzlishvili VZ, Marriott I. RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes. *Glia.* 2010;58(13):1620-9.
147. Crill EK, Furr-Rogers SR, Marriott I. RIG-I is required for VSV-induced cytokine production by murine glia and acts in combination with DAI to initiate responses to HSV-1. *Glia.* 2015;63(12):2168-80.
148. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* 2006;314(5801):994-7.
149. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science.* 2006;314(5801):997-1001.
150. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell.* 2011;147(2):423-35.
151. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):637-42.
152. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17264-9.
153. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell.* 2013;152(1-2):276-89.
154. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005;23(1):19-28.
155. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell.* 2010;141(4):668-81.
156. Yu CY, Chiang RL, Chang TH, Liao CL, Lin YL. The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases. *Journal of virology.* 2010;84(5):2421-31.

157. Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol*. 2012;22(17):R733-40.
158. Bruns AM, Pollpeter D, Hadizadeh N, Myong S, Marko JF, Horvath CM. ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(2):938-46.
159. Childs KS, Randall RE, Goodbourn S. LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA. *PLoS One*. 2013;8(5):e64202.
160. Li X, Ranjith-Kumar CT, Brooks MT, Dharmiah S, Herr AB, Kao C, et al. The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(20):13881-91.
161. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, Maillard PV, et al. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *Elife*. 2014;3:e01535.
162. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(10):959-65.
163. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 2007;448(7152):501-5.
164. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*. 2010;11(11):997-1004.
165. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013;339(6121):786-91.
166. Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:461-88.
167. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*. 2009;10(3):266-72.
168. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, et al. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(14):5477-82.
169. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol*. 2008;181(9):6427-34.
170. Furr SR, Chauhan VS, Moerdyk-Schauwecker MJ, Marriott I. A role for DNA-dependent activator of interferon regulatory factor in the recognition of herpes simplex virus type 1 by glial cells. *J Neuroinflammation*. 2011;8:99.

171. Triantafilou K, Eryilmazlar D, Triantafilou M. Herpes simplex virus 2-induced activation in vaginal cells involves Toll-like receptors 2 and 9 and DNA sensors DAI and IFI16. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;210(2):122 e1- e10.
172. Conrady CD, Zheng M, Fitzgerald KA, Liu C, Carr DJ. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal immunology.* 2012;5(2):173-83.
173. Pham TH, Kwon KM, Kim YE, Kim KK, Ahn JH. DNA sensing-independent inhibition of herpes simplex virus 1 replication by DAI/ZBP1. *Journal of virology.* 2013;87(6):3076-86.
174. Ansari MA, Dutta S, Veetil MV, Dutta D, Iqbal J, Kumar B, et al. Herpesvirus Genome Recognition Induced Acetylation of Nuclear IFI16 Is Essential for Its Cytoplasmic Translocation, Inflammasome and IFN-beta Responses. *PLoS pathogens.* 2015;11(7):e1005019.
175. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(26):10558-63.
176. Johnson KE, Bottero V, Flaherty S, Dutta S, Singh VV, Chandran B. IFI16 restricts HSV-1 replication by accumulating on the hsv-1 genome, repressing HSV-1 gene expression, and directly or indirectly modulating histone modifications. *PLoS pathogens.* 2014;10(11):e1004503.
177. Horan KA, Hansen K, Jakobsen MR, Holm CK, Soby S, Unterholzner L, et al. Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. *J Immunol.* 2013;190(5):2311-9.
178. Johnson KE, Chikoti L, Chandran B. Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes. *Journal of virology.* 2013;87(9):5005-18.
179. Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(44):E3008-17.
180. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science.* 2013;341(6152):1390-4.
181. Parker ZM, Murphy AA, Leib DA. Role of the DNA Sensor STING in Protection from Lethal Infection following Corneal and Intracerebral Challenge with Herpes Simplex Virus 1. *Journal of virology.* 2015;89(21):11080-91.
182. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* 2015;520(7548):553-7.
183. Chen Y, Livingston CM, Carrington-Lawrence SD, Bai P, Weller SK. A mutation in the human herpes simplex virus type 1 UL52 zinc finger motif results in defective primase

activity but can recruit viral polymerase and support viral replication efficiently. *Journal of virology*. 2007;81(16):8742-51.

184. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*. 2009;10(10):1065-72.

185. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 2009;138(3):576-91.

186. Chiang JJ, Sparrer KMJ, van Gent M, Lassig C, Huang T, Osterrieder N, et al. Viral unmasking of cellular 5S rRNA pseudogene transcripts induces RIG-I-mediated immunity. *Nat Immunol*. 2018;19(1):53-62.

187. Melchjorsen J, Rintahaka J, Soby S, Horan KA, Poltajainen A, Ostergaard L, et al. Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways. *Journal of virology*. 2010;84(21):11350-8.

188. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell*. 2013;50(1):5-15.

189. Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol*. 2014;35(2):88-93.

190. Ma F, Li B, Yu Y, Iyer SS, Sun M, Cheng G. Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING. *EMBO Rep*. 2015;16(2):202-12.

191. Luecke S, Paludan SR. Innate recognition of alphaherpesvirus DNA. *Advances in virus research*. 2015;92:63-100.

192. Melchjorsen J. Sensing herpes: more than toll. *Reviews in medical virology*. 2012;22(2):106-21.

193. Kawai T, Akira S. SnapShot: Pattern-recognition receptors. *Cell*. 2007;129(5):1024.

194. Gasparini C, Feldmann M. NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(35):5735-45.

195. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11:373.

196. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7(2):131-7.

197. Zhang L, Pagano JS. IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol*. 1997;17(10):5748-57.

198. Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell*. 1998;1(4):507-18.

199. Weaver BK, Kumar KP, Reich NC. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol.* 1998;18(3):1359-68.
200. Au WC, Moore PA, LaFleur DW, Tombal B, Pitha PM. Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(44):29210-7.
201. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:623-55.
202. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *The EMBO journal.* 1998;17(4):1087-95.
203. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):2986-96.
204. Kumar KP, McBride KM, Weaver BK, Dingwall C, Reich NC. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol.* 2000;20(11):4159-68.
205. Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(25):11657-61.
206. Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E, Taniguchi T. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett.* 1998;425(1):112-6.
207. Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):2465-74.
208. Morin P, Genin P, Doly J, Civas A. The virus-induced factor VIF differentially recognizes the virus-responsive modules of the mouse IFNA4 gene promoter. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(1):77-86.
209. Zhang L, Pagano JS. Structure and function of IRF-7. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(1):95-101.
210. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal.* 1998;17(22):6660-9.
211. Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 1998;441(1):106-10.

212. Marie I, Smith E, Prakash A, Levy DE. Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8803-14.
213. Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(44):34320-7.
214. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity.* 2006;25(3):349-60.
215. Barnes B, Lubyova B, Pitha PM. On the role of IRF in host defense. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(1):59-71.
216. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity.* 2000;13(4):539-48.
217. Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(4):293-312.
218. Taniguchi T, Tanaka N, Ogasawara K, Taki S, Sato M, Takaoka A. Transcription factor IRF-1 and its family members in the regulation of host defense. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999;64:465-72.
219. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):375-86.
220. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* 2003;4(1):69-77.
221. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* 2003;4(1):63-8.
222. Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(31):32269-74.
223. Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D, Wadhwa M. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine.* 2005;31(2):109-18.
224. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(5):G960-8.
225. Daniels BP, Klein RS. Knocking on Closed Doors: Host Interferons Dynamically Regulate Blood-Brain Barrier Function during Viral Infections of the Central Nervous System. *PLoS pathogens.* 2015;11(9):e1005096.

226. Daniels BP, Jujjavarapu H, Durrant DM, Williams JL, Green RR, White JP, et al. Regional astrocyte IFN signaling restricts pathogenesis during neurotropic viral infection. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(3):843-56.
227. Nayak D, Johnson KR, Heydari S, Roth TL, Zinselmeyer BH, McGavern DB. Type I interferon programs innate myeloid dynamics and gene expression in the virally infected nervous system. *PLoS pathogens*. 2013;9(5):e1003395.
228. Krause CD, Pestka S. Cut, copy, move, delete: The study of human interferon genes reveal multiple mechanisms underlying their evolution in amniotes. *Cytokine*. 2015;76(2):480-95.
229. Leib DA, Harrison TE, Laslo KM, Machalek MA, Moorman NJ, Virgin HW. Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(4):663-72.
230. Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutieres syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):429-40.
231. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(6):711-23.
232. Crotta S, Davidson S, Mahlakoiv T, Desmet CJ, Buckwalter MR, Albert ML, et al. Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. *PLoS pathogens*. 2013;9(11):e1003773.
233. Levy DE. Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(4):F15-8.
234. Gough DJ, Messina NL, Clarke CJ, Johnstone RW, Levy DE. Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity*. 2012;36(2):166-74.
235. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472(7344):481-5.
236. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol*. 2012;13(3):214-22.
237. Austin BA, James C, Silverman RH, Carr DJ. Critical role for the oligoadenylate synthetase/RNase L pathway in response to IFN-beta during acute ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol*. 2005;175(2):1100-6.
238. Al-Khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ. Distinctive roles for 2',5'-oligoadenylate synthetases and double-stranded RNA-dependent protein kinase R in the in vivo antiviral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN-beta. *J Immunol*. 2004;172(9):5638-47.
239. LEROY M DD. Les interférons de type I et leur fonction antivirale. *Ann Med Vet*. 2006;150(2):73-107.

240. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87-103.
241. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:255-81.
242. Dauer M, Pohl K, Obermaier B, Meskendahl T, Robe J, Schnurr M, et al. Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology*. 2003;110(1):38-47.
243. Santodonato L, D'Agostino G, Nisini R, Mariotti S, Monque DM, Spada M, et al. Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2003;170(10):5195-202.
244. Hahm B, Trifilo MJ, Zuniga EI, Oldstone MB. Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity*. 2005;22(2):247-57.
245. Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. 2002;99(9):3263-71.
246. Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, et al. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood*. 2001;98(10):3022-9.
247. Rouzaut A, Garasa S, Teijeira A, Gonzalez I, Martinez-Forero I, Suarez N, et al. Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha. *European journal of immunology*. 2010;40(11):3054-63.
248. Marshall HD, Urban SL, Welsh RM. Virus-induced transient immune suppression and the inhibition of T cell proliferation by type I interferon. *Journal of virology*. 2011;85(12):5929-39.
249. Tanabe Y, Nishibori T, Su L, Arduini RM, Baker DP, David M. Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. *J Immunol*. 2005;174(2):609-13.
250. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol*. 2002;169(8):4279-87.
251. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-45.
252. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89.

253. Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41 Suppl 7:S421-6.
254. Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(4):397-403.
255. Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Frontiers in Immunology*. 2016;7(366).
256. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol*. 2015 ; 98(4) : 557-64.
257. Van Strijp JA, Van Kessel KP, van der Tol ME, Fluit AC, Snippe H, Verhoef J. Phagocytosis of herpes simplex virus by human granulocytes and monocytes. *Arch Virol*. 1989;104(3-4):287-98.
258. Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, et al. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol*. 2006;177(12):8658-66.
259. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology*. 1986;60(3):1068-74.
260. Hayashi K, Hooper LC, Okuno T, Takada Y, Hooks JJ. Inhibition of HSV-1 by chemoattracted neutrophils: supernatants of corneal epithelial cells (HCE) and macrophages (THP-1) treated with virus components chemoattract neutrophils (PMN), and supernatants of PMN treated with these conditioned media inhibit viral growth. *Arch Virol*. 2012;157(7):1377-81.
261. Tumpey TM, Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *Journal of virology*. 1996;70(2):898-904.
262. Miyazaki D, Inoue Y, Araki-Sasaki K, Shimomura Y, Tano Y, Hayashi K. Neutrophil chemotaxis induced by corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. *Current Eye Research*. 1998;17(7):687-93.
263. Zheng M, Fields MA, Liu Y, Cathcart H, Richter E, Atherton SS. Neutrophils protect the retina of the injected eye from infection after anterior chamber inoculation of HSV-1 in BALB/c mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(9):4018-25.
264. Etzrodt M, Cortez-Retamozo V, Newton A, Zhao J, Ng A, Wildgruber M, et al. Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep*. 2012;1(4):317-24.
265. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*. 2010;115(3):e10-9.

266. Mildner A, Chapnik E, Manor O, Yona S, Kim KW, Aychek T, et al. Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2013;121(6):1016-27.
267. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
268. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-34.
269. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. 2013;39(3):599-610.
270. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 2000 ; 20(11) : 4106-14.
271. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(9):1361-73.
272. Wacleche VS, Tremblay CL, Routy JP, Ancuta P. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses*. 2018;10(2).
273. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(1):171-80.
274. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):206-18.
275. Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*. 2013;38(3):555-69.
276. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.
277. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
278. Prinz M, Priller J. Tickets to the brain: role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol*. 2010;224(1-2):80-4.
279. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.

280. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-75.
281. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4:23.
282. Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Urban SL, Lokensgard JR. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *J Immunol*. 2008;181(9):6417-26.
283. Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, et al. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *Journal of virology*. 2008;82(14):7078-88.
284. Menasria R, Canivet C, Piret J, Boivin G. Infiltration Pattern of Blood Monocytes into the Central Nervous System during Experimental Herpes Simplex Virus Encephalitis. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145773.
285. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):259-68.
286. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol*. 1986;137(9):2735-9.
287. Ferlazzo G, Münz C. NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2004;172(3):1333-9.
288. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 2004;173(7):4273-6.
289. Fadda L, Borhis G, Ahmed P, Cheent K, Pigeon SV, Cazaly A, et al. Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(22):10160-5.
290. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 2002;296(5571):1323-6.
291. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, et al. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood*. 2009;113(26):6593-602.
292. Waggoner SN, Reighard SD, Gyurova IE, Cranert SA, Mahl SE, Karmele EP, et al. Roles of natural killer cells in antiviral immunity. *Curr Opin Virol*. 2016;16:15-23.
293. Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of

cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):10116-21.

294. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.

295. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44.

296. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *J Immunol*. 2007 ; 178(7) : 4011-6.

297. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002;100(6):1935-47.

298. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007;39(6):733-40.

299. Lopez-Botet M, Angulo A, Guma M. Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens*. 2004;63(3):195-203.

300. Campillo JA, Martinez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Marin LA, Muro M, Guerra N, et al. Natural killer receptors on CD8 T cells and natural killer cells from different HLA-C phenotypes in melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2006 ; 12(16) : 4822-31.

301. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-61.

302. Gillard GO, Bivas-Benita M, Hovav AH, Grandpre LE, Panas MW, Seaman MS, et al. Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes. *PLoS pathogens*. 2011;7(8):e1002141.

303. Paust S, Gill HS, Wang BZ, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1127-35.

304. Gorbachev AV, Fairchild RL. Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(5):451-72.

305. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006;7(5):507-16.

306. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*. 2002;4(15):1545-58.

307. Vandevenne P, Sadzot-Delvaux C, Piette J. Innate immune response and viral interference strategies developed by human herpesviruses. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(12):1955-72.

308. Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Smyth MJ, Jones CM, Clarke SR, et al. Redundancy in the immune system restricts the spread of HSV-1 in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 mice. *Virology*. 2010;400(2):248-58.
309. Berzins SP, Cochrane AD, Pellicci DG, Smyth MJ, Godfrey DI. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *European journal of immunology*. 2005;35(5):1399-407.
310. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):101-17.
311. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
312. Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817-90.
313. Exley M, Garcia J, Wilson SB, Spada F, Gerdes D, Tahir SM, et al. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology*. 2000;100(1):37-47.
314. Cohen NR, Garg S, Brenner MB. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol*. 2009;102:1-94.
315. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):405-17.
316. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-50.
317. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(2):267-79.
318. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, et al. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol*. 2003;171(10):5140-7.
319. Grubor-Bauk B, Arthur JL, Mayrhofer G. Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *Journal of virology*. 2008;82(22):11073-83.
320. Ashkar AA, Rosenthal KL. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *Journal of virology*. 2003;77(18):10168-71.
321. Sato A, Linehan MM, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17343-8.

322. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):352-61.
323. Noisakran S, Carr DJ. Type I interferons and herpes simplex virus infection: a naked DNA approach as a therapeutic option? *Immunol Res*. 2001;24(1):1-11.
324. Zhao X, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, et al. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(2):153-62.
325. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*. 2006;25(1):153-62.
326. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(5):488-95.
327. Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF, Barth H. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):350-60.
328. Reizis B. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(6):1053-6.
329. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
330. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):978-85.
331. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):417-28.
332. Shortman K, Heath WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev*. 2010;234(1):18-31.
333. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev*. 2010;234(1):90-104.
334. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO journal*. 2014;33(10):1104-16.
335. Kalia V, Sarkar S, Ahmed R. CD8 T-Cell Memory Differentiation during Acute and Chronic Viral Infections. In: Zanetti M, Schoenberger SP, editors. *Memory T Cells*. New York, NY: Springer New York; 2010. p. 79-95.
336. Lee YJ, Jameson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol*. 2011;32(2):50-6.

337. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011;35(2):161-8.
338. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-62.
339. Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, et al. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(9):1395-402.
340. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. 2002;111(6):837-51.
341. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003;4(3):225-34.
342. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 ; 75(2) : 163-89.
343. Zhang J, Liu H, Wei B. Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(4):277-88.
344. Nick S, Metzger B, Muller S, Falke D. Virus-specific IgM and IgG antibody production by B cells during herpes simplex virus type 2-induced immunosuppression as analysed by an immunospot assay. *J Gen Virol*. 1987;68 (Pt 7):1951-9.
345. O'Rourke SM, Yu B, Morales JF, Didinger CM, Alexander DL, Vollmers C, et al. Production of a recombinant monoclonal antibody to Herpes Simplex Virus glycoprotein D for immunoaffinity purification of tagged proteins. *J Immunol Methods*. 2019;465:31-8.
346. Skaper SD. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1122:23-34.
347. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004;1(1):14.
348. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):57-69.
349. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Muller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(10):2319-37.
350. Bennett JL, Elhofy A, Charo I, Miller SD, Dal Canto MC, Karpus WJ. CCR2 regulates development of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Viral Immunol*. 2007;20(1):19-33.
351. Menasria R, Canivet C, Piret J, Gosselin J, Boivin G. Both Cerebral and Hematopoietic Deficiencies in CCR2 Result in Uncontrolled Herpes Simplex Virus Infection of the Central Nervous System in Mice. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168034.

352. Savarin C, Stohlman SA, Atkinson R, Ransohoff RM, Bergmann CC. Monocytes regulate T cell migration through the glia limitans during acute viral encephalitis. *Journal of virology*. 2010;84(10):4878-88.
353. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain research*. 1995;20(3):269-87.
354. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(21):10061-5.
355. Schachtele SJ, Hu S, Little MR, Lokensgard JR. Herpes simplex virus induces neural oxidative damage via microglial cell Toll-like receptor-2. *J Neuroinflammation*. 2010;7:35.
356. Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Lokensgard JR. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *Journal of neurovirology*. 2008;14(3):229-38.
357. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):49-59.
358. Chentoufi AA, Kritzer E, Yu DM, Nesburn AB, Benmohamed L. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:187585.
359. Petro C, Gonzalez PA, Cheshenko N, Jandl T, Khajoueinejad N, Benard A, et al. Herpes simplex type 2 virus deleted in glycoprotein D protects against vaginal, skin and neural disease. *Elife*. 2015;4.
360. Davido DJ, Tu EM, Wang H, Korom M, Gazquez Casals A, Reddy PJ, et al. Attenuated Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Expressing a Mutant Form of ICP6 Stimulates a Strong Immune Response That Protects Mice against HSV-1-Induced Corneal Disease. *Journal of virology*. 2018;92(17).
361. Wang L, Aoli Wang Q, Jin F, Fang S, Luo F, Wu Y, et al. Construction, identification, and immunogenic assessments of an HSV-1 mutant vaccine with a UL18 deletion. *Acta Virol*. 2018 ; 62(2) : 164-71.
362. Van Wagoner N, Fife K, Leone PA, Bernstein DI, Warren T, Panther L, et al. Effects of Different Doses of GEN-003, a Therapeutic Vaccine for Genital HSV-2, on Viral Shedding and Lesions: Results of a Randomized Placebo-controlled Trial. *The Journal of infectious diseases*. 2018.
363. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*. 2012;366(1):34-43.
364. Bloom DC, Tran RK, Feller J, Voellmy R. Immunization by Replication-Competent Controlled Herpesvirus Vectors. *Journal of virology*. 2018;92(16).
365. Li X, Zhang S, Lei J, Zhu Y, Zhou X, Xiao J, et al. Prophylactic herpes simplex virus type 2 vaccine adjuvanted with a universal CD4 T cell helper peptide induces long-term protective immunity against lethal challenge in mice. *Int Immunopharmacol*. 2018;61:100-8.

366. Sandgren KJ, Bertram K, Cunningham AL. Understanding natural herpes simplex virus immunity to inform next-generation vaccine design. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(7):e94.
367. Tyring S, Wald A, Zadeikis N, Dhadda S, Takenouchi K, Rorig R. ASP2151 for the Treatment of Genital Herpes: A Randomized, Double-Blind, Placebo- and Valacyclovir-Controlled, Dose-Finding Study. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(7):1100-10.
368. Kawashima M, Nemoto O, Honda M, Watanabe D, Nakayama J, Imafuku S, et al. Amenamevir, a novel helicase-primase inhibitor, for treatment of herpes zoster: A randomized, double-blind, valaciclovir-controlled phase 3 study. *J Dermatol*. 2017;44(11):1219-27.
369. Biswas S, Jennens L, Field HJ. The helicase primase inhibitor, BAY 57-1293 shows potent therapeutic antiviral activity superior to famciclovir in BALB/c mice infected with herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res*. 2007;75(1):30-5.
370. Kleymann G, Fischer R, Betz UA, Hendrix M, Bender W, Schneider U, et al. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med*. 2002;8(4):392-8.
371. Betz UA, Fischer R, Kleymann G, Hendrix M, Rubsamen-Waigmann H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(6):1766-72.
372. Baumeister J, Fischer R, Eckenberg P, Henninger K, Ruebsamen-Waigmann H, Kleymann G. Superior efficacy of helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 for herpes infection and latency in the guinea pig model of human genital herpes disease. *Antivir Chem Chemother*. 2007;18(1):35-48.
373. Kaufman HE, Varnell ED, Gebhardt BM, Thompson HW, Atwal E, Rubsamen-Waigmann H, et al. Efficacy of a helicase-primase inhibitor in animal models of ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2008;24(1):34-42.
374. Wald A, Corey L, Timmler B, Magaret A, Warren T, Tyring S, et al. Helicase-Primase Inhibitor Pritelivir for HSV-2 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(3):201-10.
375. Wald A, Timmler B, Magaret A, Warren T, Tyring S, Johnston C, et al. Effect of Pritelivir Compared With Valacyclovir on Genital HSV-2 Shedding in Patients With Frequent Recurrences: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(23):2495-503.
376. Agyemang E, Magaret AS, Selke S, Johnston C, Corey L, Wald A. Herpes Simplex Virus Shedding Rate: Surrogate Outcome for Genital Herpes Recurrence Frequency and Lesion Rates, and Phase 2 Clinical Trials End Point for Evaluating Efficacy of Antivirals. *The Journal of infectious diseases*. 2018.
377. Quenelle DC, Birkmann A, Goldner T, Pfaff T, Zimmermann H, Bonsmann S, et al. Efficacy of pritelivir and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus infections in a mouse model of herpes simplex encephalitis. *Antiviral Res*. 2018;149:1-6.

378. Zinser E, Krawczyk A, Muhl-Zurbes P, Aufderhorst U, Drassner C, Stich L, et al. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 2018;149:202-10.
379. de Oliveira A, Prince D, Lo CY, Lee LH, Chu TC. Antiviral activity of theaflavin digallate against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 2015;118:56-67.
380. Schnitzler P, Schon K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie.* 2001;56(4):343-7.
381. Mancini DAP, Torres RP, Pinto JR, Mancini-Filho J. Inhibition of DNA virus: Herpes-1 (HSV-1) in cellular culture replication, through an antioxidant treatment extracted from rosemary spice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2009;45:127-33.
382. Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, et al. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007 ; 6:10.
383. Ren Z, Zhang C-h, Wang L-j, Cui Y-x, Qi R-b, Yang C-r, et al. In vitro anti-viral activity of the total alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* against herpes simplex virus type 1. *Virologica Sinica.* 2010;25(2):107-14.
384. Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, Mori T, Shibata S, Baba M, et al. Antiviral Activities of Glycyrrhizin and Its Modified Compounds against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) in Vitro. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN.* 1991;39(1):112-5.
385. Gavanji S, Sayedipour SS, Larki B, Bakhtari A. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *Journal of Acute Medicine.* 2015;5(3):62-8.
386. Hou J, Zhang Z, Huang Q, Yan J, Zhang X, Yu X, et al. Antiviral activity of PHA767491 against human herpes simplex virus in vitro and in vivo. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):217.
387. Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol.* 2007;88(2):85-94.
388. Schmidt A, Bunjes D, Friedrich J, Koenig W, Eggeling T, Hombach V. Neurological outcome after a severe herpes simplex encephalitis treated with acyclovir and beta-interferon. Time course of intracranial pressure. *Klinische Wochenschrift.* 1990;68(5):286-9.
389. Wintergerst U, Belohradsky BH. Acyclovir monotherapy versus acyclovir plus beta-interferon in focal viral encephalitis in children. *Infection.* 1992;20(4):207-12.
390. Huang WY, Su YH, Yao HW, Ling P, Tung YY, Chen SH, et al. Beta interferon plus gamma interferon efficiently reduces acyclovir-resistant herpes simplex virus infection in mice in a T-cell-independent manner. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 3):591-8.
391. Gupta AK, Cherman AM, Tying SK. Viral and nonviral uses of imiquimod: a review. *Journal of cutaneous medicine and surgery.* 2004;8(5):338-52.

392. Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(6):1144-51.
393. Petretera E, Nittolo AG, Alche LE. Antiviral action of synthetic stigmasterol derivatives on herpes simplex virus replication in nervous cells in vitro. *Biomed Res Int*. 2014 ; 2014:947560.
394. Meyding-Lamade U, Seyfer S, Haas J, Dvorak F, Kehm R, Lamade W, et al. Experimental herpes simplex virus encephalitis: inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in mouse brain tissue. *Neurosci Lett*. 2002;318(1):21-4.
395. Guo YJ, Li W, Li XF, Zhao L, Zhang SL, Zhou Y, et al. S-methylisothiourea induces apoptosis of herpes simplex virus-1-infected microglial cells. *Inflammation*. 2011;34(5):388-401.
396. Guo YJ, Zhao L, Li XF, Mei YW, Zhang SL, Tao JY, et al. Effect of Corilagin on anti-inflammation in HSV-1 encephalitis and HSV-1 infected microglia. *Eur J Pharmacol*. 2010;635(1-3):79-86.
397. Boivin N, Menasria R, Piret J, Rivest S, Boivin G. The combination of valacyclovir with an anti-TNF alpha antibody increases survival rate compared to antiviral therapy alone in a murine model of herpes simplex virus encephalitis. *Antiviral Res*. 2013;100(3):649-53.
398. Schepers K, Hernandez A, Andrei G, Gillemot S, Fiten P, Opendenacker G, et al. Acyclovir-resistant herpes simplex encephalitis in a patient treated with anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies. *J Clin Virol*. 2014 ; 59(1) : 67-70.
399. Fine AJ, Sorbello A, Kortepeter C, Scarazzini L. Central nervous system herpes simplex and varicella zoster virus infections in natalizumab-treated patients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(6):849-52.
400. Kyu HH, Fernandez E. Artemisinin derivatives versus quinine for cerebral malaria in African children: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2009;87(12):896-904.
401. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*. 2011;17:1217.
402. Hou LF, He SJ, Wang JX, Yang Y, Zhu FH, Zhou Y, et al. SM934, a water-soluble derivative of artemisinin, exerts immunosuppressive functions in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2009 ; 9(13-14) : 1509-17.
403. Gasasira AF, Kanya MR, Achan J, Mebrahtu T, Kalyango JN, Ruel T, et al. High risk of neutropenia in HIV-infected children following treatment with artesunate plus amodiaquine for uncomplicated malaria in Uganda. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(7):985-91.
404. Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Curr Clin Pharmacol*. 2007;2(1):59-73.

405. Wang JX, Tang W, Shi LP, Wan J, Zhou R, Ni J, et al. Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *Br J Pharmacol*. 2007;150(5):652-61.
406. Langroudi L, Hassan ZM, Ebtekar M, Mahdavi M, Pakravan N, Noori S. A comparison of low-dose cyclophosphamide treatment with artemisinin treatment in reducing the number of regulatory T cells in murine breast cancer model. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(9):1055-61.
407. Yang Z-S, Wang J-X, Zhou Y, Zuo J-P, Li Y. Synthesis and immunosuppressive activity of new artemisinin derivatives. Part 2: 2-[12(β or α)-Dihydroartemisininomethyl(or 1'-ethyl)]phenoxy propionic acids and esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14(23):8043-9.
408. Wang J, Zhou H, Zheng J, Cheng J, Liu W, Ding G, et al. The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(7):2420-7.
409. Zhao M, Xue DB, Zheng B, Zhang WH, Pan SH, Sun B. Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2007;13(42):5612-7.
410. Li WD, Dong YJ, Tu YY, Lin ZB. Dihydroarteannuin ameliorates lupus symptom of BXSB mice by inhibiting production of TNF-alpha and blocking the signaling pathway NF-kappa B translocation. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(8):1243-50.
411. Li Y, Wang S, Wang Y, Zhou C, Chen G, Shen W, et al. Inhibitory effect of the antimalarial agent artesunate on collagen-induced arthritis in rats through nuclear factor kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Transl Res*. 2013;161(2):89-98.
412. Park KH, Yoon YD, Han SB, Oh SJ, Yun J, Lee CW, et al. Artemisinin inhibits lipopolysaccharide-induced interferon-beta production in RAW 264.7 cells: implications on signal transducer and activator of transcription-1 signaling and nitric oxide production. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(4):580-4.
413. Li X, Li TT, Zhang XH, Hou LF, Yang XQ, Zhu FH, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis through enhancing the expansion and functions of regulatory T cell. *PLoS One*. 2013;8(8):e74108.
414. Li B, Zhang R, Li J, Zhang L, Ding G, Luo P, et al. Antimalarial artesunate protects sepsis model mice against heat-killed *Escherichia coli* challenge by decreasing TLR4, TLR9 mRNA expressions and transcription factor NF-kappa B activation. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(3):379-89.
415. Li B, Li J, Pan X, Ding G, Cao H, Jiang W, et al. Artesunate protects sepsis model mice challenged with *Staphylococcus aureus* by decreasing TNF-alpha release via inhibition TLR2 and Nod2 mRNA expressions and transcription factor NF-kappaB activation. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(3):344-50.

416. Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan Z, Ye Y, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(6):920-6.
417. Sellar RS, Ward KN, Thomson KJ, Peggs KS. Evidence for clinical activity of artesunate in multidrug-resistant herpes simplex infection following HSCT. *Bone marrow transplantation*. 2012;47(11):1482-3.
418. Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*. 2009;21(6):827-35.
419. Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nature Immunology*. 2008;9:1157.
420. Zhao J, Benakanakere MR, Hosur KB, Galicia JC, Martin M, Kinane DF. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates TLR3 induced cytokines in human oral keratinocytes. *Mol Immunol*. 2010;48(1-3):294-304.
421. Janes MR, Fruman DA. Immune regulation by rapamycin: moving beyond T cells. *Science signaling*. 2009;2(67):pe25.
422. Powell JD, Lerner CG, Schwartz RH. Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J Immunol*. 1999;162(5):2775-84.
423. Zapata G, Racca L, Tau J, Berra A. Topical use of rapamycin in herpetic stromal keratitis. *Ocular immunology and inflammation*. 2012;20(5):354-9.
424. Whitley RJ. Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2015;21(6 Neuroinfectious Disease):1704-13.
425. Kastrukoff LF, Lau AS, Thomas EE. The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae*. 2012;3:4.
426. Wang JP, Bowen GN, Zhou S, Cerny A, Zacharia A, Knipe DM, et al. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. *Journal of virology*. 2012;86(4):2273-81.
427. Terry RL, Getts DR, Deffrasnes C, van Vreden C, Campbell IL, King NJ. Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis. *J Neuroinflammation*. 2012;9:270.
428. Lopez C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature*. 1975;258(5531):152-3.
429. Lundberg P, Welander PV, Edwards CK, 3rd, van Rooijen N, Cantin E. Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *Journal of virology*. 2007;81(3):1451-60.

430. Lundberg P, Welander P, Openshaw H, Nalbandian C, Edwards C, Moldawer L, et al. A locus on mouse chromosome 6 that determines resistance to herpes simplex virus also influences reactivation, while an unlinked locus augments resistance of female mice. *Journal of virology*. 2003;77(21):11661-73.
431. Kastrukoff LF, Lau AS, Takei F, Carbone FR, Scalzo AA. A NK complex-linked locus restricts the spread of herpes simplex virus type 1 in the brains of C57BL/6 mice. *Immunology and cell biology*. 2015;93(10):877-84.
432. Lucinda N, Figueiredo MM, Pessoa NL, Santos BS, Lima GK, Freitas AM, et al. Dendritic cells, macrophages, NK and CD8(+) T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Viral J*. 2017;14(1):37.
433. Paludan SR, Melchjorsen J, Malmgaard L, Mogensen SC. Expression of genes for cytokines and cytokine-related functions in leukocytes infected with Herpes simplex virus: comparison between resistant and susceptible mouse strains. *Eur Cytokine Netw*. 2002;13(3):306-16.
434. Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *J Neuroimmunol*. 2010;220(1-2):1-9.
435. Piret J, Boivin G. Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Reviews in medical virology*. 2015;25(5):300-19.
436. Zawatzky R, Gresser I, DeMaeyer E, Kirchner H. The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of herpes simplex virus type 1. *The Journal of infectious diseases*. 1982;146(3):405-10.
437. Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Abel L, et al. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):19-33.
438. Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):143-54.
439. Brennan K, Bowie AG. Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4):503-7.
440. Kollias CM, Huneke RB, Wigdahl B, Jennings SR. Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis. *Journal of neurovirology*. 2015;21(1):8-23.
441. Meyding-Lamade UK, Oberlinner C, Rau PR, Seyfer S, Heiland S, Sellner J, et al. Experimental herpes simplex virus encephalitis: a combination therapy of acyclovir and glucocorticoids reduces long-term magnetic resonance imaging abnormalities. *Journal of neurovirology*. 2003;9(1):118-25.
442. Barker KR, Sarafino-Wani R, Khanom A, Griffiths PD, Jacobs MG, Webster DP. Encephalitis in an immunocompetent man. *J Clin Virol*. 2014 ; 59(1) : 1-3.

443. Armien AG, Hu S, Little MR, Robinson N, Lokensgard JR, Low WC, et al. Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis. *Brain pathology*. 2010;20(4):738-50.
444. Jennische E, Eriksson CE, Lange S, Trybala E, Bergström T. The anterior commissure is a pathway for contralateral spread of herpes simplex virus type 1 after olfactory tract infection. *Journal of neurovirology*. 2015;21(2):129-47.
445. Manglani M, McGavern DB. New advances in CNS immunity against viral infection. *Curr Opin Virol*. 2018;28:116-26.
446. Hui CW, St-Pierre MK, Detuncq J, Aumailley L, Dubois MJ, Couture V, et al. Nonfunctional mutant Wrn protein leads to neurological deficits, neuronal stress, microglial alteration, and immune imbalance in a mouse model of Werner syndrome. *Brain, behavior, and immunity*. 2018;73:450-69.
447. Kassim SH, Rajasagi NK, Zhao X, Chervenak R, Jennings SR. In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. *Journal of virology*. 2006;80(8):3985-93.
448. Andrews DM, Scalzo AA, Yokoyama WM, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol*. 2003;4(2):175-81.
449. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-8.
450. Pollara G, Jones M, Handley ME, Rajpopat M, Kwan A, Coffin RS, et al. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. *J Immunol*. 2004;173(6):4108-19.
451. Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL. The role of natural killer cells in protection of mice against death and corneal scarring following ocular HSV-1 infection. *Antiviral Res*. 2000;45(1):33-45.
452. Cornish AL, Keating R, Kyparissoudis K, Smyth MJ, Carbone FR, Godfrey DI. NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution. *Immunology and cell biology*. 2006;84(1):13-9.
453. Habu S, Akamatsu K, Tamaoki N, Okumura K. In vivo significance of NK cell on resistance against virus (HSV-1) infections in mice. *J Immunol*. 1984;133(5):2743-7.
454. Pereira RA, Scalzo A, Simmons A. Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol*. 2001;166(10):5869-73.
455. Wuest TR, Carr DJ. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Front Biosci*. 2008;13:4862-72.
456. Tremblay ME, Riad M, Majewska A. Preparation of mouse brain tissue for immunoelectron microscopy. *J Vis Exp*. 2010(41).

457. Han J, Harris RA, Zhang X-M. An updated assessment of microglia depletion: current concepts and future directions. *Molecular Brain*. 2017;10(1):25.
458. Rosato PC, Leib DA. Neurons versus herpes simplex virus: the innate immune interactions that contribute to a host-pathogen standoff. *Future Virol*. 2015;10(6):699-714.
459. Luker GD, Prior JL, Song J, Pica CM, Leib DA. Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *Journal of virology*. 2003;77(20):11082-93.
460. Bryant-Hudson KM, Chucair-Elliott AJ, Conrady CD, Cohen A, Zheng M, Carr DJJ. HSV-1 targets lymphatic vessels in the eye and draining lymph node of mice leading to edema in the absence of a functional type I interferon response. *Am J Pathol*. 2013;183(4):1233-42.
461. Murphy AA, Rosato PC, Parker ZM, Khalenkov A, Leib DA. Synergistic control of herpes simplex virus pathogenesis by IRF-3, and IRF-7 revealed through non-invasive bioluminescence imaging. *Virology*. 2013;444(1-2):71-9.
462. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005;434(7034):772-7.
463. Menachery VD, Pasiaka TJ, Leib DA. Interferon regulatory factor 3-dependent pathways are critical for control of herpes simplex virus type 1 central nervous system infection. *Journal of virology*. 2010;84(19):9685-94.
464. Sas AR, Bimonte-Nelson H, Smothers CT, Woodward J, Tyor WR. Interferon-alpha causes neuronal dysfunction in encephalitis. *J Neurosci*. 2009 ; 29(12) : 3948-55.
465. Fritz-French C, Tyor W. Interferon- α (IFN α) neurotoxicity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(1-2):7-14.
466. Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *Journal of molecular medicine*. 2002;80(4):233-42.
467. He R, Park K, Cai H, Kapoor A, Forman M, Mott B, et al. Artemisinin-derived dimer diphenyl phosphate is an irreversible inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(7):3508-15.
468. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):324-37.
469. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity*. 2008;29(4):565-77.
470. Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*. 2011;117(16):4273-83.

471. Pong K, Zaleska MM. Therapeutic implications for immunophilin ligands in the treatment of neurodegenerative diseases. *Current drug targets CNS and neurological disorders*. 2003;2(6):349-56.
472. Canivet C, Uyar O, Rheaume C, Piret J, Boivin G. The recruitment of peripheral blood leukocytes to the brain is delayed in susceptible BALB/c compared to resistant C57BL/6 mice during herpes simplex virus encephalitis. *Journal of neurovirology*. 2019.
473. Eriksson C, Van Dam AM, Lucassen PJ, Bol JG, Winblad B, Schultzberg M. Immunohistochemical localization of interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience*. 1999;93(3):915-30.
474. Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem*. 2000;74(2):457-71.
475. Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA, Mizel SB, Hinton D, Merrill JE. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol*. 1986;136(9):3239-45.
476. Deckert-Schluter M, Schluter D, Schwendemann G. Evaluation of IL-2, sIL2R, IL-6, TNF-alpha, and IL-1 beta levels in serum and CSF of patients with optic neuritis. *J Neurol Sci*. 1992;113(1):50-4.
477. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996;211(1):13-6.
478. Zhao ML, Kim MO, Morgello S, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2001;115(1-2):182-91.
479. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*. 2017;127(7):624-33.
480. Degousee N, Stefanski E, Lindsay TF, Ford DA, Shahani R, Andrews CA, et al. p38 MAPK regulates group IIa phospholipase A2 expression in interleukin-1beta -stimulated rat neonatal cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(47):43842-9.
481. Basu A, Krady JK, Enterline JR, Levison SW. Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia*. 2002;40(1):109-20.
482. Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *Journal of neuroscience research*. 2004;78(2):151-6.
483. Vallieres L, Rivest S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem*. 1997;69(4):1668-83.
484. Frei K, Leist TP, Meager A, Gallo P, Leppert D, Zinkernagel RM, et al. Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon gamma in the central nervous system during viral

meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(1):449-53.

485. Hirohata S, Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum*. 1990;33(5):644-9.

486. Pagliusi SR, Schachner M, Seeburg PH, Shivers BD. The Adhesion Molecule on Glia (AMOG) Is Widely Expressed by Astrocytes in Developing and Adult Mouse Brain. *Eur J Neurosci*. 1990;2(5):471-80.

487. Bociaga-Jasik M, Ciesla A, Kalinowska-Nowak A, Skwara P, Garlicki A, Mach T. Role of IL-6 and neopterin in the pathogenesis of herpetic encephalitis. *Pharmacol Rep*. 2011;63(5):1203-9.

488. M A Farrar a, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annual Review of Immunology*. 1993;11(1):571-611.

489. Patterson CE, Lawrence DMP, Echols LA, Rall GF. Immune-Mediated Protection from Measles Virus-Induced Central Nervous System Disease Is Noncytolytic and Gamma Interferon Dependent. *Journal of virology*. 2002;76(9):4497-506.

490. Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Kato H, Wang J, Mitsuma N, et al. Production of interferon-gamma by microglia. *Mult Scler*. 2006;12(5):558-64.

491. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*. 1998;58(13):2832-7.

492. Rakshit S, Chandrasekar BS, Saha B, Victor ES, Majumdar S, Nandi D. Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2645-61.

493. Stamatovic SM, Shakuji P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(5):593-606.

494. Yao Y, Tsirka SE. Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):683-97.

495. Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P. Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci*. 2000;20(21):8153-9.

496. Oshima T, Laroux FS, Coe LL, Morise Z, Kawachi S, Bauer P, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res*. 2001;61(1):130-43.

497. Liu H, Qiu K, He Q, Lei Q, Lu W. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Disruption in Herpes Simplex Encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019;14(2):157-72.

498. Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.* 2000;12(1):85-98.
499. Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, et al. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 1999;11(6):721-31.